



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS ACUOSOS COMBINADOS DE *Ilex guayusa* (Loes), *Vernonanthura patens* (Kunth) y *Theobroma cacao* (Linneo) EN MODELO ANIMAL RATA (*Rattus norvegicus*)”.

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: Proyecto de investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: LISSETHY DEL PILAR VALVERDE ZUMBA

TUTORA: DRA. SUSANA ABDO LÓPEZ

Riobamba-Ecuador

2019

© 2019, Lissethy del Pilar Valverde Zumba

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica: El trabajo de Titulación Tipo: Proyecto de investigación, “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS ACUOSOS COMBINADOS DE *Ilex guayusa* (Loes), *Vernonanthura patens* (Kunth) y *Theobroma cacao* (Linneo) EN MODELO ANIMAL RATA (*Rattus norvegicus*)**”, de responsabilidad de la señorita Lissethy del Pilar Valverde Zumba, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dra. Susana del Pilar Abdo López

**DIRECTORA DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Lcda. Karen Lisseth Acosta León

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, LISSETHY DEL PILAR VALVERDE ZUMBA 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

Lissethy del Pilar Valverde Zumba

160050658-6

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a Dios, por ser la fuente de esperanza de días mejores.

A Blanchita mi querida y siempre recordada abuelita que desde el cielo está bendiciéndome, gracias por ser mi apoyo cuando las cosas se ponían difíciles.

A mi papito Víctor, que fue mi ejemplo de perseverancia y trabajo arduo, sus enseñanzas las llevo en el corazón.

A mi querida Mamita Pilar que sin su apoyo y dedicación no hubiese logrado culminar mi carrera, mi ejemplo de fortaleza, valentía y alegría ante las adversidades, siempre alentándome a seguir adelante a pesar de los obstáculos en el camino. ¡Madre te adoro!

A mis hermanos Jean y Jair por ser mis cómplices en todas mis locuras, por darme alas para seguir mi sueño. Los amo hermanitos.

A mi tía Nancy por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo, cariño y comprensión.

A todos mis maestros que me enseñaron tanto durante el transcurso de la carrera desde lo científico hasta lo humano.

Lisse

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento más profundo a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por haber sido un soporte fundamental en mi formación profesional.

Al personal de los laboratorios de Productos Naturales, Análisis instrumental, Análisis clínicos y Bioterio, por haberme ayudado en todo el proceso de investigación.

A mi directora de tesis Dra. Susana Abdo López, a la Lcda. Karen Acosta y BQF. Diego Vinueza M. Sc., por guiarme en todo el desarrollo del trabajo de investigación.

A mi familia por haber sido mi apoyo incondicional en todo momento.

A mis compañeros que supieron compartir sus conocimientos y experiencias para que este trabajo de investigación se realiza de buena manera.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
PAF	Factor activador de plaquetas
IgE	Inmunoglobulina E
ADP	Adenosín difosfato
COX	Ciclooxigenasa
CONASA	Consejo Nacional de Salud
PGE1	Prostaglandina E1
PGE2	Prostaglandina E2
AA	Ácido araquidónico
IL	Interleucina
TNF	Factor de necrosis tumoral
INF	Interferón
NO	Óxido nítrico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
OMS	Organización mundial de la salud
SNC	Sistema nervioso central
DIC	Coagulación intravascular diseminada
PCR	Proteína C reactiva
SAA	Proteína amiloide A sérica
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
MAC	Complejo de ataque de membrana
DCA	Diseño completamente al azar
BCG	Verde de bromocresol
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EQ	Equivalentes de quercetina
EA	Equivalentes de atropina

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	x
SUMARY.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Inflamación	5
1.1.1. Inflamación aguda.....	6
1.1.1.1. <i>Signos cardinales de la inflamación aguda.....</i>	6
1.1.1.2. <i>Etapas de la inflamación aguda.....</i>	7
1.1.1.3. <i>Mediadores inflamatorios.....</i>	8
1.1.2. Inflamación crónica.....	16
1.1.3. Efectos sistémicos de la inflamación.....	17
1.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	19
1.2.1. Clasificación de los AINEs.....	19
1.2.2. Mecanismo de acción.....	21
1.2.3. Efectos adversos.....	21
1.2.4. Diclofenaco sódico.....	22
1.3. Plantas con actividad antiinflamatoria.....	23
1.3.1. Introducción.....	23
1.3.2. <i>Ilex guayusa</i> Loes.....	25
1.3.2.1. <i>Taxonomía.....</i>	25
1.3.2.2. <i>Descripción, origen y distribución.....</i>	25
1.3.2.3. <i>Morfología.....</i>	26
1.3.2.4. <i>Usos etnobotánicos.....</i>	26
1.3.2.5. <i>Composición química de la hoja de <i>Ilex guayusa</i> L.....</i>	27
1.3.3. <i>Vernonanthura patens</i> (Kunth) H. Rob.....	28
1.3.3.1. <i>Taxonomía.....</i>	28
1.3.3.2. <i>Descripción, origen y distribución.....</i>	28
1.3.3.3. <i>Morfología.....</i>	29
1.3.3.4. <i>Usos etnobotánicos.....</i>	30
1.3.3.5. <i>Composición química de la hoja de <i>Vernonanthura patens</i> K.....</i>	30
1.3.4. <i>Theobroma cacao</i> Linneo.....	31
1.3.4.1. <i>Taxonomía.....</i>	31

1.3.4.2.	<i>Descripción, origen y distribución</i>	31
1.3.4.3.	<i>Morfología</i>	32
1.3.4.4.	<i>Usos etnobotánicos</i>	33
1.3.4.5.	<i>Compuestos en Theobroma cacao L.</i>	34
1.4.	Sinergismo y términos relacionados	34
1.5.	Metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria	35
1.5.1.	Fenoles	35
1.5.1.1.	<i>Flavonoides</i>	36
1.5.1.2.	<i>Taninos</i>	38
1.5.2.	Alcaloides	39
1.6.	Modelo animal	39
1.6.1.	El reactivo biológico	40
1.6.2.	Principio de las tres Rs	40
1.7.	Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	41
1.7.1.	Taxonomía	41
1.7.2.	Características Generales	41
1.7.3.	Características Reproductivas	43
1.8.	Vías de administración	43
1.9.	Modelos de evaluación de efecto antiinflamatorio in vivo	45
1.9.1.	Modelo de inducción de edema subplantar por carragenina	45
1.9.2.	Carragenina	46
1.10.	DCA (Diseño completamente aleatorio)	47
CAPÍTULO II		
2.	MARCO METODOLÓGICO	48
2.1.	Lugar y factores de investigación	48
2.2.	Materiales, equipos y reactivos	49
2.2.1.	Materia prima	49
2.2.2.	Reactivo biológico	49
2.2.3.	Equipos	50
2.2.4.	Materiales de laboratorio	50
2.2.5.	Reactivos	51
2.3.	Métodos y técnicas	51
2.3.1	Control de calidad de droga cruda	51
2.3.1.1.	<i>Cenizas totales</i>	51
2.3.1.2.	<i>Cenizas solubles en agua</i>	52
2.3.1.3.	<i>Cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	52

2.3.1.4.	<i>Humedad</i>	53
2.3.1.5.	<i>Tamizaje fitoquímico</i>	54
2.3.2.	<i>Obtención de los extractos blandos de Ilex guayusa, Vernanthura patens y Theobroma cacao</i>	54
2.3.3.	<i>Control de calidad de los extractos blandos de Ilex guayusa, Vernanthura patens y Theobroma cacao</i>	55
2.3.3.2.	<i>Descripción organoléptica</i>	55
2.3.3.3.	<i>Control de calidad físico-químico</i>	55
2.4.	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos combinados de Ilex guayusa, Vernanthura patens y Theobroma cacao	59
2.4.1.	<i>Preparación de los extractos acuosos</i>	59
2.4.2.	<i>Modelo experimental y población de prueba</i>	59
2.4.3.	<i>Protocolo farmacológico</i>	61
2.5.	Análisis estadístico	64
2.5.1.	<i>Planteamiento de hipótesis</i>	64
 CAPÍTULO III		
3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	65
3.1.	Control de calidad de droga cruda	65
3.1.1.	<i>Parámetros físicos: Cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico</i>	65
3.1.2.	<i>Parámetros químicos: Tamizaje fitoquímico</i>	67
3.2.	Rendimiento de extractos blandos	68
3.3.	Control de calidad de los extractos blandos	69
3.3.1.	<i>Descripción organoléptica</i>	69
3.3.2.	<i>p H</i>	70
3.3.3.	Cuantificación de metabolitos secundarios	71
3.3.3.1.	<i>Fenoles totales</i>	71
3.3.3.2.	<i>Flavonoides</i>	72
3.3.3.3.	<i>Alcaloides totales</i>	73
3.4.	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos combinados de Ilex guayusa, Vernanthura patens y Theobroma cacao	74
3.5.	Análisis estadístico	79
3.5.1.	<i>Prueba ANOVA</i>	79
3.5.2.	<i>Test de Tukey</i>	80
CONCLUSIONES		81

RECOMENDACIONES.....83

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda.....	15
Tabla 2-1:	Clasificación de los AINEs según su estructura química.....	20
Tabla 3-1:	Taxonomía de <i>Ilex guayusa</i> L.....	25
Tabla 4-1:	Taxonomía del <i>Vernonanthura patens</i> (Kunth) H. Rob.....	28
Tabla 5-1:	Taxonomía del <i>Theobroma cacao</i> L.....	31
Tabla 6-1:	Taxonomía de <i>Rattus norvegicus</i>	41
Tabla 7-1:	Parámetros biológicos básicos.....	42
Tabla 8-1:	Volúmenes máximos según las vías de administración.....	44
Tabla 1-2:	Evaluación de actividad antiinflamatoria de extractos acuosos combinados a distintas dosis.....	60
Tabla 2-2:	Denominación de los grupos.....	61
Tabla 3-2:	Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	63
Tabla 1-3:	Resultados de parámetros físicos de calidad de droga cruda.....	65
Tabla 2-3:	Resultados del tamizaje fitoquímico.....	67
Tabla 3-3:	Resultados del rendimiento de los extractos blandos.....	68
Tabla 4-3:	Parámetros de calidad organolépticos.....	69
Tabla 5-3:	Resultado de medición de pH.....	70
Tabla 6-3:	Resultados de la cuantificación de fenoles totales.....	71
Tabla 7-3:	Resultados de la cuantificación de flavonoides.....	72
Tabla 8-3:	Resultados de la cuantificación de alcaloides totales.....	73
Tabla 9-3:	Diámetros de inflamación (mm).....	74
Tabla 10-3:	Prueba ANOVA unifactorial (tratamientos).....	79

Tabla 11-3: Prueba ANOVA unifactorial (tiempo).....	79
Tabla 12-3: Test de Tukey de los distintos tiempos de medición.....	80

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Variaciones de los diámetros de inflamación en función del tiempo para la combinación 1.....	75
Gráfico 2-3: Variaciones de los diámetros de inflamación en función del tiempo para las combinaciones 2, 3 y 4.....	76
Gráfico 3-3: Comparación de los porcentajes de inhibición 24 horas después de la inducción de la patología entre los distintos tratamientos.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Etapa vascular de la inflamación aguda.....	7
Figura 2-1: Derivados del ácido araquidónico.....	10
Figura 3-1: Efectos del óxido nítrico.....	11
Figura 4-1: Clasificación de las quimiocinas.....	13
Figura 5-1: Papel de los macrófagos en la inflamación crónica.....	17
Figura 6-1: Escalera analgésica de la OMS.....	19
Figura 7-1: <i>Ilex guayusa</i> L.....	26
Figura 8-1: <i>Vernonanthura patens</i> (Kunth) H. Rob.....	29
Figura 9-1: <i>Theobroma cacao</i> L.....	33
Figura 10-1: <i>Rattus norvegicus</i>	42
Figura 11-1: Algunas vías de administración en ratas: A) Vía oral; B) Vía intravenosa; C) Vía intraperitoneal.....	44
Figura 12-1: Estructura química de los distintos tipos de carragenina.....	46

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Control de calidad de la droga cruda. Determinaciones físicas
- ANEXO B:** Control de calidad de la droga cruda. Tamizaje fitoquímico
- ANEXO C:** Concentración de extractos etanólicos
- ANEXO D:** Control de calidad de los extractos. Medición de pH
- ANEXO E:** Cuantificación de fenoles
- ANEXO F:** Cuantificación de flavonoides
- ANEXO G:** Cuantificación de alcaloides totales
- ANEXO H:** Curva de calibración de alcaloides totales
- ANEXO I:** Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos acuosos combinados *I. guayusa*, *V. patens* y *T. cacao* en modelo animal rata.
- ANEXO J:** Guía de movilización de especies vegetales.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos combinados de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao* para lo cual se utilizó ratas (*Rattus norvegicus*) en las cuales se indujo un edema en la aponeurosis subplantar de la pata izquierda con el uso de carragenina al 1% en solución salina 0,9%. Se utilizaron 21 ratas, hembras y machos distribuidos en 7 grupos; dos hembras y un macho en cada uno con un peso comprendido entre 160-210 g. Se evaluó la actividad de 4 combinaciones de extractos: La combinación 1 (*Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*) fue evaluada en dos dosis (100 mg/kg y 300 mg/kg). Las restantes combinaciones: Combinación 2 (*Ilex guayusa* y *Vernonanthura patens*); Combinación 3 (*Ilex guayusa* y *Theobroma cacao*) y Combinación 4 (*Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*), fueron evaluadas en una dosis de 200 mg/kg. Se usó como vehículo agua destilada y control positivo diclofenaco sódico (150 mg/kg). Se realizaron 7 mediciones desde 30 minutos antes de la inducción de la inflamación hasta 24 horas después. Previamente se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides totales. Los resultados de la actividad antiinflamatoria, expresados como diámetro de inflamación, fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA unifactorial y un test de Tukey. Se concluyó que las combinaciones poseían distintos efectos, siendo la combinación 1 la más efectiva, esto se pudo evidenciar al analizar los porcentajes de inflamación 24 horas después de inducida la patología. La combinación 1 en dosis 100 mg/kg casi igualó el efecto del diclofenaco sódico pero la dosis de 300 mg/kg lo superó. Las combinaciones 2,3 y 4 tuvieron un porcentaje menor. Por esta razón se recomienda evaluar la actividad de la combinación 1 a dosis inferiores a 100 mg/kg y superiores a 300 mg/kg.

PALABRAS CLAVES: <BIOQUÍMICA>, <FARMACOLOGÍA>, <INFLAMACIÓN>,

<GUAYUSA (*Ilex guayusa*)>, <LARITACO (*Vernonanthura patens*)>, <CACAO

(*Theobroma cacao*)>, <Carragenina>, <RATA (*Rattus norvegicus*)>.

SUMMARY

This research work aimed at evaluating anti-inflammatory activity of combined aqueous extracts of *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens*, and *Theobroma cacao* for which rats were used (*Rattus norvegicus*) in which edema in the plantar aponeurosis on the left foot was induced with the use of carrageenan at 1% in saline solution at 0,9%. Twenty-one rats were tested, male and female split into seven groups; two females and a male within each group weighing between 160-210 g. It was tested the activity of four combined extracts. Combination 1 (*Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens*, and *Theobroma cacao*) was assessed in two doses (100mg/kg and 300 mg/kg). The remaining combinations: Combination 2 (*Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens*); Combination 3 (*Ilex guayusa* and *Theobroma cacao*) and Combination 4 (*Vernonanthura patens* and *Theobroma cacao*) were assessed in a dose of 200 mg/kg. Distilled water and positive control diclofenac sodium (150 mg/kg). Seven measurements were carried out from 30 minutes before the carrageenan-induced inflammation to 24 hours later. The quantification of phenolic compounds, flavonoids, and total alkaloids was previously carried out. The results of the anti-inflammatory activity expressed as the diameter of inflammation were statistically analyzed through a one-way ANOVA and Tukey's test. It was concluded that the combinations had different effects, being Combination 1 the most effective, this was witnessed analyzing the percentages of inflammation 24 hours after induced the pathology. Combination 1 in doses 100 mg/kg almost equaled the diclofenac sodium effect but the dose of 300 mg/kg exceeded it. Combinations 2, 3 and 4 had a minor percentage. For this reason, it is recommended to assess Combination 1 activity at lower doses to 100 mg/kg and higher doses to 300 mg/kg.

KEYWORDS: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACOLOGY>, <INFLAMMATION>, <GUAYUSA (*Ilex guayusa*)>, <LARITACO (*Vernonanthura patens*)>, <CACAO (*Theobroma cacao*)>, <Carrageenan>, <RATA (*Rattus norvegicus*)>.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es la respuesta que presenta un tejido cuando se produce una lesión, la cual puede ser causada por agentes físicos, químicos o biológicos. En esta se encuentra involucrados diversos cambios a nivel celular que a su vez dan paso a múltiples sustancias denominadas mediadores (histamina, bradiquininas, prostaglandinas, etc.), los cuales producen vasodilatación, dolor, edema, calor y en algunos casos pérdida de la funcionalidad del área afectada (Enciso & Arroyo, 2011, pp. 231-232)

A nivel mundial, las enfermedades de origen inflamatorio como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), Enfermedades cardiovasculares (ECV), artritis reumatoidea, etc, representan un porcentaje significativo en las tasas de morbilidad y mortalidad (Organización mundial de la salud, 2017).

Actualmente existen muchas alternativas farmacológicas para el tratamiento de la inflamación tanto aguda como crónica. Estos medicamentos, principalmente Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), generan efectos adversos serios, a nivel gastrointestinal, cardiaco, renal y cerebrovascular (Prieto, 2007, pp. 30-32).

Se estima que aproximadamente el 70% de la población mayor de 65 años usa con frecuencia algún AINEs, bajo prescripción médica o sin ella (Machado, et al., 2013, p. 626).

En 2013, se realizó un estudio para evaluar el uso de AINEs en distintos países principalmente asiáticos. En el resultado se evidenció que el medicamento más usado era el diclofenaco (43,4%), seguido del ácido mefenámico (34,7%), naproxeno (28,2%), ibuprofeno (26,6%) y el de menor consumo fue la Indometacina (7,2%) (McGettigan & Henry, 2013).

Esta es la razón por la que constantemente se busca en la naturaleza alguna solución o alternativa al uso de medicamentos producidos por la industria farmacéutica. Por tal motivo, el estudio de actividad antiinflamatoria entre otras actividades biológicas en plantas es un campo en constante crecimiento (Gómez, et al., 2011).

En Ecuador existen 5.172 especies de plantas con alguna utilidad de las cuales 3.118 son medicinales. De estas el 75 % son nativas, el 5% son endémicas y el 11 % son introducidas (De la Torre, et al., 2008).

Las especies vegetales ecuatorianas presentan diversos usos tales como antiinfecciosas (26%), cicatrizantes (17%), antídotos (14%), digestivas (15%), antiinflamatorias (13%), etc (De la Torre, et al., 2008, pp. 106,107,108,109,110).

La población que más hace uso de estos recursos es la indígena debido a que posee un amplio y diverso conocimiento de los beneficios de las plantas medicinales, el cual se ha transmitido de generación en generación. En los últimos años el uso etnofarmacológico ha entrado en auge en el resto de la población principalmente por las políticas inclusivas del gobierno y su plan de desarrollo (Consejo Nacional de Planificación, 2017, p. 33).

