



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA Y  
CITOTÓXICA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE  
HOJAS DE *Roupala ferruginea* Kunth.”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: EBELIN GABRIELA INCA CABEZAS**

**TUTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA, M.Sc.**

Riobamba-Ecuador

2018

**©2018, Ebelin Gabriela Inca Cabezas**

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

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

El tribunal de Trabajo de titulación certifica que: el presente trabajo experimental: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Roupala ferruginea* Kunth.” de responsabilidad de la estudiante Ebelin Gabriela Inca Cabezas, ha sido revisado por los miembros del tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizado así su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Renato Vinueza Tapia

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DIRECTOR DE TRABAJO**

**DE TITULACIÓN**

Dra. Susana del Pilar Abdo López.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Yo, Ebelin Gabriela Inca Cabezas, 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.

Riobamba, 16 de octubre del 2018

Ebelin Gabriela Inca Cabezas

060412223-4

## **DEDICATORIA**

A:

Dios, por brindarme cada día la fuerza y la fe para culminar cada meta propuesta y por estar siempre en cada una de las metas realizadas, por haber puesto en mi camino a las personas que han sido mi soporte y apoyo de esta mi carrera.

Mi madre Elena Cabezas, por darme la vida y las enseñanzas de ser cada día una persona con valores, principios y por creer en mí. Mamá gracias infinitas por darme una carrera para mi futuro todo esto te lo debo a ti.

Mi padre Juan Carlos Inca, por regalarme la vida y quien está presente en cada paso que di, dándome su mano y su confianza que necesitaba para seguir este camino a ti que a pesar que no estás entre nosotros porque así Dios lo ha decidido esto también te lo debo a ti mi ángel del cielo.

Mi esposo David León, y mi hijita querida Emily quienes han sido mi motor durante este largo camino, quienes, con su amor, comprensión me impulsaron día a día a culminar mi meta tan añorada.

Mis hermanos, Cristian y Brayan Inca por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos y por apoyarme siempre, los quiero mucho.

**Ebelin**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mi Dios, por haberme dado la oportunidad de estudiar y bendecirme en este largo camino y ser el apoyo, fortaleza en aquellos momentos de flaqueza brindándome su sabiduría e inteligencia.

Gracias a mis padres Elena y Juan Carlos por ser los principales promotores y entusiastas de mis sueños y anhelos por siempre confiar y creer que lo lograría y por los consejos dados en los momentos más oportunos.

Mis más sinceros agradecimientos al BQF. Diego Vinuesa, M.Sc., quien ha sido mi tutor y amigo, quien con sus conocimientos, ética y principios me enseñó que cuando uno se propone metas se debe llegar a cumplirlas con esfuerzo, dedicación y que con la investigación se pueda llegar a ser grandes cosas a favor de la humanidad.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por apoyarme a crecer, como persona y profesional con la ayuda de sus docentes.

**Ebelin**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvi
SUMMARY .....	xvii
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1.1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Plantas medicinales .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Historia de la investigación botánica en el Ecuador .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Estudio etnobotánico en el Ecuador .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Uso de las plantas medicinales en el Ecuador .....</b>	<b>8</b>
<b>1.6 Uso de las plantas medicinales en el mundo .....</b>	<b>8</b>
<b>1.7 Género Roupala.....</b>	<b>9</b>
<b>1.8 Familia de las Proteaceae .....</b>	<b>9</b>
<i>1.8.1 Especies de la familia Proteaceae.....</i>	<i>9</i>
<i>1.8.2 Importancia .....</i>	<i>10</i>
<i>1.8.3. Determinación de los géneros.....</i>	<i>10</i>
<i>1.8.4 Botánica.....</i>	<i>11</i>
<i>1.8.5 Roupala ferruginea .....</i>	<i>11</i>
<i>1.8.5.1 Clasificación taxonómica.....</i>	<i>12</i>
<i>1.8.5.2 Hábitat .....</i>	<i>12</i>
<i>1.8.5.3 Usos comunes.....</i>	<i>12</i>
<i>1.8.5.4 Usos etnomédicos.....</i>	<i>13</i>
<i>1.8.5.5 Usos y antecedentes fitoquímicos.....</i>	<i>13</i>
<b>1.9 Inflamación .....</b>	<b>14</b>
<i>1.9.1 Definiciones.....</i>	<i>14</i>
<i>1.9.2 Generalidades sobre desordenes inflamatorios.....</i>	<i>14</i>
<i>1.9.3 Importancia del proceso inflamatorio .....</i>	<i>15</i>
<i>1.9.4. Fases de la infamación .....</i>	<i>16</i>

<b>1.9.5.</b>	<b><i>Factores de la inflamación</i></b> .....	<b>17</b>
<b>1.9.6</b>	<b><i>Proceso de inflamación</i></b> .....	<b>17</b>
<b>1.9.7</b>	<b><i>Liberación de mediadores de la inflamación</i></b> .....	<b>17</b>
<b>1.9.8</b>	<b><i>Efecto de los mediadores de inflamación</i></b> .....	<b>18</b>
<b>1.9.8.1</b>	<b><i>Llegada de moléculas y células inmunes al lugar de la inflamación</i></b> .....	<b>19</b>
<b>1.9.8.2</b>	<b><i>Regulación de la respuesta inflamatoria</i></b> .....	<b>19</b>
<b>1.9.8.3</b>	<b><i>Proceso de reparación</i></b> .....	<b>20</b>
<b>1.9.9</b>	<b><i>Tipos de inflamación</i></b> .....	<b>20</b>
<b>1.9.9.1</b>	<b><i>Inflamación aguda</i></b> .....	<b>20</b>
<b>1.9.10</b>	<b><i>Mecanismos de la inflamación aguda</i></b> .....	<b>20</b>
<b>1.9.11</b>	<b><i>Inflamación Crónica</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.9.12</b>	<b><i>Finalidad de la inflamación</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.10</b>	<b><i>Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.10.1</b>	<b><i>Mecanismo de acción</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.10.2</b>	<b><i>Efectos adversos</i></b> .....	<b>22</b>
<b>1.10.3</b>	<b><i>Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos</i></b> .....	<b>22</b>
<b>1.11</b>	<b><i>Manifestaciones de la reacción Inflamatoria</i></b> .....	<b>23</b>
<b>1.12</b>	<b><i>Modelos de evaluación <i>in vitro</i> de la Actividad Antiinflamatoria</i></b> .....	<b>23</b>
<b>1.12.1</b>	<b><i>Métodos colorimétricos <i>in vitro</i> de sales de tetrazolio</i></b> .....	<b>24</b>
<b>1.13</b>	<b><i>Compuestos antiinflamatorios de origen natural</i></b> .....	<b>24</b>
<b>1.13.1</b>	<b><i>Compuestos fenólicos</i></b> .....	<b>24</b>
<b>1.13.2</b>	<b><i>Compuestos de flavonoides</i></b> .....	<b>25</b>
<b>1.13.3</b>	<b><i>Estructura Química</i></b> .....	<b>25</b>
<b>1.13.4</b>	<b><i>Acción antioxidante de los flavonoides</i></b> .....	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO II</b>		
<b>2.1</b>	<b><i>MARCO METODOLÓGICO</i></b> .....	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Lugar de la investigación</i></b> .....	<b>27</b>
<b>2.3</b>	<b><i>Recolección del material vegetal</i></b> .....	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b><i>Identificación del material vegetal</i></b> .....	<b>27</b>

<b>2.5.</b>	<b>Materiales, equipos y reactivos .....</b>	<b>28</b>
2.5.1.	<i>Material Vegetal .....</i>	28
2.5.2.	<i>Material Biológico.....</i>	28
2.5.3.	<i>Material farmacológico.....</i>	28
2.5.4.	<i>Materiales de laboratorio utilizados. ....</i>	28
2.5.5.	<i>Equipos. ....</i>	29
2.5.6.	<i>Reactivos .....</i>	30
<b>2.6.</b>	<b>Técnicas y métodos.....</b>	<b>31</b>
2.6.1.	<i>Determinación de los parámetros de control de calidad de la droga cruda .....</i>	31
2.6.1.1.	<i>Determinación del contenido de humedad.....</i>	31
2.6.1.2.	<i>Determinación de cenizas totales.....</i>	32
2.6.1.3.	<i>Determinación de cenizas solubles en agua .....</i>	33
2.6.1.4.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....</i>	33
2.6.2.	<b>Tamizaje fitoquímico.....</b>	<b>34</b>
2.6.2.1.	<i>Ensayo de Sudán .....</i>	37
2.6.2.2.	<i>Ensayo de Dragendorff.....</i>	37
2.6.2.3.	<i>Ensayo de Mayer.....</i>	37
2.6.2.4.	<i>Ensayo de Wagner.....</i>	37
2.6.2.5.	<i>Ensayo de Baljet.....</i>	37
2.6.2.6.	<i>Ensayo de Liebermann-Burchard .....</i>	38
2.6.2.7.	<i>Ensayo de Catequinas .....</i>	38
2.6.2.8.	<i>Ensayo de resinas.....</i>	38
2.6.2.9.	<i>Ensayo de Fehling.....</i>	38
2.6.2.10.	<i>Ensayo de la Espuma .....</i>	39
2.6.2.11.	<i>Ensayo de cloruro férrico .....</i>	39
2.6.2.12.	<i>Ensayo de Borntrager .....</i>	39
2.6.2.13.	<i>Ensayo de la Ninhidrina.....</i>	39
2.6.2.14.	<i>Ensayo de Kedde .....</i>	40
2.6.2.15.	<i>Ensayo de Antocianidinas.....</i>	40

2.6.2.16.	<i>Ensayo de Shinoda</i> .....	40
2.6.2.17.	<i>Ensayo de Mucílagos</i> .....	40
2.6.2.18	<i>Ensayo de principios amargos y astringentes</i> .....	41
<b>2.6.3.</b>	<b><i>Preparación del extracto hidroalcohólico de R. ferruginea</i></b> .....	<b>41</b>
<b>2.6.4</b>	<b><i>Control de calidad del extracto hidroalcohólico</i></b> .....	<b>41</b>
2.6.4.1.	<i>Determinación de las características organolépticas</i> .....	41
2.6.4.2.	<i>Determinación de densidad relativa</i> .....	41
2.6.4.3.	<i>Índice de refracción</i> .....	42
2.6.4.4.	<i>Medición del pH</i> .....	42
2.6.4.5	<i>Determinación de sólidos totales</i> .....	42
<b>2.6.5.</b>	<b><i>Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu</i></b> .....	<b>43</b>
<b>2.6.6.</b>	<b><i>Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico</i></b> .....	<b>43</b>
<b>2.6.7.</b>	<b><i>Determinación de la actividad antioxidante mediante ensayo de eliminación de DPPH</i></b> .....	<b>43</b>
<b>2.6.8.</b>	<b><i>Ensayo antiinflamatorio y citotóxico in vitro</i></b> .....	<b>44</b>
2.6.8.1.	<i>Aislamiento de neutrófilos</i> .....	44
2.6.8.2.	<i>Ensayo antiinflamatorio in vitro sobre neutrófilos aislados</i> .....	44
2.6.8.3.	<i>Ensayo de citotoxicidad in vitro sobre neutrófilos aislados</i> .....	45
 <b>CAPÍTULO III</b>		
<b>3.1</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2.</b>	<b>Control de calidad de la muestra vegetal (<i>R. ferruginea</i>)</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3.</b>	<b>Tamizaje Fitoquímico</b> .....	<b>48</b>
<b>3.4.</b>	<b>Control de calidad del extracto alcohólico</b> .....	<b>49</b>
<b>3.5.</b>	<b>Cuantificación de fenoles totales</b> .....	<b>50</b>
<b>3.6.</b>	<b>Cuantificación de flavonoides totales</b> .....	<b>51</b>
<b>3.7.</b>	<b>Actividad Antioxidante</b> .....	<b>52</b>
<b>3.8.</b>	<b>Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i></b> .....	<b>54</b>
<b>3.9.</b>	<b>Citotoxicidad <i>in vitro</i></b> .....	<b>57</b>

<b>CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	61
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Especies de la familia Proteaceae.....	10
<b>Tabla 2-1:</b> Claves para determinar los géneros.....	10
<b>Tabla 3-1:</b> Clasificación taxonómica <i>Roupala ferruginea</i> .....	12
<b>Tabla 4-1:</b> Factores endógenos exógenos de la inflamación.....	17
<b>Tabla 5-1:</b> Clasificación química de los antiinflamatorios no esteroides.....	22
<b>Tabla 1-2:</b> Descripción de los materiales utilizados.....	28
<b>Tabla 2-2:</b> Equipos usados.....	29
<b>Tabla 3-2:</b> Descripción de reactivos.....	30
<b>Tabla 1-3:</b> Parámetros de calidad de la droga cruda.....	47
<b>Tabla 2-3:</b> Resultados del Tamizaje Fitoquímico de hojas de <i>R. ferruginea</i> .....	48
<b>Tabla 3-3:</b> Control de calidad de las hojas de <i>R.ferruginea</i> .....	49
<b>Tabla 4-3:</b> Método de Folin-Ciocalteu cuantificación de fenoles totales.....	51
<b>Tabla 5-3:</b> Método de tricloruro de aluminio para la cuantificación de flavonoides totales.....	52
<b>Tabla 6-3:</b> Resultados de la actividad antioxidante del extracto liofilizado de <i>R.ferruginea</i> . ...	53
<b>Tabla 7-3:</b> Porcentaje de actividad anti-inflamatoria del extracto hidroalcohólico de <i>R.ferruginea</i> y ácido acetilsalicílico.....	54
<b>Tabla 8-3:</b> Porcentaje de actividad citotóxica in vitro de <i>R.ferruginea</i> y ácido acetilsalicílico.	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Género Roupala .....	11
<b>Figura 2-1:</b> Pasos a la respuesta inflamatoria .....	15
<b>Figura 3-1:</b> Escenarios de actuación de la inflamación .....	16
<b>Figura 4-1:</b> Estructura y tipos de los flavonoides .....	25
<b>Figura 1-2:</b> Protocolo para elaborar los extractos para el tamizaje fitoquímico .....	35
<b>Figura 2-2:</b> Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.....	36
<b>Figura 3-2:</b> Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico .....	36

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b>	Curva de calibración de ácido gálico, determinado en el eje de las “x” las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs la absorbancia. ....	50
<b>Gráfico 2-3:</b>	Curva de calibración de ácido gálico, establecido en el eje de las “x” la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs absorbancia. ....	51
<b>Gráfico 3-3:</b>	Porcentaje de captación de radicales libres (DPPH-) a diferentes concentraciones vs el porcentaje de captación de radicales. ....	53
<b>Gráfico 4-3:</b>	Representación de la concentración inhibitoria media (IC50) de la captación de radicales libres establecido en el eje de las x la concentración vs él % de captación de radicales.....	53
<b>Gráfico 5-3:</b>	Porcentaje de la Inhibición Inflamatoria del extracto liofilizado de <i>R. ferruginea</i> y el ácido acetilsalicílico con diferentes concentraciones vs la inhibición infamatoria.....	55
<b>Gráfico 6-3:</b>	Extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>R. ferruginea</i> de la actividad anti-inflamación y curva de concentración inhibitoria media.....	55
<b>Gráfico 7-3:</b>	Porcentaje de viabilidad celular extracto liofilizado de <i>R. ferruginea</i> y el ácido acetilsalicílico condiferentes concentraciones.....	57
<b>Gráfico 8-3:</b>	Curva de concentración letal media de la citotoxicidad para el extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>R. ferruginea</i> , determinando en el eje de la “X” las concentraciones en ppm vs la viabilidad celular en porcentaje. ....	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo A:** Materia prima vegetal de *Roupala ferruginea* Kunth

**Anexo B:** Control de calidad de la droga vegetal

**Anexo C:** Control de calidad del extracto alcohólico

**Anexo D:** Extracto hidroalcohólico liofilizado de *Roupala ferruginea* Kunth.

**Anexo E:** Actividad antiinflamatoria y citotóxica

**Anexo F:** Antiinflamatorio

**Anexo G:** Citotóxico

## RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo principal evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Roupala ferruginea* Kunth, para lo cual se siguió una metodología estandarizada. El estudio de fenoles totales se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Folin – Ciocalteu, elaborando previamente una curva de calibración con soluciones estándares de ácido gálico a diferentes concentraciones (20, 40,60, 80 y 100 ppm). El contenido de fenoles fue de  $856.71 \pm 13.38$  mg GAE/g de planta, el cual es un valor considerable que podría estar relacionado con la actividad antiinflamatoria. Los flavonoides totales del extracto liofilizado representan el  $18.77\% \pm 0.12$ ; siendo una cantidad apreciable de flavonoides presentes en la planta. Los extractos presentaron capacidad captadora de radicales libres con una  $IC_{50}$  de  $190.33 \mu\text{g/mL}$ . Una vez obtenido el extracto hidroalcohólico liofilizado, se analizó la reducción de la sal de tetrazolio (WST-1) a formazan por espectrofotometría para evidenciar las actividades antiinflamatoria y citotóxica. La actividad citotóxica permitió conocer la viabilidad celular del extracto a diferentes concentraciones, presentando valores de 52.24% a la mínima concentración (12.5 ppm) y 84.96% a la máxima concentración (200 ppm). Sin embargo, en comparación con el ácido acetilsalicílico presenta menor viabilidad celular (mayor citotoxicidad), ya que la viabilidad celular del ácido acetilsalicílico oscila entre 40,93-99,45%. Se recomienda a futuros testistas evaluar la actividad antioxidante de *R. ferruginea* por métodos diferentes al de captación de DPPH, ya que presenta un alto contenido de flavonoides y fenoles.

**Palabras Claves:** <BIOQUIMICA>, <FARMACIA>, <ANTIOXIDANTE>, <*Roupala ferruginea* Kunth>, <CITOTÓXICA>, < ANTIINFLAMATORIA>, < FLAVONOIDES>.

## SUMMARY

The objective of the present research was to evaluate the in vitro anti-inflammatory and cytotoxic activity of the hydroalcoholic extract of *Roupala ferruginea* Kunth; for which a standardized methodology was achieved. The study of total phenols was carried out using the Folin- Ciocalteu colorimetric method, previously preparing a calibration curve with standard solutions of gallic acid at different concentrations ( 20,40,60,80 and 100ppm). The content of phenols was 856. 71  $\pm$ 13.38mg GAE/g of plant (Gallic acid standard), which is a considerable value that could be related to the anti-inflammatory activity. The total flavonoids of the lyophilized extract represent 18.77% $\pm$ 0.12; being an appreciable quantity of flavonoids present in the plant. The extracts presented free radical scavenging capacity with an IC<sub>50</sub> of 190.33  $\mu$ g/mL. Once the lyophilized hydroalcoholic extract was obtained, the reduction of the tetrazolium salt (WST-1) to formazan was analyzed by spectrophotometry to demonstrate the anti-inflammatory and cytotoxic activities. The cytotoxic activity allowed to know the cell viability of the extract different concentrations, presenting values of 52.24% at the minimum concentration (12.5 ppm) and 84.96% at the maximum concentration (200 ppm). However, in comparison with acetylsalicylic acid it has lower cell viability (greater cytotoxicity), since the cell viability of acetylsalicylic acid ranges from 40.93-99.45%. It is recommended to future thesis students to evaluate the antioxidant activity of *Roupala ferruginea* by different methods than the capture of DPPH, since it presents a high content of flavonoids and phenols.

**KEY WORDS:** <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <ANTIOXIDANT>, <*Roupala ferruginea* Kunth>, <CYTOTOXICITY>, < ANTI-INFLAMMATORY>, < FLAVONOIDS>.

## INTRODUCCIÓN

La abundante biodiversidad de los diferentes especímenes botánicos en los últimos años ha sido de gran importancia por sus múltiples propiedades terapéuticas que ha despertado la curiosidad del mundo científico, el cual busca nuevos conocimientos en la medicina popular.

El Ecuador es un país multidiverso dado que posee una gran cantidad de flora y fauna en sus tres regiones lo que ha conllevado a que el 80% de la población ecuatoriana utiliza medicinas basadas en plantas para mantener un buen estado de salud, esta tendencia crece día a día debido, principalmente, al difícil acceso de la población a una atención médica y medicamentosa general en hospitales públicos, causado por la grave crisis de salud del país así como también por la reducción del gasto público en esta área (Bullón, 2014 , p. 67), sin embargo, existen miles de especies vegetales que carecen de un estudio determinante para poder ser utilizadas como principios activos para una determinada actividad terapéutica.

En la búsqueda de medicinas alternativas se ha obtenido valiosos resultados y con menores efectos colaterales en relación a la medicina convencional, y que de ser posible, convertirlo en una herramienta útil para la salud y para mejorar las condiciones socioeconómicas de las comunidades donde se desarrollen, utilicen y comercialicen este tipo de plantas (Montealegre, 2013, p. 23).