Las plantas que fueron estudiadas (*Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*) tienen muchos usos tradicionales entre los que destaca la actividad antiinflamatoria. Por este motivo se quiso analizar esta actividad en combinaciones para determinar si existía sinergia entre los compuestos y así aumentar la actividad antiinflamatoria.

El presente trabajo se realizó como parte de la investigación del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Laboratorio de Bioproductos y Bioprocesos de la Escuela Superior Politécnica del Litoral mediante acuerdo interinstitucional con el Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia GIPRONAF de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Ilex guayusa es una planta poco estudiada desde el punto de vista de actividades biológicas y fitoquímico, aunque posee múltiples estudios en el ámbito de la etnobotánica. Cabe destacar que aunque es poco estudiada fitoquímicamente se tiene información sobre los principales metabolitos que posee. Actualmente se la considera con un gran potencial en cosmética y en nutracéutica (Radice, et al., 2016, pp. 2-3).

Ilex guayusa presenta un porcentaje considerable del alcaloide cafeína, usada comúnmente en neonatología para tratar la hipoxia. Este compuesto produce broncodilatación y aumento de la sensibilidad al dióxido de carbono (Carrera, et al., 2015, pp. 110-111), además posee polifenoles, de los cuales se sabe tienen un gran potencial antiinflamatorio (Enciso & Arroyo, 2011, p. 235).

Vernonanthura patens se usa comúnmente para tratar muchas enfermedades tales como leishmaniasis, cefaleas, parasitosis, inflamaciones, etc. Según el estudio realizado por Manzano *et al* en el extracto acuoso de las hojas se puede encontrar taninos y flavonoides (Manzano, et al., 2013, p. 136).

Los flavonoides pueden inhibir algunas enzimas entre las cuales se encuentran las ciclooxigenasas muy importantes en el proceso inflamatorio (Enciso & Arroyo, 2011, p. 235). Se ha demostrado en diversos estudios tanto *in vitro* e *in vivo* la acción que ejercen los taninos sobre la ciclooxigenasa 2 y sobre los mediadores inflamatorios como las interleucinas (Olivas, et al., 2015, pp. 62-63).

Los terpenos también poseen actividad antiinflamatoria importante. En algunos estudios se ha determinado la acción sobre las citoquinas que son las precursoras de proteínas propias de la osteoartritis primaria en humanos. Además existen monoterpenos que actúan sobre TNF y sobre las interleucinas (Gómez, et al., 2011).

Teobroma cacao desde hace muchos años ha constituido la base para una de las industrias más prolíficas a nivel mundial, la chocolatera. Es conocido que esta industria produce millones de toneladas de desechos entre cascarilla, mucílago y cáscara de la mazorca. En la actualidad se están realizando estudios para determinar la utilidad de estos en el campo de la nutrición y cosmética por el contenido de polifenoles (Panak, et al., 2018, pp. 3-5).

Se han realizado estudios referentes a los beneficios del chocolate en el sistema cardiovascular, debido a su contenido de polifenoles, demostrándose su actividad en la regulación de la presión arterial (Vega & Kwik-Urbe, 2012, p. 55) , inhibición de la agregación plaquetaria, aumento de la biodisponibilidad de la prostaciclina, reducción de las ciclooxigenasas, mejoramiento de la función endotelial, etc (Gómez, et al., 2011, p. 291).

La investigación se orientó a la posibilidad de crear un fitofármaco capaz de contrarrestar los síntomas de las enfermedades inflamatorias que aquejan a la mayoría de la población ecuatoriana. Aunque se usó un modelo de inflamación aguda, mediante los resultados se podrían predecir como actuarían estas combinaciones en casos de inflamación crónica.

Los pacientes polimedcados serían los beneficiarios directos, estos se encuentran sobre los 60 años, donde es común padecer de enfermedades inflamatorias de las articulaciones, para lo cual los médicos prescriben AINEs.

Con la investigación se les daría la opción de un antiinflamatorio de origen vegetal que no le generarían efectos adversos tan severos como los AINEs. Al tener esta alternativa farmacológica, este grupo etario podría mejorar su calidad de vida.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antiinflamatoria de combinaciones de extractos blandos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el control de calidad de la droga cruda mediante ensayos físico-químicos.
- Cuantificar los metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria mediante técnicas adecuadas (fenoles totales, flavonoides y alcaloides totales).
- Analizar la actividad antiinflamatoria de combinaciones de extractos blandos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao* en modelo animal rata (*Rattus norvegicus*) mediante la inducción de edema subplantar con carragenina al 1%.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Inflamación

La inflamación es una reacción de protección orientada a eliminar la causa de la lesión celular así como de las células y tejidos necróticos que resultan de la lesión (Porth, 2006).

La inflamación involucra una serie de eventos inespecíficos que pueden ser provocados por numerosos estímulos o agresiones del medio (ej.: agentes biológicos, isquemia, interacciones antígeno - anticuerpo, traumatismos, lesiones térmicas o fisicoquímicas de otra índole, etc.) (Gómez, et al., 2011, p. 186).

Cada tipo de estímulo provoca una respuesta característica que constituye una variante relativamente menor del mismo fenómeno. A nivel macroscópico, la respuesta está usualmente acompañada por conocidos signos clínicos como tumefacción (edema), rubor, calor, dolor espontáneo a la palpación y desorden de la función tisular (Gómez, et al., 2011, p. 186).

La respuesta inflamatoria está conformada por tres fases diferentes (Gómez, et al., 2011, p. 186) :

- Fase aguda transitoria, se caracteriza por la vasodilatación local, hiperemia activa y un aumento de la permeabilidad capilar.
- Fase tardía subaguda, caracterizada por un periodo de hiperemia pasiva e infiltración de células del sistema inmunitario: leucocitos y fagocitos.

- Fase crónica proliferativa, en donde ocurre una degeneración de tejidos, lesión en el endotelio y fibrosis.

1.1.1. *Inflamación aguda*

La inflamación aguda surge como una respuesta inmediata a la agresión de un agente, esta sirve para activar a mediadores que van a defender el organismo (Porth, 2006, p. 387) (León, et al., 2015, p. 47).

La inflamación aguda tiene una evolución relativamente breve; sus características fundamentales son la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas (edema), y la migración de leucocitos (principalmente neutrófilos) (Zeballos, 2011, p. 679) (Richard, et al., 2012, p. 25).

Es inespecífica y puede ser inducida por cualquier lesión de corta duración que puede ser fatal inmediatamente, aparece antes de que se active el sistema inmunológico y su objetivo es limitar el área de lesión (Porth, 2006, p. 388).

Las causas de inflamación aguda son (Robbins, 1975, p. 56):

- Agentes físicos como el calor, el frío, etc.
- Sustancias químicas corrosivas e irritantes como los ácidos y álcalis.
- Infecciones microbianas.
- Reacciones de hipersensibilidad.
- Necrosis tisular.

1.1.1.1. Signos cardinales en la inflamación aguda

A través de la historia la descripción de la inflamación ha evolucionado. El médico romano Celso fue el primero en describir la reacción local de una lesión. Él determinó cuatro signos

presentes en la inflamación que son rubor, tumor, calor y dolor. Luego Galeno agregó un quinto signo, la pérdida de la función. Estos signos son evidentes cuando la lesión se produce en la superficie corporal sin embargo no pueden presentarse en una lesión interna (Porth, 2006, p. 388).

También pueden desarrollarse manifestaciones sistémicas como la fiebre, esto se produce cuando los mediadores inflamatorios alcanzan el torrente sanguíneo. Las diversas manifestaciones sistémicas que pueden presentarse se denominan respuestas de fase aguda. En algunas ocasiones la inflamación local aguda puede producir una respuesta sistémica amplificadas, la cual puede exceder el control y generar una sepsis mortal (Porth, 2006, p. 388).

1.1.1.2. Etapas de la inflamación aguda

La inflamación aguda está constituida por dos etapas: la etapa vascular y la etapa celular.

A. Etapa vascular

Los cambios hemodinámicos o vasculares se presentan casi inmediatamente después de haberse dado la lesión. En primera instancia se produce la vasoconstricción de los vasos sanguíneos pequeños que están en la zona, luego se da una vasodilatación de arteriolas y vénulas, el área se congestiona provocando calor y rubor. Con el aumento de la permeabilidad se origina la tumefacción de la zona (edema), dolor y pérdida de la función (Porth, 2006, p. 388).

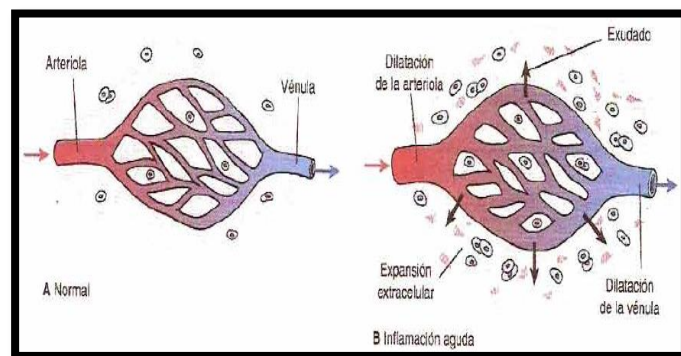


Figura 1-1: Etapa vascular de la inflamación aguda

Fuente: Porth, Carol; 2006.

B. Etapa celular

Se caracteriza por la movilización de leucocitos fagocíticos hacia la lesión. También se requiere la liberación de mediadores químicos de las células centinelas (mastocitos y macrófagos) para una respuesta rápida (Porth, 2006, pp. 388-389).

El neutrófilo es el primer tipo de leucocitos que llega a la zona afectada generalmente a los 90 minutos de haberse producido la lesión, también genera derivados del oxígeno como el peróxido de hidrógeno y del nitrógeno como el óxido nítrico (Porth, 2006, p. 389).

El recuento de neutrófilos en sangre suele aumentar considerablemente en un proceso inflamatorio en especial cuando el agente causal es una bacteria (Porth, 2006, p. 389).

Los monocitos migran hacia los tejidos en respuesta a estímulos inflamatorios, aquí maduran y se transforman en macrófagos, estos internalizan material extraño más eficazmente que los neutrófilos. Los macrófagos inician la respuesta inmunitaria al migrar a los ganglios linfáticos (Porth, 2006, p. 390).

Los mastocitos se encuentran en el tejido conectivo principalmente en la piel, el tracto pulmonar y gastrointestinal, su función es la de actuar como guardianes en dichos tejidos (Porth, 2006, p. 390).

1.1.1.3. Mediadores inflamatorios

En la inflamación las etapas tanto vascular como celular son mediadas por innumerables moléculas derivadas del plasma y de las células. Las sustancias provenientes del plasma son sintetizadas en el hígado y circulan como precursores inactivos los cuales se activan mediante proteólisis. Los mediadores derivados de las células son preformados y liberados por exocitosis o sintetizados de *novo* por estímulos (Richard, et al., 2012, p. 32).

Los mediadores inflamatorios se clasifican según su función (Porth, 2006, p. 391):

1. Sustancias con capacidad vasoactiva y contracción del músculo liso: histamina, prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de plaquetas (PAF).
2. Factores quimiotácticos: Fragmentos del complemento y las citocinas.
3. Proteasas plasmáticas capaces de activar el complemento y los componentes del sistema de la coagulación.
4. Moléculas y citocinas reactivas liberadas por los leucocitos que causan daño tisular.

- *Mediadores inflamatorios derivados de células*

La histamina tiene una amplia distribución por el organismo, se encuentra principalmente en los basófilos y en las plaquetas. También se encuentra en altas concentraciones en los mastocitos de los cuales es liberada por estímulos como traumatismos y reacciones inmunológicas mediadas por la inmunoglobulina E (IgE). La histamina provoca dilatación y aumento de la permeabilidad capilar (Porth, 2006, p. 391).

La serotonina tiene una acción similar a la histamina, se encuentra mayoritariamente en las plaquetas y en las células neuroendocrinas distintas de los mastocitos (Richard, et al., 2012, p. 34).

La liberación de la histamina y la serotonina se da por el contacto con colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP), y complejos antígeno-anticuerpo (Richard, et al., 2012, p. 34).

Los metabolitos de ácido araquidónico son las prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas. Este ácido es liberado de las membranas de las células activadas a través de la acción de las fosfolipasas A₂, a su vez la enzima ejerce una acción catalítica generando mediadores lipídicos (eicosanoides) (Richard, et al., 2012, p. 34).

En la síntesis de mediadores existen dos vías: La vía de las ciclooxigenasas en la cual se sintetizan las prostaglandinas (Porth, 2006, p. 391), tromboxanos (Richard, et al., 2012, p. 34) y prostaciclina (Clark, et al., 2012, p. 819); por otro lado la vía de las lipooxigenasas produce leucotrienos (Porth, 2006, p. 391) y lipoxinas (Richard, et al., 2012, p. 34).

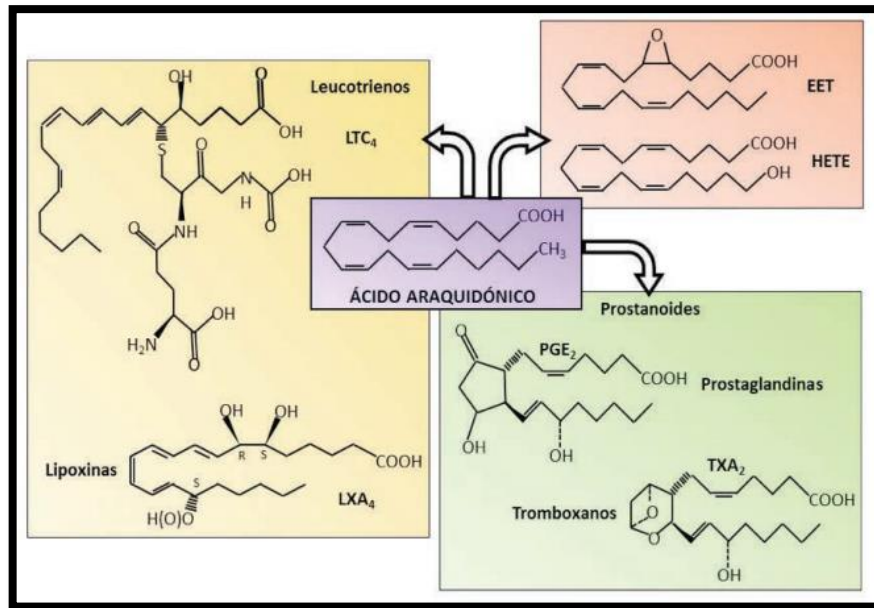


Figura 2-1: Derivados del ácido araquidónico.

Fuente: Cantú *et al.*, 2017.

- 1) **Vía de las ciclooxigenasas:** Existen dos isoformas de ciclooxigenasas. La ciclooxigenasa 1 o COX-1 se encarga de la producción fisiológica de prostanoides, es una enzima constitutiva o guardián que regula los procesos celulares normales como la citoprotección gástrica, la homeostasis vascular, la agregación plaquetaria y la función renal (Clark, et al., 2012, p. 819).

La ciclooxigenasa 2 o COX-2 es expresada en tejidos como el cerebro, el hueso y el riñón. Se la denomina como una enzima inducida debido ya que su concentración aumenta en los estados inflamatorios (Clark, et al., 2012, p. 819).

- 2) **Vía de las lipooxigenasas:** Por esta vía se producen leucotrienos que son mediadores pro-inflamatorios y lipoxinas, mediadores antiinflamatorios. La interacción célula-célula es importante en la síntesis de estos mediadores. Los productos del ácido araquidónico pueden difundirse de una célula a otra (Richard, et al., 2012, p. 34).

Esta vía necesita ser activada lo cual implica la movilización desde el citoplasma hacia la membrana celular. Las lipoxinas son sintetizadas principalmente en los neutrófilos mediante la asociación de la 5-lipooxigenasa y la 15-lipooxigenasa (Florez, et al., 1997, p. 329).

El factor activador de plaquetas (PAF) se genera a partir de un complejo lipídico de las membranas celulares, afecta a una variedad de tipos celulares e induce agregación plaquetaria, activa a los neutrófilos y es un factor importante en la quimiotaxis de los eosinófilos (Porth, 2006, p. 391). Se encuentra en los mastocitos, leucocitos, células endoteliales y plaquetas (Richard, et al., 2012, p. 34).

El PAF puede inducir la mayoría de efectos vasculares y celulares como vasodilatación y aumento de la permeabilidad (aproximadamente de 10 a 10.000 veces de la que produce la histamina), broncoconstricción, estallido oxidativo, adhesión leucocitaria y quimiotaxis (Richard, et al., 2012, p. 34).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son radicales libres que se liberan de los leucocitos después de la fagocitosis y de la exposición a quimiocinas, complejos inmunes y productos microbianos. Las ROS producen daño endotelial provocando aumento en la permeabilidad vascular, lesionan diversos tipos celulares como células sanguíneas, cancerígenas, etc. Por último inactivan a las antiproteasas (Richard, et al., 2012, p. 34).

El óxido nítrico (NO) es un derivado endotelial que causa dilatación vascular por relajación del músculo liso, este regula la respuesta inflamatoria al inhibir la agregación plaquetaria y el reclutamiento de leucocitos, además bloquea algunas características de la inflamación mediadas por mastocitos (Richard, et al., 2012, p. 37).

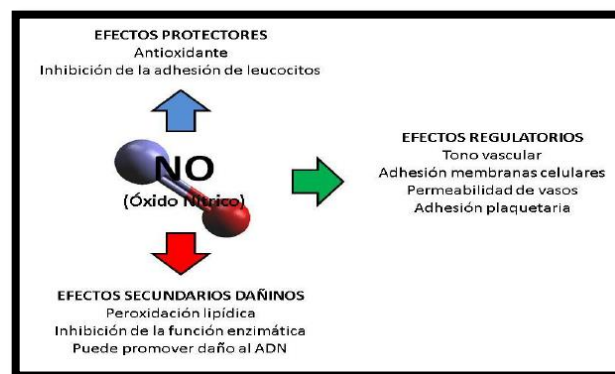


Figura 3-1: Efectos del óxido nítrico

Fuente: Gómez et al, 2011

Las citocinas son productos polipeptídicos de linfocitos y macrófagos, cuya función es modular la actividad de otros tipos celulares. Las citocinas más importantes son: Factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas (IL) e interferones (INF) (Porth, 2006, p. 392).

El TNF e IL-1 son producidos principalmente por la actividad de macrófagos, estos afectan la activación de los fibroblastos, leucocitos y endotelio y también inducen la respuesta sistémica. La secreción es estimulada por endotoxinas, complejos inmunitarios, daños físicos y una variedad de mediadores inflamatorios (Richard, et al., 2012, p. 37).

La activación endotelial aumenta la expresión de adhesión de moléculas y mediadores químicos, enzimas asociadas con la remodelación de matriz y trombogénesis endotelial. La IL-1 y TNF estimula el sistema de respuesta de fase aguda asociada con infección o lesión incluyendo fiebre, anorexia, letargia, neutrofilia y liberación de corticotropina y corticoesteroides (Richard, et al., 2012, p. 37).

El TNF regula también la masa corporal promoviendo la movilización de lípidos y proteínas, además suprime el apetito. Concentraciones elevadas de TNF producen caquexia, una patología caracterizada por pérdida de peso y anorexia (Richard, et al., 2012, p. 37).

La IL-1 es producida controladamente por inflammasoma, este es un complejo intracelular, el cual responde a varios factores desencadenantes microbianos y necróticos celulares. Los inflammasomas activan a la familia de las caspasas para inhibir a los precursores de IL-1 en la actividad biológica de las citosinas (Richard, et al., 2012, p. 37).