La investigación de productos derivados de la naturaleza ecuatoriana permitirá en el mediano y largo plazo disminuir la importación de medicamentos y promoverá la autosuficiencia del país cuando se los desarrolle como fitofármacos, convirtiéndose en una alternativa que garantizaría el buen vivir de la población. Este hecho se puede sustentar en base a que las plantas medicinales y sus derivados, constituyen al menos el 25 % de los fármacos actuales y el 50 % que son de origen sintético están estrechamente relacionados los principios activos aislados de plantas (Moya, 2017, p. 36).

Actualmente, en el mercado existen medicamentos capaces de combatir el proceso inflamatorio y posibles efectos colaterales. Sin embargo, estos pueden ocasionar la aparición de otros efectos adversos ligados a la administración de los mismos, una de las más comunes son los daños ocasionados a la mucosa gástrica como lesiones, irritación y ulceraciones.

El estudio de plantas medicinales continúa siendo importante como precursor de nuevos activos para ser utilizados por la industria farmacéutica. Un sin número de plantas originarias de Latinoamérica ha dado origen a compuestos y posteriormente medicamentos para tratar diversas enfermedades, sustancias como la quinina utilizada para tratar el paludismo y 19 muchas otras plantas que están siendo investigadas actualmente para tratar enfermedades graves como el cáncer o el SIDA.

El estudio de la actividad antiinflamatoria de plantas medicinales ha mostrado gran interés científico en el área de la farmacología, ya que ciertos compuestos fitoquímicos presentan una elevada capacidad de interferir en el desarrollo de enfermedades, asociadas a procesos inflamatorios con un importante reducción de lesiones a nivel gástrico (Bullón, 2014 , p. 12). Algunos metabolitos secundarios de plantas tales como alcaloides, fenoles, taninos, glucósidos, terpenoides, saponinas, flavonoides y esteroides han sido implicados en su capacidad para inhibir la formación de moléculas de señalización pro-inflamatorias tales como prostaglandinas y leucotrienos.

En esta investigación se plantea realizar un estudio sobre la Evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de la planta *Roupala ferruginea* Kunth, para lo cual se ha desarrollo del estudio se ha dividido en cuatro capítulos.

Capítulo I, en donde se establece el marco teórico se desarrolla las definiciones de las variables de acuerdo al tema de investigación sobre la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico.

Capítulo II, se desarrolla los diferentes ensayos de acuerdo a los objetivos que fueron planteados dentro del proceso investigativo.

Capítulo III, en este capítulo se desarrolla los resultados obtenidos de acuerdo a los experimentos realizados mediante los paradigmas realizados con el tema de investigación.

Como proceso final se establece las conclusiones y recomendaciones de acuerdo a los objetivos específicos planteados en el desarrollo de la investigación, con el fin de conocer cuáles fueron los resultados pertinentes.

## **ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN**

La existencia de nuevas alternativas farmacológicas ha permitido el desarrollo de estudios sobre las plantas a través del uso etnobotánico y particularmente de sus metabolitos secundarios, los cuales representan un alto potencial antiinflamatorio, ya que el mismo permite encontrar nuevos compuestos de elevada eficacia y seguridad en el tratamiento de enfermedades que cursan con un proceso inflamatorio. Las plantas medicinales son consideradas como una de las formas más antiguas de tratamiento de dolencias (Borrero, 2016, p. 32).

Existen muchos ejemplos que demuestran con evidencia experimental, el papel de estos metabolitos en el efecto antiinflamatorio y citotóxico, comprobado en diferentes especies de plantas medicinales (Arango, 2015 , p. 23).

La finalidad de esta investigación servirá como una base sólida para una posible aplicación en formulaciones magistrales o farmacéuticas, con el propósito de innovar y mejorar la producción de medicamentos de origen natural y a su vez mejorar la calidad de vida de los consumidores, ya que son los principales beneficiados al reducir o eliminar los efectos adversos que puedan generarse por su ingesta. Además, de producir un impacto económico positivo en los agricultores que se dedican a cultivar este tipo de plantas, ya que serán los principales proveedores de la materia prima para la industria farmacéutica.

## JUSTIFICACIÓN

El Ecuador es un país con una gran Biodiversidad tanto de Flora y Fauna, en especial por contar con una gran cantidad de especies de plantas por lo que lo hace un país muy rico en cultura y biodiversidad, estas plantas tanto en la antigüedad como en la actualidad son utilizadas en el área de la curación, medicina para curar enfermedades, dolencias, heridas etc. Las condiciones cálidas y húmedas de la selva tropical durante todo el año proporcionan condiciones óptimas para las plantas (Harling, 2013 , p. 76).

Con el uso de plantas medicinales se quiere disminuir el uso irracional de medicamentos convencionales que en muchos de los casos provocan gran cantidad de efectos adversos, provocando otro cuadro clínico más crónico y enfermedades adyacentes y en algunos casos la muerte.

El uso racional de plantas medicinales va encaminado a beneficiar y a mejorar a la población y más para aquellos que se han visto afectados por el uso de medicina convencional como los AINES, al mismo tiempo se aprovecha los recursos naturales del Ecuador, promoviendo la cultura y la educación de conocimientos a la población sobre el cuidado de las plantas, incentivando a un mayor uso y evitando la extinción de diversas especies ( Hernández y Gally , 2013 ).

Cabe señalar que la planta *Roupala ferruginea* Kunth, se encuentra en la región Andina del Ecuador, provincia de Loja es fácilmente encontrada e identificada.

Con esta investigación se quiere dar un aporte a la ciencia, y a la medicina para fortalecer el uso racional de las plantas medicinales propias del Ecuador e incentivar el desarrollo y la investigación de nuevos establecimientos, y empresas que puedan dedicarse a la fabricación de medicamentos en base a plantas medicinales con una actividad terapéutica.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Roupala ferruginea* Kunth.

### **ESPECÍFICOS**

1. Definir la cantidad relativa de flavonoides totales y fenoles que se encuentren presentes en el extracto hidroalcohólico de *Roupala ferruginea* Kunth, mediante métodos colorimétricos.
2. Reconocer cualitativamente los grupos fitoquímicos presentes en las hojas de *R. ferruginea* mediante screening fitoquímico.
3. Valorar la capacidad de captación de radicales libres en el extracto hidroalcohólico de *R. ferruginea* mediante el ensayo de DPPH.
4. Determinar la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *R. ferruginea* con aislamiento de neutrófilos.
5. Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *R. ferruginea* en neutrófilos aislados.

# CAPÍTULO I

## 1.1. MARCO TEÓRICO

### 1.2 Plantas medicinales

Son plantas medicinales, todas aquellas que contienen en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades del ser humano (Pérez, 2014, p. 18).

En la actualidad las plantas medicinales forman parte del recurso fundamental para la salud de la población, sus orígenes se remontan desde inicios de la existencia del ser humano, ya que su uso se destinaba a las curaciones de enfermedades desde dolores de cabeza hasta la cicatrización de heridas cutáneas.

Con el pasar de los años estos métodos han ido evolucionando, ya que permitieron la generación de toda clase de medicamentos a través de la elaboración de pastillas, tónicos jarabes entre otros. Los componentes establecidos en los estudios de las plantas medicinales, se basan en las sustancias las cuales tiene una función farmacológica en el ser humano entre los compuestos más comunes se encuentran azúcares y heterósidos (Cuba y Paz, 2011, pp. 34-89).

Los extractos de las plantas se han utilizado durante siglos y se siguen utilizando en la actualidad como remedios tradicionales contra diferentes patologías que afectan a la salud. Los productos naturales usados en la medicina folklórica tradicional, han sido la fuente de conocimientos para la obtención de muchas drogas, con una trascendental actividad biológica y farmacológica al momento de ser utilizados como agentes terapéuticos (Jaimés, 2011, p. 39).

### 1.3 Historia de la investigación botánica en el Ecuador

El Ecuador cuenta con una gran biodiversidad de plantas, las mismas que han permitido que los ancestros generen un resultado a través de la historia, mediante la llegada de los Incas se generó uno de los primeros estudios en cuanto a la utilización de las plantas como medicina (Ocegueda, 2013, p. 96).

La variedad de culturas existentes generó la acumulación del conocimiento sobre la diversidad del ecosistema, a través de esto se estableció el descubrimiento y el relato que ha hecho que la mayor parte de los exploradores e investigadores cumplan con su objetivo como es el conocer la flora y la fauna y los aportes que generan las mismas para la aplicación de la medicina natural, y desempeñar las necesidades (Morales y Paloma, 2014, p. 78).

Los conocimientos acumulados con el pasar del tiempo mediante las diversas culturas existentes en el ecosistema ecuatoriano ha permitido el descubrimiento para lo cual el relato ha sido uno de los objetivos para muchos de los exploradores e investigaciones en las distintas épocas.

A través del paso de los años, los españoles se desinteresaron por el estudio de las plantas por lo cual decidieron proseguir varias misiones, entre las cuales se encuentran las más importantes son el descubrimiento del uso de las plantas medicinales, así como las especies que se utilizan para la agricultura (Ocegueda, 2013, p. 49).

En los últimos años se ha profundizado aún más el estudio de las plantas, ya que el descubrimiento de sus usos ha permitido la cura de varias enfermedades patógenas para el ser humano, la población en general como las nuevas generaciones han permitido que las investigaciones se lleven a cabo también mediante la experimentación en los animales estableciendo de esta manera el potencial uso que las plantas tienen como medicina.

#### **1.4 Estudio etnobotánico en el Ecuador**

La etnobotánica es aquella que permite el estudio entre las plantas y el hombre, lo cual ayuda a la toma de decisiones desde la manera en que las personas que lo utilicen establezcan la influencia ante el ambiente natural en las culturas que aprovechen los recursos (Fonnegra, 2015, p. 12).

La etnobotánica estudia la relación entre el hombre y las plantas, lo que permite apreciar a estos recursos desde el punto de vista de quienes lo utilizan, así como la influencia del ambiente natural en las culturas que aprovechan este recurso (García, 2012, p. 67).

El Ecuador debido a su gran variedad biológica y cultural, es considerado un país con gran potencial en cuanto a la medicina tradicional, con lo cual es importante determinar algunos aspectos como las formas en que se usa cada planta y los beneficios curativos que se adquiere a partir éstas.

El uso de medicina tradicional, con base en el conocimiento etnobotánico es una práctica llevada a cabo desde épocas ancestrales y ha demostrado ser una de las mejores opciones en cuanto a cuidados de la salud, particularmente en el área rural, que es donde más se lo practica, debido a

la limitada posibilidad económica de estas regiones, donde en ocasiones no es fácil tener acceso a la medicina convencional (Vega, 2016 , p. 78).

### **1.5 Uso de las plantas medicinales en el Ecuador**

El Ecuador es un país que cuenta con gran cantidad de recursos naturales en todas las regiones que el país posee. Muchas de estas plantas poseen características que pueden ser aprovechadas por su poder medicinal que, en conjunto con el conocimiento etnobotánico que las diferentes culturas mantienen, hace de las plantas medicinales poderosas herramientas de uso terapéutico (Pérez, 2014, p. 45).

En el Ecuador el uso de plantas medicinales todavía se mantiene, debido a que la cultura de la gente aún hace que mantengan confianza en éstas (Fernández, 2012, p. 12). Generalmente, las plantas medicinales y su uso son llevadas a cabo por personas “especializadas” como curanderos o shamanes aunque en nuestros días el uso en mercados de la ciudad aún se ve vigente.

A nivel de la zona andina del Ecuador se han descrito gran cantidad de plantas medicinales, gracias a los estudios de herbolarios, colecciones botánicas y el conocimiento etnobotánico.

De allí se tienen datos de 432 especies medicinales de las cuales 273 corresponden a aquellas plantas que se expenden en los mercados y 255 son plantas silvestres. Se ha determinado que las plantas que pueden conseguirse en los mercados sirven para tratar 77 dolencias y las silvestres 74 (Arango, 2015 , p. 78).

### **1.6 Uso de las plantas medicinales en el mundo**

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

Actualmente, en el mercado mundial apenas el 20% de las plantas tienen 6 finalidades terapéuticas siendo un aproximado de 10.000 plantas medicinales, la mayoría utilizadas de forma tradicional, sin embargo, solo un pequeño porcentaje se utiliza en cantidades significativas (Hernández & Gally , 2013 , p. 21).

Los principales países productores son países en desarrollo de América, África y Asia y van dirigidos al mercado de países desarrollados como EEUU y Japón.

## **1.7 Género Roupala**

El género Roupala fue establecido por Salisbury en el año de 1989, basado en un ejemplar recolectado en Guayana y descrito como *hameliaefolia*. En Colombia se conoce hasta ahora por el registro de 7 especies de las cuales cuatro son comunes en Ecuador lo cual establece una distribución principalmente en el norte de Centroamérica (Gutierrez, 2015, p. 67).

El género Roupala consta de 20 especies distribuidas desde Costa Rica hasta el sur del Brasil. En el Ecuador están representadas 3–5 especies ampliamente distribuidas; en los bosques andinos se han registrado 3 especies.

El género Roupala está distribuido de manera general en la parte norte de Suramérica en las áreas como Venezuela, Colombia, Ecuador y explícitamente se lo encuentra en la selva amazónica de Perú y Brasil. Existen estudios que determinan que también se lo encuentran en tierras bajas como Bolivia. Esta planta se la registra distribuida en zonas montañosas de las selvas amazónicas y las cordilleras (Cruz, 2013, p. 18).

## **1.8 Familia de las Proteaceae**

Las plantas compuestas por esta familia se encuentran constituidas por árboles o matas, las cuales se caracterizan por poseer hojas simples, verticales alternas. Las flores de este tipo de plantas son desarrolladas mediante racimos, cabezuelas. El tallo se constituye mediante cuatro partes las cuales pueden ser constituidas mediante cuatro partes estas pueden ser libres o unidas. El fruto es un conducto del cual se desarrollan unas cápsulas leñosas y las semillas se caracterizan por ser varias (Soto, 2011, p. 45).

La familia de las Proteaceae se la considera como las destacadas del hemisferio Sur, se encuentra establecido alrededor de 75 géneros de las cuales existen una serie de especies extendidas en las regiones subtropicales y tropicales. Existe una mayor concentración de estas plantas en Australia, Sur África como Sur América.

### ***1.8.1 Especies de la familia Proteaceae***

Esta especie cuenta de 75 géneros alrededor de 1350 especies se la encuentra en Argentina a continuación se establece las especies.

**Tabla 1-1:** Especies de la familia Proteaceae

Especies Nativas	Nombre Vulgar	Especies exóticas	Nombre Vulgar
<i>Embothriumcoccineum</i>	notro, ciruelillo	<i>Banksiaspinulosa</i>	
<i>Gevuina avellana</i>	avellano	<i>Grevillea robusta</i>	roble sedoso
<i>Lomatia hirsuta</i>	Radal	<i>Leucospermum</i> sp.	
<i>Roupala brasiliensis</i>	caá-guazú	<i>Mimetescucullatus</i>	protea Rey
		<i>Proteacynaroides</i>	

Fuente: Estudios de la familia Proteaceae (Borrero, 2016)

### 1.8.2 Importancia

Las especies constituidas por esta familia son cultivadas por el gran valor ornamental que poseen por lo que fueron introducidas de manera exitosa en América del Sur y Central. Esta especie es cultivada en grandes cantidades con el fin de proporcionar la madera ya que presenta características similares al roble, es de fácil utilización en la construcción.

### 1.8.3. Determinación de los géneros

**Tabla 2-1:** Claves para determinar los géneros

Flores grandes y vistosas, de más de 3.5 cm de largo Flores pequeñas, de menos de 2 cm de largo.	<i>Oreocallis</i>
Tres glándulas hipóginas; inflorescencia axilar, corta. Cuatro glándulas hipóginas o disco 4-lobulado; inflorescencia generalmente terminal y larga.	<i>Lomatia</i>
Folículo drupáceo, indehisciente, una semilla sin alas.	<i>Panopsis</i>
Folículo dehiscente, semillas aladas.	<i>Roupala</i>

Fuente: (Gutierrez, 2015, p. 34)

#### **1.8.4 Botánica**



**Figura 1-1: Género *Roupala***

**Fuente:** (García, et al., 2015)

*Roupala* se caracteriza por ser un árbol que mide hasta 6m., sus hojas son alternas, verticales, simples y ovaladas coriáceas, borde entero, glabra, pecíolo 1-1.5 cm, agudas en la base, asimétricas, agudas en el ápice; 13-15 cm de largo, 6-7 cm de ancho. Inflorescencia en racimo terminal (Cruz, 2013, p. 41).

Las flores son cortantemente pediceladas, blancas, perianto tubuloso. Fruto un folículo coriáceo, esferoide, de hasta 4 cm.

#### **1.8.5 *Roupala ferruginea***

También conocida como *Roupala varehana*, sus hojas son lineadas y coriáceas. Las hojas de las especies de *Roupala*, general mente corresponde al tipo mesófilo y macrófilo; no obstante, se observan variaciones dentro de las ramillas de una misma especie. La lámina generalmente es simétrica, aunque se presentan casos de asimetría ya sea en láminas adultas o juveniles (Gutierrez, 2015, p. 65).

### 1.8.5.1 Clasificación taxonómica

**Tabla 3-1:** Clasificación taxonómica *Roupala ferruginea*

TAXONOMÍA	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Protalae
Familia:	Gravilleoideae
Género:	Roupaleae
Especie:	<i>Roupala</i>

Fuente: (Pérez, 2014, p. 45)

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

### 1.8.5.2 Hábitat

Esta especie es común encontrarla en los bosques húmedos y secundarios, o en matorrales de tierras bajas húmedas, especialmente de regiones tropicales, aproximadamente desde 600 hasta los 1600 metros de altitud (Tebbs, 1993d). Es nativa de México, Centro América, las Antillas y Sudamérica (Ruiz, 2012, p. 45).

### 1.8.5.3 Usos comunes

Uno de los usos que comúnmente se le da es para leña, así como para carbón vegetal de alta calidad, se utiliza también para la medicina y de manera muy limitada para la carpintería y la construcción, existen estudios que determinan que se lo utiliza también como afrodisiaco (Muriel, 2014, p. 41).

Diversas culturas indígenas han usado las especies de proteáceas como sustento, medicina, fuente de curtientes y tintes, leña y madera para construcción. Los aborígenes australianos se alimentaban de los frutos de *Persoonia* y las semillas de especies de otros géneros, entre ellos *Gevuina* y *Macadamia*, forman parte de la alimentación no sólo de los indígenas, sino que se comercializan por todo el mundo (Nágera, 2014, p. 34).

En Java se usan los brotes tiernos de especies de *Helicia* y en Australia se bebía el néctar de las inflorescencias de varias especies. Se obtienen fármacos tradicionales mediante la infusión de raíces, corteza, hojas o flores de diversas especies, que se usan para aplicaciones tópicas en enfermedades de la piel o en uso interno como tónicos, afrodisíacos, galactógenos, para dolores de cabeza, tos, disentería, diarreas, indigestión, úlceras de estómago y enfermedades renales.

#### *1.8.5.4 Usos etnomédicos*

En la medicina tradicional boliviana, peruana y brasileña se utiliza en el tratamiento de patologías hepáticas, inflamatorias e infecciosas (Quattochi, 2013 , p. 67). Algunos de los modos de preparación etnofarmacológicos para emplear las hojas de esta planta son la maceración en agua para el tratamiento de las cefaleas, dolor y fiebre; su cocción para el tratamiento de odontalgias, y su calentamiento y aplicación en el cordón umbilical para expulsar la placenta luego del parto. Otra variante de empleo, es la cocción de la raíz utilizada para disminuir el vómito y como diurético (Towle, 2011, p. 39).

En la Fitomedicina de la cultura Maya esta planta era empleada para tratar diferentes patologías como dolores uterinos, hemorragias vaginales, diarrea, dolores corporales y tradicionalmente para eliminar los malos espíritus que provocaban la constipación (Fernández, 2012, p. 45).

#### *1.8.5.5 Usos y antecedentes fitoquímicos*

En la literatura este espécimen presenta pocos estudios acerca de sus usos o su caracterización Fitoquímica, ya que esta planta solo presenta un estudio enfocado a su taxonomía (Harling, 2013 , p. 67).

En la cultura mexicana, las poblaciones indígenas extraen un incienso genuino o resina de copal de *R. ferruginea*, el cual es considerado un símbolo sagrado que lo utilizan en ritos religiosos. Además, como pegamento para madera (Solbring, 2013 , p. 34).De acuerdo a Vásques (2014, p. 23), menciona que en las hojas se presentan compuestos de baja polaridad responsables de los efectos citotóxicos.

Esta planta conocida en Colombia como "tatamaco" y de acuerdo con la medicina botánica tradicional posee un gran potencial curativo, por lo cual se le considera efectivo contra dolencias relacionadas con la próstata en los hombres, calmante de dolores premenstruales en las mujeres y males relacionados con el cáncer (Morales, 2014, p. 34).

## **1.9 Inflamación**

### ***1.9.1 Definiciones***

La inflamación es una respuesta inmunológica del organismo y que tiene el objetivo de defenderse contra las agresiones físicas, químicas o biológicas. Los cuatro signos principales de la inflamación son: calor, rubor, tumor y dolor.

La inflamación es una respuesta de reparación que implica un enorme gasto de energía metabólica; cuando la inflamación no es tratada a tiempo o es mal tratada puede transcurrir a enfermedades degenerativas como la artritis, arterosclerosis o el cáncer (Barreno, 2012, p. 43).

La inflamación, es una reacción de defensa que se manifiesta ante cualquier agresión, actúa como un mecanismo homeostático y tiene como finalidad adaptar al organismo a circunstancias anormales (Vega, 2016 , p. 67).

En cualquier caso, la respuesta inflamatoria está coordinada por un copioso dispositivo de mediadores que se organizan en complejas redes reguladoras. Para diseccionar tal entramado, es útil agrupar esas señales en categorías funcionales y distinguir entre inductores y mediadores de la respuesta inflamatoria.

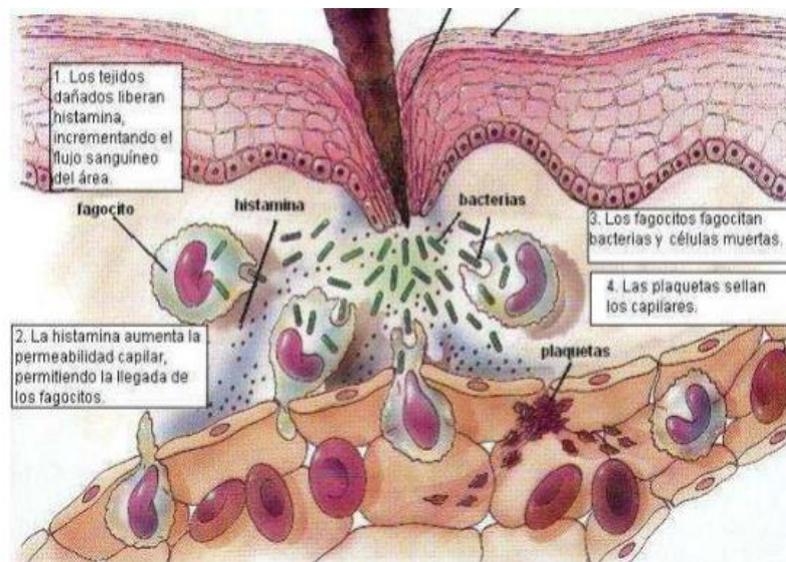
### ***1.9.2 Generalidades sobre desórdenes inflamatorios***

La inflamación es un factor subyacente común que contribuye a la exacerbación de una amplia variedad de enfermedades que incluyen la artritis, el asma, las enfermedades dérmicas y las enfermedades cardiovasculares entre otras, lo cual representa un serio problema de salud (Bullón, 2014 , p. 22).

Entre las muchas enfermedades que aquejan a la población mundial, las que involucran procesos inflamatorios representan un importante grupo; enfermedades como la artritis reumatoide, la gota, el asma o los trastornos neurodegenerativos implican reacciones inflamatorias en algunos casos incapacidad para quienes las padecen (Colbert, 2015, pp. 23-30). Además, muchas otras dolencias menores que se presentan diariamente involucran procesos inflamatorios como respuesta natural del organismo ante traumas físicos y alergias.

Como interfase primaria con el ambiente externo, la piel está sujeta constantemente a heridas y a la invasión de patógenos, lo cual puede traer como consecuencia distintos trastornos inflamatorios que pueden ocurrir en el curso de la vida. Mientras algunos desórdenes inflamatorios de la piel

suelen ser bien tratados, normalmente no es posible tratar satisfactoriamente las enfermedades inflamatorias crónicas de la piel, como la psoriasis y las dermatitis atópicas (Sears, 2015, pp. 24-30).



**Figura 2-1: Pasos a la respuesta inflamatoria**  
Fuente: (Barreno, 2012)

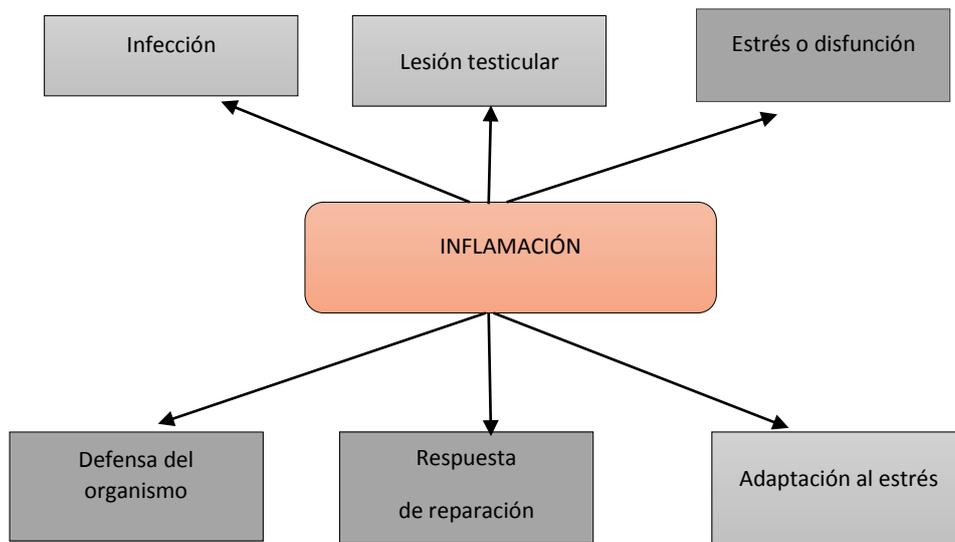
Los desórdenes inflamatorios incluyen diferentes tipos de enfermedades reumáticas que son comunes en todo el mundo. Aunque el reumatismo es una de las enfermedades más antiguas conocidas de la humanidad la cual afecta a la mayoría de población, no se ha hecho ningún progreso sustancial para alcanzar una cura permanente (Eladi, 2014, pp. 21-27). La mayor desventaja que tienen en este momento las potentes medicinas sintéticas disponibles está en su toxicidad y en la reaparición de los síntomas después de la interrupción. Por lo tanto, el desarrollo y la selección de drogas con actividad antiinflamatoria sigue todavía en progreso, y hay muchas esperanzas en encontrar medicinas antiinflamatorias a partir de las plantas medicinales de los indígenas (Villalva, 2016 , p. 56).

### ***1.9.3 Importancia del proceso inflamatorio***

John Hunter, un respetado cirujano escocés, afirmó que la inflamación no es una enfermedad, sino más bien una respuesta inespecífica, que tiene un efecto beneficioso en el organismo. De no ser por la inflamación, los procesos infecciosos no podrían ser controlados, la curación y reparación de heridas sería imposible, así como la recuperación del órgano afectado (Barreno, 2012, p. 32).

El autor (Barreno, 2012, p. 45), expresa que las enfermedades en que la inflamación juega un papel patológico importante son:

- Anafilaxis
- Artritis
- Asma
- Dermatitis atópica
- Enfermedad de Alzheimer
- Enfermedad de Crohn
- Esclerosis múltiple
- Gota
- Lupus eritematoso
- Sarcoidosis



**Figura 3-1: Escenarios de actuación de la inflamación**  
 Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

#### *1.9.4. Fases de la infamación*

De acuerdo con (Colbert, 2015, p. 33), divide a la inflamación en cinco etapas que son las siguientes:

1. **Liberación de mediadores:** la liberación de mediadores se caracteriza por una liberación de moléculas, la mayor parte de las mismas se encuentran determinadas por el mastocito esto se lo realiza mediante la realización de varios estímulos.
2. **Efecto de los mediadores:** se encuentra dentro de la segunda etapa y una vez que son liberadas las moléculas producen alteraciones vasculares los efectos se establecen ante la llegada de las moléculas generando el foco inflamatorio.
3. **Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio:** esto sucede a través de la llegada de la sangre, así como también de las zonas circulantes al foco.
4. **Regulación del proceso inflamatorio:** en esta fase se determina una de las mayores partes de las respuestas inmunes, este fenómeno contempla una serie de componentes que permiten equilibrar o finalizar el proceso.

5. **Reparación:** es una fase constituida mediante los fenómenos que van establecer la curación o reparación total o parcial de los tejidos que han sido dañados por la proporción a la respuesta inflamatoria.

### 1.9.5. Factores de la inflamación

**Tabla 4-1:** Factores endógenos exógenos de la inflamación

<b>Factores endógenos</b>	<b>Factores exógenos</b>
Necrosis tubular	Mecanismos (corte)
Rotura ósea	Físicos (quemaduras)
	Químicos (corrosivos)
	Biológicos (microorganismos)
	Inmunológicos (hipersensibilidad)

Fuente: Barreno (2012)

Elaborado por: Ebelin Inca

### 1.9.6 Proceso de inflamación

El proceso de inflamación, inicia después de la lesión inicial lo que hace la generación de vasodilatación, lo cual hace el desencadenamiento y enrojecimiento de la temperatura para la entrada de microbios y los compuestos endógenos y exógenos (Barreno, 2012, p. 54).

Tradicionalmente se ha considerado a la inflamación por cuatro signos. El calor y rubor dados por las alteraciones vasculares, donde se observa una acumulación sanguínea en el sitio de la inflamación. El tumor producido por la acumulación de células inmunes y el dolor por la acción de determinados mediadores sobre terminaciones nerviosas del dolor.

### 1.9.7 Liberación de mediadores de la inflamación

Estas moléculas son sintetizadas y liberadas por el mastocito gracias a estímulos. El mastocito, una célula procedente de la médula ósea, contiene en el citoplasma gránulos con mediadores preformados, los mismos que son liberados cuando la inflamación progresa y se acumulan en el tejido suficientes factores activados del complemento (C3a y C5a), actuando sobre los receptores de membrana (Toledo, 2014 , pp. 45-54).

Otro mecanismo por el cual se activaría el mastocito para que libere los mediadores, sería mediante la IgE, la misma que es captada por la membrana del mastocito. Los mediadores que se

encuentran preformados en los gránulos en el mastocito, son principalmente histamina, el factor quimiotáctico del eosinófilo, factor quimiotáctico del neutrófilo y la heparina.

El ácido araquidónico que se forma, sigue dos vías metabólicas; el ciclo de la enzima ciclooxigenasa mediante la cual se producen prostaglandinas y tromboxanos y el ciclo de la lipooxigenasa que produce leucotrienos (Toledo, 2014 , p. 21).

Los compuestos mencionados anteriormente forman parte de un grupo importante de mediadores de la inflamación de naturaleza lipídico, que son sintetizados en el mastocito. Los basófilos son otras células responsables de liberar los mediadores químicos de la inflamación, los mismos que se activan por mecanismos idénticos al mastocito.

### ***1.9.8 Efecto de los mediadores de inflamación***

La liberación de los mediadores produce alteraciones y efectos quimiotácticos en las células inmunes para que logren alcanzar el foco de la inflamación. Los mediadores más importantes que actúan en la inflamación se describen a continuación:

- **Histamina:** Es un mediador que producen vasodilatación e incremento de la permeabilidad cuando actúa sobre los receptores H<sub>2</sub>, produce efectos inhibidores o reguladores de la inflamación. Son liberados por el mastocito y el basófilo.
- **Enzimas proteolíticas:** Son enzimas liberadas por el mastocito, empezando por la kininogenasa; que actúa sobre proteínas de la sangre llamadas kininógenos que se desdobra en péptidos denominados kininas, que producen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor.
- **Factores quimiotácticos de la inflamación:** Son los encargados de atraer y activar a eosinófilos y neutrófilos al lugar de la inflamación.
- **Heparina:** Inhibe la coagulación facilitando la llegada de los mediadores y células al lugar de la inflamación.
- **Prostaglandina E<sub>2</sub>:** Actúa produciendo vasodilatación y dolor.
- **Leucotrienos B<sub>4</sub>:** Es un factor quimiotáctico de los eosinófilos, mastocitos, macrófagos y neutrófilos.
- **Factor activador de plaquetas:** Es el encargado de activar a las plaquetas para de esta manera liberar mediadores e iniciar con los procesos de coagulación. Es un factor quimiotáctico y activador de neutrófilos (León, 2014 , p. 31).

### *1.9.8.1 Llegada de moléculas y células inmunes al lugar de la inflamación*

Las células inmunes junto con los mediadores provienen de la sangre y llegan al sitio de la inflamación en dos fases:

**1. Fase inicial:** Esta fase describe la llegada de las moléculas al lugar de la inflamación, a través de mecanismos de alteración vascular, que favorecen el trasvase de moléculas y la formación del edema. Las moléculas que intervienen en esta fase son:

- **Inmunoglobulinas:** Se unen al agente para bloquearlo, tales como la IgM e IgG, que se encargan de activar al complemento por la vía clásica. Además, la IgG potencia la fagocitosis.
- **Factores del complemento:** El complemento se activa por la vía alternativa, alcanzando la vía común y produciendo la lisis del antígeno.
- **Proteína C reactiva (PCR):** Activa el complemento por la vía clásica y fija antígenos como el neumococo (Toledo, 2014 , p. 89).

**2. Fase tardía:** En esta fase actúan las células sanguíneas específicamente la llegada de las células inmunes mediante alteraciones vasculares y la liberación de mediadores, cuya función se describe a continuación:

- **Basófilo:** Contribuye en la liberación de mediadores.
- **Neutrófilos:** Cumple con funciones relacionadas con la fagocitosis del antígeno.
- **Monocito:** Cumple también con funciones relacionadas a la fagocitosis. El monocito en los tejidos se diferencia en macrófago, célula que además de cumplir con la fagocitosis de antígenos, también actúa como célula presentadora del antígeno a las células T y B.
- **Linfocitos T y B:** Las células B sintetizan IgE que conjuntamente con el basófilo, potencian la inflamación. Por otro lado, las células T producen linfoquinas que promueven la respuesta inmune.
- **Eosinófilo:** En el proceso inflamatorio, tiene una función reguladora (León, 2014 , pp. 23-26).

### *1.9.8.2 Regulación de la respuesta inflamatoria*

Fase en la cual se regula la respuesta inflamatoria con la finalidad de evitar una respuesta exagerada. A continuación, se detalla los mediadores capaces de inhibir y equilibrar la respuesta inflamatoria:

- **Histamina:** Actúa sobre los receptores H2, inhibe la liberación de mediadores por el basófilo y mastocito, inhibe la actividad del neutrófilo y activa las células T supresoras.

- **Prostaglandina:** Inhibe los mediadores liberados por el mastocito y basófilo e inhibe la proliferación y diferenciación de linfocitos.
- **Agonistas autonómicos:** El mastocito y el basófilo presentan receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos que regulan de forma autónoma la liberación de mediadores. El receptor  $\beta$ -adrenérgico produce inhibición mientras que la  $\alpha$ -adrenérgico induce la estimulación.
- **Heparina:** Activa los factores del complemento e inhibe la coagulación.
- **Eosinófilo:** Esta célula acude al lugar de la inflamación para liberar enzimas que degradan mediadores de la inflamación; así tenemos, la histaminasa que actúa sobre la histamina, la arilsulfatasa sobre los leucotrienos y la fosfolipasa sobre el factor activador de plaquetas (Palma, 2014, p. 23).

### *1.9.8.3 Proceso de reparación*

Una vez que el agente inflamatorio ha desaparecido se inician los procesos de la reparación. Este proceso inicia cuando al lugar donde ocurrió la inflamación llegan fibroblastos, activados por la interleucina-1, los mismos que proliferan y sintetizan colágeno, promueven la proliferación de células epiteliales y de vasos en la herida (García, 2012).

## **1.9.9 Tipos de inflamación**

### *1.9.9.1 Inflamación aguda*

Presenta un periodo de tiempo relativamente corto; se caracteriza por la migración de leucocitos especialmente los neutrófilos al lugar de la inflamación y por la exudación de fluidos plasmáticos (Valencia, 2015).

### **1.9.10 Mecanismos de la inflamación aguda**

1) Células circundantes son aquellas que se encuentran alojados en la sangre, tales como los neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos y plaquetas.

2) Células en tejido conectivo como lo son mastocitos que se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos, los fibroblastos en el tejido conectivo y en ocasiones macrófagos y linfocitos residentes (Aguire, 2011).

La inflamación aguda inicia con tres sucesos secuenciales que son: alteraciones en el calibre de los vasos sanguíneos (vasodilatación), lo que ocasiona un aumento en el flujo sanguíneo, la

permeabilidad vascular y migración de los leucocitos al foco de lesión donde se acumulan (Cortéz, 2014, p. 23).

La alteración del flujo sanguíneo y del calibre de los vasos se produce de forma rápida tras producirse la lesión y evolucionan en dependencia a la intensidad de la lesión (Borges, 2011, p. 17). Primero se genera un periodo inconstante y transitorio de vasoconstricción de las arteriolas, posteriormente se ocasiona una vasodilatación afectando las arteriolas, provocando la apertura de lechos vasculares en la zona de lesión, dando lugar al enrojecimiento e incremento del calor en la ZONA (American College , 2015, p. 12).

### ***1.9.11 Inflamación Crónica***

Se caracteriza por presentarse por un tiempo prologado. Ocasionalmente la evolución de la inflamación aguda suele ser causante de este tipo de inflamación. Cuando no se ha podido eliminar el agente causal o no se ha detenido el proceso de reparación (Valencia, 2015 ).

### ***1.9.12 Finalidad de la inflamación***

- Ubicar y recluir el agente causal para luego ser eliminado y así poder reparar el daño producido por el agente y el proceso.
- Evitar la proliferación de la infección /agente causal

## **1.10 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)**

En la actualidad, los AINES son los medicamentos convencionales de mayor uso para tratar dolencias de tipo inflamatorio, especialmente musculo esqueléticos y articulares. En este grupo aunque no presentan relación química alguna entre sí, comparten actividades terapéuticas y efectos secundarios (Vega, 2016 , p. 18).

### ***1.10.1 Mecanismo de acción***

Como mecanismo de acción, los AINES se encargan de inhibir la enzima ciclooxigenasa, reduciendo la formación de prostaglandinas y tromboxanos, con lo cual se disminuye el dolor, fiebre e inflamación en la zona afectada (García, 2012).

En la vía de las ciclooxigenasas, la COX – 1 interviene con la participación de las prostaglandinas y tromboxanos en las funciones fisiológicas; mientras que la COX-2 es una enzima que actúa en la inflamación inducida por citoquinas y mediadores (García, 2012).

Los AINES tienen como finalidad inhibir la actividad enzimática tanto de la COX-1 como la COX-2; pero cuando la inhibición de la COX-1 es mayor aparecen efectos secundarios a nivel gástrico, renal y en la coagulación.

### ***1.10.2 Efectos adversos***

La inhibición de la ciclooxigenasa, sobretodo de la COX-2; está relacionada con los efectos adversos de los antiinflamatorios no esteroideos. Estos efectos adversos pueden ser:

- Efectos a nivel del SNC: Cefalea, mareo, adormecimiento, insomnio.
- Efectos a nivel hematológico: Anemia, trombocitopenia, neutropenia. La aspirina inhibe de forma irreversible la agregación plaquetaria.
- Efecto hipertensivo: Se ha demostrado que producen un incremento de la presión arterial en 5 mm Hg además, los AINES antagonizan el efecto de los hipertensivos en especial beta bloqueadores y vasodilatadores.
- Efecto a nivel renal: Nefritis, síndrome nefrotóxico, falla renal, retención de fluido y de sodio debido a la inhibición renal de prostaglandinas necesaria para mantener la hemodinámica renal. El abuso de estos fármacos está asociado con nefropatía.

### ***1.10.3 Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos***

Los Antiinflamatorios no Esteroideos presentan una estructura química compleja lo que impiden la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de la enzima COX. Además, suprime los signos y síntomas ocasionado por la inflamación. Adicionalmente, pueden ejercer acciones analgésicas como antipiréticas (Malgor, 2014 , p. 27).

**Tabla 5-1:** Clasificación química de los antiinflamatorios no esteroideos

Salicílico:	Fármaco prototipo: ácido acetilsalicílico
Enólicos:	Fármaco prototipo: Fenibutazona
Pirazolonas:	Fármaco prototipo: Peroxicam
Pirazolidindionas:	
Oxican:	
Acético:	

Indolacético	Fármaco prototipo: Indometacina
Pirrolacético	Fármaco prototipo: Ketorolac
Finalacético	Fármaco prototipo: Diclofenaco
Piranoindolacético	Fármaco prototipo: Naproxeno
Propiónico	Fármaco prototipo: Naproxeno
Antranílico	Fármaco prototipo: Ácido mefenámico
Sulfonilidas:	Fármaco prototipo: Nimesulida
Alcanonas	Fármaco prototipo: Nabumetona
Paraaminofenoles:	Fármaco prototipo: Paracetamol

Fuente: García, 2012

### 1.11 Manifestaciones de la reacción Inflamatoria

- Dolor: El aumento del dolor se debe a la presión del líquido sobre las terminaciones nerviosas y a la irritación nerviosa provocada.
- Fiebre: Considerada con una respuesta común de la inflamación inducida por una variación del centro regulador de la temperatura a nivel del hipotálamo.
- Rubor: Enrojecimiento progresivo de la piel estimulado una dilatación de los vasos de la zona afectada.
- Hinchazón o Tumor: Se debe a la acumulación anormal de fluidos en las áreas extravasculares presentes en foco de la inflamación.
- Disminución de la funcionalidad (Montealegre, 2016 , p. 23).