Las quimiocinas son pequeñas proteínas expresadas por diversos tipos celulares que actúan en primera instancia como leucocitos quimioatrayentes y activadores. Estas se clasifican en cuatro grandes grupos de acuerdo a su disposición del residuo conservado de cisteína (Richard, et al., 2012, p. 39).

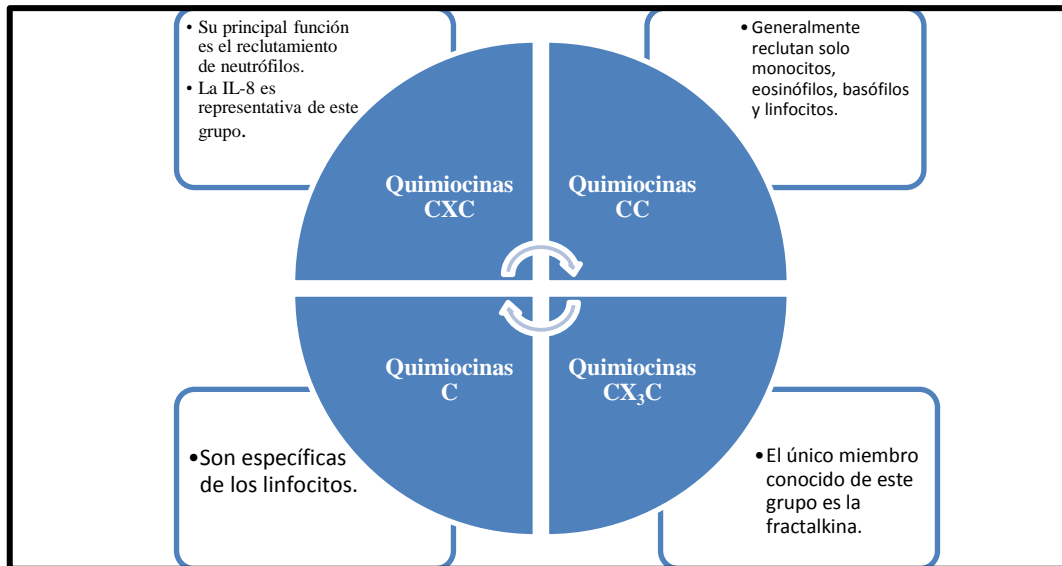


Figura4-1: Clasificación de las quimiocinas

Fuente: Richard *et al.*: 2012

Otras citocinas que actúan en la respuesta inflamatoria aguda son: Interleucina -6 (IL-6), producida únicamente por macrófagos, está involucrada en múltiples respuestas inflamatorias tanto locales como sistémicas y la interleucina-17 (IL-17), producida únicamente por linfocitos T e involucrada en el reclutamiento de neutrófilos (Richard, et al., 2012, p. 39).

Los leucocitos tienen constituyentes lisosomales (gránulos), los cuales se liberan de los neutrófilos y monocitos, contribuyendo a la respuesta inflamatoria y al daño tisular (Richard, et al., 2012, p. 39).

Los neutrófilos poseen dos tipos granulares: los gránulos específicos pequeños o secundarios los cuales contienen lisozima, colagenasa, gelatinasa, lactoferrina, activador plasminogénico e histamina; los gránulos grandes azurófilos o primarios que contienen mieloperoxidasa, factores bactericidas como la lisozima y defensina, hidrolasa ácida y variadas proteasas neutras como la elastasa, catepsina G y colagenasa (Richard, et al., 2012, p. 39).

Los monocitos y macrófagos contienen también hidrolasas como las colagenasas, elastasas, fosfolipasas y activador plasminogénico, que cumplen un papel importante en las reacciones inflamatorias crónicas (Richard, et al., 2012, p. 39).

Los neuropéptidos son secretados por nervios sensoriales y leucocitos pueden iniciar y propagar respuestas inflamatorias, por ejemplo la sustancia G es un poderoso mediador de la permeabilidad vascular, transmite signos de dolor, regula la presión arterial, estimula la secreción endócrina y la liberación de células inmunes (Richard, et al., 2012, p. 39).

- *Mediadores derivados de las proteínas plasmáticas*

Las proteasas plasmáticas están constituidas por cininas, proteínas activadas del complemento y factores de la coagulación. La bradisinina un tipo de cinina produce aumento de la permeabilidad capilar y dolor (Richard, et al., 2012, p. 40).

El sistema de coagulación actúa en la etapa vascular a través de fibrinopéptidos que se forman en las etapas finales del proceso de coagulación (Richard, et al., 2012, p. 40).

El sistema de complemento está conformado por proteínas plasmáticas que juegan un papel muy importante en la inmunidad y en la inflamación. En esta última producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular; estimulan a los leucocitos activándolos, promoviendo la adherencia y la quimiotaxis; aumentan la fagocitosis (Richard, et al., 2012, p. 40).

El sistema de complemento comprende alrededor de 20 proteínas, las más importantes van desde la C1 hasta C9, son sintetizadas por el hígado, circulan por el plasma como precursores que son activados por proteólisis (Richard, et al., 2012, p. 40).

El paso más importante en la actividad biológica del complemento es la activación del componente C3, la escisión de este resulta en fragmentos funcionalmente distintos: C3a y C3b. C3a es liberado mientras C3b se une covalentemente al sitio cuando el complemento está siendo activado (Richard, et al., 2012, p. 40).

Las funciones biológicas del complemento cae dentro de tres categorías: lisis celular, inflamación y opsonización (Richard, et al., 2012, p. 40).

En la lisis celular participan las cadenas C5b, terminando en la formación del complejo de ataque de membrana (MAC), el cual forma hoyos en las membranas celulares. En la inflamación actúan el fragmento C3a y C5a también llamados anafilotoxinas, estos estimulan la liberación de histamina desde las células centinelas así aumentan la permeabilidad vascular y vasodilatación (Richard, et al., 2012, p. 40).

En la opsonización, C3b promueve la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos. La inflamación promueve la coagulación por incremento de producción de varios factores de coagulación, haciendo al endotelio más pro-coagulación y reduciendo los mecanismos reguladores de anticoagulación. La trombina promueve la inflamación por unión a los receptores activos de proteasas, receptores acoplados a proteína G presentes en las plaquetas, endotelios y células musculares lisas (Richard, et al., 2012, p. 40).

Tabla 1-1: Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda

Mediador químico y acción	Mediador químico y acción
Histamina y serotonina: Incremento de la permeabilidad	C3a (producto del complemento, anafilotoxinas): Incremento de la permeabilidad opsonina.
Bradicinina: Incremento de la permeabilidad y el dolor.	C5a (producto del complemento, anafilotoxinas): Incremento de la permeabilidad, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria.
Prostaglandinas: Vasodilatación, dolor, fiebre, activa a otros mediadores.	Leucotrieno B₄: Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria.
Leucotrieno C₄, D₄, E₄: Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, vasoconstricción.	Metabolitos del oxígeno (radicales libres): Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular.
Factor activador de plaquetas (PAF): Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, cebado de leucocitos.	Interleucina -1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral (TNF) (citocinas): Reacciones de fase aguda, activación endotelial., quimiotaxis.
Óxido nítrico: Incremento de la permeabilidad, vasodilatación, citotoxicidad.	

Fuente: León *et al.*, 2016

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018.

1.1.2. *Inflamación crónica*

La inflamación crónica tiene una duración larga que puede ir desde semanas hasta años. Puede originarse de una inflamación aguda recurrente o progresiva o de respuestas provocativas de baja intensidad que no evocan una respuesta aguda. Su principal característica es la infiltración de células mononucleares y linfocitos. También implica proliferación de fibroblastos en lugar de exudados, por lo cual existe un mayor riesgo de cicatrización y deformidad (Porth, 2006, p. 392).

Los principales agentes causantes de inflamación crónica son sustancias irritantes persistentes de baja intensidad, que no pueden penetrar en profundidad ni diseminarse con rapidez (Porth, 2006), a los cuales se está expuesto prolongadamente y son potencialmente tóxicos como la sílica que causa silicosis o incluso sustancias propias del organismo como los lípidos que producen arterioesclerosis (Richard, et al., 2012, p. 44).

También pueden causar inflamación crónica microbios intracelulares como el bacilo de la tuberculosis, virus, hongos y parásitos grandes de virulencia baja a moderada (Porth, 2006, p. 392), pero capaces de originar una respuesta inmunitaria, reacciones inmunitarias particularmente las que se dan en contra de tejidos propios del organismo (Enfermedades autoinmunes) o respuestas regulatorias anormales a la microbiota hospedante (Enfermedad inflamatoria intestinal) o sustancias ambientales que originan alergias (Richard, et al., 2012, p. 44).

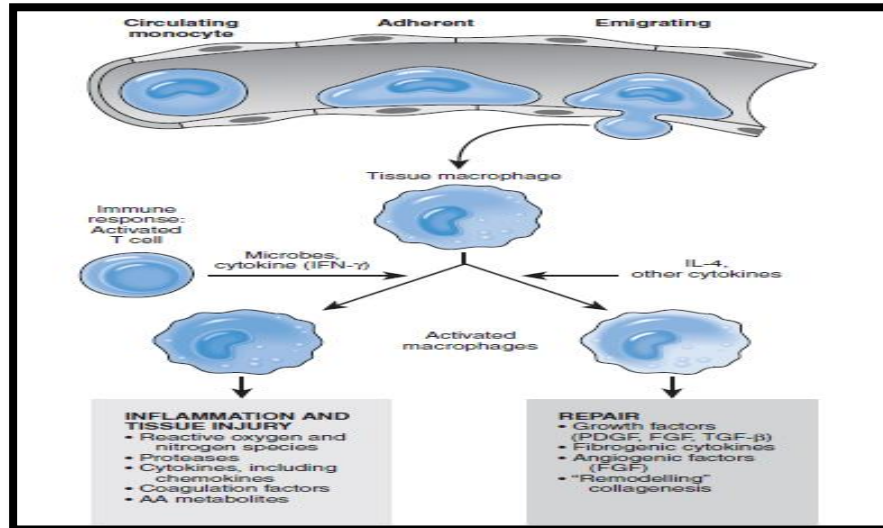


Figura 1-1: Papel de los macrófagos en la inflamación crónica.

Fuente: Richard *et al*; 2012

Existen dos patrones de inflamación crónica: la inflamación crónica inespecífica, en la cual se acumulan macrófagos y linfocitos en el sitio de la lesión provocada por la quimiotaxis continua y la inflamación granulomatosa que es una forma distintiva de inflamación crónica caracterizada por la presencia de una lesión (granuloma) de 1 a 2 mm en donde se conglomeran macrófagos rodeados de linfocitos (Porth, 2006, p. 392).

1.1.3. Efectos sistémicos de la inflamación

Los cambios asociados con inflamación son colectivamente llamados respuesta de fase aguda o en casos severos síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), estas responden a citoquinas producidas por productos bacterianos o por otros estímulos inflamatorios (Richard, et al., 2012, p. 47).

La respuesta de fase aguda consiste en cambios clínicos y patológicos (Richard, et al., 2012, p. 47) entre los que se encuentran la fiebre y alteraciones del recuento de leucocitos (leucocitosis o leucopenia) (Porth, 2006, p. 393).

La fiebre se produce como respuesta a pirógenos, sustancias que estimulan la síntesis de prostaglandinas en el hipotálamo. Las proteínas de fase aguda son proteínas plasmáticas sintetizadas en el hígado, cuya producción se incrementa cien veces por estimulación inflamatoria, entre estas se destacan la proteína C reactiva (PCR), fibrinógeno y proteína sérica amiloide A (SAA) (Richard, et al., 2012, p. 47) .

PCR y SAA enlazan las paredes de los microbios, pueden actuar como opsoninas y reparar el complemento, también pueden ayudar a limpiar las células necróticas y a mover los almacenamientos metabólicos. Grandes cantidades de fibrinógeno aumentan la agregación de los eritrocitos y por ende su velocidad de sedimentación (Richard, et al., 2012, p. 47).

La hepcidina es otro reactante de fase aguda responsable de regular la liberación del hierro intracelular, una elevación crónica de esta proteína causa anemia por deficiencia de hierro asociada con inflamación crónica (Richard, et al., 2012, p. 47).

El aumento de leucocitos o leucocitosis ocurre por una liberación acelerada de las células medulares del hueso, típicamente con incremento del número de neutrófilos inmaduros en sangre (desviación a la izquierda) (Richard, et al., 2012, p. 47).

Otras manifestaciones de la fase de respuesta aguda incluyen aumento de pulso y presión arterial, decremento de la sudoración, temblores, resfriados, anorexia, somnolencia y malestar, probablemente producidos por citoquinas en el sistema nervioso central (SNC) (Richard, et al., 2012, p. 47).

En infecciones bacterianas severas o sepsis, la gran cantidad de organismos y endotoxinas en la sangre estimula la producción de enormes cantidades de varias citoquinas principalmente TNF e IL-1. Altas concentraciones de estas citoquinas pueden resultar en una triada clínica de coagulación intravascular diseminada (DIC), disturbios metabólicos y falla cardiovascular descrito como shock séptico (Richard, et al., 2012, p. 47).

1.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Son un grupo variado de compuestos químicos no relacionados entre sí, que comparten acciones farmacológicas similares. Su diversidad química les otorga características farmacocinéticas distintas y producen efectos adversos secundarios similares (Prieto, 2007, p. 30).

Son considerados los fármacos de primera elección en el tratamiento del dolor, se encuentran en el primer peldaño de la Escalera Analgésica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Prieto, 2007, p. 30) .

Los AINEs son fármacos muy eficaces para tratar la inflamación aguda y crónica, estos actúan como antipiréticos, antiinflamatorios y analgésicos (Perea, et al., 2016, p. 77).



Figura 2-1: Escalera analgésica de la OMS

Fuente: Prieto, Juan; 2007

1.2.1. Clasificación de los AINEs

Los AINEs pueden clasificarse según su índice de selectividad (IS) para la isoenzima COX-2 en cuatro grupos (Perea, et al., 2016, p. 77):

- Poco selectivo (IS < 1)
- Medianamente selectivo (IS=1)
- Preferencialmente selectivo (IS>1)
- Altamente selectivos (no actúan sobre COX-1)

El índice de selectividad es el cociente entre la cantidad de una AINE necesaria para inhibir la acción de la COX-2 en un 50 % y la cantidad del mismo AINE para inhibir la acción en un 50 % de la COX-1 (Perea, et al., 2016, p. 77).

Los AINEs también se pueden clasificar según su estructura química, estos son sustancias derivadas de distintos ácidos orgánicos. Los efectos adversos están relacionados directamente con su estructura química (Perea, et al., 2016, p. 77).

Tabla 2-1: Clasificación de los AINEs según su estructura química.

Grupos	Fármacos	Grupos	Fármacos
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico y ácido salicílico	Oxicames	Piroxicam, y meloxicam.
Pirazolona	Antipirina y dipirona	Derivados del ácido nicotínico	Clonixinato de lisina
Indoles	Indometacina	Derivados de la naftilalcanonas	Nabumetona.
Derivados del ácido acético	Arilacético (diclofenaco sódico y diclofenaco potásico); pirrolacético (ketorolaco); piranoacético (etodolac).	Derivados de ácidos heterocíclicos	Oxaproxin.
Fenamatos o arilantranilicos	Ácido mefenámico	Derivados de la sulfonanilida	Nimesulida.
Derivados del ácido propiónico	Ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno, indoprofeno.	Derivados de las benzoxazocinas	Nefopam.

Fuente: Perea *et al.* 2016

Realizado por: Lissethy Valverde; 2018

1.2.2. Mecanismo de acción

Los AINEs actúan en la síntesis de prostanoïdes, compitiendo por el sitio activo de la enzima COX al cual se une el ácido araquidónico. Sus efectos farmacológicos dependen en gran medida de su acción en la COX-2 y sus efectos adversos más comunes están relacionados con su acción sobre la COX-1 expresada a nivel gastrointestinal, renal, pulmonar y en plaquetas (Perea, et al., 2016, p. 77)

También pueden actuar a nivel de las plaquetas al inhibir la agregación plaquetaria, el ácido acetilsalicílico es un AINEs que posee esta particularidad (Perea, et al., 2016, p. 77).

1.2.3. Efectos adversos de los AINEs

Generalmente los AINEs son bien tolerados, los efectos adversos se ven asociados a sobredosis. La mayor toxicidad de estos fármacos se evidencia a nivel gastrointestinal, renal y cardíaco (Leyva, et al., 2007, p. 42).

A nivel gastrointestinal los AINEs causan irritación de la mucosa gástrica y en casos extremos ulceración de la misma. En los riñones la inhibición de las dos isoformas de la COX, producen un aumento en las concentraciones de creatinina y disminución en su depuración especialmente en pacientes predispuestos a hipovolemia, alteración de la función renal o disminución del flujo sanguíneo renal (Leyva, et al., 2007, p. 42).

A nivel pulmonar producen broncoespasmos (Leyva, et al., 2007, p. 42), además de daños a nivel dérmico como el valdecoxib que produce necrólisis epidérmica tóxica y síndrome de Stevens-Johnson (Prieto, 2007, p. 32).

Los inhibidores selectivos de la COX-2 actúan en el sistema prostaciclina/tromboxano, lo cual aumenta el riesgo cardiovascular (Leyva, et al., 2007, p. 42), también causan hipertensión arterial (etoricoxib) (Prieto, 2007, p. 32).

La Administración de alimentos y drogas de Estados Unidos (FDA) ha exigido que se incluya en el etiquetado de los AINEs comúnmente usados y del celecoxib los siguientes puntos (Clark, et al., 2012, p. 825):

- 1) Advertir sobre los riesgos potenciales de fenómenos trombóticos cardiovasculares graves, infarto de miocardio e ictus, en tratamientos prolongados y en pacientes predispuestos.
- 2) Advertir sobre su contraindicación en el tratamiento del dolor perioperatorio en la cirugía de derivación aortocoronaria.
- 3) Avisar acerca de un riesgo mayor de efectos gastrointestinales graves, como hemorragias, úlceras y perforación del estómago o el intestino, potencialmente letales.

1.2.4. Diclofenaco sódico

Es un ácido heteroarilacético, posee propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas. Se lo puede utilizar por tiempo prolongado en el tratamiento de artritis reumatoidea, espondilitis alquilosante y artritis debido a que este medicamento se acumula en el líquido sinovial (Clark, et al., 2012, p. 835)

El diclofenaco actúa inhibiendo la síntesis de la ciclooxigenasa aunque también puede inhibir a la prostaglandina sintetasa. El diclofenaco administrado por vía oral, se absorbe en un 100 %,

pero debido al metabolismo de primer paso solo el 50% se encuentra disponible en la circulación sistémica (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2014)

Aunque se administre en dosis repetidas el diclofenaco no se acumula en plasma. No se recomienda su administración con alimentos debido a que estos retrasan su absorción sin embargo no afecta la absorción global a pesar de esto reduce las concentraciones máximas en plasma (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2014).

La absorción del diclofenaco se determina por su eliminación renal, que es de aproximadamente el 65 %, el otro 35 % se da por vía biliar (Vidal Vademecum Spain, 2010) (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2014), la cual es su principal vía de excreción (Clark, et al., 2012, p. 835). Posee una farmacocinética lineal (la concentración es proporcional a la dosis) (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2014)

El diclofenaco tiene un volumen aparente de distribución de 1,3 l/kg, se une a proteínas plasmáticas en un 99% aproximadamente principalmente a la albúmina. Su vida media terminal sin cambios es de 2 horas (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2014).

Sus efectos adversos más comunes son: dolor y distensión abdominal, flatulencias, dispepsia, náuseas, anorexia, úlcera péptica, hemorragia gastrointestinal, prurito, rash, insuficiencia renal aguda, edema periférico, tinnitus, cefalea, somnolencia, retención de fluidos, mareo, vértigo, incremento de transaminasas (Consejo Nacional de Salud, 2014, pp. 451-452).

1.3. Plantas con propiedades antiinflamatorias

1.3.1. Introducción

En Ecuador existen diversas especies vegetales con propiedades medicinales, se estima que hay 17.000 especies de plantas vasculares que son resultado de la adaptación a los distintos climas

existentes en el país y también de la acción humana como difusora de plantas útiles (De la Torre, et al., 2008, p. 13).

En Ecuador el uso de plantas medicinales está muy arraigado en la población sobre todo en la de bajos recursos económicos, específicamente en el área rural, ya que este sector de la población recurre a las plantas para curar sus enfermedades antes de usar medicamentos comerciales (De la Torre, et al., 2008, p. 105).

Una población que usa de forma permanente las plantas medicinales son los indígenas de la Amazonía, estos utilizan un sinnúmero de especies vegetales para curar las más diversas patologías. De acuerdo a un estudio realizado por Giovannini en 2015 la población Achuar por citar un grupo étnico específico utiliza un total de 134 plantas de las cuales 44 tienen múltiples usos (Giovannini, 2015, p. 12).

Los Achuar utilizan las plantas en forma de decocciones y con estas preparan jarabes. También hacen uso de técnicas de maceración con agua. Algunas preparaciones resultan de las mezclas inventadas de varias plantas (Giovannini, 2015, p. 13).

Esta población posee conocimientos de qué plantas mezclar y cuáles no por ejemplo ellos nunca combinan *Ilex guayusa* y *Psidium guajava*, debido a que esta combinación produce un potente tóxico (Giovannini, 2015, p. 13).

El uso de plantas con fines antiinflamatorios se ha usado exclusivamente para tratar problemas externos de cara, cuello y extremidades aunque también se las ha utilizado para desinflamar riñones, hígado, ovarios, estómago e intestinos. Las familias más utilizadas son: las Malváceas, Solanáceas y Asteráceas (De la Torre, et al., 2008, p. 109).

1.3.2. *Ilex guayusa* Loes.

1.3.2.1. Taxonomía

Tabla 3-1: Taxonomía de *Ilex guayusa* L.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Celastrales
Familia	Aquifoliaceae
Género	<i>Ilex</i>
Especie	<i>Ilex guayusa</i> Loes

Fuente: Sequeda *et al.*; 2016

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018

1.3.2.2. Descripción, origen y distribución

Es una planta domesticada, originaria de la selva amazónica de Perú, Ecuador y sur de Colombia (Villacís, 2017, p. 83).

En Ecuador se encuentra localizada en las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Pichincha, Loja y Tungurahua (Radice & Vidari, 2007, p. 4).

Pertenece al género *Ilex* presente en trópicos y subtrópicos (Radice & Vidari, 2007, p. 4), que está compuesto por 600 especies, localizadas en zonas muy húmedas y lluviosas (Dueñas, et al., 2013, p. 270)

Fue descrita por Loesener, su evolución no está totalmente clara, debido a la gran variedad entre especies de la misma familia que se evidencia en la morfología de las hojas (Dueñas, et al., 2013, p. 270).



Figura 7-1: *Ilex guayusa* L.

Fuente: <https://www.nutraval.com/es/guayusa-powder.html>

1.3.2.3. *Morfología*

Ilex guayusa se cultiva específicamente de estacas leñosas de una planta madura (mayor a 4 años). Su fruto es una baya globosa, verde o roja, de 1 cm. Su flor tiene una corola blanco-verdosa con pétalos obtusos y estambres en la misma cantidad. Posee hojas coriáceas, enteras, simples, alternas, dentadas, glabras en el haz y envés, ápice acuminado, base aguda de 15 a 21 cm de longitud y de 5 a 7,5 cm de ancho (Radice & Vidari, 2007, p. 4) (Dueñas, et al., 2013, pp. 270-271).

La altura promedio de los árboles de *I. guayusa* es de 10 metros y 80 cm de ancho (Dueñas, et al., 2013, pp. 270-271), se localiza desde los 200 m a 2.000 m sobre el nivel del mar (Radice, et al., 2016, p. 3)

1.3.2.4. *Usos etnobotánicos*

Ilex guayusa es usada como infusión a la que se atribuye múltiples propiedades medicinales como energizante, diurética, antigripal, analgésica y estimuladora del líbido. En el siglo XVI,

Fray Juan de Santa Gertrudis Serra, describió algunas propiedades de la planta tales como digestiva, mucolítica y endulzada con miel para la fertilidad femenina (Sequeda, et al., 2016, p. 196).

En el siglo XIX, se la utilizaba como tratamiento de la amenorrea, hipnótico, para tratar la diarrea, dolor estomacal y purgante (Sequeda, et al., 2016, p. 196). También se le otorga propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes (Villacís, 2017, p. 83), como tratamiento de enfermedades venéreas, gastritis, coadyuvante en picaduras de insectos y serpientes (Radice, et al., 2016, pp. 3-4).

Esta planta es usada por algunos grupos indígenas entre los que se encuentran: Kichwa, Cofán, Secoya, Záparo, Shuar y Achuar, los cuales la utilizan en rituales y como medicina (Dueñas, et al., 2013, p. 271).

1.3.2.5. Composición química de la hoja de *Ilex guayusa* L.

En estudios realizados a las hojas de *Ilex guayusa* se ha identificado cafeína, teobromina, polifenoles (ácido tánico), flavonoides, taninos, compuestos clorogénicos, triterpenos (ácido ursólico y oleanólico), aminoácidos, quinonas, esteroides, compuestos lactónicos y cumarínicos (Radice, et al., 2016, p. 2) (Dueñas, et al., 2013, p. 271).

Específicamente en el extracto acuoso se han reportado la presencia de saponinas, taninos, fenoles, azúcares reductores y alcaloides, estos últimos de tipo metilxantinas (cafeína, theobromina y teofilina), ácido ascórbico, ácido nicotínico, riboflavina, colina y piridoxina (Sequeda, et al., 2016, p. 197).

1.3.3. *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob

1.3.3.1. Taxonomía

Tabla 4-1: Taxonomía del *Vernonanthura patens*.

Phylum o división	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Compositae
Género	<i>Vernonanthura</i>
Especie	<i>Vernonanthura patens</i>
Nombre científico	<i>Vernonanthura patens</i>

Fuente: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010

Realizado por: Lissethy Valverde; 2018

1.3.3.2. Descripción, origen y distribución

El género *Vernonanthura* pertenece a la subfamilia Cichorioideae, fue descrito en 1992 por Robinson, está constituido por 65 especies. Tiene una amplia distribución en América, se la puede encontrar en América Central y del Sur, las Antillas y México (Manzano et al., 2013, p.132).

Vernonanthura patens (Kunth) H. Rob., es un arbusto silvestre originario de Sudamérica y México (Manzano, et al., 2013, p. 576) que crece en diversas provincias de Ecuador (Manzano et al., 2013, p.132) (Bolívar, Chimborazo, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Loja, Los Ríos, Manabí, Morona, Napo, Pastaza, Pichincha, Tungurahua y Zamora Chinchipe) (Aguirre, et al., 2014, p. 55). Los estudios botánicos, químicos y biológicos de esta especie son escasos (Manzano Santana et al., 2013, p.132).

Crece a alturas entre 0 a 2000 metros sobre el nivel del mar en bosques andinos, bosques y matorrales secos (Aguirre, et al., 2014, p. 55).

1.3.3.3. *Morfología*

Vernonanthura patens es un arbusto de 3 m de altura poco ramificado, posee tricomas ferrugíneos, sus tallos son surcados por estos. Sus hojas son alternas, pecioladas, estrechamente lanceoladas con pecíolo tomentoso y tricomas ferrugíneos, su borde es entero o ligeramente aserrado, con base redonda, ápice agudo o acuminado, su tamaño está entre 4 a 11 mm de largo (Blair & Madrigal, 2005, p. 84).

Posee inflorescencias paniculadas, terminales, provistas de hojas, brácteas y numerosas flores; brácteas de color carmelita oscuro (Blair & Madrigal, 2005, p. 84). Sus flores son de color blanco vistoso. Su fruto es una aquenio seco, de semilla pequeña y con capacidad de dispersión muy buena (Aguirre, et al., 2014, p. 55).



Figura 8-1: *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob

Fuente: Santana *et al.* 2012

1.3.3.4. Usos etnobotánicos

Vernonanthura patens es ampliamente utilizada por la población debido a que se le atribuye varias propiedades medicinales tales como cicatrizante, analgésica, antiinflamatoria, antitusígena, antimicótica, antihemorrágica, descongestionante nasal, para el tratamiento de leishmaniasis y anticancerígeno (Manzano, et al., 2013, p. 576) (Aguirre, et al., 2014, p. 55).

Como cicatrizante se utiliza las cenizas obtenidas al quemar hojas y tallos jóvenes. La corteza se usa en decocción para tratar afecciones de la piel como erupciones y heridas. Las hojas se usan para tratar las úlceras gástricas (zumo), para la congestión nasal (hojas enteras sobre la cabeza) y para las hemorragias nasales (tapón de hojas machacadas) (Aguirre, et al., 2014, p. 55).

1.3.3.5. Composición química de la hoja de *Vernonanthura patens* Kunth.

El primer estudio realizado de esta especie data de 1975, en el cual se indica la ausencia de lactonas sesquiterpénicas, luego en 1986 se identifican 10 compuestos entre los cuales se hallaron lactonas sesquiterpénicas (Manzano, et al., 2013, p. 576).

En 2013 Manzano et al., realizaron el tamizaje fitoquímico de extractos de hojas, tallos y flores de *Vernonanthura patens*, en estado de floración. En las hojas se hallaron triterpenos y esteroides; catequinas, fenoles tipo taninos y flavonoides (Manzano et al., 2013, p. 577).

En estudios posteriores de Manzano et al. Se identificaron fracciones insaponificables en las hojas, flores y tallos. En las hojas se identificaron los siguientes compuestos: β -amirina y lupeol; en las flores, β -amirina, α -amirina, lupeol, taraxasterol y neoganmacer; en el tallo glutinol, α -amirina con lupeol y acetato de taraxasterol (Manzano, et al., 2013, p. 582).

1.3.4. *Theobroma cacao* Linneo.

1.3.4.1. Taxonomía

Tabla 5-1: Taxonomía del *Theobroma cacao* L.

Reino	Plantae	
Subreino	Tracheobionta	
Filo	Magnoliophyta	
Clase	Magnoliopsida	
Subclase	Dilleniidae	
Orden	Malvales	
Familia	Sterculiaceae	
Género	<i>Theobroma</i>	
Especie	<i>Theobroma cacao</i>	
Autor	Epíteto	Linneo
Específico		

Fuente: Dostert *et al.* ; 2011

Realizado por: Lissethy Valverde; 2018

1.3.4.2. Descripción, origen y distribución.

Es un árbol que se usa con fines alimenticios, medicinales y rituales (Waizel *et al.*, 2012), aún crece de forma silvestre pero fue domesticado hace muchos años. Es originario de los bosques tropicales de América central y de los ecuatoriales de América del Sur. Su cultivo es muy importante dentro de la economía mundial. Se lo cultiva en el Oeste de África, América del Sur y Asia (Bruneton, 2001, p. 795).

Crece en bosques húmedos tropicales de clima cálido, a 500 metros sobre el nivel del mar pero se tiene un mejor crecimiento en alturas entre los 100 a 160 metros. Las condiciones

ambientales óptimas de crecimiento son: temperatura media anual de 27 °C, precipitación pluvial entre 1,150 y 2,500 mm (Waizel, et al., 2012, p. 237).

1.3.4.3. Morfología

El árbol de cacao cultivado alcanza una altura de 4 a 7 metros mientras los que crecen de forma silvestre pueden alcanzar una altura promedio de 20 metros (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 1994, p. 253). Su principal característica son sus flores ya que estas se encuentran insertadas directamente en el tronco y ramas gruesas (Bruneton, 2001, p. 1069).

Posee hojas grandes, alternas, elípticas, oblongas y colgantes de 20 a 35 cm de largo y de 4 a 15 cm de ancho (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 1994, p. 253), sus ramas son ligeramente vellosas de color café (Dostert, et al., 2011, p. 3).

Sus flores son pentámeras y hermafroditas (Dostert, et al., 2011) de 10 a 20 mm de diámetro, pueden ser blancas, rosas o púrpuras (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 1994, p. 253), los pétalos son más largos que los sépalos (Dostert, et al., 2011, p. 3).

Su fruto es una baya de gran tamaño denominada comúnmente mazorca (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 1994, p. 253) de forma variada, esférica o fusiforme, carnosa de 15 a 30 cm de largo y 7 a 10 cm de ancho, de color amarillo o púrpura en la madurez (Dostert, et al., 2011, p. 3) con pared coriácea marcada por surcos verrugosos, posee entre 20 a 40 semillas (Bruneton, 2001, p. 1069).



Figura 9-1: *Theobroma cacao* L

Fuente: Valverde, Lissethy, 2018

Las semillas de tamaño similar a una almendra de 2 a 3 cm de largo y de sabor amargo rodeadas de una pulpa blanca de sabor dulce, son ricas el almidón, proteínas y grasa (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 1994, p. 253), estas en estado fresco no tienen olor y son astringentes. Solo después de ser procesadas, estas semillas adquieren el color café y olor característico del chocolate (Bruneton, 2001, p. 1069).

1.3.4.4. Usos etnobotánicos

El cacao es un fruto muy comercializado a nivel mundial. Se lo utiliza en la industria alimentaria para fabricar dulces, también se lo emplea en cosmética y perfumería por su contenido de aceite cuyo principal componente es el linalol (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 1994, p. 257).

Por su contenido de alcaloides como la teobromina y cafeína se lo utiliza como estimulante, vasodilatador y diurético, del mismo modo se le atribuye alguna actividad antitumoral sobre todo en compuestos contenidos en hojas y cáscara (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 1994, p. 257)

La manteca de cacao es utilizada en farmacia como excipiente graso (Bruneton, 2001, p. 1071), emoliente y en la elaboración de preparados tópicos como cremas y ungüentos. Otros usos de

este derivado del cacao son como humectante en casos de resequedad de piel, caspa, disentería, mordeduras de serpiente, sarampión y quemaduras (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 1994, p. 257)

1.3.4.5. *Compuestos en el Theobroma cacao L.*

Theobroma cacao es una planta rica en grasas, su semilla contiene alrededor de 50% de estos compuestos. La manteca de cacao tiene un 75 % de triacilglicerol (ácido oleico, esteárico y palmítico), así mismo el contenido de ácidos grasos varía según donde crezca esta especie. Este derivado también contiene cantidades pequeñas de esteroides y metilesteroides (beta-sitosteroides, estigmasterol, campesterol y colesterol) (Bruneton, 2001, p. 1071).

Theobroma cacao contiene aproximadamente 300 compuestos algunos volátiles entre los que se destacan: ésteres, polifenoles, flavonoides, procianidol, oligómeros, hidrocarbocinonas, monocarbonilos, carbonios aromáticos insaturados y alcaloides (teobromina y cafeína). Además contiene proteínas, tiramina, dopamina, salsolinol, trigonelina, ácido nicotínico, aminoácidos, taninos y fosfolípidos (Bruneton, 2001, p. 1071) (Kalvatchev, et al., 1998, p. 23).

La cáscara tiene un pigmento que pertenece al grupo de los poliflavonoglucósidos, el cual es resistente al calor y la luz, estable a pH entre 3 y 11. Este contiene sales de potasio en 3 a 4 %. Asimismo contiene alcaloides mayoritariamente teobromina y taninos (Kalvatchev, et al., 1998, p. 23)

1.4. Sinergismo y términos relacionados.

El término sinergismo es ampliamente utilizado en la actualidad y denota un tipo de interacción positiva entre drogas, también se lo puede definir como el efecto aditivo de estas. Existen dos formas de calcular el sinergismo: Dosis aditiva y la acción independiente (Evans, 2009, p. 53).

Un término relacionado es el antagonismo que es definido como la reducción de los efectos esperados. Por otro lado las interacciones pueden involucrar una potenciación de efectos (Evans, 2009, p. 53).

Cuando se trata de una combinación en la cual todos los componentes inducen un efecto se usan los términos sinergismo, adición y antagonismo. En cambio el término potenciación debe ser usado cuando existan componentes inactivos que exacerben el efecto de otros activos (Evans, 2009, p. 53).

El sinergismo puede tener lugar entre los componentes de un extracto simple así como también en una mezcla de hierbas (Evans, 2009, p. 53).

El sinergismo está presente cuando el efecto total de una combinación es significativo el cual debe ser predicho en base a los efectos aditivos esperados de la mezcla. Cada expectativa de aditividad puede derivarse de la dosis aditiva o como una acción independiente (Evans, 2009, p. 54).

Algunas veces la aditividad anticipada es calculada por simple suma de los efectos individuales de los componentes de la mezcla, pero este método puede dar resultados erróneos (Evans, 2009, p. 54).

1.5. Metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria.

1.5.1. Fenoles

Constituyen metabolitos secundarios distribuidos ampliamente, su estructura varía desde estructuras simples de un solo anillo aromático hasta poliméricas de alta complejidad como los taninos y ligninas (Evans, 2009, p. 219).

Los fenoles pueden proceder de la ruta del ácido shikímico así como también de la ruta del acetato (Kukliski, 1999, p. 94).

Se clasifican en: flavonoides, cumarinas, antocianidinas, antocianinas, taninos, lignanos, ligninas, antraquinonas, naftaquinonas y fenoles simples (Evans, 2009, p. 219).

Los fenoles sencillos se encuentran como heterósidos y son poco frecuentes. Se clasifican en arbutósidos, salicósidos y vainillósidos. Los ácidos fenólicos pueden agruparse en derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico, estos pueden estar en forma libre, formando ésteres con el ácido quínico u otros ácidos fenólicos y unidos a azúcares (Kukliski, 1999, pp. 24-25).

Los fenoles generalmente son solubles en disolventes orgánicos polares, en disoluciones de hidróxido sódico y carbonato sódico. Los heterósidos por su parte son solubles en agua. Todos estos compuestos se caracterizan por ser inestables y oxidables en medio alcalino (Bruneton, 2001, p. 242).

1.5.1.1. Flavonoides

Son pigmentos vegetales distribuidos ampliamente en la naturaleza. Su principal función es dar color a flores, frutos y hojas. Pueden estar en forma libre o como glicósidos. Las agliconas son frecuentes en tejidos leñosos. Presentan diversa polaridad es decir algunos son solubles en agua, otros en etanol y en éter etílico pero por regla general son insolubles en éter de petróleo (Domínguez, 1979, p. 81).

En la actualidad se conocen aproximadamente 2000 de estos compuestos de los cuales cerca de 500 se encuentran en estado libre (agliconas). Están formados por tres unidades de acetatos y una unidad de fenilpropano (Evans, 2009, p. 252).