### 1.12 Modelos de evaluación *in vitro* de la Actividad Antiinflamatoria

Los leucocitos polimorfos nucleares (PMN) tienen un papel muy importante modulando la iniciación y persistencia del proceso inflamatorio. Los macrófagos modulan la inflamación sintetizando mediadores biológicos como prostaglandinas y no, que exhiben efectos inflamatorios como cardiovasculares (Gómez, 2013, p. 45).

Los leucocitos (PMN y los macrófagos) identifican los estímulos de la membrana mediante la síntesis y liberación extracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS); este proceso es conocido como estallido oxidativo provocado por el incremento en la recaptación de O<sub>2</sub>, seguida por la reducción de un e<sup>-</sup> de oxígeno a superóxido (O<sub>2</sub>) por medio del uso de nicotinamida, adenina, (NADPH), (Noreica, 2015, p. 34).

### ***1.12.1 Métodos colorimétricos in vitro de sales de tetrazolio***

El método colorimétrico *in vitro* está determinado mediante la aplicación de sales de tetrazolio, a través de neutrófilos los cuales son convertidos a la acción metabólica sobre deshidrogenasas mitocondriales, con la finalidad de que se pueda determinar el grado de la viabilidad celular (Vinueza , et al., 2017 ). Los ensayos utilizados son técnicas que se las utiliza para que se establezca la reducción intracelular. Estos métodos son utilizados para la sensibilidad mediante una baja masa molecular y un alto coeficiente de extinción.

## **1.13 Compuestos antiinflamatorios de origen natural**

Los compuestos antiinflamatorios de origen natural realizados mediante la utilización de las plantas medicinales, son establecidos como una terapia alternativa ya que permiten la generación de efectos para la curación de los malestares y dolencias causados por la inflamación. En la actualidad se ha generado un sin número de estudios que han permitido que se deje de lado la utilización de químicos y se los remplace por antiinflamatorios naturales es decir a base de plantas.

### ***1.13.1 Compuestos fenólicos***

Los compuestos fenólicos son aquellos que intervienen como los agentes antioxidantes de forma natural, se encuentra asociado al papel de reactor en las enfermedades cardiovasculares. El comportamiento antioxidante fenólico permite que se encuentre relacionado con la capacidad necesaria para el mantenimiento o incremento de la actividad catalítica para a su vez reducirla (Porras, 2014, p. 15).

En la actualidad las hierbas culinarias son cada vez más populares debido a las características que las determina por ser de una gran cantidad de alimentos, siendo estas fuentes importantes de las composiciones de las necesidades estudiadas.

La mayor parte de las plantas y los alimentos contienen una gran variedad de derivados fenólicos determinados por los fenoles simples, derivados del ácido, estilbenos, y ligninas además los fenoles establecidos por una parte de los ácidos carboxílicos.

Entre las propiedades que se determina a los fenoles se encuentran situadas la función como antibiótico, el uso mediante pesticidas naturales, determinantes como agentes protectores de los rayos y aislantes en las paredes celulares.

### 1.13.2 Compuestos de flavonoides

Los flavonoides se encuentran compuestos por fenólicos constituyentes de la parte no energética, en principio estos fueron considerados como sustancias que no generaban ninguna reacción beneficiosa, sin embargo, con el pasar del tiempo bajo ciertos estudios estos se establecieron efectos positivos debido a la acción antioxidante generada (Peñarrieta , et al., 2014).

Los antioxidantes se encuentran ampliamente distribuidos ante las plantas en las frutas, verduras y en varias bebidas que representan los componentes necesarios como parte energética para el ser humano. Estos compuestos fueron descubiertos en el año de 1930 mediante un premio Nobel llamado Szent – Gyogy.

Los flavonoides determinan en su estructura química un sin número de variables de grupos de hidróxilo, fenólico el cual contiene excelentes propiedades de quelación de hierro como de otros metales de transmisión lo que hace que se genere grandes cantidades de antioxidantes.

### 1.13.3 Estructura Química

Los flavonoides son establecidos mediante un bajo peso molecular, de los cuales se comparten bajo un gran esqueleto mediante (C6-C3-C6), establecidos mediante los anillos de fenilos (A y B). Las propiedades base determinan los radicales flavonoides mediante un medio ácido.

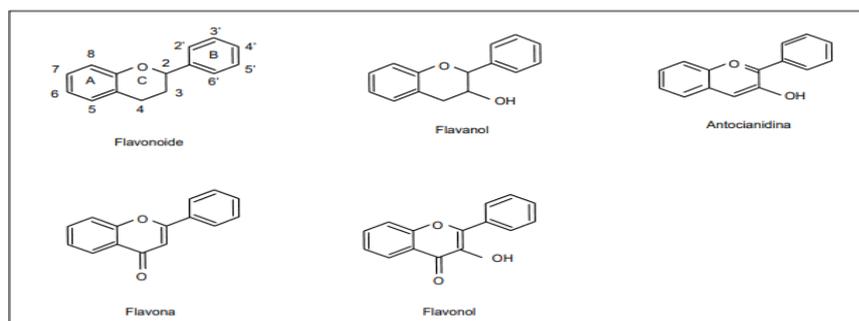


Figura 4-1: Estructura y tipos de los flavonoides

### 1.13.4 Acción antioxidante de los flavonoides

La capacidad de los polifenoles vegetales ante la actuación como antioxidante entre los sistemas biológicos fue establecida en los años treinta, tomando en consideración que el mecanismo antioxidante fue ignorado en la mayor parte. En la actualidad el interés determinado de los flavonoides se debe a una apreciación alta de una actividad farmacológica.

Entre las actividades que son destacadas se encuentran las acciones antivirales, y antialérgicas, así como las propiedades antitrombótica y antiinflamatoria (Tuñón & Jorge , 2013 , p. 38).

## CAPÍTULO II

### 2.1 MARCO METODOLÓGICO.

#### 2.2 Lugar de la investigación

Esta investigación fue realizada en el laboratorio de Productos Naturales, Fitoquímica y Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela de Bioquímica y Farmacia que pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.3 Recolección del material vegetal

El material vegetal (hojas) de *Roupala ferruginea* Kunth se recolectó 2 muestras completas del espécimen en la provincia de Loja, parroquia Cajanuma a 1451 m.s.n.m las mismas que se encuentran ubicadas a las siguientes coordenadas: Latitud: 3°59'35" S y Longitud: 79°12'15" O; las mismas que reposan en el laboratorio de productos naturales.

Esta investigación se llevó a cabo gracias al **CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENETICOS DEL PROGRAMA DE INVESTIGACION CIENTIFICA DENOMINADO: “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE”** CELEBRADO ENTRE EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, A TRAVES DE LA SUBSECRETARÍA DE PATRIMONIO NATURAL Y LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO asignado con el Nro. MAE-CNB-CM-2018-0086.

#### 2.4 Identificación del material vegetal

Para la identificación veraz de la muestra vegetal se tomó dos muestras, las mismas que se identificaron en el Jardín Botánico y Herbario “Reinaldo Espinosa” que pertenece a la Universidad Nacional de Loja, el mismo que se encuentra responsable el Ing. Zhofre Aguirre Mendoza, Ph.D.

## 2.5. Materiales, equipos y reactivos

Para la realización de este trabajo de investigación se hizo uso de los siguientes materiales, equipos, y reactivos que se explican a continuación:

### 2.5.1. Material Vegetal

Se usaron únicamente las hojas de la planta de *Roupala ferruginea* Kunth, la misma que se procedió a limpiar cuidadosamente con el fin de eliminar cualquier material extraño que no sea de las hojas de la planta, luego fue secada a una temperatura de 50°C usando la estufa por un tiempo de 12 horas, una vez secada las hojas, fue triturada en el molino de marca Arthur H. Thomas, hasta obtención de partículas muy pequeñas las cuales se utilizaron para los diferentes ensayos de control de calidad de la droga, obtención de extractos, extracto hidroalcohólico, tamizaje fitoquímico, y ensayos de actividad antiinflamatoria y citotóxico.

### 2.5.2. Material Biológico

Dentro del material biológico utilizado para este trabajo de investigación fue sangre humana de un paciente sano, lo que ayudo a realizar el ensayo de la actividad antiinflamatoria y citotóxico *in vitro*.

### 2.5.3. Material farmacológico

Se usó ácido acetilsalicílico de 100mg como blanco comparativo con el extracto de *Roupala ferruginea* Kunth, para el ensayo de actividad antiinflamatoria y citotóxico *in vitro*.

### 2.5.4. Materiales de laboratorio utilizados.

**Tabla 6-2:** Descripción de los materiales utilizados

ENSAYOS	MATERIALES					
CONTROL DE CALIDAD DE LA MUESTRA	Reverbero	Pinzas	Cápsulas de porcelana	Desecador. Crisoles	Piseta.	
TAMIZAJE FITOQUIMICO	Embudos. Papel filtro.	Frasco ámbar de 250ml.	Trípodes. Tubos de ensayo.	Vasos de precipitación de 250ml.	Tubos de ensayo	Gradillas Pipetas.

EXTRACTO HIDROALCOHOLICO CONTROL DE CALIDAD	Vasos de precipitación.	Frasco ámbar de 1000ml.	Picnómetro. Pinzas.	Probeta de 50ml.	Pipeta. Micropipeta.	Cápsula de porcelana.
CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES TOTALES Y FENOLES	Pipeta.	Balón de aforo de 25 y 100ml.	Micropipeta de 100 µL y 1000 µL.	Vasos de precipitación Puntas para micropipeta	Tubos de ensayo.	Papel aluminio.
ENSAYO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTOXICO <i>in vitro</i> .	Alcohol. Torniquete. Capsula.	Aguja de vancuntainer. Micropipeta automática 1000uL.	Puntas para micropipeta. Pocillos.	Jeringuillas de 3, 5,10ml. Toallas absorbentes.	Curita. Tubos de vidrio.	
ENSAYO ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> .	Gradilla. Pipetas graduadas.	Papel aluminio.	Micropipeta.	Balones aforados.	Tubos de ensayo.	

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

### 2.5.5. Equipos.

**Tabla 7-2:** Equipos usados.

ENSAYOS	EQUIPOS					
TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y CONTROL DE CALIDAD DE LA MUESTRA	Sonicador Marca Branson 2510	Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C	Estufa	Balanza analítica	Molino Arthur H. Thomas C. O	
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO CONTROL DE CALIDAD	Rotavapor	Liofilizador ThermoScientific	Refractómetro	pH-metro		
CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES Y FENOLES. ENSAYO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTOXICO <i>in vitro</i> .	Centrifuga	Balanza analítica	Espectrofotómetro ThermoScientific	Vórtexmixer	Estufa Memmert SNB40	

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

### 2.5.6. Reactivos

**Tabla 8-2:** Descripción de reactivos

ENSAYOS	REACTIVOS						
CONTROL DE CALIDAD DE LA MUESTRA	Ácido clorhídrico al 10%				Agua destilada		
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Cloruro de sodio (polvo). Carbonato de sodio. Hidróxido de sodio al 5%. Ácido sulfúrico concentrado. Magnesio metálico. Alcohol amílico. Anhídrido acético. Ácido clorhídrico al 1%. Ácido clorhídrico concentrado. Cloroformo. Reactivo para Catequinas. Reactivo de Borntrager. Reactivo de FeCl <sub>3</sub> . Reactivo de Fehling A y B. Reactivo de Lieberma-Burchard. Reactivo de Baljet. Reactivo de Wagner. Reactivo de Mayer. Reactivo de Dragendorff. Reactivo Sudan III. Agua destilada. Etanol al 96%. Éter etílico.						
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO O CONTROL DE CALIDAD.	Agua destilada				Etanol 70%		
CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES TOTALES Y FENOLES.	Reactivo de Folin-Ciocalteu.	Soluciones de quercetina.	Tricloruro de aluminio 10% (AlCl <sub>3</sub> ).	Nitrito de Sodio 5% (NaNO <sub>2</sub> ).	Agua destilada.	Hidróxido de sodio 1M (NaOH).	Carbonato de sodio al 7,5% (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ).
ENSAYO ANTIINFLAMATOR	Solución de Ácido	Agua bidestilada	Ficoll-Paque.	Zymosan A	Reactivo WST-1	Dimetilsulfóxido 5%	

IO Y CITOTOXICO <i>in vitro</i> .	Acetilsalicílico o (Aspirina).	Heparina Sódica.	Cloruro de Amonio	Tritón X- 100		Solución modificada de Hanks.
--------------------------------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------	------------------	--	-------------------------------------

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

## 2.6. Técnicas y métodos

### 2.6.1. Determinación de los parámetros de control de calidad de la droga cruda

Una vez recolectada la planta se realizó el ensayo de control de calidad de la droga cruda, cada uno de los ensayos se lo efectuó por triplicado para garantizar seguridad y eficacia de cada proceso, haciendo uso de métodos físico-químicos. De esta forma se describe a continuación cada uno de los procedimientos, los cuales fueron basados en el folleto de Farmacognosia y Productos Naturales (Miranda , 2006, p. 31).

#### 2.6.1.1. Determinación del contenido de humedad

Es un parámetro indispensable para analizar la calidad de la muestra que va a ser analizada. De esta forma un incremento en el contenido de agua en la droga vegetal provoca un riesgo de hidrólisis de metabolitos secundarios que estén presentes en la droga y a la vez contaminación microbiana provocando de esta manera que la muestra se deteriore con una mayor facilidad.

Por lo tanto, es importante realizar éste ensayo porque permite saber la estabilidad de la muestra por ende la estabilidad de los componentes químicos que estén presentes, en especial aquellas muestras que presentan un elevado porcentaje de humedad. Para lo cual se hace uso del método gravimétrico, por una mayor facilidad; pero no se lo debe utilizar en muestras de drogas que presentan sustancias volátiles (Miranda , 2006, p. 34).

#### **Procedimiento:**

Se pesaron 2g, de droga (seca, cruda, y molida) con una desviación alrededor de 0.5mg, se procedió a colocar en una cápsula de porcelana previamente tarada a cada una de las muestras, después se ubicó en la estufa a una temperatura de 105 °C durante 3 horas, consecutivamente se dejó enfriar las cápsulas con el fin de evitar que haya un choque energético y se las introdujo en el desecador por un tiempo de 15mn, donde se pesó. Luego se llevó nuevamente las muestras a la

estufa por una hora más, se vuelve a repetir el mismo proceso hasta obtener finalmente un peso constante de cada muestra (Miranda , 2006, p. 34).

Para realizar el cálculo y determinar el contenido de humedad de la droga se aplicó la siguiente ecuación:

$$H = \frac{M1 - M2}{M1 - M} * 100$$

Dónde:

H = Pérdida en peso por desecación.

M = Masa de la cápsula vacía.

M1 = Masa de la cápsula con la muestra de ensayo (g)

M2 = Masa de la cápsula con la muestra de ensayos desecada (g)

#### 2.6.1.2. *Determinación de cenizas totales*

Se llama cenizas totales al residuo inorgánico es decir es el contenido total de minerales, que queda mediante el proceso de incineración de los compuestos orgánicos de la muestra seca. Este ensayo se realizó gravimétricamente (Miranda , 2006, p. 34).

#### **Procedimiento:**

Se pesó 2g ± una desviación de 0.5mg de droga molida, tamizada, cruda, y seca, se añadió cada una de las muestras en un crisol de porcelana que estaba previamente tarado.

Se carbonizó cada una de las muestras con la ayuda de un reverbero hasta que esté ya no emane humo, se colocó cada muestra en la mufla a una temperatura de 750°C para su incineración completa, durante 2-3 horas aproximadamente.

Si a pesar que ha transcurrido este tiempo y el residuo presenta aun trozos de carbón, añadimos unas gotas de peróxido de hidrógeno concentrado se calienta hasta que se evaporen los solventes. Se observa que al dejar enfriar el crisol conjuntamente con el residuo este es de color blanco.

Se deja enfriar el crisol por unos segundos antes de colocar en el desecador para evitar un choque energético posterior a ello se pesa, repitiéndose el proceso las veces que sean necesarias hasta tener dos pesadas consecutivas que no difieran más de 0.5mg. Para determinar el porcentaje de cenizas totales de la droga cruda se lo realiza con la siguiente ecuación (Miranda , 2006, p. 32).

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

Dónde:

C = Porcentaje de cenizas totales.

M = Masa del crisol vacío (g)

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

M2= Masa del crisol con la ceniza (g)

#### *2.6.1.3. Determinación de cenizas solubles en agua*

Tiene como fin determinar el material inorgánico cuantitativamente existente en las cenizas totales.

##### **Procedimiento:**

Una vez obtenidas las cenizas totales con el ensayo anterior se colocó 15mL de agua en el crisol, el cual se tapó con la ayuda de un vidrio reloj el mismo que se dejó hervir durante 5 mn. Transcurrido este tiempo se filtró el residuo (papel filtro libre de cenizas). Después el residuo y el papel filtro se colocó en un crisol, y se calentó hasta su completa carbonización, posterior a esto se introdujo la muestra incinerada a la mufla a una temperatura óptima de 750°C en un tiempo de 2 horas. Pasado este tiempo se colocó el crisol en el desecador y se pesó. Este procedimiento lo repetimos hasta obtener un peso constante se lo hace en intervalos de 30mn aproximadamente (Miranda , 2006, p. 36).

Para realizar el cálculo y poder determinar el porcentaje de cenizas totales de la droga cruda se lo realiza con la siguiente ecuación:

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

Donde:

Ca = Porcentaje de cenizas solubles en agua.

M = Masa del crisol vacío.

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

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

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

#### *2.6.1.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

El objetivo de este ensayo es el determinar el contenido de minerales insolubles en ácido clorhídrico que contiene la droga cruda.

### **Procedimiento:**

Al crisol que contiene las cenizas totales se añadió 3 mL de ácido clorhídrico al 10%. Se procedió a taparlo con un vidrio reloj y calentarlo en agua hirviendo durante 10 minutos, se procedió a lavar el vidrio reloj con agua caliente (5 mL) uniendo esto a la totalidad del contenido del crisol. Filtramos la solución con la ayuda del papel filtro libre de cenizas, se procedió al lavado del residuo con agua caliente mientras que la solución filtrada acidulada con ácido nítrico se colocaron dos gotas de nitrato de plata 0, 1 mol/L no haya la presencia de cloruros. Se deseco el residuo y filtrado en la estufa a 105°C y se colocó en el crisol.

El crisol obtenido en el apartado anterior se introdujo en la mufla a una temperatura óptima de 750°C durante 2 horas y posterior a una estufa 105 °C durante 15 minutos. Se dejó enfriar el crisol en el desecador y se pesó hasta tener peso constante (Miranda , 2006, p. 33).

Para realizar el cálculo y poder determinar el porcentaje de cenizas totales de la droga cruda se lo realiza con la siguiente ecuación:

$$B = \frac{M2 - M}{M1 - M} * 100$$

Dónde:

B= Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

M = Masa del crisol vacío (g)

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

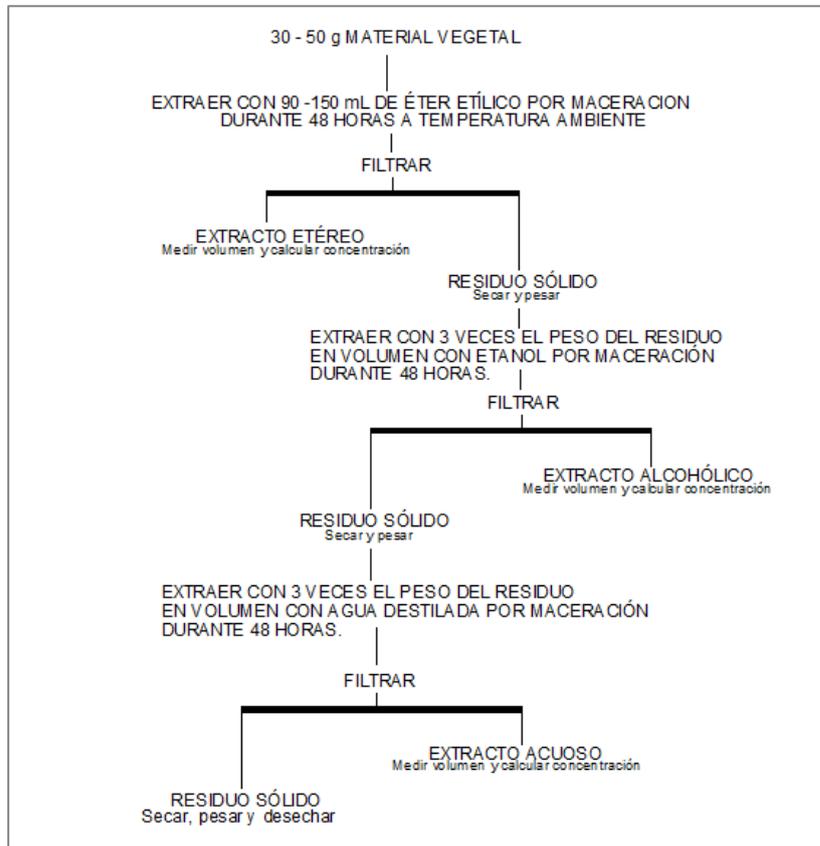
M2= Masa del crisol con las cenizas insolubles en ácido clorhídrico (g)

### ***2.6.2. Tamizaje fitoquímico***

El tamizaje fitoquímico o también llamado “screening” nos ayuda a reconocer cada uno de los metabolitos presentes en la droga vegetal ya sean estos primarios y secundarios, con reacciones colorimétricas o precipitados. Cada método se caracteriza por ser rápido, sencillo y eficaz para determinar los componentes fitoquímicos de la muestra vegetal. Una vez que se culmina con los parámetros de calidad de la muestra vegetal o droga vegetal se procede a preparar los extractos del screening fitoquímico (Miranda , 2006, p. 38).

### **Procedimiento:**

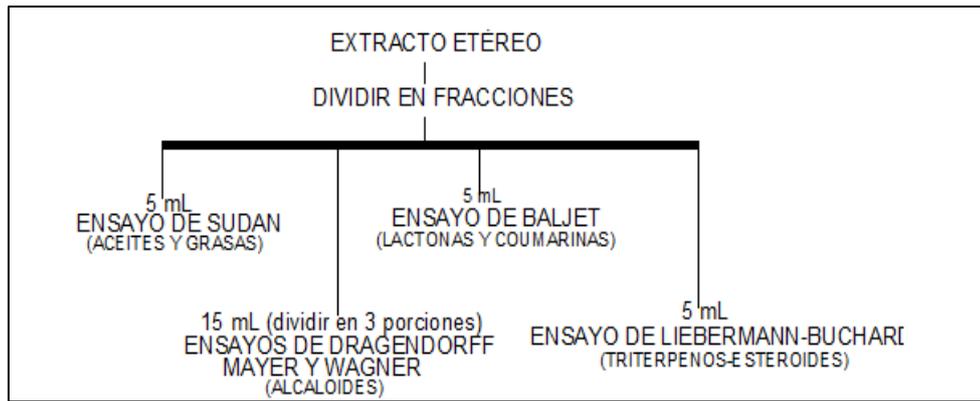
Una vez que la planta está seca y molida, se procede a extraer de una manera continua con solventes de polaridad ascendente como se detalla a continuación en el esquema de Normas Ramales de drogas crudas, tinturas y extractos (Miranda , 2006, pp. 30-64).



**Figura 5-2: Protocolo para elaborar los extractos para el tamizaje fitoquímico**

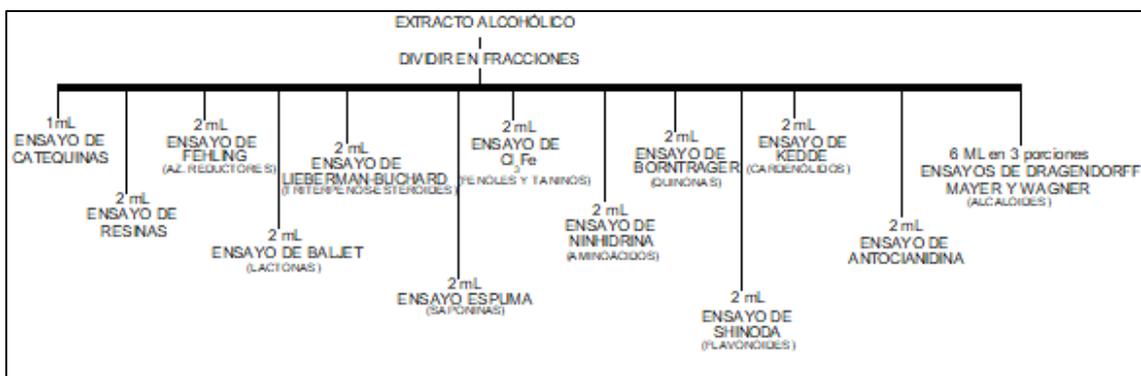
Fuente: (Miranda , 2006, p. 39)

Una vez conseguidos los diferentes extractos se procede a realizar diferentes pruebas de identificación de los metabolitos, basados en Las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda , 2006, p. 39).



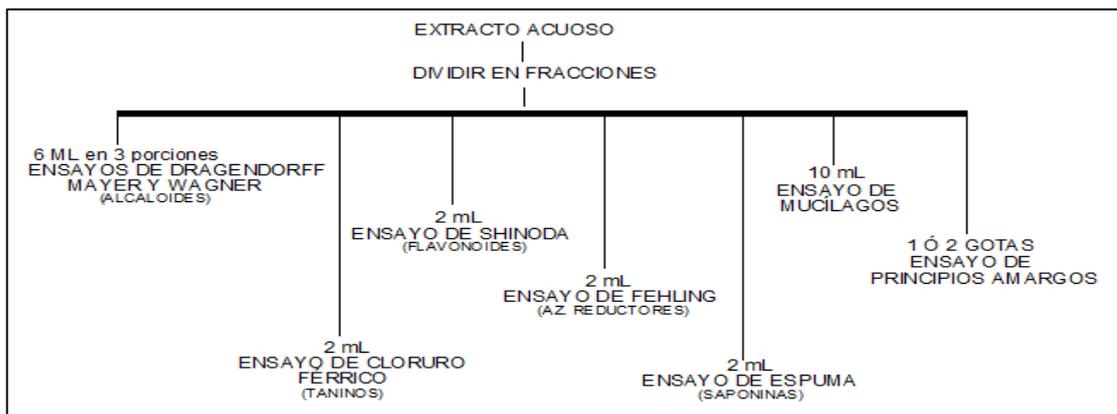
**Figura 6-2: Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo**

Fuente: (Miranda , 2006, p. 40)



**Figura 7-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico**

Fuente: (Miranda , 2006)



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

Fuente: (Miranda, 2006n, pág. 41)

Cada ensayo descrito anteriormente para tamizaje fitoquímico de cada uno de los extractos analizados se detalla a continuación en base a Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tintura (Miranda , 2006, pp. 40-45).

#### *2.6.2.1. Ensayo de Sudán*

Determina la presencia de compuestos grasos que están presentes en la muestra vegetal, donde se añadió 5ml de extracto en un tubo de ensayo al mismo tubo se le integro un 1ml de sudan III y en caso de no haber sudan IV, posteriormente se evaporo en baño maría es positivo el ensayo si se observa gotas o un color rojo (Miranda , 2006, pp. 39-40).

#### *2.6.2.2. Ensayo de Dragendorff*

Analiza la presencia de alcaloides, donde se tomó una alícuota de extracto, si el extracto es orgánico se lo debe evaporar hasta sequedad, una vez obtenido el residuo se colocó 1ml de ácido clorhídrico al 1% en agua, se incorpora a la solución acuosa 3 gotas de Dragendorff, es positivo si hay opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda , 2006, p. 40).

#### *2.6.2.3. Ensayo de Mayer*

El ensayo de Mayer analiza si existe alcaloides, y realizamos el mismo procedimiento de Dragendorff, introducimos una migaja de cloruro de sodio en polvo se agito, y filtro y finalmente se añade 3 gotas del reactivo de Mayer. El ensayo es positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda , 2006, p. 40)

#### *2.6.2.4. Ensayo de Wagner*

Identifica si existe la presencia de alcaloides, se procede de la misma manera que los ensayos anteriores forma hasta obtener la solución ácida. Después, se añadió 3 gotas del reactivo de Wagner. El ensayo es positivo cuando se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda , 2006, p. 41).

#### *2.6.2.5. Ensayo de Baljet*

Con la ayuda de este ensayo se identifica compuestos lactónicos, como lo son las cumarinas. Se tomó una alícuota del extracto, si no está disuelto en alcohol se evapora en baño maría y el residuo procedemos a re-disolver con 1ml de alcohol etílico, luego se colocó 1 mL de reactivo de Baljet.

El ensayo es positivo cuando aparece una coloración rojiza (++) o un precipitado rojo (+++) (Miranda , 2006, p. 41).

#### 2.6.2.6. *Ensayo de Liebermann-Burchard*

Determina si existen compuestos triterpenicos y/o esteroides, ya que los dos presentan un núcleo androstano, insaturado en el anillo B posición 5 y 6. Se procedió añadir una alícuota de extracto, se dejó evaporar hasta sequedad en baño maría y una vez obtenido el residuo se volvió a re-disolver con 1ml de cloroformo y 1ml anhídrido acético y se mezcló. Después se colocó lentamente y con cuidado 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, el ensayo es positivo si hay un cambio rápido de coloración como se detalla a continuación:

- Rosado - Azul (muy rápido).
- Verde intenso - visible (aunque rápido).
- Verde oscuro – negro - final de la reacción (Miranda , 2006, p. 42).

#### 2.6.2.7. *Ensayo de Catequinas*

Se procedió a coger una gota del extracto etanólico con la ayuda de un capilar y se colocó encima del papel filtro y se adiciono 1 gota de solución de carbonato de sodio sobre la mancha del extracto. Este ensayo es positivo cuando se introduce el papel filtro en una cámara de UV y se observa una mancha de color verde carmelita (Miranda , 2006, p. 42).

#### 2.6.2.8. *Ensayo de resinas*

Se adiciono 10ml de agua destilada a una alícuota de extracto etanólico este ensayo es positivo si se observa un precipitado (Miranda , 2006, p. 42).

#### 2.6.2.9. *Ensayo de Fehling*

Analiza la presencia de azúcares reductores en el extracto de la muestra. Se procedió a evaporar el solvente hasta llegar a sequedad y se re-disolvió el residuo con 2ml de agua después añadimos 2ml de reactivo de Fehling y se calentó a baño maría en un tiempo de 10mn. Este ensayo es positivo si cambia a un color rojo o precipitado rojo (Miranda , 2006, p. 42).

#### 2.6.2.10. *Ensayo de la Espuma*

Este ensayo de la espuma nos permite identificar la presencia de saponinas tanto esteroidales como triterpénicas. Se procedió a colocar 2mL del extracto etanólico en un tubo de ensayo se disolvió con 5 veces su volumen en agua, se mezcló y se agitó durante un tiempo de 10 minutos. Esto es positivo si hay presencia de espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y dura un tiempo mínimo de 2 minutos (Miranda , 2006, p. 42).

#### 2.6.2.11. *Ensayo de cloruro férrico*

Con la ayuda de este ensayo se puede determinar si existen compuestos fenólicos y taninos. Determinamos la presencia de fenoles y taninos exclusivamente en el extracto etanólico y en el acuoso solo taninos. Se tomó una alícuota del extracto y se lo neutralizo añadiendo acetato de sodio (solo en el extracto acuoso). Después se colocó 3 gotas de solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina. Es positivo si hay un cambio en la coloración indica la presencia de los siguientes componentes:

- Coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos (Miranda , 2006, p. 43).

#### 2.6.2.12. *Ensayo de Borntrager*

Detecta la presencia en los extractos vegetales de quinonas. Se tomó una alícuota del extracto y se procedió a evaporar a baño maría hasta sequedad, una vez obtenido el residuo se re-disolvió con 1 mL de cloroformo, se añadió 1 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua, se homogenizo, agitó, y se dejó en reposo hasta que se dé la separación de las fases. Es positivo cuando en la fase superior (fase acuosa alcalina) toma una coloración rosada (++) o roja (Miranda , 2006, p. 42).

#### 2.6.2.13. *Ensayo de la Ninhidrina*

Determina la presencia de los aminoácidos libres o aminas en general procedemos a tomar 1ml del extracto en alcohol o su residuo de la concentración a baño maría si se encuentra el extracto en otro solvente se procede adicionar 2ml de la solución de Ninhidrina al 2% en agua, esto se calienta de 5 a 10mn en baño maría. Esto es positivo cuando se torna de un color azul-violáceo.

#### 2.6.2.14. *Ensayo de Kedde*

Analiza la presencia de glicósidos cardiotónicos. En el extracto etanólico se colocó 1ml del reactivo de Kedde y se dejó reposar de 5 a 10 minutos. Este ensayo es positivo si da una coloración violácea persistente durante 1-2 horas.

Preparación del reactivo:

Solución 1: Ácido 3,5-dinitrobenzónico al 2% en metanol.

Solución 2: Hidróxido de potasio al 5,7% en agua.

Las soluciones se mantienen preparadas de forma independiente y se mezclan en proporciones iguales de volumen de cada una de ellas, en el momento de realizar el ensayo.

#### 2.6.2.15. *Ensayo de Antocianidinas*

Analiza la presencia de estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se tomó una alícuota de extracto etanólico y se calentó por 10 minutos en conjunto con 1ml de ácido clorhídrico concentrado, se dejó enfriar y se añadió 1ml de agua y 2mL de alcohol amílico. Finalmente se agito y se deja reposar hasta que las fases se separen. Es el ensayo positivo cuando se torna de un color rojo a marrón en la fase amílica.

#### 2.6.2.16. *Ensayo de Shinoda*

Indica la presencia de flavonoides en la muestra vegetal. Se diluyo una alícuota de extracto acuoso o alcohólico con 1ml de ácido clorhídrico concentrado y con un trozo de cinta de magnesio metálico, se esperó 5mn hasta que la reacción finalice y después se añadió 1ml de alcohol amílico, se mezcló y dejó reposar hasta que se separen las fases. Es positivo cuando el alcohol amílico se torna amarillo, naranja, carmelita o rojo (Miranda , 2006, pp. 40-45).

#### 2.6.2.17. *Ensayo de Mucílagos*

Indica si existe la presencia de estructuras de tipo polisacárido que forman un coloide alto en índice de masa y densidad de agua con la cual se extrae. Se tomó una alícuota de extracto y se lo enfrió a temperaturas de 0-5°C. En caso de ser positivo presenta una consistencia gelatinosa.

#### *2.6.2.18 Ensayo de principios amargos y astringentes*

Se tomó 1 gota del extracto acuoso, se procedió a saborear y a reconocer el sabor de cada uno de los principios y finalmente a diferenciarlos al paladar (Miranda , 2006, pp. 40-41).

#### ***2.6.3. Preparación del extracto hidroalcohólico de *R. ferruginea****

Se preparó en una proporción de 1:10 donde se pesó 100g de la droga molida, cruda y seca esto añadimos en un frasco ámbar en el cual se adicione 1L de etanol al 70% y se dejó en reposo durante 3 días durante los mismos se debe agitar suavemente, después se filtró y se concentró el extracto en un volumen de  $\frac{1}{4}$  en el rotavapor a una temperatura de 60°C. Finalmente se filtró, congelo y se liofilizo el extracto hasta que la muestra quede libre de agua.

#### ***2.6.4 Control de calidad del extracto hidroalcohólico***

Con el extracto hidroalcohólico ya filtrado se utilizó para poder determinar cada uno de los parámetros de calidad que se realizaron por triplicado y se describen a continuación:

##### *2.6.4.1. Determinación de las características organolépticas*

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

Determinación de olor: Se colocó una tira de papel en el extracto de esta manera se analizó si el olor pertenece a las características propias del extracto obtenido.

Determinación de color: Se colocó una alícuota del extracto en un tubo de ensayo seco y limpio y finalmente se define el color y la transparencia.

##### *2.6.4.2. Determinación de densidad relativa*

Es la relación entre la masa y el volumen de la sustancia que se va a ensayar a una temperatura de 25°C. De esta manera se procedió a pesar el picnómetro vacío y bien seco, a continuación, se llenó con el extracto y se dejó reposar en un tiempo no mayor a 15 minutos a una temperatura de 25 °C y finalmente se pesó este ensayo se repite usando agua destilada con el fin de calcular la densidad del extracto para esto utilizamos esta ecuación:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M} * 100$$

Donde:

D<sub>25</sub>: Densidad relativa

M<sub>1</sub>: Peso del picnómetro con la muestra en g

M<sub>2</sub>: Peso del picnómetro con el agua en g

M: Peso el picnómetro vacío en g

#### 2.6.4.3. Índice de refracción

Se añade en el refractómetro una gota de la muestra sobre el prisma se enfoca con el compensador cromático hasta lograr tener la línea de intersección entre el campo oscuro y el claro.

#### 2.6.4.4. Medición del pH

Con un pH-metro digital medimos el pH, previamente ajustando con la solución buffer reguladora y de esta manera se introdujo el electrodo en la muestra.

#### 2.6.4.5 Determinación de sólidos totales

Es el residuo de la muestra que es sometida a evaporación y al secado en la estufa. Se añadió 5ml de extracto en la capsula de porcelana previamente tarada, se evaporo a baño maría hasta sequedad, después colocamos en una estufa a 105°C durante 2 horas. Finalmente se dejó enfriar y se pesó esto se repite hasta obtener por lo menos dos pesos constantes (Capasso et al., 2011, p. 42).

La proporción de sólidos totales (ST), se calculó en porcentaje utilizando la siguiente ecuación:

$$ST = (Pr - P * V) * 100$$

Donde:

Pr= masa de la cápsula más el residuo en g

P= masa de la cápsula vacía en g

V= volumen de la porción de ensayo

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

Es una reacción redox donde todos los compuestos fenólicos interaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, pasando de un color amarillo a un color azul intenso. Se preparó soluciones estándares de ácido gálico a 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, se procede a las lecturas con la ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm, de esta manera realizar la curva de calibración y de igual manera se preparó una solución del extracto (1000 ppm).

#### **Procedimiento:**

Se cogió 1 alícuota tanto de la muestra como las soluciones de ácido gálico, a esto se incorporaron 15ml de agua destilada con 1,25 ml de Folin-Ciocalteu. Se dejó reposar 8 minutos, y luego se colocó 3,75 mL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5% y aforar con 25 ml de agua destilada, se procede a vortear durante 1 minuto y se dejó en reposo durante 2 horas en oscuridad. Finalmente se realizó las lecturas con una longitud de onda de 765nm (Vinueza , et al., 2017 , p. 2).

### ***2.6.6. Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico***

Se preparó soluciones estándares de quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, se realiza las lecturas con la ayuda del espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm, para construir la curva de calibración de igual forma se preparó la solución de extracto (1000 ppm).

#### **Procedimiento:**

Se cogió una cantidad tanto de la muestra y las soluciones estándares de quercetina, se colocó 4ml de agua destilada y 300 µl de nitrito de sodio al 5%. Se dejó pasar 5mn y se incorporó 300 µl de cloruro de aluminio al 10%, se vortearizó por un tiempo de 1 minuto y se dejó reposar durante 5 minutos en oscuridad. Finalmente se colocó 2ml de hidróxido de potasio (KOH) 1M, se homogeniza y se lee las absorbancias de cada muestra a una longitud de 510nm (Vinueza et al., 2017, p. 2).

### ***2.6.7. Determinación de la actividad antioxidante mediante ensayo de eliminación de DPPH***

Es una reacción de óxido-reducción entre el DPPH y un átomo de hidrogeno del antioxidante (extracto/ estándar de ácido gálico), lo que ocasiona la reducción de DPPH\* a DPPH<sub>2</sub> provocando un cambio de color de púrpura a amarillo y a una reducción de las absorbancias cuando se lee a una longitud de onda de 517 nm. Se preparó soluciones estándares de ácido gálico con diferentes concentraciones (10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm) y de la misma manera se preparó la solución del extracto a las mismas concentraciones.

### **Procedimiento:**

Se preparó 250 ml de una solución de reactivo DPPH, donde se disolvió 5.9 mg de DPPH en metanol, a continuación, se dejó reposar en oscuridad durante 2 horas para que el reactivo se estabilice y este con absorbancias de 0.6-0.8. Se añadió en un tubo de ensayo 100 µL de la solución de la muestra en etanol se homogeniza con 3.9 mL de la solución de DPPH, después se incubó a baño maría con una temperatura de 37°C por 20 minutos. Finalmente se hace las lecturas de las absorbancias a una longitud de onda de 517 nm (Alhakmaniet, et al., 2014, pp. 657-658).

La inhibición de los radicales libres DPPH\* en porcentaje (% I) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%I = \frac{\text{ABS control} - \text{ABS muestra}}{\text{ABS control}} * 100$$

Donde:

% I = Porcentaje de inhibición

ABS control= La absorbancia de la muestra control

ABS muestra= Absorbancia del extracto de ensayo

#### ***2.6.8. Ensayo antiinflamatorio y citotóxico in vitro***

##### ***2.6.8.1. Aislamiento de neutrófilos***

Se tomó un tubo de ensayo limpio y seco se añadió 0.5 mL de heparina sódica al 5%, y después se extrajo 6ml de sangre venosa y a esto se incorporó 4ml de solución modificada de Hank's (MHS) y se homogeniza despacio por un lapso de 1mn. Se cogió otro tubo de ensayo y se añadió 3ml de Ficoll-paque, se tomó 4ml de sangre extraída añadiéndola despacio por las paredes del tubo y se dejó en reposo durante 5mn y centrifugar a 1500 RPM durante 30 minutos. A continuación, en otro tubo de ensayo se separó los neutrófilos y se re-disolvió en MHS en una porción de 1:2 y se centrifuga. Después se desechó el sobrenadante y se diluyó con 1ml de MHS y con gotas de cloruro de amonio se centrifugó y finalmente desechó el sobrenadante y el precipitado obtenido se reconstituyó con 1ml de MHS a una concentración de 107 células/mL (Vinueza, et al., 2017, p. 2).