Se los clasifica de acuerdo a sus variaciones estructurales (Kukliski, 1999, p. 108):

- a) Con doble enlace en las posiciones 2 y 3: Flavonas y flavonoles.
- b) Sin doble enlace en las posiciones 2 y 3: Flavanonas y flavanololes.
- c) Chalconas
- d) Isoflavonoides
- e) Diflavonoides

Las flavonas y sus compuestos relacionados son generalmente amarillos, están ampliamente distribuidos en la naturaleza sobre todo en las plantas superiores y en los tejidos jóvenes. Son usados extensamente como marcadores quimiotaxonómicos. Se encuentran abundantemente en Rutáceas, Leguminosas, Umbelíferas, Poligonáceas y Compostáceas (Evans, 2009, p. 252).

Las flavonas pueden estar en forma libre o como glicósidos, estos últimos son solubles en agua y etanol e insolubles en solventes orgánicos (Evans, 2009, p. 252).

Los flavonoides en medio alcalino dan soluciones de color amarillo mientras que en medio ácido dan soluciones incoloras. Algunos de ellos pueden formar quelatos al reaccionar con sales de hierro o aluminio (Evans, 2009, p. 252) (Kukliski, 1999, p. 107).

El grupo es conocido por tener varias acciones farmacológicas entre las que destacan: antiinflamatoria, antialérgica, antitumoral, antioxidante, antitrombótica, vasoprotectora, diurética, antiespasmódica, antibacterial y antimicótica (Evans, 2009, p. 252), antihemorrágica, antiescorbútica, antiarrítmicos, antihepatotóxicos, antivíricos y antiurémicos (Kukliski, 1999, p. 108).

Un subgrupo muy especial es el de las isoflavonas, los cuales ejercen efecto a nivel del sistema endócrino, cuya estructura y funcionalidad son similares al estradiol actuando en las hormonas sexuales provocando un efecto estrogénico débil (Evans, 2009, pp. 252-254).

1.5.1.2. Taninos

Los taninos constituyen un grupo amplio de compuestos hidrosolubles de estructura polifenólica capaces de unirse a proteínas animales. Tienen pesos moleculares de 1000 a 5000 pero también existen pseudotaninos con pesos moleculares bajos (Evans, 2009, p. 225) (Kukliski, 1999, p. 112).

Sus principales características son: forman sólidos amorfos, son solubles en agua (soluciones coloidales), acetona, glicerina y alcohol pero insolubles en cloroformo y éter, pueden formar complejos con metales pesados, se oxidan fácilmente (Kukliski, 1999, p. 112).

Los taninos se clasifican en:

- a) **Taninos hidrolizables:** Son ésteres de azúcares de número variable de ácidos fenólicos. El azúcar generalmente es una glucosa (Játiva, 2000). Estos pueden ser hidrolizados por ácidos o enzimas como la tanasa. Están formados por varias moléculas de ácido fenólico (ácido gálico o ácido hexahidroxidifénico) los que se unen por enlaces éster a una glucosa central. Los principales tipos de estos taninos son los galitaninos y elagitaninos (Evans, 2009, p. 226).
- b) **Taninos condensados:** También conocidos como proantocianidinas, son dímeros o polímeros flavánicos, están relacionados con los pigmentos flavonoicos. Tienen estructuras poliméricas de flavan-3-ol. Un tratamiento con ácidos o enzimas los convierten en una red insoluble llamados flobafenos, estos le otorgan el color rojo característico a algunas drogas (Evans, 2009, p. 227).

Los principales usos farmacológicos de los taninos son como antidiarreicos, antiinflamatorios, antidotos en envenenamientos con metales pesados y alcaloides, antitumoral y tratamiento contra VIH (Kukliski, 1999, pp. 115-116).

1.5.2. Alcaloides

Son sustancias nitrogenadas (nitrógeno heterocíclico), básicas, principalmente de origen vegetal. Poseen una estructura compleja, precipitan con determinados reactivos y son tóxicos. Se originan a partir de aminoácidos, estos se denominan alcaloides verdaderos. Existe un grupo que no deriva de aminoácidos a los que se los denomina pseudoalcaloides y otro grupo cuyo nitrógeno no está dentro del sistema heterocíclico denominados protoalcaloides (Kukliski, 1999, p. 167) (Bruneton, 2001, p. 776).

Se encuentran principalmente en las plantas superiores, distribuidos en los órganos periféricos como flores, semillas, hojas, etc. Cumplen distintas funciones en el vegetal tales como almacenamiento de nitrógeno y defensa (Kukliski, 1999, pp. 167-168).

Los alcaloides son sustancias de gran interés en el ámbito farmacológico. Sus efectos se dan a muy bajas dosis, estos actúan a nivel del sistema nervioso central y autónomo. Además tienen efectos antitumorales, antimaláricos, anestésicos, antifibrilantes, amebicidas, entre otros (Bruneton, 2001, pp. 791-792)

Los alcaloides púricos son derivados de la xantina. Resultan de la unión de un anillo pirimidínico y un imidazólico, no derivan de un aminoácido. Tienen carácter anfótero, son solubles en agua caliente y en disolventes clorados. Los más conocidos son: cafeína, teobromina y teofilina. Sus principales usos son como estimulantes, diuréticos y en el tratamiento del asma en el caso de la teofilina (Evans, 2009, p. 408) (Bruneton, 2001, p. 1062).

1.6. Modelo animal

Una pieza fundamental en las investigaciones biomédicas es el modelo animal, el cual es usado para comprender, diagnosticar y tratar enfermedades humanas y animales. El uso de estos animales constituyen un elemento primordial en el desarrollo avances en la prevención y tratamiento de las enfermedades transmisibles y no transmisibles (Hernández, 2006, p. 252).

1.6.1. *El reactivo biológico*

El reactivo biológico es un animal estandarizado (composición genético-sanitaria definida), debe ser criado y mantenido en ambientes controlados requeridos por cada especie ya que de no cumplirse se obtendrían resultados erróneos y generaría mayores costos por la repetición de los procedimientos además de las implicaciones éticas (Hernández, 2006, p. 253).

Con la finalidad de tener animales adecuados para la investigación se han creado animales libres de gérmenes o axénicos, con flora vírica o bacteriana conocida llamados gnotobióticos y libres de gérmenes patógenos o SPF (Hernández, 2006, p. 253).

Incluso estos animales son reproducidos siguiendo ciertas pautas como las cepas endocriadas, en las cuales se cruzan líneas sanguíneas iguales (hermano x hermana), lo que garantiza la igualdad genética, perfil genético propio, estabilidad por más tiempo, fenotipo igual, sensibilidad a cambios ambientales y distribución mundial (Hernández, 2006, p. 253).

También existen los animales exogámicos los cuales representan la variabilidad genética humana por lo que son usados en investigaciones farmacológicas y toxicológicas (Hernández, 2006, p. 253).

1.6.2. *Principio de las tres Rs*

Está relacionado con el uso humanitario de los animales de experimentación. Define claramente las normas a seguir para el uso ético de estos animales. Las tres Rs implican reducir, reemplazar y refinar, que son fundamentales como estrategia racional e inteligente en la reducción del uso de animales y las causas de dolor (Hernández, 2006, p. 255).

Las investigaciones deben ser realizadas con el número mínimo de individuos, además se debe buscar alternativas como modelos matemáticos, simulaciones en computadoras, pruebas serológicas o ensayos *in vitro*. Por último el refinamiento involucra el conjunto de condiciones óptimas en donde se puede obtener un reactivo biológico adecuado y se evite la repetición de los procedimientos en donde se utilizan un exceso de recursos y se cause excesivo dolor a los animales (Hernández, 2006, p. 255).

1.7. Rata (*Rattus norvegicus*)

1.7.1. Taxonomía

Tabla 6-1: Taxonomía de *Rattus norvegicus*

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Rodentia
Familia	Muridae
Nombre científico	<i>Rattus norvegicus</i> Berkenhout

Fuente: Álvarez, Jorge y Medellín, Rodrigo; 2005

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018

1.7.2. Características Generales

El género *Rattus* es cosmopolita compuesto por 56 especies, capaces de alimentarse y vivir en distintos hábitats. Por ser un animal de elección en investigaciones debido a que se conoce su comportamiento, fisiología y nutrición (Méndez & Pérez, 2011, p. 128).

Rattus norvegicus es una especie originaria de las zonas frías de Asia central, de distribución mundial. A pesar de haber diferencias entre cepas, generalmente la rata es un animal dócil, inquisitivo y fácilmente entrenable. Los cambios en los ciclos de luz permiten a las ratas e investigadores optimizar el tiempo de las investigaciones (Sharp & La Regina, 1998, p. 15).



Figura 10-1: *Rattus norvegicus*

Fuente: <http://www.ciimar.up.pt/boga/en/oquecumbioterio.php>

La manipulación continúa contribuye a que no se desarrolle la agresividad mientras se adapta a situaciones nuevas sin embargo manejos inadecuados, ruidos producidos por otras ratas y deficiencias nutricionales pueden ocasionar cambios en su comportamiento. La rata es un animal nocturno, especialmente activo en la madrugada. Los machos a diferencia de lo que ocurre con los ratones, no pelean cuando viven juntos (Sharp & La Regina, 1998, p. 15).

Carece de vesícula biliar y reflejo de vómito. Su cola posee la función de termorregulación y equilibrio. En situaciones de estrés secreta porfirina de la órbita de los ojos (glándula Harderiana) (Sharp & La Regina, 1998, pp. 18-30)

Tabla 7-1: Parámetros biológicos básicos

Parámetro	Valor
Esperanza de vida (años)	2,5-3,5
Glándulas mamarias	6 pares
Peso corporal del macho (g)	450-520
Peso corporal de la hembra (g)	250-300
Temperatura corporal (rectal)	35,9-37,5°C

Ingesta de alimento (g/100 g peso corporal/día)	5-6
Ingesta de agua (ml/100 g de peso corporal/día)	10-12

Fuente: Sharp, Patrick y La Regina, Marie; 1998

Realizado por: Lissethy, Valverde: 2018

1.7.3. *Características reproductivas*

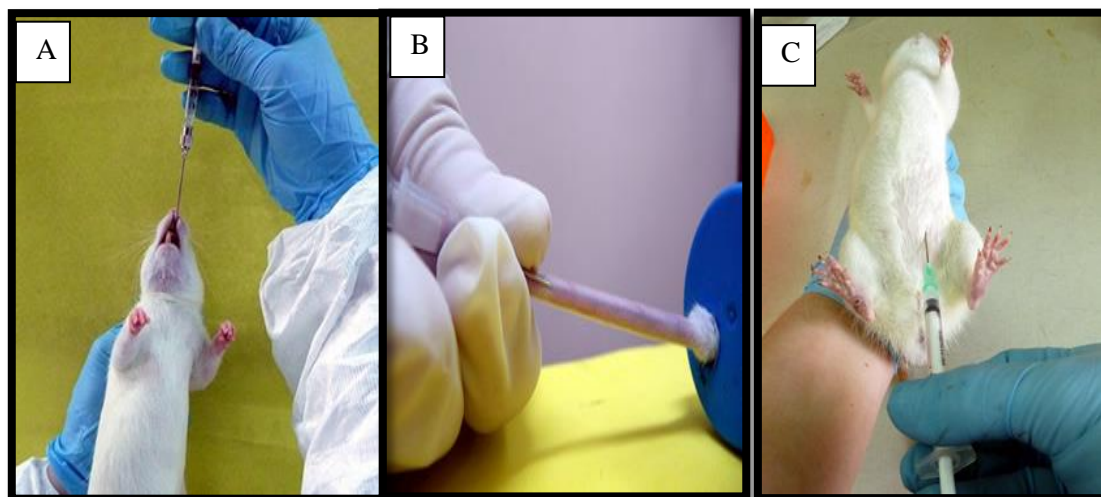
Los sexos se diferencian por la distancia ano-genital, la cual es mayor en machos. La hembra posee un útero bicorne y 6 pares de mamas: 3 torácicas, 1 abdominal y 2 inguinales. Es poliéstrica continua, su ciclo estral es de 4 a 5 días y la duración del celo es de 12 horas. Luego del parto el celo se inicia 24 horas después y aparece un tapón vaginal (Sharp & La Regina, 1998, pp. 20-27).

El macho posee un canal inguinal abierto persistente en la adultez y testículos abdominales. La pubertad dura 6 semanas, la gestación de 21 a 23 días y el periodo de lactancia 21 días. No tienen el efecto Bruce (Feromonas de otro macho impiden la implantación) pero tienen un efecto Whitten leve (sincronización del estro en las hembras después de la introducción de un macho) (Sharp & La Regina, 1998, pp. 27-29).

1.8. *Vías de administración*

Las vías de administración más comúnmente usadas en ratas son (Muñoz, et al., 2011, pp. 8-9):

- **Intraperitoneal (IP):** Consiste en inyectar el medicamento en el abdomen del animal, inclinándolo 35° para no tocar los órganos ni causar peritonitis.
- **Intramuscular (IM):** Se inyecta el medicamento en las extremidades posteriores del animal, introduciendo la aguja paralela al fémur, para esto se utilizan agujas de 25 a 27 G.



**Figura 11-1: Algunas vías de administración de sustancias en ratas. A) Vía Oral
B) Vía Intravenosa C) Vía intraperitoneal**

Fuente: <https://www.bioterios.com/post.php?s=2013-05-03-vas-de-administracin-de-sustancias-en-animales-de-laboratorio>

- **Oral (PO):** Se coloca al animal verticalmente, se introduce una cánula adaptada a una jeringuilla comprobando la deglución del animal se administra el volumen de medicamento y se retira el dispositivo lentamente.
- **Subcutánea (SC):** La administración se realiza tomando la piel del dorso o abdomen del animal para luego inyectar en esta zona el medicamento.
- **Intravenosa (IV):** La administración se realiza en las venas de la cola, para lo cual se las debe dilatar con agua caliente o xilol y por último se inyecta el medicamento.

Tabla 8-1: Volúmenes máximos según las vías de administración.

Vía de administración	Volumen máximo	Observaciones
Subcutánea	5 ml /kg	
Intramuscular	0,1-0,2 ml/ sitio	Administrar en 2 a 3 sitios
Intraperitoneal	10 ml/kg	
Intavenosa	5 ml	Fluidos calientes a temperatura corporal: Administrar sobre 2 a 3 minutos, el volumen de inyección única no debe sobrepasar el 10% del volumen circulante.
Intradérmica	0,05 ml/sitio	

Traqueal	40 µl	Para una rata de 200 g
Intranasal	100 µl	
Gástrica	20 ml/kg	
Subplantar	0,1 ml/ pata	Solamente en una pata.

Fuente: Sharp, Patrick y La Regina, Marie; 1998

Realizado por: Lissethy, Valverde; 2018

1.9. Modelos de evaluación de efecto antiinflamatorio *in vivo*

Para realizar estudios sobre actividad antiinflamatoria *in vivo* se dispone de modelos de acuerdo a la intensidad de la reacción, así se tiene modelos de inflamación aguda y modelos de inflamación subcrónica y crónica (Gómez, et al., 2011, pp. 206-207).

Dentro de los modelos de inflamación aguda se destacan tres métodos que son (Gómez, et al., 2011, p. 207):

- a) Edema subplantar por carragenina.
- b) Protocolo experimental por aceite de crotón.
- c) Edema auricular en ratón inducido por el 13-Acetato de 1-12-O-tetradecanoilforbol (TPA).

1.9.1. Modelo de inducción de edema subplantar por carragenina

Este método fue descrito por primera vez en 1957 por Winter y Porter, modificado en 1981 por Sughisita *et al.* Es un método sencillo y reproducible por lo cual ha sido utilizado ampliamente en el estudio de fármacos antiinflamatorios (Gómez, et al., 2011, p. 207).

El método consiste en administrar una solución de carragenina vía subcutánea en la aponeurosis plantar de la rata. La carragenina genera una respuesta bifásica. La primera fase se caracteriza por la liberación de mediadores inflamatorios como histamina, serotonina y quininas mientras que en la segunda fase se liberan prostaglandinas, bradiquinina, proteasas y lisosomas.

El efecto máximo se observa a las tres horas de haberse administrado la carragenina (Gómez, et al., 2011, p. 207).

1.9.2. Carragenina

En la Farmacopea de Estados Unidos se la describe como un hidrocoloide obtenido por extracción con agua o soluciones alcalinas de las algas rojas. Está conformada principalmente de copolímeros de 3,6-anhidrogalactosa y sulfato de galactosa, estas hexosas están vinculadas alternativamente en sitios α -1,3 y β -1,4 en el polímero (Rowe, et al., 2006, p. 124).

La carragenina se clasifica en tres familias según la posición del grupo sulfato y la presencia o ausencia de anhidrogalactosa. Estas familias son (Rowe, et al., 2006, p. 124):

- λ -Carragenina: Es un polímero no gelificante, contiene cerca de 35 % de éster sulfato por peso y no tiene 3,6-anhidrogalactosa.
- ι - Carragenina: Es un polímero gelificante, contiene cerca de 32% de éster sulfato por peso y un 30% de 3,6-anhidrogalactosa.
- κ - Carragenina: Es un polímero fuertemente gelificante, contiene 25% de éster sulfato por peso y aproximadamente 34% de 3,6-anhidrogalactosa.

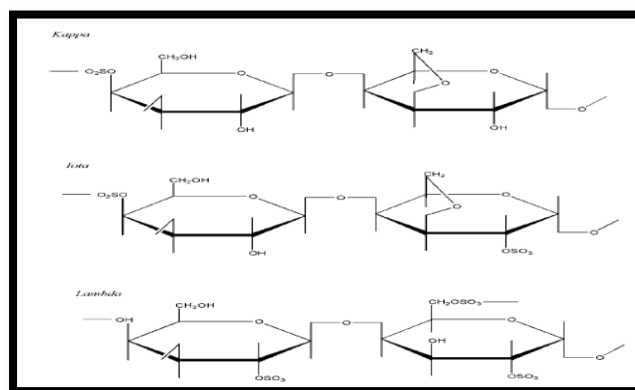


Figura 12-1: Estructura química de los distintos tipos de carragenina

Fuente: Rowe, Raymond, Shenkey, Paul y Owen, Sian; 2006

1.10. DCA (Diseño completamente aleatorio)

Este diseño consiste en la asignación aleatoria de tratamientos a un conjunto de unidades experimentales. Se usa k tratamientos los cuales se asignan al azar a n unidades experimentales. Luego de realizado el experimento se tendrá datos compuestos por kn respuestas de las unidades experimentales agrupados según el tratamiento aplicado (Badii, et al., 2007, pp. 287-288).

En este tipo de diseño se hacen las siguientes suposiciones (Badii, et al., 2007, p. 288):

- a) Los datos se distribuyen normalmente.
- b) La variación entre las unidades tratadas de igual forma se manifiesta de la misma forma en todos los tratamientos.
- c) Los valores observados en cualquier grupo constituye una muestra aleatoria de todas las respuestas posibles para un tratamiento de todas las unidades experimentales.

Las ventajas de este diseño son: permite flexibilidad completa, un análisis estadístico fácil, es sencillo, efectivo, permite determinar el error estándar por unidad experimental. Este tipo de diseño es aplicable cuando el grupo experimental es homogéneo, exista la probabilidad de destrucción de una parte de las unidades experimentales y en experimentos a pequeña escala (Badii, et al., 2007, p. 288).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar y factores de investigación

El material vegetal fue facilitado por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Laboratorio de Bioproductos y Bioprocesos de la Escuela Superior Politécnica del Litoral mediante acuerdo interinstitucional con el Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia GIPRONAF de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

El control de calidad tanto de droga cruda y obtención de extractos fueron realizados en el laboratorio de productos naturales y análisis instrumental (control de calidad de extractos) de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos blandos combinados de *I. guayusa*, *V. patens* y *T. cacao* fueron realizados en el bioterio de la ESPOCH.