##### ***2.6.8.2. Ensayo antiinflamatorio in vitro sobre neutrófilos aislados***

Con el extracto liofilizado se preparó soluciones de diferentes concentraciones (100, 200, 500, 800 y 1000 µg/mL), con Dimetilsulfóxido al 5% disuelto en MHS, con la ayuda de matraces de

aforo de 25 ml. A continuación, se preparó Triton X-100 al 0.1% con una solución modificada de Hank's y con concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL de ácido acetilsalicílico, disueltos en solución modificada Hank's.

Para este ensayo se preparó los controles:

Control Positivo: Solución al 5% Dimetilsulfóxido en MHS.

Control Negativo: Solución al 0.1% Tritón X-100 en MHS.

Se determina mezclando 140µl de neutrófilos aislados en MHS (pH 7.4), 10µl WST-1 y 100µl, cada disolución se incubaba a 37 °C durante 30 minutos. Después de este lapso de tiempo se añade 50 µL de una solución de Zymosan A opsonizado iniciando la reacción e incubaba a 37°C, por 1 hora. Finalmente se procede a leer cada una de las absorbancias a una longitud de onda de 450nm mediante un lector de microplacas (Choudhary and Jalil, 2005 , p. 2349).

Para calcular el porcentaje de inhibición inflamatoria se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh. Inflamatoria} = 100 - \left( AM * \frac{100}{ADMSO} \right)$$

Donde:

AM Corresponde a la absorbancia de la muestra / ADMSO a la absorbancia del control.

#### 2.6.8.3. *Ensayo de citotoxicidad in vitro sobre neutrófilos aislados*

Se prepararon soluciones de extracto liofilizado con Dimetilsulfóxido al 5% disuelto en MHS en diferentes concentraciones (100, 200, 500, 800 y 1000 µg/mL), se preparó Triton X-100 al 0.1% con solución modificada de Hank's y soluciones de ácido acetilsalicílico con concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL disueltos en solución modificada de Hank's.

Para el ensayo se preparó los siguientes controles:

Control Positivo: Solución de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS.

Control Negativo: Solución de Tritón X-100 0.1% en MHS.

La actividad antiinflamatoria in vitro se determinó mezclando 140µl de una suspensión de neutrófilos aislados en MHS (pH 7.4), 10µl WST-1 y 100µl de cada una de las diluciones preparadas se incubó a 37 °C durante 3 horas. Finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm mediante un lector de microplacas (Berridge , et al., 2008 , pp. 15-16).

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular se empleará la siguiente ecuación:

$$\% ViabilidadCelular = \frac{AM}{ADMSO} * 100$$

Dónde: AM corresponde a la absorbancia de la muestra / ADMSO a la absorbancia del control.

## CAPÍTULO III

### 3.1 MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.2. Control de calidad de la muestra vegetal (*R. ferruginea*)

Una vez realizado el control de calidad de la droga cruda por triplicado se obtuvo los siguientes valores:

**Tabla 9-3:** Parámetros de calidad de la droga cruda

Parámetros	Hojas de <i>R. ferruginea</i>	Referencia de la Real Farmacopea Española
Humedad	6.26± 0.07	≤ 14%
Cenizas Totales	2.34 ± 0.02	≤ 12%
Cenizas Solubles en Agua	0.54± 0.05	≤ 7%
Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico	1.21 ± 0.02	≤ 5%

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

El control de calidad permite determinar si la muestra vegetal cumple con los requisitos óptimos para ser utilizada en estudios científicos. En la tabla 1-3 se pueden observar los resultados obtenidos en el análisis de cada parámetro de calidad de las hojas de *R.ferruginea*. Para el parámetro de humedad presenta un valor de 6.26% ± 0.07, encontrándose dentro de los límites establecidos por la real farmacopea española. Este valor obtenido indica que la muestra vegetal fue procesada adecuadamente (secado, conservación y almacenamiento), con lo cual se evita la degradación de los componentes fitoquímicos presentes en la planta de *R.ferruginea*.

El porcentaje de cenizas totales fue de 2.34% ± 0.02; que está constituida por sales minerales e inorgánicas (fosfatos, carbonatos, etc.). Estos son lo que se encuentran con mayor prevalencia); al igual que algunos ácidos orgánicos tales como los ácidos: acético, oxálico, entre otros.

El ensayo de cenizas solubles en agua presenta un valor de 0.54% ± 0.05; el cual, nos permite conocer la cantidad de sales solubles presentes en la muestra, mientras que el porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico fue de 1.21% ± 0.02; que nos permite saber la cantidad de carbonatos u oxalatos que presenta la muestra de esta manera si los valores sobre pasan los límites establecidos se asocia a una contaminación por algún objeto extraño (tierra, sílice, mala recolección, etc.). Los resultados cumplen con los requisitos establecidos en la Real Farmacopea Española, mostrando la ausencia de contaminantes en la droga cruda.

### 3.3. Tamizaje Fitoquímico

Para la identificación de los diferentes compuestos fitoquímicos, la muestra se sometió a una extracción continua en solventes de polaridad creciente (hexano, etanol y agua), permitiendo la extracción de componentes tanto hidrófilos como lipófilos. La presencia de uno u otro componente fitoquímico difiere en cada extracto en dependencia del solvente aplicado, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 10-3:** Resultados del Tamizaje Fitoquímico de hojas de *R. ferruginea*

ENSAYOS	EX. ETEREO	EX. ETANOLICO	EX. ACUOSO
SUDAN (Aceites -grasas)	+	NA	NA
DRAGENDORFF (Alcaloides)	+	+	+
MAYER (Alcaloides)	-	+	+
WAGNER (Alcaloides)	-	+	+
BALJET(Latonas- cumarinas)	+	++	NA
LIEBERMAN-BURCHARD (Triterpenos-esteroides)	+	+	NA
NIHIDRINA (Aminoácidos)	NA	+	NA
BORNTRAGER (Quinonas)	NA	+++	NA
KEDDE (Glicósidos cardiotónicos)	NA	-	NA
ANTOCIANIDINAS (Secuencia del grupo de los flavonoides)	NA	+++	NA
CATEQUINAS	NA	-	NA
RESINAS	NA	+	NA
SHINODA (Flavonoides)	NA	++	+
FEHLING (Azúcares reductores)	NA	+	+
CLORURO FERRICO (Fenoles-taninos)	NA	+	-
ESPUMA (Saponinas)	NA	-	-
MUCILAGOS (Polisacáridos)	NA	NA	+
PRINCIPIOS AMARGOS	NA	NA	-

**Nota:** (N/A) No aplica, (-) Ausencia, (+) Presencia, (++) Moderado, (+++) Abundante

**Elaborado por:** Ebelin Inca, 2018

En la tabla 2-3, se puede observar los resultados obtenidos para cada una de las diferentes extracciones. Se determinó en el extracto etéreo la presencia de compuestos grasos, alcaloides, triterpenos y esteroides; que fueron positivos en los ensayos de Sudán, Dragendorff, y Lieberman-Burchard, respectivamente. Mientras que en el extracto etanólico se determinó la presencia de aminoácidos, triterpenos, cumarinas, esteroides, quinonas, catequinas, fenoles, taninos, flavonoides y azúcares reductores, siendo positivos para Mayer, Wagner, Baljet, Ninhidrina, Lieberman-Burchard, Borntrager, Cloruro Férrico, Antocianidinas, Shinoda y Fehling

respectivamente; en el análisis de este extracto, se pudo ver la presencia dominante de compuestos fenólicos, flavonoides, y de azúcares reductores, ya que los resultados para los ensayos de Cloruro férrico, Shinoda y Fehling, respectivamente fueron positivos. Finalmente, en los ensayos para el extracto acuoso se pudo observar la existencia de alcaloides, polisacáridos, flavonoides y azúcares reductores; identificados por los ensayos de Dragendorff, Mayer, Wagner, Mucilagos, Shinoda y Fehling. Los alcaloides, flavonoides y azúcares reductores presentan una mayor dominancia en cada uno de los diferentes extractos de la muestra vegetal.

La especie vegetal *R. ferruginea* no presenta ningún estudio farmacológico y fitoquímico con el cual se pueda comparar. Sin embargo, existen pequeñas investigaciones sobre algunos géneros esta familia, por ejemplo *Darlingia darlingiana* y *Darlingia ferruginea* que demuestra la presencia de un único alcaloide (darlingine) en su composición (Yang, Zhao and Carroll, 2017, p. 1). Otro es *Grevillea robusta* que en su estudio menciona la presencia de flavonoides y fenoles en una alta cantidad, seguido de cumarinas y aminoácidos (Wang *et al.*, 2008, pp. 452-453).

### 3.4. Control de calidad del extracto alcohólico

Con las hojas de *R.ferruginea* se preparó un extracto hidroalcohólico al 70% y se determinó los siguientes parámetros de calidad.

**Tabla 11-3:** Control de calidad de las hojas de *R.ferruginea*.

Parámetros de calidad		Resultados
Características Organolépticas	Aspecto	Líquido
	Color	Verde intenso
	Olor	Característico
	Sabor	Dulce
Características Físico-Químicas	PH	5.04 ± 0.01
	Densidad	0.93 ± 0.08
	Índice de Refracción	1.368 ± 0.01
	Sólidos Totales	2.05 ± 0.01

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

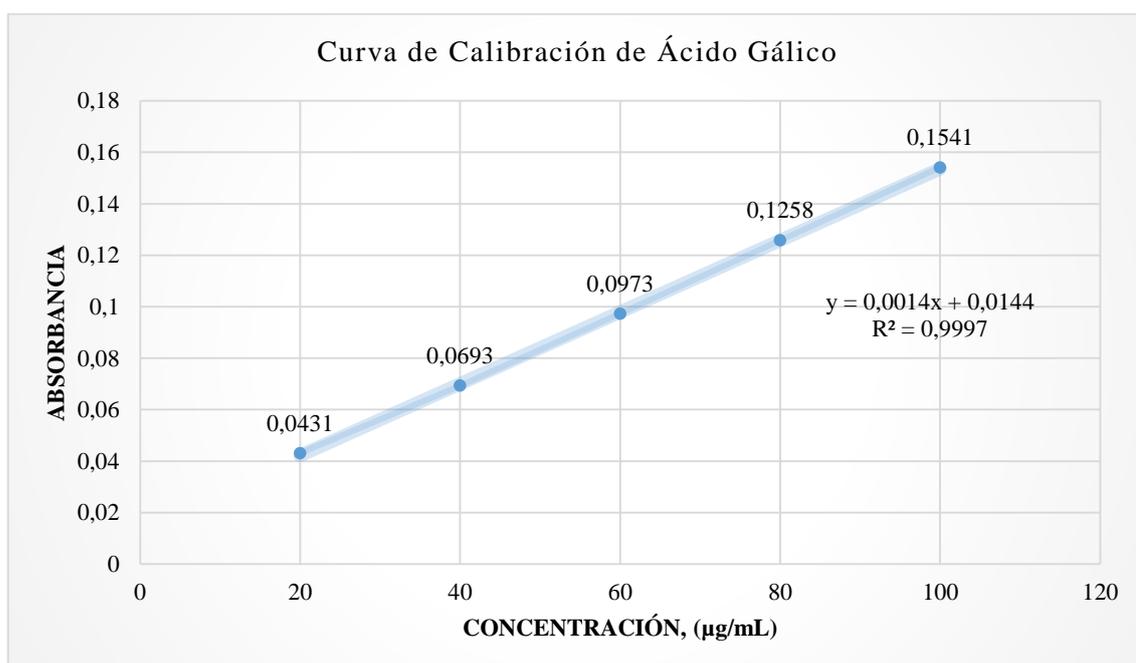
Para el control de las características organolépticas del extracto hidroalcohólico al 70% se analizó el aspecto (líquido), color (verde intenso), olor (característico de la planta) y sabor (dulce), cada una de estas propias de la planta y del solvente utilizado. El pH de la muestra analizada fue de

5.04 ± 0.01 que indica la presencia de ácidos débiles, la densidad relativa fue de 0.93 % ± 0.08 que al compararla con el etanol al 70% (0.68) se ve un incremento significativo lo que significa que hubo una adecuada extracción de los componentes fitoquímicos solubles.

El valor del índice de refracción obtenido (1.36 ± 0.01) fue superior al índice de refracción del agua cuyo valor es de 1, por lo que se asume la presencia de metabolitos secundarios como azúcares. Finalmente, el resultado obtenido de sólidos totales es de 2.05 % ± 0.01; que nos indica una adecuada extracción de metabolitos secundarios de tal forma que sobrepasa el porcentaje mínimo de 1.20%, el límite establecido en la normativa de la Real Farmacopea Española.

### 3.5. Cuantificación de fenoles totales

Se aplicó el método colorimétrico de Folin – Ciocalteu, el mismo que permitió la elaboración de la curva de calibración con soluciones estándar de ácido gálico a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100 ppm), dando la siguiente ecuación de la recta:  $A = 0.0014C + 0.0144$  y un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.99$ .



**Gráfico 1-3: Curva de calibración de ácido gálico, determinado en el eje de las “x” las concentraciones (µg/mL) vs la absorbancia.**

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

Para determinar la cantidad de fenoles totales, se procedió a interpolar el valor de las absorbancias de la muestra con la curva de calibración de ácido gálico (Gráfico 1-3), dando resultados en mg de ácido gálico por cada “g” del extracto liofilizado.

**Tabla 12-3:** Método de Folin-Ciocalteu cuantificación de fenoles totales

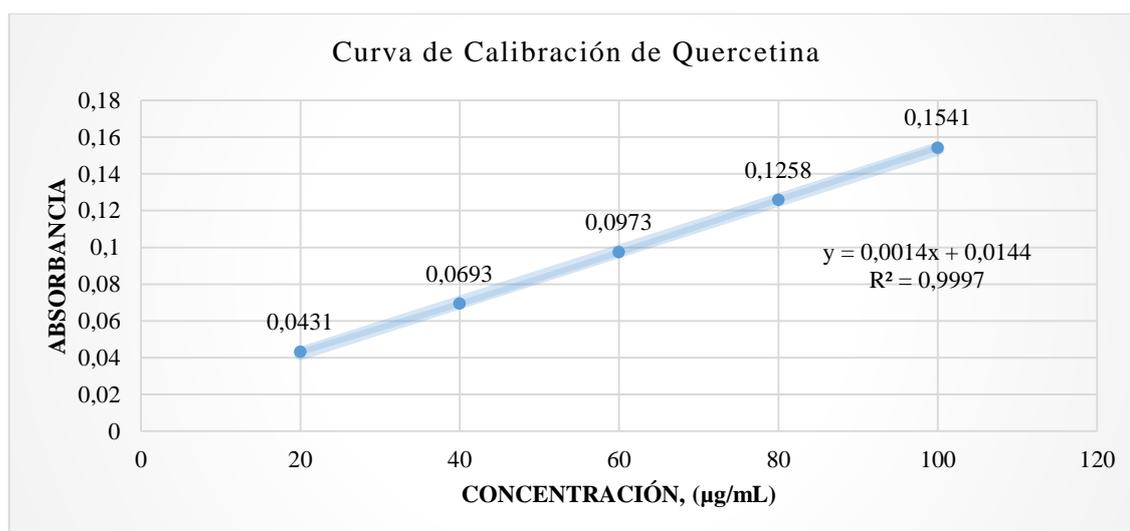
Extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>R.ferruginea</i>	Fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto liofilizado	Porcentaje
1000 µg/mL en etanol al 70%	187.71± 1.24	18.77± 0.12

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

Los resultados representados en la tabla 4-3 nos indica la cantidad de fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto liofilizado de hojas de *R. ferruginea* es de  $187.71 \pm 1.24$ , los fenoles totales del extracto liofilizado representan el  $18.77\% \pm 0.12$ ; siendo una cantidad moderada de fenoles presentes en la planta. No existen datos bibliográficos que permitan verificar estos datos, ya que no existen estudios realizados.

### 3.6. Cuantificación de flavonoides totales

Para cuantificar los flavonoides totales, se utilizó el método colorimétrico de tricloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ), y se elaboró una curva de calibración con soluciones estándar de quercetina a diferentes concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm; presentando la siguiente ecuación de la recta  $A = 0.0014C + 0.0144$  y con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.99$ .



**Gráfico 2-3:** Curva de calibración de ácido gálico, establecido en el eje de las “x” la concentración (µg/mL) vs absorbancia.

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

Se calculó el valor de flavonoides totales mediante interpolación del valor obtenido de la absorbancia de la muestra vegetal con la curva de calibración de quercetina (Gráfico2-3), en la cual se obtuvo el siguiente resultado expresado en mg equivalentes de quercetina por “g” del extracto liofilizado.

**Tabla 13-3:** Método de tricloruro de aluminio para la cuantificación de flavonoides totales.

Extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>R. ferruginea</i>	Flavonoides totales expresados como mg equivalentes de quercetina por g de extracto liofilizado	Porcentaje
1000 µg/mL en etanol al 70%	856.71± 13.38	85.67± 1.34

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

En la tabla 5-3 se determina la concentración de flavonoides totales con un valor de 856.71± 13.38, es expresado en mg de quercetina por cada g de extracto liofilizado de *R. ferruginea*. El cual es un valor elevado que posiblemente se relaciona con la actividad antiinflamatoria. Además, no existen referencias bibliográficas que ayuden a corroborar estos datos obtenidos, ya que no existen estudios relacionados con esta planta.

Existe un estudio realizado a 3 especies (*L. tasmanica*, *L. tinctoria* y *L. polymorpha*) del género *Lomatia* (Proteaceae) en el cual nos menciona la presencia de una elevada cantidad de flavonoides especialmente aquellos que se derivan de la quercetina (quercetin 3-O-β-D-glucose, Dihydroquercetin 3-O-β-D-xyloside, etc..), lo cual justifica una mayor cantidad de flavonoides en comparación a los fenoles (Deans *et al.*, 2018, pp. 75-76)

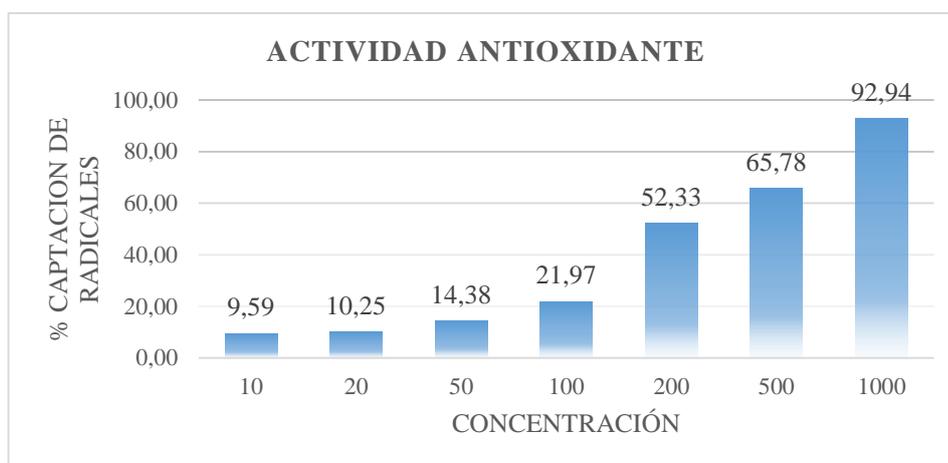
### 3.7. Actividad Antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante con la ayuda del método DPPH, el que nos indica la capacidad de eliminación de radicales libres en el extracto hidroalcohólico de las hojas *R.ferruginea* a diferentes concentraciones para obtener la concentración inhibitoria media (IC50) del extracto.

**Tabla 14-3:** Resultados de la actividad antioxidante del extracto liofilizado de *R.ferruginea*.

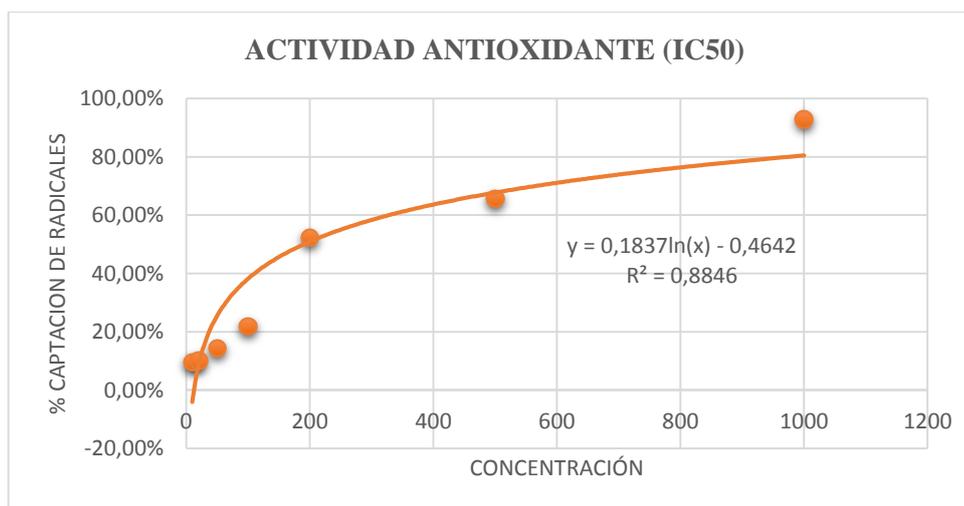
Concentración, (ppm)	Captación de Radicales Libres, (%)
10	9.59
20	10.25
50	14.38
100	21.97
200	52.33
500	65.78
1000	92.94

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018



**Gráfico 3-3:** Porcentaje de captación de radicales libres (DPPH-) a diferentes concentraciones vs el porcentaje de captación de radicales.

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018.



**Gráfico 4-3:** Representación de la concentración inhibitoria media (IC50) de la captación de radicales libres establecido en el eje de las x la concentración vs él % de captación de radicales.

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

El poder antioxidante se debe a la capacidad de eliminar los radicales libres del agente oxidante, los resultados que se obtuvieron muestran una alta capacidad de captación de los radicales libres, ya que está alrededor del 99% comparado a un estudio de la vitamina C presente en la uchuva, el cual demostró un porcentaje de captación de radicales libres de 39.37%, esto se debe a una alta cantidad de flavonoides y fenoles presentes en el extracto de la planta. Se determinó la concentración inhibitoria media (IC50) de la actividad antioxidante que es de 190,33 ug / ml; es decir se requiere de esta concentración del extracto para alcanzar el 50% de la actividad antioxidante.

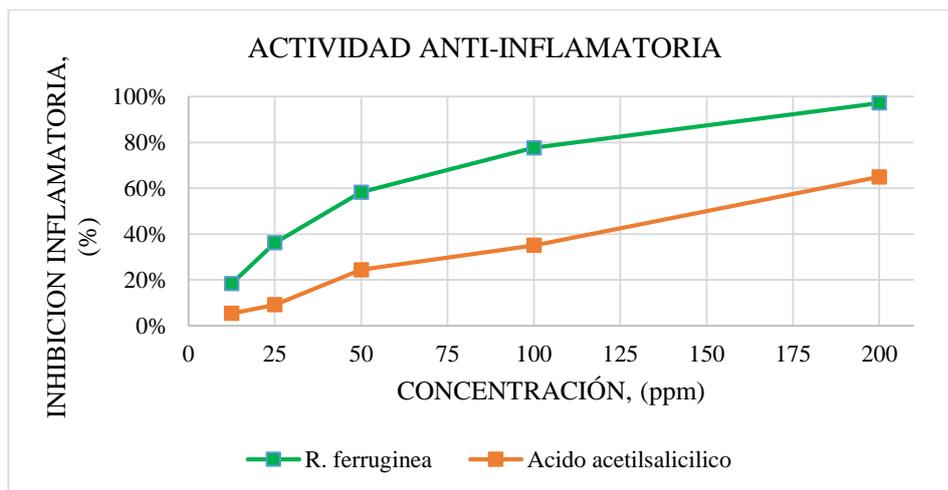
### 3.8. Actividad antiinflamatoria *in vitro*

Una vez obtenido el extracto hidroalcohólico liofilizado, se analizó con el método colorimétrico que mide la reducción de sales de tetrazolio (WST-1) a formazan por espectrofotometría, con neutrófilos aislados como lo que describen Tan y Berridge. En la tabla 7-3 se observa el porcentaje de inhibición inflamatoria.

**Tabla 15-3:** Porcentaje de actividad anti-inflamatoria del extracto hidroalcohólico de *R.ferruginea* y ácido acetilsalicílico.

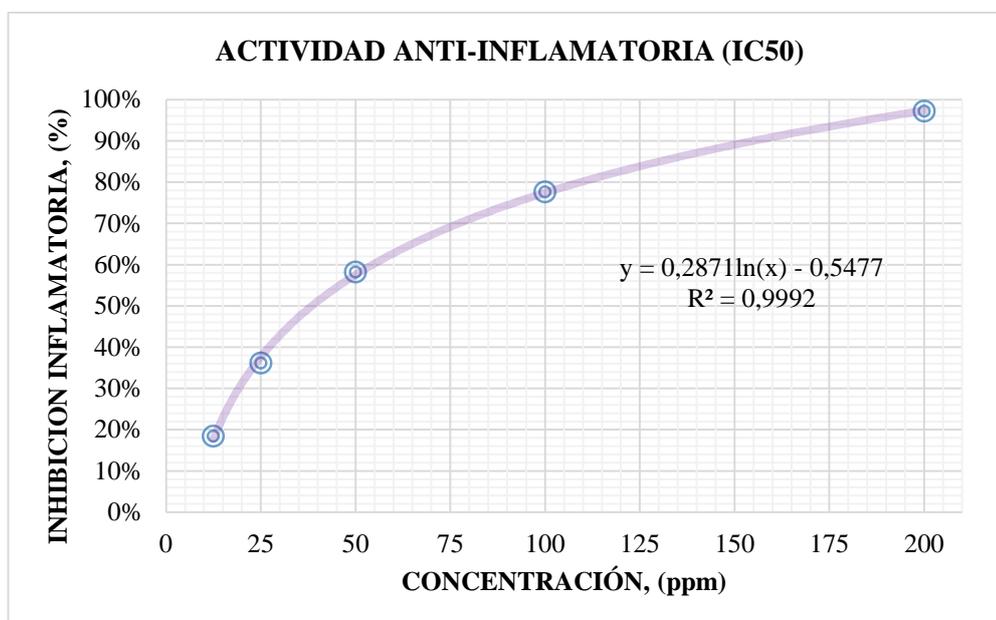
CONCENTRACIÓN, (ppm)	<i>R. ferruginea</i> ; INHIBICION INFLAMATORIA (%)	Ácido acetilsalicílico; INHIBICION INFLAMATORIA (%)
200	97.19±01.57	64.91±3.53
100	77.62±2.04	35.09±3.78
50	58.22±1.59	24.39±1.96
25	36.15±1.18	9.19±1.49
12,5	18.44±1.69	5.41±2.36

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018



**Gráfico 5-3: Porcentaje de la Inhibición Inflamatoria del extracto liofilizado de *R. ferruginea* y el ácido acetilsalicílico con diferentes concentraciones vs la inhibición inflamatoria**

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018



**Gráfico 6-3: Extracto hidroalcohólico liofilizado de *R. ferruginea* de la actividad anti-inflamación y curva de concentración inhibitoria media.**

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

Se observa en el gráfico 5-3 una comparación del porcentaje de la inhibición inflamatoria entre los resultados del extracto de *R. ferruginea* liofilizado con el ácido acetilsalicílico, demostrando una relativa superioridad en el porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto hidroalcohólico con referencia al ácido acetilsalicílico, aun cuando las concentraciones utilizadas son las mismas.

Cada uno de los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa SPSS 23 mediante un diseño completamente aleatorio, el test de ANOVA de un factor para saber si existe o no diferencias entre el porcentaje de inhibición inflamatoria con las concentraciones del

extracto. Primeramente, se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Levene, para constatar si cumplen los datos con los fundamentos de estos métodos de la estadística paramétrica, homogeneidad de varianzas, distribución normal.

Para el resultado del test de Kolmogorov-Smirnov, se obtuvo un nivel de significancia de  $p > 0,05$  como se demuestra en el (Gráfico 1 F). Por lo cual, se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ) que verifica que no presenta diferencias significativas en la actividad antiinflamatoria, de esta manera se concluye que los datos presentan una distribución normal. Mientras que, en el test de Levene presenta un valor mayor a 0.05 (Gráfico 2 F), lo que demuestra que no existen diferencias significativas entre cada uno de los grupos de datos obtenidos en este estudio, ya que poseen una variabilidad similar (equivalente).

Una vez cumplido con los requisitos de la estadística paramétrica se analizaron los datos con el test de ANOVA de un factor para identificar si existen diferencias significativas en los diferentes casos, como se muestra en el (Gráfico 3 F), nos indica un “p” con un valor de cero, de tal manera que se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, donde nos dice que si hay diferencias significativas entre los diferentes grupos de concentración y de actividad antiinflamatoria. Finalmente se analizó los datos con el test de Tukey como se muestra en el (Gráfico 4 F), de comparación múltiple, indicando una significancia menor a 0.05 para cada uno de los grupos de datos de tal manera que el porcentaje de inhibición inflamatoria si son diferentes para cada concentración al igual que para el ácido acetilsalicílico.

Se detalla en la tabla 7-3 que a la máxima concentración (200 ppm) el porcentaje de inhibición inflamatoria para el ácido acetilsalicílico es de  $64.91 \pm 3.53$ ; mientras que, para el extracto liofilizado presenta un valor de  $97.19 \pm 01.57$ . Se observó que el extracto de *R.ferruginea* liofilizado presenta una mayor capacidad de inhibición inflamatoria con respecto al ácido acetilsalicílico, ya que tienen un alto contenido de flavonoides y otros grupos fitoquímicos que al interactuar en sinergismo provocan una potencial actividad antiinflamatoria.

En el gráfico 6-3 se detalla la curva de concentración inhibitoria media de la actividad antiinflamatoria para el extracto liofilizado, presentando un valor de 38.45 ppm para alcanzar el IC50. Por ende, se requiere de pequeñas concentraciones para alcanzar la actividad antiinflamatoria deseada.

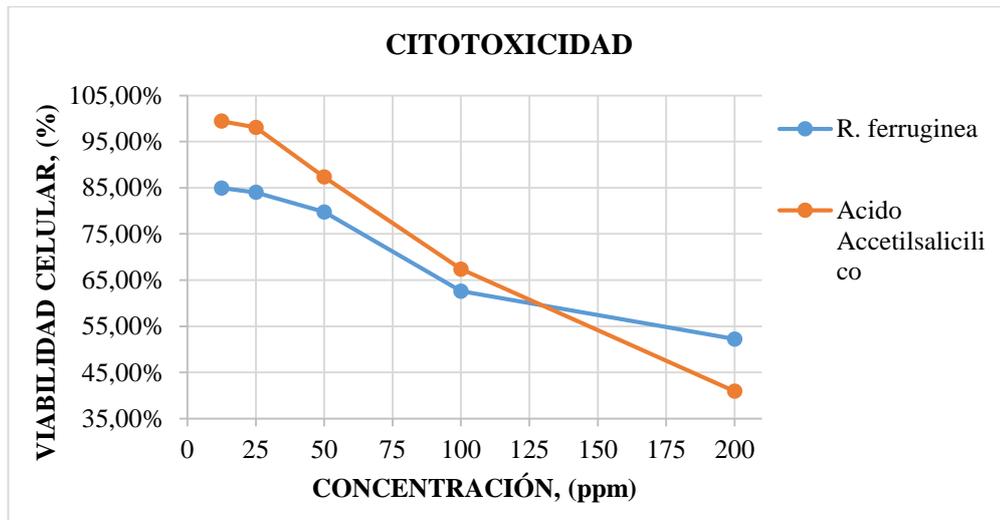
### 3.9. Citotoxicidad *in vitro*

Una vez obtenido el extracto hidroalcohólico liofilizado, se analizó con el método colorimétrico que mide la reducción de sales de tetrazolio (WST-1) a formazan por espectrofotometría, con neutrófilos aislados como lo que describen Tan y Berridge. En la tabla 8-3 se observa el porcentaje de viabilidad celular.

**Tabla 16-3:** Porcentaje de actividad citotóxica *in vitro* de *R.ferruginea* y ácido acetilsalicílico.

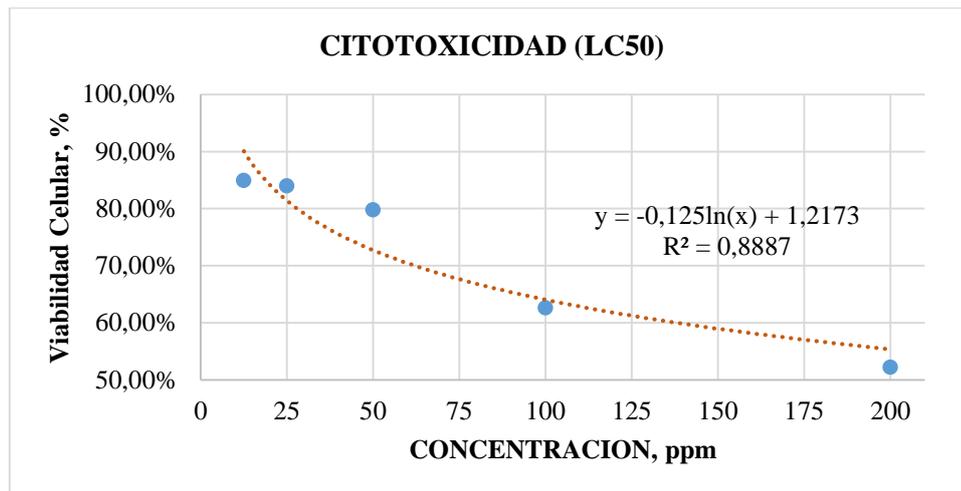
Concentración, ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>R. ferruginea</i>	Ácido Acetilsalicílico
200	52.24 $\pm$ 4.43	40.93 $\pm$ 2.01
100	62.60 $\pm$ 4.09	67.37 $\pm$ 1.55
50	79.77 $\pm$ 1.12	87.34 $\pm$ 0.78
25	84.00 $\pm$ 3.78	98.10 $\pm$ 0.91
12.5	84.96 $\pm$ 5.58	99.45 $\pm$ 0.69

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018



**Gráfico 7-3:** Porcentaje de viabilidad celular extracto liofilizado de *R. ferruginea* y el ácido acetilsalicílico con diferentes concentraciones.

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018



**Gráfico 8-3: Curva de concentración letal media de la citotoxicidad para el extracto hidroalcohólico liofilizado de *R. ferruginea*, determinando en el eje de la “X” las concentraciones en ppm vs la viabilidad celular en porcentaje.**

Elaborado por: Ebelin Inca, 2018

Se observa en el gráfico 7-3 una comparación de la citotoxicidad entre los resultados expresados como porcentaje de viabilidad celular del extracto de *R. ferruginea* liofilizado con el ácido acetilsalicílico, demostrando menor viabilidad celular (mayor citotoxicidad) del extracto con respecto al ácido acetilsalicílico, aun cuando las concentraciones utilizadas son las mismas.

Cada uno de los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa SPSS 23 mediante un diseño completamente aleatorio, el test de ANOVA de un factor para saber si existe o no diferencias entre el porcentaje de viabilidad celular con las concentraciones del extracto. Primeramente, se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Levene, para constatar si cumplen los datos con los fundamentos de estos métodos de la estadística paramétrica, homogeneidad de varianzas, distribución normal.

Para el resultado del test de Kolmogorov-Smirnov, se obtuvo un nivel de significancia de  $p > 0,05$  como se demuestra en el (Gráfico 1 G) Por lo cual, se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ) que verifica que no presenta diferencias significativas en la actividad citotóxica, de esta manera se concluye que los datos presentan una distribución normal. Mientras que, en el test de Levene presenta un valor mayor a 0,05 (Gráfico 2 G), lo que demuestra que no existen diferencias significativas entre cada uno de los grupos de datos obtenidos en este estudio, ya que poseen una variabilidad similar (equivalente).

Una vez cumplido con los requisitos de la estadística paramétrica se analizaron los datos con el test de ANOVA de un factor para identificar si existen diferencias significativas en los diferentes casos como se muestra en el (Gráfico 3 G), nos indica un “p” con un valor de cero, de tal manera que se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, donde nos dice que si hay

diferencias significativas entre los diferentes grupos de concentración y la viabilidad celular. Finalmente se analizó los datos con el test de Tukey como se muestra en el (Grafico 4 G) De comparación múltiple, indicando una significancia menor a 0.05 para las concentraciones de 200 y 100 ppm, mientras que, las concentraciones de 50, 25 y 12.5 presentan un nivel de significancia superior al 0.05 entre sí, con lo cual aceptamos la hipótesis nula donde se expresa que no existen diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad celular al relacionar estos grupos de concentraciones.

Se detalla en la tabla 8-3 que a la máxima concentración (200 ppm) el porcentaje de viabilidad celular para el ácido acetilsalicílico es de  $40.93 \pm 2.01$ ; mientras que, para el extracto liofilizado presenta un valor de  $52.24 \pm 4.43$ . Se observó que el extracto de *R.ferruginea* liofilizado presenta una mayor viabilidad celular con respecto al ácido acetilsalicílico. Sin embargo, a la concentración más baja (12.5 ppm) el ácido acetilsalicílico presenta mayor viabilidad celular que el extracto.

En el gráfico 8-3 se detalla la curva de concentración letal media de la actividad citotóxica para el extracto liofilizado, presentando un valor de 310.57 ppm para alcanzar la LC50. Por ende, se requiere de pequeñas concentraciones para alcanzar el 50% de citotoxicidad.

En la ESPOCH se realizó el estudio de la especie vegetal *Oreocallis grandiflora* (Proteaceae) por la señorita Martha Yanza, donde se evaluó la actividad antiinflamatoria y citotóxica. Al comparar los resultados de esta investigación experimental se concluye que los valores obtenidos son similares, ya que estos especímenes pertenecen a la misma familia.

## CONCLUSIONES

- Una vez que se ha desarrollado el control de calidad tanto del extracto hidroalcohólico como de la droga cruda se concluyó que cada uno de los parámetros de calidad tienen uniformidad es decir que están dentro de los límites establecidos como lo indica la Real Farmacopea Española. Los metabolitos secundarios representativos, en el tamizaje fitoquímico son azúcares reductores, fenoles, flavonoides, cumarinas, y alcaloides presentes en las hojas de *R. ferruginea*. De igual forma en el extracto acuoso se identificó la presencia de compuestos como flavonoides, azúcares reductores, alcaloides y polisacáridos mientras que en el extracto etanólico se presentaron compuestos como alcaloides, cumarinas, aminoácidos, quinonas, flavonoides, fenoles y azúcares reductores
- Se obtuvieron valores de fenoles totales de  $856.71 \pm 13.38$  mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto, representando el 85.67% del extracto liofilizado y flavonoides totales con un valor de  $187.71 \pm 1.24$  como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto, representando el 18.77% del extracto liofilizado, cuantificados por espectrofotometría por métodos colorimétricos.
- Se comprobó que el extracto hidroalcohólico de *R. ferruginea* presenta un potencial interesante para captar radicales libres de DPPH (actividad antioxidante), ya que a su máxima concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  capta el 92.94% de DPPH. Esto ocurre debido a que el espécimen se recolectó en una zona elevada (1451m.s.n.m.), lo cual favorece la síntesis de compuestos fitoquímicos necesarios para adaptarse a este ambiente, especialmente los compuestos fenólicos y flavonoides responsable de la actividad antioxidante.
- Se determinó la capacidad anti-inflamatoria del extracto hidroalcohólico de *R. ferruginea* a diferentes concentraciones, la misma que presento un alto porcentaje de inhibición inflamatoria a 200ppm siendo superior al ácido acetilsalicílico. El porcentaje de inhibición inflamatoria para el extracto varía entre valores de 18-97%.
- La actividad citotóxica permitió conocer la viabilidad celular del extracto a diferentes concentraciones, presentando valores de 52.24 a la mínima concentración (12.5 ppm) y 84.96% a la máxima concentración (200 ppm). Sin embargo, en comparación con el ácido acetilsalicílico, *R. ferruginea* presenta menor citotoxicidad, ya que la viabilidad celular del ácido acetilsalicílico oscila entre 40.93-99.45%.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio in vivo evaluando la actividad antiinflamatoria ya que presenta excelentes resultados en los ensayos in vitro.
- Se recomienda aislar y cuantificar los diversos componentes fitoquímicos que se encuentra en la plantan, para poder determinar con exactitud el compuesto químico responsable de la actividad antiinflamatoria.
- Se recomienda a futuros investigadores evaluar la actividad antioxidante de *R. ferruginea* ya que presenta un alto contenido de flavonoides y fenoles por otros métodos diferentes al de DPPH.
- Se recomienda realizar más estudios científicos de la familia de las Proteaceae, ya que presentan gran cantidad de compuestos fitoquímicos útiles para el campo de la salud.