2.2. Materiales, equipos y reactivos

2.2.1. *Materia prima*

Las hojas de *Ilex guayusa*, las hojas de *Vernonanthura patens* y la cascarilla de *Theobroma cacao*.

2.2.2. *Reactivo biológico*

Para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* se utilizó ratas (*Rattus norvegicus*).

A. *Descripción*

- **Peso promedio:** 160-210 g
- **Edad:** 2-3 meses
- **Sexo:** Hembras/Machos
- **Lugar de nacimiento:** Bioterio de la Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

B. *Condiciones ambientales*

- **Temperatura:** 22 ± 2 °C
- **Humedad relativa:** 50 ± 10 %
- **Periodo de fotoluminiscencia:** 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.
- **Cama con viruta:** Cambio cada 48 horas (viruta estéril)
- **Alimentación:** Balanceado de roedor (pellets) 25 g / 100 g al día y agua purificada *ad libitum*.

- **Periodo de tiempo:** 4 semanas

2.2.3. Equipos

Balanza analítica RADWAG	Rotavapor Büchi 461RE111
Estufa Proingal	Potenciómetro Accumet Fisher Scientific
Mufla Optic Ivimen System	Espectrofotómetro Helios β
Molino Thomas	Vortex mixet MRC S1 – 100
Zonicador Branson 3510	Autoclave Hirayama HVA-100
Cámara UV	Sorbona Biobase
Cronómetro	Congelador

2.2.4. Materiales de laboratorio

Desecador	Papel aluminio	Mangueras
Cápsulas	Papel absorbente	Cajas y rejillas
Crisoles	Vidrio reloj	Viruta estéril
Pinzas para crisol	Tapas de crisol	Jeringas 1ml
Gradilla	Balones(250,500 ml)	Anaqueles
Tubos de ensayo	Papel milimetrado	Bebedores
Frascos de cristal ámbar	Trípode	Pellet para roedores
Reverbero	Hielo	Papel filtro
Malla metálica	Percolador	Mangueras
Vasos de precipitación (25, 50, 250 y 600 ml)	Balones de aforo(10, 25, 50, 100 y 1000 ml)	Jeringas 3 ml
Probetas (10, 25 y 100 ml)	Varilla de agitación	Cánula
Pipetas (1, 5, 10 ml)	Refrigerante de bolas	Algodón
Embudo	Erlenmeyer (125ml)	

2.2.5. *Reactivos*

Hexano	Ácido sulfúrico	Ácido cítrico monohidrato
Alcohol potable	Reactivo de Fehling	Verde de bromocresol
Agua destilada	Cloruro férrico	Atropina
Ácido clorhídrico	Magnesio metálico	Carragenina 1%
Ácido nítrico	Alcohol amílico	Diclofenaco sódico 50 mg
Nitrato de plata	Tungstato de sodio	Solución salina 0,9%
Peróxido de hidrógeno	Molibdato de sodio	Alcohol antiséptico
Reactivo de Dragendorff	Ácido fosfórico	Vaselina simple
Reactivo de Mayer	Sulfato de litio	
Reactivo de Wagner	Carbonato de sodio	
Reactivo de Baljet	Nitrito de sodio	
Reactivo de Sudán	Cloruro de Aluminio	
Cloroformo	Hidróxido de sodio	
Anhídrido acético	Fosfato dibásico de sodio	

2.3. *Métodos y técnicas*

2.3.1. *Control de calidad de droga cruda*

2.3.1.1. *Cenizas totales*

Para la determinación de cenizas totales se aplicó la técnica descrita en *Quality control methods for medicinal plant materials*. El ensayo se realizó por triplicado. Se aplicó la siguiente fórmula (World Health Organization Geneva, 1998, p. 34):

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

C = Porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = Masa del crisol vacío (g)

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

M₂ = Masa del crisol con la ceniza (g)

100 = Factor Matemático

2.3.1.2. *Cenizas solubles en agua*

Para la determinación de cenizas solubles en agua se aplicó la técnica descrita en Quality control methods for medicinal plant materials. El ensayo se realizó por triplicado. Se aplicó la siguiente fórmula (World Health Organization Geneva, 1998, p. 34):

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

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

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

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

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

M = Masa del crisol vacío.

100 = Factor matemático.

2.3.1.3. *Cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

Para la determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico se aplicó la técnica descrita en Quality control methods for medicinal plant materials. El ensayo se realizó por triplicado. Se aplicó la siguiente fórmula (World Health Organization Geneva, 1998, p. 34):

$$\% \text{ Cenizas insolubles en HCl} = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

M_2 = masa de la cápsula con las cenizas insolubles en HCL, en g.

M_1 = masa de la cápsula con la muestra, en gramos.

M = masa de la cápsula vacía, en gramos.

100 = Factor matemático

2.3.1.4. Humedad

Para la determinación de la humedad se aplicó la técnica descrita en Quality control methods for medicinal plant materials. El ensayo se realizó por triplicado. Se aplicó la siguiente fórmula (World Health Organization Geneva, 1998, p. 36):

$$\text{Hg} = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

Hg = pérdida en peso por desecación (%).

M_2 = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M_1 = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

2.3.1.5. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico fue realizado según la metodología indicada por Miranda, 2006.

2.3.2. *Obtención de los extractos blandos de Ilex guayusa, Vernonia patens y Theobroma cacao*

Para la obtención del extracto etanólico se maceró por 24 horas, 40 gramos de cada planta con 250 ml de etanol al 96%. Luego de transcurrido este tiempo se filtró el extracto y el residuo sólido (marco) se colocó en el mismo recipiente con la misma cantidad de alcohol. Este procedimiento se repitió dos veces.

Los tres extractos se los sometió a un proceso de concentración mediante el uso de un rotavapor, hasta eliminación total del solvente a temperatura no mayor de 60°C. Se obtuvieron extractos blandos.

Los extracto blando de *I. guayusa* tuvo una consistencia sólida, el de *T. cacao* una cremosa por lo que fueron de fácil manejo en cambio el de *V. patens* fue de difícil manipulación por razón de su consistencia pegajosa incluso hubo pérdida del extracto por este motivo.

2.3.3. Control de calidad de los extractos blandos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*.

2.3.3.1. Descripción organoléptica.

En la determinación organoléptica se utilizó la técnica descrita por Ochoa et al, 2013. Se analizaron los siguientes parámetros:

Se redisolvió cada extracto en 10 ml de etanol al 96%. Para la determinación del color se colocó el extracto en un tubo de ensayo hasta llenar las 3/4 partes de su capacidad. Se analizó el color, la presencia de partículas suspendidas, la transparencia y la separación de fases. El ensayo se realizó por duplicado.

Para la determinación del olor se colocó la muestra en un vaso de precipitación de 25 ml, luego se procedió a introducir un pedazo de papel absorbente. Se dejó secar y se procedió a oler la muestra para determinar si correspondía o no al olor característico de cada planta. El ensayo se realizó por duplicado.

2.3.3.2. Control de calidad físico-químico

A. Ensayos físicos.

- **pH:** En la determinación de pH se utilizó la técnica descrita por Ochoa *et al*, 2013, para la cual se utilizó un pHmetro (Ochoa, et al., 2013).

B. Ensayos químicos.

- **Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu**

La cuantificación de fenoles totales se basó en el método descrito por Jara et al 2013 (Jara, et al., 2013, p. 3).

Primero se procedió a la preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu de la siguiente manera:

Se colocó en un balón de fondo redondo 10 g de Tungstato de sodio, 2,5 g de Molibdato de sodio, 5 ml de ácido fosfórico y 10 ml de ácido clorhídrico fumante. Esta mezcla se reflujo por 10 horas. Luego de transcurrido el tiempo se enfrió la mezcla y se añadió 15 g de sulfato de litio y 2 ml de agua de bromo. Esto se sometió a calentamiento por una hora en sorbona. Se colocó el reactivo en un balón de aforo de 100 ml y se aforó con agua destilada.

Se preparó una solución de concentración 1mg/ml (25 mg del extracto blando en 25 ml de etanol al 96%). Se tomó 1 ml de la solución, se le añadió 15 ml de agua destilada junto con 1,25 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, se esperó 8 minutos y se vortizó. Por último se agregó 3,75 ml de una solución de carbonato de sodio al 7,5 %. La mezcla se aforó a 25 ml y fue sometida a oscuridad absoluta por 2 horas.

Se tomó como estándar ácido gálico en diferentes concentraciones, desde 20 ppm hasta 100 ppm, con lo cual se realizó una curva de calibración ($y=0,0014x+0,0144$).

Se realizó la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 765 nm. El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como g EAG/ g de extracto y porcentaje masa-masa.

- **Cuantificación de flavonoides**

La cuantificación de flavonoides se basó en la metodología descrita por Jara *et al.* 2013 de la siguiente manera (Jara, et al., 2013):

Para la obtención de la muestra de ensayo se procedió de la misma manera descrita para la cuantificación de fenoles.

Se colocó en un tubo de ensayo 1 ml de la solución de muestra seguido de 4 ml de agua destilada y 0,3 ml de una solución de nitrito de sodio al 5%, se esperó 5 minutos y se agregó 0,3 ml de una solución de cloruro de aluminio al 10 %. La mezcla se vortizó por 1 minuto y se la colocó en oscuridad absoluta por 5 minutos.

Se tomó como estándar quercetina en distintas concentraciones desde 20 ppm hasta 100 ppm. Con los datos obtenidos se elaboró una curva de calibración ($y=0,0014x+0,0144$).

Luego se procedió a la lectura de las absorbancias en una longitud de onda de 210 nm. El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como g EQ/g de extracto y porcentaje masa-masa.

- **Cuantificación de alcaloides totales mediante el método de Verde de bromocresol.**

Para la cuantificación de alcaloides se utilizó la técnica descrita por Rojas *et al* 2015, se la llevó a cabo de la siguiente manera (Rojas, et al., 2015, pp. 32-37).

Las muestras fueron obtenidas mediante infusión de 20 g de droga cruda (*Ilex guayusa* y *Theobroma cacao*) en 100 ml de agua destilada y se filtró. Se obtuvo aproximadamente 50 ml de cada extracto.

Se preparó una solución de verde de bromocresol, pesando 69,8 mg de este mezclándolo con 3 ml de hidróxido de sodio 2M y 5 ml de agua destilada hasta total disolución. La mezcla se traspasó a un balón de aforo de 1000 ml y se completó el volumen con agua destilada.

También se elaboró una solución tampón de fosfato ácido de sodio de pH 4,7, para lo cual se preparó una solución de concentración 2M del fosfato y se le añadió la solución de ácido cítrico 0,2 M hasta obtener un pH de 4,7.

Como estándar se utilizó una solución de atropina 0,1 mg/ml (100 ppm). Se tomaron alícuotas de esta solución de la siguiente manera: 0; 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 ml. A todas estas se les añadió 5 ml de solución de fosfato pH 4,7 y 5 ml de solución de verde de bromocresol. Por último se añadió volúmenes variables de cloroformo hasta extracción total de los alcaloides.

La fracción clorofórmica se recogió en balones de aforo de 10 ml y se completó el volumen con el mismo solvente. Con estas soluciones se elaboró una curva de calibración ($y=0,298x+0,1266$), realizando la lectura de absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro UV visible.

En cuanto a las muestras, se tomó una alícuota de 5 ml de extracto y se procedió de la misma manera descrita anteriormente. El ensayo se realizó por triplicado.

Con los datos obtenidos se calculó la concentración de alcaloides totales de cada muestra. Los resultados se expresaron como mg EA por g de droga cruda y porcentaje masa-volumen (mg/100 ml extracto).

2.4. Evaluación de la actividad antinflamatoria de extractos acuosos combinados de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*.

2.4.1. Preparación de los extractos acuosos.

Para preparar las combinaciones de extractos acuosos se pesó cada extracto blando según las proporciones y concentraciones descritas en la tabla 1-2. Cada combinación tuvo una concentración distinta en dependencia del peso promedio de los animales en cada grupo, se las disolvió en 10 ml de agua destilada, se sonicó cada una por 10 minutos y se las filtró.

2.4.2. Modelo experimental y población de prueba.

Población

- **Número de animales:** 21 ratas
- **Nombre Científico:** *Rattus norvegicus*
- **Sexo:** Hembras/machos
- **Peso:** 160-210 g
- **Edad:** 2-3 meses
- **Alimento:** Balanceado para roedor en forma de pellets y Agua *ad libitum*.

Tabla 1-2: Evaluación de actividad de extractos combinados a distintas dosis

Código	Grupo	Combinación	Tratamiento	N° de ratas
GB	Blanco	N/A	Sin tratamiento	3
GCP	Control positivo	N/A	Edema inducido por carragenina 1% + Diclofenaco sódico (150 mg/kg)	3
GC1D1	Grupo tratamiento 1	<i>Ilex guayusa</i> (66,2%) <i>Vernonanthura patens</i> (19,6%) <i>Theobroma cacao</i> (14,1%) (Concentración 20 mg/ml)	Edema inducido por carragenina 1% + extracto acuoso 100 mg/kg	3
GC1D2	Grupo tratamiento 2	<i>Ilex guayusa</i> (66, 2%) <i>Vernonanthura patens</i> (19,6%) <i>Theobroma cacao</i> (14,1%) (Concentración 60 mg/ml)	Edema inducido por carragenina 1% + extracto acuoso 300 mg/kg	3
GC2D3	Grupo Tratamiento 3	<i>Ilex guayusa</i> (66,2 %) <i>Vernonanthura patens</i> (33,7%) (Concentración 40 mg/ml)	Edema inducido por carragenina 1% + extracto acuoso 200 mg/kg	3
GC3D3	Grupo Tratamiento 4	<i>Ilex guayusa</i> (66,2%) <i>Theobroma cacao</i> (33,7%) (Concentración 40 mg/ml)	Edema inducido por carragenina 1% + extracto acuoso 200 mg/kg	3
GC4D3	Grupo Tratamiento 5	<i>Vernonanthura patens</i> (52,7%) <i>Theobroma cacao</i> (47,20%) (Concentración 40 mg/ml)	Edema inducido por carragenina 1% + extracto acuoso 200 mg/kg	3

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018.

2.4.3. Protocolo farmacológico

A. Periodo de ambientación

Se agrupó a los animales de investigación de acuerdo a su peso a fin de estandarizarlo, para lo cual se proporcionó el alimento según su necesidad. El agua se entregó a libre demanda.

Se los mantuvo en las condiciones ambientales descritas anteriormente, poniendo mayor énfasis en los siguientes parámetros:

- **Temperatura:** 20 ± 2 °C
- **Humedad:** 50 ± 10 %
- **Periodo de fotoluminiscencia:** 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.
- **Alimentación:** Balanceado para roedor (pellets) 25 g al día y agua *ad libitum*
- **Periodo de tiempo:** 4 semanas

B. Modelo experimental

Tabla 2-2: Denominación de los grupos

Grupos	Repeticiones		
GB	R1	R2	R3
GCP	R1	R2	R3
GC1D1	R1	R2	R3
GC1D2	R1	R2	R3
GC2D3	R1	R2	R3
GC3D3	R1	R2	R3
GC4D3	R1	R2	R3

Realizado por: Lissethy, Valverde; 2018.

Dónde:

- GB: Grupo blanco, administración oral del vehículo y administración de solución de carragenina al 1% (0,1 ml).
- GCP: Grupo control positivo, administración de solución de carragenina al 1% (0,1ml) más diclofenaco sódico (150mg/kg).
- GC1D1: Grupo combinación 1 en la dosis 1, administración de solución de carragenina al 1% (0,1ml) y extracto combinado (100 mg/kg) de *I. guayusa*, *V. patens* y *T. cacao*.
- GC1D2: Grupo combinación 1 en la dosis 2, administración de solución de carragenina al 1% (0,1ml) y extracto combinado (300 mg/kg) de *I. guayusa*, *V. patens* y *T. cacao*.
- GC2D3: Grupo combinación 2 en la dosis 3, administración de solución de carragenina al 1% (0,1 ml) y extracto combinado (200 mg/kg) de *I. guayusa* y *V. patens*.
- GC3D3: Grupo combinación 3 en la dosis 3, administración de solución de carragenina al 1% (0,1ml) y extracto combinado (200 mg/kg) de *I. guayusa* y *T. cacao*.
- GC4D3: Grupo combinación 4 en la dosis 3, administración de solución de carragenina al 1% (0,1 ml) y extracto combinado (200 mg/kg) de *V. patens* y *T. cacao*.

C. Inducción de la patología

- Ensayo edema de carragenina al 1% (Winter *et al*, 1963):
 - Volumen de solución de carragenina al 1%: 0,1 ml
 - Periodos de evaluación: -30'; 0; 1; 2; 3; 4; 24horas (Variación de diámetro de la pata)
 - Vía de administración: Subplantar (aponeurisis de la pata izquierda)
 - Porcentaje de inhibición (Alami, *et al.*, 2018, p. 1051):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(C_T - C_0)_{CONTROL} - (C_T - C_0)_{TRATAMIENTO}}{(C_T - C_0)_{CONTROL}} \times 100 \quad \text{Ecuación (7)}$$

Donde:

C_T = Medida de la pata después de la inducción de la inflamación en determinado tiempo (horas).

C_0 = Medida de la pata antes de la inducción de la inflamación.

D. Periodo de evaluación farmacológica.

Se sometió a los grupos experimentales a un ayuno de 12 horas previo al inicio de la evaluación farmacológica. Se administró 0,1 ml de la solución de carragenina al 1% vía subplantar en la aponeurosis de la pata izquierda. Previo a esto se administró las combinaciones por vía oral, 30 minutos antes de la inducción de la inflamación.

Se inició la evaluación con los machos escogiéndolos totalmente al azar debido a que cada grupo contó con un solo macho y sus pesos estaban entre 190 a 210 g, así se eliminó el sesgo. Se midieron los diámetros de las patas 30 minutos antes de la inducción, en el momento de esta y en periodos posteriores (1h, 2h, 3h, 4h y 24h) (Solanki, et al., 2015, pp. 1278-1280).

Tabla 3-2: Evaluación de la actividad antiinflamatoria

N° grupo	Grupos	Tratamiento	Vía de administración	Evaluación			N° de ratas
				Periodo (horas)	% Inflamación	% Inhibición	
1	Grupo Blanco	Sin tratamiento vehículo (agua destilada)	Vía oral	0-24	X ₁	%	3
		Solución de carragenina al 1% (0,1ml)	Vía subplantar				
2	Grupo control Positivo	Solución de carragenina al 1% (0,1 ml)	Vía subplantar	0-24	X ₃	%	3
		Diclofenaco sódico (150 mg/kg)	Vía oral				

3	Grupo combinación 1 dosis 1	Solución de carragenina al 1% (0,1 ml)	Vía subplantar	0-24	X ₄	%	3
		Extracto combinado de <i>I. guayusa</i> + <i>V. patens</i> + <i>T. cacao</i> (100 mg/kg)	Vía oral				
4	Grupo combinación 1 dosis 2	Solución de carragenina al 1% (0,1 ml)	Vía subplantar	0-24	X ₅	%	3
		Extracto combinado de <i>I. guayusa</i> + <i>V. patens</i> + <i>T. cacao</i> (300 mg/kg)	Vía oral				
5	Grupo combinación 2 dosis 3	Solución de carragenina al 1% (0,1 ml)	Vía subplantar	0-24	X ₆	%	3
		Extracto combinado de <i>I. guayusa</i> + <i>V. patens</i> (200 mg/kg)	Vía oral				
6	Grupo combinación 3 dosis 3	Solución de carragenina al 1%	Vía subplantar	0-24	X ₇	%	3
		Extracto combinado de <i>I. guayusa</i> + <i>T. cacao</i> (200 mg/kg)	Vía oral				
7	Grupo combinación 4 dosis 3	Solución de carragenina al 1% (0,1 ml)	Vía subplantar	0-24	X ₈	%	3
		Extracto combinado de <i>V. patens</i> + <i>T. cacao</i> (200 mg/kg)	Vía oral				
TOTAL							21

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018

2.5. Análisis estadístico

Los datos se tabularon en el programa Excel y se analizaron en el programa SPSS versión 23. Se realizó un Test ANOVA de un factor y un Test de Tukey.

2.5.1. Planteamiento de la hipótesis.

H₀= No existen diferencias significativas en los diámetros de inflamación respecto al tratamiento y al tiempo ($p \geq 0,05$).

H₁= Existen diferencias significativas en los diámetros de inflamación respecto al tratamiento y al tiempo ($p < 0,05$)

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Control de calidad de droga cruda

3.1.1. *Parámetros físicos: cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico y humedad.*

Tabla 1-3: Resultados de parámetros físicos de calidad de droga cruda.

Planta	Cenizas totales (%)	Cenizas solubles en agua (%)	Cenizas insolubles en ácido clorhídrico (%)	Humedad (%)
<i>Ilex guayusa</i>	5,37 ± 0,25	1,45 ± 0,07	1,29 ± 0,03	5,68 ± 0,21
<i>Vernonanthura patens</i>	13,55 ± 0,013	0,86 ± 0,14	10,30 ± 0,13	10,56 ± 0,45
<i>Theobroma cacao</i>	5,77 ± 0,07	2,60 ± 0,14	1,82 ± 0,94	6,29 ± 0,28
Especificaciones	5	2	1	14

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018

Cenizas totales: Los resultados obtenidos para *I. guayusa* (5,37 %) y *T. cacao* (5,77 %) sobrepasan levemente el máximo de 5% especificado en la Real Farmacopea Española, en bibliografía se indica que *T. cacao* puede tener entre 2,6-4,2 % de ceniza (Vega & Kwik-Urbe, 2012, p. 45), lo que no es concluyente debido a la variedad que presenta esta planta. Con respecto a *I. guayusa* se estima un contenido de cenizas de 6-7% (Manzano, et al., 2018).

En caso de *V. patens* (13,55 %) este valor es muy alto, según bibliografía esta planta puede contener entre un 11 a 18 % de cenizas totales lo que puede verse influenciado por el tipo de suelo donde crece la planta (Manzano, et al., 2013, p. 134)

Cenizas solubles en agua: Los resultados obtenidos para *I. guayusa* (1,45 %) y *V. patens* (0,86 %) se encuentran dentro de la especificación de 2 % indicado en la Real Farmacopea Española, lo que indicaría que las muestras tienen una cantidad pequeña de sales minerales.

T. cacao (2,6 %) excede el valor máximo en poco, según bibliografía la cascarilla de cacao contiene cantidades variables de minerales tales como calcio, magnesio, cinc, cobre, manganeso, hierro, sodio y potasio. Este último se encuentra en grandes cantidades en comparación a los demás esto puede deberse al lugar donde creció la planta (Sangronis, et al., 2014).

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico: Los resultados obtenidos para *I. guayusa* (1,29 %) y *T. cacao* (1,82 %) demuestran que el contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en la muestra supera levemente el máximo de 1 % indicado en la Real Farmacopea Española, lo que indicaría un ligero contenido de sílice.

Sin embargo para *V. patens* el resultado sobrepasa en mucho dicho límite lo que puede indicar componentes propios de la planta, lo cual no se puede asegurar con certeza debido a la escasa investigación de esta especie. Según bibliografía la planta puede tener 4,3 % de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (Manzano, et al., 2013, p. 134).

Humedad: Los resultados obtenidos en las tres muestras, demuestran que estaban dentro del límite de humedad indicado en la Real Farmacopea Española (14%), por lo tanto estaban correctamente preservadas tanto química como microbiológicamente.

3.1.2. Parámetros químicos. Tamizaje fitoquímico.

El tamizaje fitoquímico es un paso importante dentro del estudio de plantas medicinales debido a que éste ayuda a identificar compuestos químicos (metabolitos) que pueden variar en su proceso de síntesis (Martins, et al., 2014, p. 159).

Mediante el uso de este método se puede dilucidar una actividad biológica real para la planta en estudio ya que permite la identificación adecuada de metabolitos y la localización del órgano que los puede o no contener (Martins, et al., 2014, p. 159).

Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico.

Planta Metabolito	<i>Ilex guayusa</i>	<i>Vernonanthura patens</i>	<i>Theobroma cacao</i>
Extracto Hexánico			
Grasas		---	+
Alcaloides	---	---	---
Cumarinas	---	---	---
Triterpenos y esteroides	+	+	---
Extracto etanólico			
Catequinas	+	---	---
Resinas	---	---	---
Azúcares reductores	+	+	+
Cumarinas	---	---	---
Triterpenos y esteroides	+++	++	---
Saponinas	---	+	+
Fenoles (taninos)	Verde intenso(+++)	Verde intenso(+++)	Verde intenso(+++)
Quinonas	---	---	---
Flavonoides	---	---	Amarillo claro(+)
Antocianidinas	---	---	+
Alcaloides	----	---	---
Extracto acuoso			
Alcaloides	+++	----	+++
Saponinas	+	---	---

Azúcares reductores	+	+	+
Fenoles (taninos)	Verde intenso(+++)	Verde intenso(+++)	Verde intenso(+++)
Mucílagos	---	---	---
Flavonoides	Amarillo claro (+)	Amarillo claro(+)	---
Principios amargos y astringentes	+ Amargo	+ Amargo + Astringente	---

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018

El tamizaje fitoquímico se realizó para determinar los metabolitos secundarios presentes en las muestras debido a que la cantidad, producción e incluso composición química de estos dependen de factores tales como la época del año, condiciones ambientales, hora del día en que se realizó la cosecha, secado, transporte, lugar donde creció la planta etc., lo que genera una gran variabilidad (Martins, et al., 2014, p. 162), incluso puede verse afectada por la información genética de la planta (Kukliski, 1999, p. 9).

En las tres muestras se pudo verificar la presencia de flavonoides, fenoles tipo taninos y azúcares reductores. Metabolitos como los alcaloides se observaron en *T. cacao* e *I. guayusa*, los cuales se manifestaron mayoritariamente en el extracto acuoso y compuestos terpénicos tanto en *I. guayusa* y *V. patens*.

3.2. Rendimiento de los extractos blandos.

Tabla 3-3: Resultados del rendimiento de los extractos blandos.

Plantas	Peso de droga cruda (g)	Peso de extracto blando(g)	Rendimiento (%)
<i>Ilex guayusa</i>	40,00	4,34	10,85
<i>Vernonanthura patens</i>	40,00	3,05	7,62
<i>Theobroma cacao</i>	40,00	4,37	10,94

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018.

El rendimiento de extracción se ve afectado por la afinidad de los compuestos de las plantas con el solvente de la planta y la polaridad de éste. Según los datos obtenidos, se puede decir que *V. patens* tiene una mayor afinidad por el solvente debido al rendimiento obtenido (7,62 %) en comparación con *T. cacao* (10,94 %) e *I. guayusa* (10,85%).

Con respecto a la polaridad, se usó etanol al 96% debido a que es un solvente de polaridad media el cual puede extraer metabolitos tanto apolares como polares, lo que benefició a la investigación ya que se evaluó la actividad de metabolitos polares.

3.3. Control de calidad de extractos blandos.

3.3.1. Descripción organoléptica.

Tabla 4-3: Parámetros de calidad organolépticos.

Planta / Parámetro	<i>Ilex guayusa</i>	<i>Vernonanthura patens</i>	<i>Theobroma cacao</i>
Color	Verde oscuro, transparente, sin partículas en suspensión ni separación de fases.	Negro, opaco, sin evidencia de partículas en suspensión, sin separación de fases.	Café claro, opaco, con partículas suspendidas y separación de fases.
Olor	Etanólico herbal, característico	Etanólico herbal, característico	Etanólico, característico del cacao ligeramente dulce.

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018.

Se evaluó las características organolépticas de cada uno de los extractos, poniendo mayor énfasis en el color, transparencia, partículas en suspensión, separación de fases y olor.

En el caso de *I. guayusa*, el extracto fue de color verde claro, transparente a contra luz debido a la ausencia de partículas en suspensión con olor etanólico herbal característico. En el extracto de *V. patens* se pudo observar una coloración negra que no permitió verificar si existían o no partículas en suspensión pero no hubo separación de fases, de olor etanólico herbal característico.

En el extracto de *T. cacao* se pudo observar una coloración café clara muy opaca debido a la gran cantidad de partículas en suspensión y una clara separación de fases esto pudo deberse a diferencias en las densidades de las partículas suspendidas, de olor etanólico característico ligeramente dulce.

3.3.2. pH

Tabla 5-3: Resultados de la medición de pH

Planta	pH
<i>Ilex guayusa</i>	5,31 ± 0,03
<i>Vernonanthura patens</i>	5,40 ± 0,20
<i>Theobroma cacao</i>	4,68 ± 0,19

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018

Para determinar la calidad de los extractos se evaluó su pH. Los tres extractos tenían un pH ácido, lo que indicaría que la presencia de ácidos orgánicos libres que se pueden absorber fácilmente en el estómago del sujeto de prueba (Delgado, et al., 2003).

3.3.3. Cuantificación de metabolitos secundarios

3.3.3.1. Fenoles totales

Tabla 6-3: Resultados de la cuantificación de fenoles totales.

Parámetro Planta	Fenoles totales (g EAG/ g de extracto)	Fenoles totales (%)
<i>Ilex guayusa</i>	0,18 ± 0,000	17,5 ± 0,00
<i>Vernonanthura patens</i>	0,20 ± 0,002	19,9 ± 0,17
<i>Theobroma cacao</i>	0,11 ± 0,001	11,17 ± 0,12

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018.

Según los resultados obtenidos *V. patens* presentó 19,9% de fenoles totales. Este resultado se pudo comparar con la investigación de Martínez, 2017 (Martínez, 2017, p. 26) en la cual se estableció varios resultados para este parámetro presentando concentraciones de equivalentes de ácido gálico que se encontraron entre 10,40 – 37,02%, en extracto acuosos. Debido a que no se encontró información sobre extractos etanólicos, se tomaron estos resultados como referencia (Martínez, 2017, p. 26).

Para *I. guayusa* el porcentaje de fenoles fue 17,5%, lo que sobrepasa los datos reportados en la investigación de Pardau *et al* (5,34% - 6,42%) (Pardau, et al., 2017, p. 4601). En bibliografía se indica que el contenido de metabolitos secundarios pueden ser afectados por factores bióticos y abióticos por lo cual los contenidos de fenoles en cualquiera de las muestras no es concluyente (Luna, et al., 2018, p. 81).

En cuanto a *T.cacao* se obtuvo 11,17 % lo cual fue comparado con los resultados de Almeida *et al*, cuyo estudio evaluó la cantidad de metabolitos tanto primarios como secundarios antes y después del proceso de fermentación de la cascarilla de cacao, se estableció un 2,12 % (Almeida,

et al., 2017, p. 4), mientras que en el estudio de Vivanco *et al*, fue de 1,02 % para la variedad Nacional y 2,03 % para la variedad CCN-51 (Vivanco, et al., 2017, p. 219).

Con lo antes expuesto se puede decir que el contenido de fenoles en *T. cacao* depende de la variedad, procesos a los que se someta la muestra, etc.

3.3.3.2. Flavonoides.

Tabla 7-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides.

Parámetro Planta	Flavonoides (g EQ/g de extracto)	Flavonoides (%)
<i>Ilex guayusa</i>	0,09 ± 0,0004	8,81 ± 0,04
<i>Vernonanthura patens</i>	0,10 ± 0,0005	10,14 ± 0,05
<i>Theobroma cacao</i>	0,09 ± 0,0004	8,81 ± 0,04

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018

Respecto al contenido de flavonoides se obtuvo un 8,81 % para *I. guayusa*, este valor sobrepasa lo indicado por Radice *et al*, 4,6% (Radice, et al., 2016, p. 4), lo que puede deberse entre otras cosas al origen de la muestra debido a que la síntesis de flavonoides se ve afectada por condiciones propias de cada planta ya sea como señalamiento químico, defensa o acción sobre enzimas (Cartaya & Reynaldo, 2001).

V. patens tuvo 10,14%. En bibliografía se estima que esta planta puede contener entre 12,11 %-30,96%, en extractos acuosos. Con esto se puede decir que la mayoría de flavonoides de esta especie son solubles en agua y muy poco en etanol (Martínez, 2017, p. 29).

Por último *T. cacao* tuvo 8,81% de flavonoides, esto contrasta con lo expresado por Almeida *et al*, en cuya investigación concluyó un 0,038 % de flavonoides en extractos hidroalcohólicos y

0,032 % en extractos acuosos (Almeida, et al., 2017, p. 4). Sin embargo establecer una comparación entre estos resultados y el de la presente investigación no pudo llevarse a cabo debido a la diferencia entre los solventes de extracción.

Los flavonoides son moléculas con diversas polaridades en dependencia si se encuentran unidos a un azúcar o no (agliconas), por lo que comparar entre distintos tipos de extractos hubiese sido incorrecto.

3.3.3.3. Alcaloides totales.

Tabla 8-3: Resultados de la cuantificación de alcaloides totales.

Parámetro	Alcaloides totales (mg EA/ g de droga cruda)	Alcaloides totales (%)
Planta		
<i>Ilex guayusa</i>	0,79 ± 0,03	15,80 ± 0,57
<i>Theobroma cacao</i>	0,59 ± 0,03	11,80 ± 0,53

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018.

La cuantificación de alcaloides totales se realizó por motivo de la combinación de extractos ya que las plantas analizadas contienen cafeína y teobromina, que son alcaloides conocidos por sus efectos en el sistema nervioso central. En el caso de *T. cacao* se sabe que tiene trazas de teofilina, un alcaloide utilizado como broncodilatador en caso de asma bronquial, además de otras sustancias que generan adicción.

I. guayusa tuvo 15,80 % de alcaloides totales, en bibliografía se estima un 3 % de cafeína (Manzano, et al., 2018, p. 8620) pero no se encontró porcentajes de teobromina lo que indicaría que el contenido de este alcaloide podría ser superior al 10% en la muestra.

Para *T. cacao* se obtuvo 11,8 % de alcaloides totales. Según Vega & Kwik-Urbe el contenido de cafeína en las semillas de cacao se encuentran entre 0,1-0,7% y de teobromina entre 0,8-1,4% (Vega & Kwik-Urbe, 2012). Quizás el resultado obtenido en el presente trabajo se debió a la metodología utilizada para la cuantificación ya que comúnmente se usa la extracción con solventes con cambio de pH.

3.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos combinados de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*.

Tabla 9-3: Diámetro de inflamación (mm)

Tiempo \ Grupo	Blanco	Diclofenaco sódico (150mg/kg)	Combinación 1 (100 mg/kg)	Combinación 1 (300 mg/kg)	Combinación 2 (200 mg/kg)	Combinación 3 (200 mg/kg)	Combinación 4 (200 mg/kg)
-30'	24,67 ± 0,58	24,33 ± 1,53	24,67 ±1,53	23,67 ± 1,53	24,67 ± 3,06	23,33 ± 3,21	24,33 ± 2,31
0h	28,00 ± 2,65	28,33 ± 1,53	27,67± 2,52	28,33 ± 3,06	27,00 ± 3,46	27,67 ± 2,08	27,00 ± 3,46
1h	28,33 ± 2,08	27,33 ± 2,52	26,33± 1,15	27,33 ± 1,53	27,33 ± 2,52	26,67 ± 1,15	26,00 ± 1,73
2h	27,67 ± 0,58	27,67 ± 1,53	25,67± 0,58	24,00 ± 1,00	26,00 ± 1,73	25,67 ± 2,08	25,67 ± 1,53
3h	26,33 ± 1,15	24,67 ± 2,08	26,00± 0,00	24,67 ± 0,58	26,00 ± 1,73	25,67 ± 2,31	26,33 ± 0,58
4h	26,00 ± 1,73	24,33 ± 1,53	25,33± 2,08	25,67 ± 1,15	26,00 ± 1,73	26,00 ± 1,00	26,33 ± 0,58
24h	25,00 ± 1,00	24,67 ± 1,53	24,67± 1,53	24,33 ± 1,15	25,33 ± 2,52	24,67 ± 2,52	25,33 ± 2,08

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018

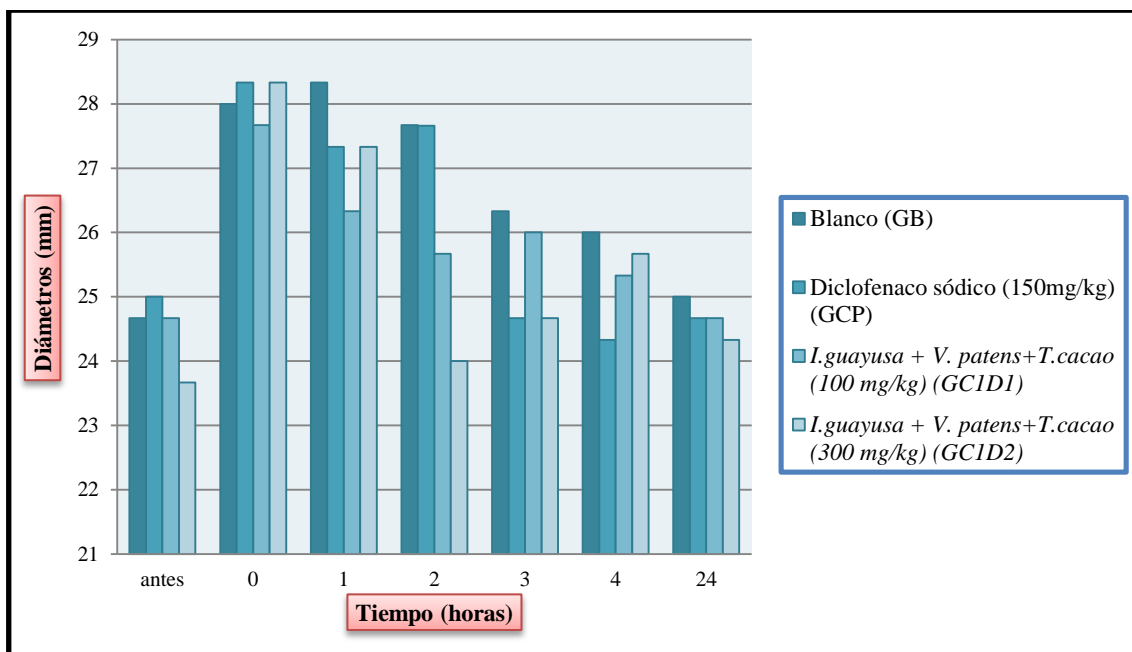


Gráfico 1-3: Variaciones de los diámetros de inflamación en función del tiempo para la combinación 1.

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018.