## BIBLIOGRAFÍA

**Aguire, L.**, *Mecanismos de la inflamación.* [En línea] Santiago-Chile: colección 2009. Consultado el 20 de Junio del 2018. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/3844/JaimesBarretoJuanJose2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**Alhakmanient, F., Khan, S. & Ahmad, A.** Determination of total phenol, in vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of seeds and fruits of *Ziziphus spina-christi* grown in Oman 2014. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), pp. 656-660.

**American college**, [En línea] Madrid - España: Consultado el 23 de Junio del 2018. Disponible en: [https://www.austinregionalclinic.com/templates/ARC/Assets/acute-inflammation\\_sp.pdf](https://www.austinregionalclinic.com/templates/ARC/Assets/acute-inflammation_sp.pdf)

**Arango, S.** *Plantas medicinales en el Ecuador. Quito-Ecuador* [En línea] Consultado el 29 de Junio del 2018. Disponible en: <http://www.mobot.org/plantscience/ccsd/Publication%20Articles/GuiaMedicinales.pdf>

**Barreno, P.** *Inflamación. Santiago-Chile:* [En línea] Consultado el 7 de Julio del 2018. Disponible en: Available at: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>

**Berridge, M., Tan, A., McCoy, K. & Wang, R. U.**, 2008. The Biochemical and Cellular Basis of cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Clinical*, Issue 4, pp. 14-19.

**Borges, A.** *Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares.* [En línea] Quito-Ecuador Consultado el 5 de Julio del 2018. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/finlay/finlay-2015/finlay151f.pdf>

**Borrero, I.** *Estudios de actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica.* [En línea] Washington - USA: Scholarly Publishing, 2011. Consultado el 16 de Julio del 2018. Disponible en: <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/48601/BORRERO%20GIR%C3%93N%2C%20IRENE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Bullón, A.** *Historia de la inflamación*. Madrid - España: Diseño ISBN, 2012, pp .12-23.
- Choudhary , M. I. & Jalil, S.** Bioactive phenolic compounds from a medical lichen *Usnea longissima* 2005. *Phytochemistry (Elsevier)* , Issue 66, pp. 2346-2350.
- Colbert, D.** *Como reinvertir la inflamación*. Madrid- España. 2005, pp. 33-49
- Cortéz, M.** *Inflamación aguda*. [En línea] *Publicaciones Esther*, 2009. Consultado el 17 de Julio del 2018. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci_arttext)
- Cruz, E. S.,** *Familia Protogae*. [En línea] Available at: <http://plantasdepulan.blogspot.com/2012/08/familia-proteaceae.html>
- Cuba, M. & Paz, E.,** 2011. *Riqueza, uso y origen de las plantas medicinales*. [En línea].
- Eladi, J.** *Farmacología*. Madrid-España 2014, pp. 38-40
- Enciso, E. & Arroyo , J.** *Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides*. [En línea] Consultado el 17 de Julio del 2018. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v72n4/a02v72n4>
- Fernández, P.** *Herbarium Mutisianum*. Madrid-España: CSIC 2012, pp. 33-49 .
- Fonnegra, R.,** . *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Medellín- Colombia: Universidad de Antioquia 2011, pp. 22-24
- García, A., Morón , F., García , A. & Morón , F.** *Plantas medicinales en revistas científicas de Cuba colonial y neocolonial*. *Publicaciones Estir 2014*. Madrid-España 2014, pp. 40-50
- García, J. & Salcedo , A.** *Conocimiento y uso de las plantas medicinales*. Madrid-España 2012 , pp. 40-50
- Gómez, E.** *Actividad antiinflamatoria de productos naturales*. [En línea], 2013 Consultado el 17 de Julio del 2018. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85618379003.pdf>
- Gutierrez, L.** *Revisión de las especies colombianas del género panopsis*. Medellín-Colombia. 2015 , pp. 40-50
- Harling, G.** *Flora of Ecuador*. Berlín : Department of Systematic Botany. Santiago-Chile.2013 , pp. 40-50

**Jaimes, J.** *Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria.* [En línea] 2011. Consultado el 21 de Julio del 2018. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/3844/JaimesBarretoJuanJose2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**León, L.**, Respuesta inflamatoria aguda consideraciones bioquímicas y celulares. *Scielo* 2014, pp. 28-32.

**Lima, S. & Días, R.** *Representación y usos de las plantas medicinales en mayores.* [En línea]. 2014. Consultado el 21 de Julio del 2018. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/3844/JaimesBarretoJuanJose2009.pdf>

**Malgor, V.** *Medicamentos Antiinflamatorios.* [En línea] 2014. Consultado el 21 de Julio del 2018. Disponible en: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/BERMUDEZ%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/BERMUDEZ%20(1).pdf)

**Miranda, M.**, 2006. *Farmacognosia y productos naturales: Normas Ramales de frogas crudas y extractos y tinturas.* Sexta ed. La Habana: s.n.

**Montealegre, A.** *Actividad antiinflamatoria y antioxidante de Bauhinia kalbreyeri.* 2016. Consultado el 24 de Julio del 2018. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962012000400006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000400006)

**Montealegre, P.** *Actividad antiinflamatoria y antioxidante de Bauhinia Kalbreyeri Harms.* Lima-Perú 2013 : ISBN.

**Morales, R. & Paloma, B.**, *Historia de la investigación botánica en España.* 2014 Consultado el 21 de Julio del 2018. Disponible en: <http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/pubinv/RMV/380Cap4PLANTA SSILVESTRES.pdf>

**Morales, M.** *Botánica economía de los Andes Centrales.* Medellín- Colombia 2014: Univesidad de San Andrés.

**Moya, E.** *Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica in vitro de los extractos vegetales.* Madrid - España 2017. [En línea] Consultado el 26 de Julio del 2018. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26010/1/BQ%20128.pdf>

**Muriel, P.** *Etnobotánica en los Andes del Ecuador.* Berlín-Alemania: 2013, pp.34-56

**Nágera, J.** *El mundo de la naturaleza tropical.* San José- Costa Rica, 2014 : Universidad Adistancia San José.

- Noreica, K.** *Procesos de inflamación*. Madrid- España, 2015, pp. 43-56
- Ocegueda, S.** *Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica*. Lima-Perú, 2013, pp. 23-31
- Palma, M.** Inflamación y respuesta inmune innata: participación de las lipoproteínas de alta densidad. Santiago - Chle, 2014, 2(14).
- Peñarrieta, M., Mollinedo, L. & Bravo, J.** Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Bolivariana de Química 2014*, Issue 2, pp. 123-131.
- Pérez, I.** *Las plantas medicinales*. Lima- Perú, 2014 pp. 23-31
- Porrás, A.** *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. Madrid- España, 2014. [En línea]  
Consultado el 26 de Julio del 2018. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porrás-Loaiza-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porrás-Loaiza-et-al-2009.pdf)
- Quattochi, U.** . *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants*. California- USA: Taylor y Francis Group, 2013 pp. 41-52
- Rapaso, R., Borrelli, F., Longo, R. & Cappaso, F.** *Farmaconosia applicate Controllo di qualita delle droghe vegetali*. 1° Edición. Edited by . ed, 2011.Italia : Editorial S. Simón Verlag . pp. 16-32
- Ruiz, E.** *La plantas medicinales en el mundo*. Medellín- Colombia, 2012: Editorial ISBN, pp. 26-35
- Sears, B.** *La inflamación silenciosa*. San José-Costa Rica, 2015: URANO, pp. 26-35
- Solbring, O.** *Biodiversity and Savanna Ecosystem Processes: A Global Perspective*. Madrid-España 2013 : Global perspective . pp. 26-35
- Soto, M.** *Bioclimatología de Flora de veracruz*. Santiago-Chile,2011 [En línea]  
Consultado el 13 de Agosto del 2018. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/258499073\\_Familia\\_Proteaceae](https://www.researchgate.net/publication/258499073_Familia_Proteaceae)
- Toledo, C.** *Inflamación, mediadores químicos*. Madrid - España, 2015. [En línea]  
Consultado el 23 de Agosto del 2018. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400005&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400005&script=sci_arttext)
- Towle, M.** *The Ethnobotany of Pre-Columbian*. Lima-Perú, 2011: Publicaciones Ríos, . pp. 26-35

**Tuñón , M. & Jorge , G..** *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.* San José-Costa Rica, 2013. Consultado el 26 de Agosto del 2018. Disponible en: [En línea] <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>

**Vásques, R.** *Flórula de las reservas biológicas de Iquitos.* Madrid - España, 2014: Mayorga, pp. 26-35

**Vega, G.** *Inflamación.* Madrid - España, 2016: [En línea] Consultado el 26 de Agosto del 2018. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un085k.pdf>

**Vega, R. .** *Evaluación del efecto antiinflamatorio.* Medellín - Colombia, 2015 [En línea] Consultado el 26 de Agosto del 2018. Disponible en: Available at: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4\\_1\\_99/pla03199.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_1_99/pla03199.pdf)

**Villalva, E.** *Bases moleculares de la inflamación.* Medellín - Colombia, 2016 [En línea] Consultado el 30 de Agosto del 2018. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci_arttext)

**Vinueza , D., López , E. & Acosta , K.** Assessment of anti-inflammatory activity and cytotoxicity of freeze dried HYDROALCOHOLIC EXTRACT of bidens andicola on isolated neutrophils, 2017. *NNovare Academic Sciences* , 10(6), pp. 8-12.

## ANEXOS

**Anexo A:** Materia prima vegetal de *Roupala ferruginea* Kunth



**Anexo B:** Control de calidad de la droga vegetal

**Gráfico 1 A**



**Gráfico 2 A**



**Gráfico 3 A**



**Anexo C: Control de calidad del extracto alcohólico**

**Gráfico 1 C**



**Gráfico 2 C**



**Gráfico 3 C**



**Anexo D:** Extracto hidroalcohólico liofilizado de *Roupala ferruginea* Kunth.

**Gráfico 1 D**



**Gráfico 2 D**



**Gráfico 3 D**

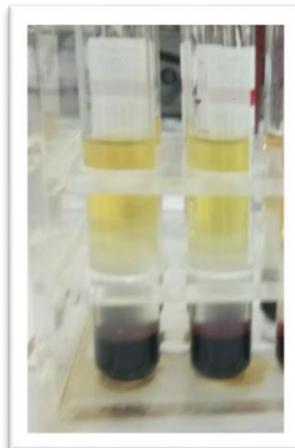


**Anexo E:** Actividad antiinflamatoria y citotóxica

**Gráfico 1 E**



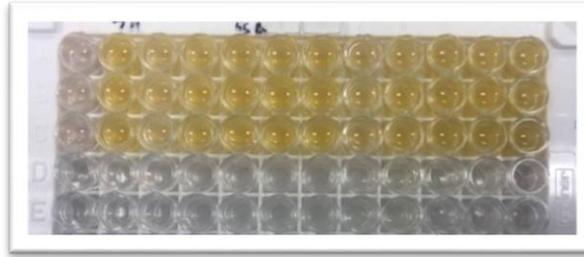
**Gráfico 2 E**



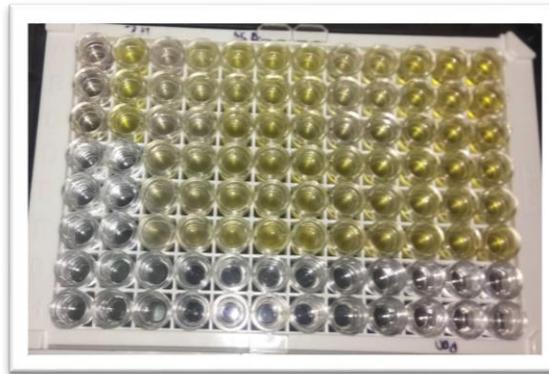
**Gráfico 3 E**



**Gráfico 4 E**



**Gráfico 5 E**



**Anexo F: Antiinflamatorio**

**Gráficos 1 F Comparaciones múltiples**

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

		INH_INF L
N		15
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	57,5253
	Desviación estándar	29,16944
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,156
	Positivo	,156
	Negativo	-,134
Estadístico de prueba		,156
Sig. asintótica (bilateral)		,200 <sup>c,d</sup>

a. La distribución de prueba es normal.

b. Se calcula a partir de datos.

c. Corrección de significación de Lilliefors.

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

**Gráfico 2 F: Prueba de muestras independientes**

**Prueba de muestras independientes**

	Prueba de Levene de calidad de varianzas	prueba t para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
INHIBICION_ INFLAMATORIA	Se asumen varianzas iguales	1,329	,259	-2,869	27	,008	-26,77614	9,33172	-45,92325	-7,62903
	No se asumen varianzas iguales			-2,847	24,912	,009	-26,77614	9,40534	-46,15026	-7,40203

**Gráfico 3F: Análisis ANOVA de un factor para el ensayo de inhibición inflamatoria**

**ANOVA**

INHIBICION\_INFLAMATORIA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	15156,359	4	3789,090	12,878	,000
Dentro de grupos	7061,270	24	294,220		
Total	22217,629	28			

**Gráfico 4 F: Comparaciones múltiples Inhibición inflamatoria**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: INHIBICION\_INFLAMATORIA

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD	200	100	21,12167	10,38655	,281	-	51,7208
		50	36,17167*	10,38655	,015	5,5726	66,7708
		25	54,81333*	10,38655	,000	24,2142	85,4124
		12,5	65,55500*	10,38655	,000	34,9559	96,1541
Tuke	100	200	-21,12167	10,38655	,281	-	51,7208

	50		15,0500			-		44,225
			0	9,90319	,56	14,125	1	1
	25		33,6916		,01			62,866
			7*	9,90319	8	4,5166	8	8
	12,5		44,4333		,00	15,258		73,608
			3*	9,90319	1	2	4	4
50	200		-	10,3865	,01	-	-	-
			36,1716	5	5	66,770	5,5726	8
			7*					
	100		-		,56	-		14,125
			15,0500	9,90319	0	44,225	1	1
			0					
	25		18,6416		,35	-		47,816
			7	9,90319	3	10,533	8	8
						4		
	12,5		29,3833		,04			58,558
			3*	9,90319	8	,2082	4	4
25	200		-	10,3865	,00	-	-	-
			54,8133	5	0	85,412	24,214	4
			3*				2	
	100		-		,01	-		-
			33,6916	9,90319	8	62,866	4,5166	8
			7*					
	50		-		,35	-		10,533
			18,6416	9,90319	3	47,816	4	8
			7					
	12,5		10,7416		,81	-		39,916
			7	9,90319	3	18,433	8	8
						4		
12,5	200		-	10,3865	,00	-	-	-
			65,5550	5	0	96,154	34,955	1
			0*				9	

100	-	44,4333	9,90319	,00	-	-
	3*			1	73,608	15,258
50	-	29,3833	9,90319	,04	-	-
	3*			8	58,558	-,2082
25	-	10,7416	9,90319	,81	-	18,433
	7			3	39,916	4
					8	

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

**Gráfico 5 F: Inhibición inflamatoria**

**INHIBICION\_INFLAMATORIA**

	CONCENTRACIONE	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
	S		1	2	3	4
HSD Tukey <sup>a,b</sup>	12,5	6	11,9250			
	25	6	22,6667			
	50	6	41,3083	41,3083		
	100	6		56,3583	56,3583	
	200	5			77,4800	
	Sig.			,054	,578	,256
TukeyB <sup>a,b</sup>	12,5	6	11,9250			
	25	6	22,6667	22,6667		
	50	6		41,3083	41,3083	
	100	6			56,3583	56,3583
	200	5				77,4800

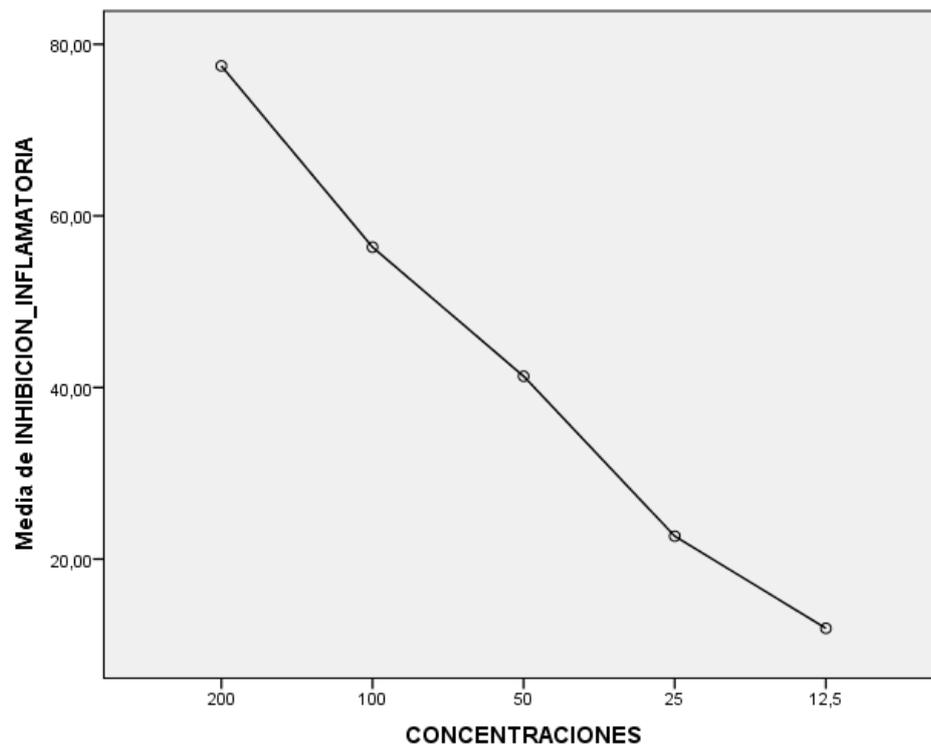
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,769.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

**Gráfico 6 F: Concentraciones inhibición inflamatoria**



**Anexo G: Citotóxico**

**Gráfico 1 G: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

		VIAB_CE
		L
N		15
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	72,4493
	Desviación estándar	14,29561
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,266
	Positivo	,108
	Negativo	-,266
Estadístico de prueba		,266
Sig. asintótica (bilateral)		,005 <sup>c</sup>

a. La distribución de prueba es normal.

b. Se calcula a partir de datos.

c. Corrección de significación de Lilliefors.

**Gráfico 2 G: Prueba de muestras independientes**

**Prueba de muestras independientes**

	Prueba de Levene de calidad de varianzas	prueba t para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
VIABILIDAD_CELULAR	Se asumen varianzas iguales	5,983	,021	,669	27	,509	4,72290	7,05694	-9,75675	19,20256
R	No se asumen varianzas iguales			,681	23,062	,503	4,72290	6,93764	-9,62655	19,07236

**Gráfico 3 G: Análisis ANOVA de un factor para el ensayo de inhibición inflamatoria**

**ANOVA**

VIABILIDAD\_CELULAR

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	8913,959	4	2228,490	54,331	,000
Dentro de grupos	984,414	24	41,017		
Total	9898,374	28			

**Gráfico 4 G: Comparaciones múltiples**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: VIABILIDAD\_CELULAR

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey y	200	100	-20,27033*	3,87810	,000	-31,6953	-8,8453
		50	-38,84033*	3,87810	,000	-50,2653	-27,4153
		25	-45,51700*	3,87810	,000	-56,9420	-34,0920
		12,5	-48,30533*	3,87810	,000	-59,7303	-36,8803
	100	200	20,27033*	3,87810	,000	8,8453	31,6953
		50	-18,57000*	3,69762	,000	-29,4633	-7,6767
		25	-25,24667*	3,69762	,000	-36,1400	-14,3534
		12,5	-28,03500*	3,69762	,000	-38,9283	-17,1417
	50	200	38,84033*	3,87810	,000	27,4153	50,2653

	100	18,5700 0*	3,6976 2	,00 0	7,6767	29,463 3
	25	-6,67667	3,6976 2	,39 4	- 17,570	4,2166 0
	12,5	-9,46500	3,6976 2	,11 0	- 20,358	1,4283 3
25	200	45,5170 0*	3,8781 0	,00 0	34,092 0	56,942 0
	100	25,2466 7*	3,6976 2	,00 0	14,353 4	36,140 0
	50	6,67667	3,6976 2	,39 4	- 4,2166	17,570 0
	12,5	-2,78833	3,6976 2	,94 1	- 13,681	8,1050 6
12,5	200	48,3053 3*	3,8781 0	,00 0	36,880 3	59,730 3
	100	28,0350 0*	3,6976 2	,00 0	17,141 7	38,928 3
	50	9,46500	3,6976 2	,11 0	- 1,4283	20,358 3
	25	2,78833	3,6976 2	,94 1	- 8,1050	13,681 6

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

**Gráfico 5 G: Comparaciones múltiples**

**VIABILIDAD\_CELULAR**

	CONCENTRACIONE	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD Tukey <sup>a,b</sup>	200	5	44,7180		
	100	6		64,9883	
	50	6			83,5583
	25	6			90,2350
	12,5	6			93,0233
	Sig.			1,000	1,000
TukeyB <sup>a,b</sup>	200	5	44,7180		
	100	6		64,9883	
	50	6			83,5583
	25	6			90,2350
	12,5	6			93,0233

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,769.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

**Gráfico 6 G: concentraciones**