En el gráfico 1-3 se puede observar las variaciones de diámetro en el tiempo de la combinación 1 (*Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*) a distintas dosis. Según la gráfica se puede decir que ambas dosis son efectivas debido a la reducción del edema con el transcurso del tiempo aunque cabe recalcar que la dosis 2 (300 mg/kg) a la primera hora y cuarta hora presentó una reducción de la actividad.

Esto puede deberse a que se trabajó con animales de experimentación de distinto sexo, quizás esto fue un factor detonante para estos resultados ya que se sabe que las hormonas en las hembras influye en la acción farmacológica. En estudios se ha demostrado que las ratas hembras son más sensibles a la acción de los fármacos (Ruiz, 2001)

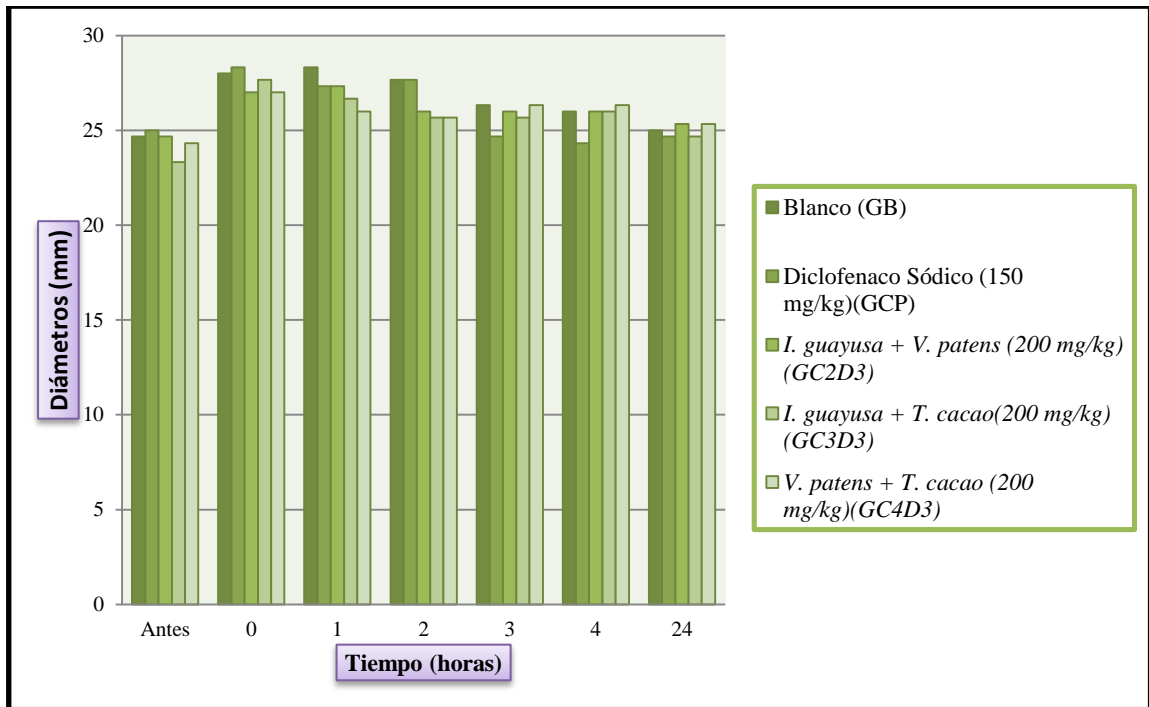


Gráfico 2-3: Variaciones de los diámetros de inflamación respecto al tiempo para las combinaciones 2, 3 y 4.

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018.

En el caso de las combinaciones 2, 3 y 4 se pudo observar ligeras diferencias en las variaciones de los diámetros de la pata pero cabe destacar la actividad de la combinación 3 que a las 24 horas igualó la acción del control positivo.

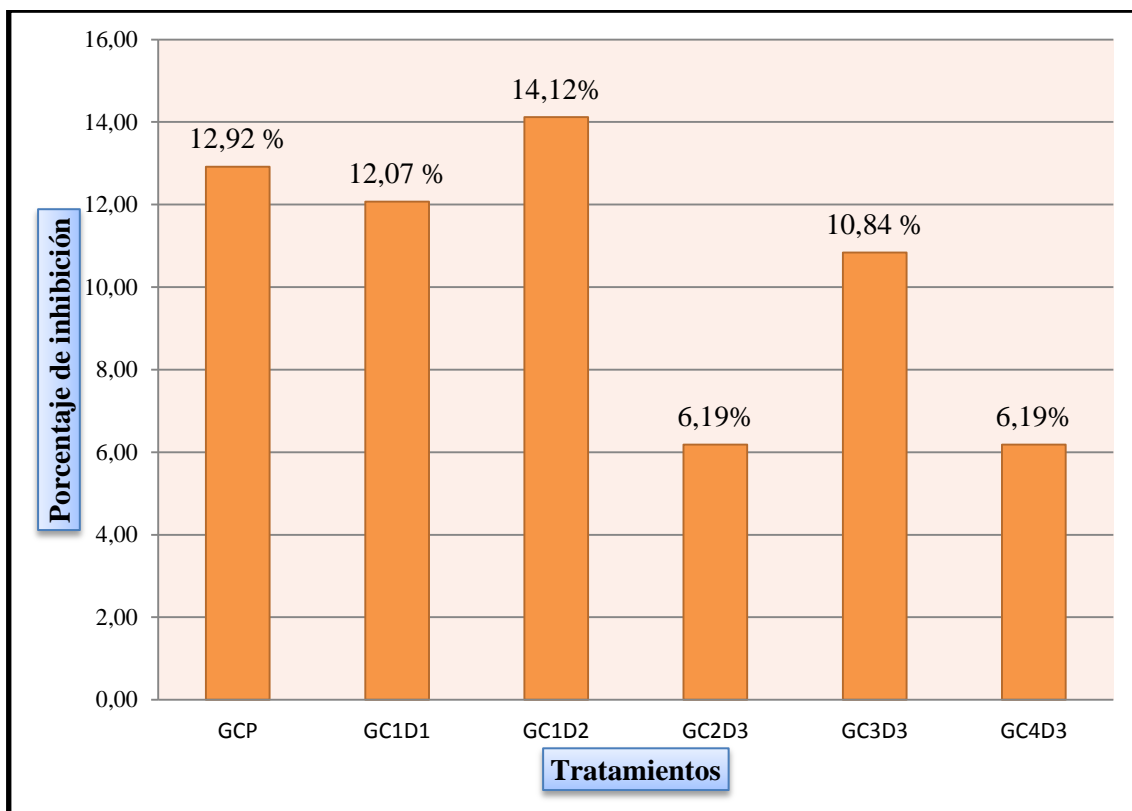


Gráfico 3-3: Comparación de los porcentajes de inhibición 24 horas después de la inducción de la patología entre los distintos tratamientos.

Realizado por: Lissethy Valverde, 2018.

En el gráfico 3-3 se puede observar los porcentajes de inhibición de los distintos tratamientos. La combinación 1 (*Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*), dosis 1 (100 mg/kg) presentó un porcentaje de inhibición similar al control positivo (diclofenaco sódico 150 mg/kg) pero la dosis 2(300 mg/kg) lo superó.

En las demás combinaciones se pudo observar que todas tuvieron porcentajes menores al control positivo, por lo tanto se puede decir que estas son menos efectivas que la combinación de las tres plantas incluso en una dosis mayor. Aunque comparando las tres combinaciones la más efectiva fue la combinación *I. guayusa* + *T.cacao* por lo tanto existió sinergia entre los componentes de estas plantas.

Por lo tanto la combinación 1 es muy efectiva a las 24 horas debido a la sinergia establecida entre los distintos metabolitos asociados y es directamente proporcional a la dosis.

También la efectividad de esta combinación depende de la cantidad de fenoles, flavonoides y alcaloides presentes.

Según bibliografía *Ilex guayusa* contiene compuestos muy diversos tales como el ácido nicotínico que es un precursor de un grupo de los AINEs (Radice, et al., 2016), metilxantinas como la cafeína que es usada en enfermedades inflamatorias respiratorias al inhibir la acción de las prostaglandinas (Carrera, et al., 2015, p. 107) y teobromina.

Además presenta una cantidad considerable de fenoles cuya actividad radica en su capacidad de capturar radicales libres, en el caso particular de la inflamación especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Luna, et al., 2018, p. 93).

En el caso de *Vernonanthura patens* los flavonoides se encontraron en un porcentaje superior a las otras plantas. Estos compuestos ejercen su acción antiinflamatoria inhibiendo la acción del TNF y las interleucinas. *Theobroma cacao* por su parte contiene polifenoles y alcaloides cuyos efectos ya fueron descritos anteriormente.

También cabe mencionar la presencia de terpenos, En *Ilex guayusa* se encuentra el ácido ursólico y ácido oleanólico (Radice, et al., 2016, p. 107) un compuesto con conocido efecto antiinflamatorio que al igual que los flavonoides inhiben al TNF y las interleucinas (Gómez, et al., 2011, p. 195).

3.5. Análisis estadístico.

3.5.1. Prueba ANOVA

Tabla 10-3: Prueba ANOVA de un factor (tratamientos)

DIÁMETRO

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5,450	6	,908	,498	,806
Dentro de grupos	76,672	42	1,826		
Total	82,122	48			

Se analizó si existía o no diferencias significativas entre todos los grupos de tratamiento aplicando una prueba ANOVA unifactorial con un coeficiente de confianza de 0,05($p \leq 0,05$).

Se usó como variables el tiempo, los diámetros y el tratamiento. En la prueba ANOVA se analizó las medias de los diámetros frente al factor tratamiento lo cual arrojó como resultado una significancia de 0,806 lo que indica que hay diferencias entre los tratamientos.

Por tal razón se puede decir que la efectividad de las distintas combinaciones está directamente ligada a las proporciones de cada extracto. Además cabe recalcar el contenido de fenoles, flavonoides y alcaloides en cada muestra.

Tabla 11-3: Prueba ANOVA de un factor (tiempo)

DIÁMETRO

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	57,920	6	9,653	16,753	,000
Dentro de grupos	24,202	42	,576		
Total	82,122	48			

Cuando se analizó las medias de los diámetros frente al tiempo se obtuvo una significancia del 0,00 como es un valor menor de 0,05 se acepta la hipótesis nula, no existen diferencias entre los

grupos respecto al tiempo. Según estos resultados se puede decir que todas las combinaciones son efectivas con el transcurso del tiempo, independientemente de las proporciones de cada extracto.

3.5.2. Test de Tukey.

Tabla 12-3: Test de Tukey de los distintos tiempos de medición variable diámetro.

TIEMPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
30 minutos antes	7	24,3343			
24 horas	7	24,8571	24,8571		
4 horas	7		25,6657		
3 horas	7		25,6671		
2 horas	7		26,0486	26,0486	
1 hora	7			27,0457	27,0457
0 horas	7				27,7143
Sig.		,853	,073	,201	,653

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

- a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 7,000.

El test de Tukey arrojó que existen subgrupos homogéneos los cuales están agrupados por columnas, cabe recalcar que los diámetros en el tiempo 1 o 30 minutos antes de la inducción de la patología y 24 horas después se encuentran agrupados en una sola columna lo que indicaría que las dimensiones iniciales de la pata se recuperaron casi totalmente luego de transcurrido un día comprobando la efectividad de todas las combinaciones de extractos.

Según el coeficiente de confianza ($p < 0,05$), los subgrupos son diferentes por lo tanto se puede decir que las combinaciones actúan distinto en cada periodo de tiempo. Algunas actúan mejor cuando recién se induce la patología pero pierden efectividad con el tiempo y en otras se observó mayor efectividad a las 24 horas.

CONCLUSIONES

- El control de calidad de la droga cruda sirvió para verificar las condiciones de preservación microbiológica y química además se pudo deducir la cantidad de material inorgánico presente en la muestra mediante las cenizas.
- En el tamizaje fitoquímico se pudo estimar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios los cuales dependen de múltiples factores como la época de año, hora de la recolección etc. Los metabolitos comunes en las tres plantas fueron fenoles y flavonoides que tienen actividad antiinflamatoria reportada. También se pudo determinar la presencia de metilxantinas en *Ilex guayusa* y *Theobroma cacao*, las cuales tienen actividad sobre mediadores inflamatorios. Cabe destacar la presencia de terpenos en *I. guayusa* y *V. patens*, los cuales pueden actuar con los otros metabolitos y ejercer sinergia.
- Mediante la cuantificación de fenoles (*Ilex guayusa* 17,5%; *Vernonanthura patens* 19,90% y *Theobroma cacao* 11,17%), flavonoides (*Ilex guayusa* y *Theobroma cacao* 8,81% y *Vernonanthura patens* 10,14%) y alcaloides (*Ilex guayusa* 15,80% y *Theobroma cacao* 11,80%) se pudo sustentar la presente investigación ya que las tres muestras presentaron cantidades considerables de estos metabolitos con lo cual se tuvo la certeza de que las combinaciones podrían tener actividad antiinflamatoria importante.
- El análisis estadístico reveló que las combinaciones eran diferentes en cuanto a su efecto lo cual se pudo comprobar al analizar este luego de 24 horas. La combinación de los tres extractos (GC1D1 y GC1D2), dieron una mayor actividad similar al diclofenaco sódico e incluso mayor en el caso de la dosis de 300 mg/kg (GC1D2) por lo tanto existió sinergia entre los distintos metabolitos presentes en las muestras de las tres especies.
- Las combinaciones de extractos de dos especies no presentaron una actividad antiinflamatoria importante luego de 24 horas con lo cual se deduce que no son tan efectivas como combinar los extractos de tres especies.

- La combinación de *Ilex guayusa* y *Theobroma cacao* fue más efectiva que las combinaciones donde se incluía a *Vernonanthura patens* por esta razón se podría concluir que posiblemente ésta última posee algún componente que produciría antagonismo con las demás.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la combinación de las tres plantas a dosis inferiores a 100 mg/kg y superiores a 300 mg/kg.
- Evaluar la combinación de *Ilex guayusa* y *Theobroma cacao* a dosis superiores a 200 mg/kg.
- Realizar el estudio de estas combinaciones en un modelo de inflamación crónica a fin de determinar la utilidad de la combinación de los extractos en enfermedades como la artritis reumatoidea.
- Analizar la toxicidad de estas combinaciones.
- Estudiar estas combinaciones para otro tipo de actividad biológica como antioxidante, antitumoral, etc, debido al contenido de fenoles y alcaloides.
- Identificar los compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides a fin de determinar la verdadera potencia de estas combinaciones como antiinflamatorias.

BIBLIOGRAFÍA

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. *Vademecum IQB.* [En línea]. Buenos Aires: ANMAT. 2014. [Consulta: 30 de julio de 2018.]. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/d020.htm>.

Aguirre, Zhofre; et al. *Plantas medicinales de la zona andina de la provincia de Loja.*[PDF] Loja , Ecuador. Universida Nacional de Loja, 2014.[Consulta: 20 de julio de 2018]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/301200536> Plantas medicinales de la zona andina de la provincia de Loja

Alami, Shah; et al. "Evaluation of anti-nociceptive, anti-inflammatory and antipyretic potential of Mikania cordata (Burm. f.) Robinson in experimental animal mode". *Saudi Journal of Biological Sciences.*[En línea], 2018, 25(1), pp. 1049–1055. [Consulta: 12 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X18300172>

Almeida, Osana; et al. "Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity and fatty acid". *The Korean Society of Food Science and Technology and Springer Science.* . [En línea], 2017, (Rio de Janeiro). pp. 1-8. [Consulta: 17 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/319974581> Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites antioxidant activity and fatty acids

Álvarez, Jorge & Medellín, Rodrigo. *Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Rattus norvegicus Berkenhout, 1769.* [En línea]. Ciudad de México-México. 2005. [Consulta: 20 de mayo de 2018.]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Rattusnorvegicus00.pdf>.

Badii, M.: et al. "Diseños experimentales e investigación científica". *Innovaciones de negocios.* [En línea] .2007, (México) 4(2). pp. 283–330, [Consulta: 04 de junio de 2018.]. ISSN 1665-9627. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/315813627> Disenos experimentales e investigacion cientifica Experimetal designs and scientific research.

Blair, Silvia & Madrigal, Beatriz. *Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica.*[En línea]. Antioquia-Colombia: Universidad de Antioquia, 2005. [Consulta: 25 de noviembre de 2017]. Disponible en:

https://books.google.com.ec/books/about/Plantas_antimal%C3%A1ricas_de_Tumaco.html?id=8a7CKa3yXr0C&redir_esc=y

Bruneton, J. *Farmacognosia: Fitoquímica de plantas medicinales*. Segunda edición. Zaragoza- España : Acribia S.A., 2001.pp. 227-1059.

Cantú, Silvana; et al. "El ácido araquidónico y sus derivados. Generalidades de los prostanoideos en relación con procesos inflamatorios". *Ciencia e Investigación*. [En línea], 2017, (Buenos Aires) 67(4).pp. 5-12. [Consulta: 15 de noviembre de 2018.]. Disponible en: <http://aargentinapciencias.org/wp-content/uploads/2018/01/RevistasCeI/tomo67-4/1-cei67-4-2.pdf>.

Carrera, S.; et al. "Citrato de cafeína: ¿por qué usarlo en los recién nacidos?". *Perinatología y reproducción humana*. [En línea], 2015, (México) 29(3), pp. 106-112. [Consulta: 12 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187533715000357>

Cartaya, O. & REYNALDO, Inés. "Flavonoides: Características químicas y aplicaciones". *Cultivos Tropicales*. [En línea], 2001, (La Habana) 22(2), pp. 5-14. ISSN: 0258-5936. [Consulta: 09 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>

Clark, Michelle; et al. 2012. *Farmacología*. Quinta. Barcelona : Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

Consejo Nacional de Planificación. *Plan Nacional del Buen Vivir 2017-2021*. [En línea]. Quito : Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo - Senplades, 2017. pp. 1-148. [Consulta: 15 de diciembre de 2018]. Disponible en: http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL_OK.compressed1.pdf

Consejo Nacional de Salud. *Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos y Registro terapéutico*. Novena. Quito : Publiasesores, 2014. p. 449.

De la Torre, Lucía; et al. *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. [En línea]. Quito : Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Universidad de Aarhus, 2008. pp. 1-322. ISBN 978-9978-77-135-8. [Consulta: 28 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.grupoecologiatropical.com/wp-content/uploads/2016/10/2008-PUB-QCA-PUCE-2008-Enciclopedia.pdf>

Delgado, Antonio; et al. *Introducción a la química terapéutica*. Segunda. Barcelona : Diaz de Santos, 2003. p. 146

Domínguez, Xorge. *Métodos de investigación Fitoquímica*. México : Limusa, 1979. p. 81

Dostert, Nicolas.; et al. Hoja botánica: Cacao. *Proyecto Perú Biodiverso*. [En línea], 2011 (Lima). [Consulta: 22 de junio de 2018.] Disponible en: http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf.

Dueñas, Juan; et al. *Runa guayusa – desarrollo de un sistema de cultivo agroforestal de Ilex guayusa Loes.*. Quito : Teacraft Technical Services, 2013. pp. 34-50

Enciso, Edwin & Arroyo, Jorge. "Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas". *Anales de la Facultad de Medicina*. [En línea], 2011, 72(4), pp. 231-237. ISSN: 1609-9419. [Consulta: 12 de noviembre de 2107]. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1074>

Evans, W. *Pharmacognosy*. 16. s.l. : Elsevier, 2009. pp. 53-61

Florez, Jesús; et al. *Farmacología Humana*. Tercera. Barcelona : Masson, 1997. pp. 305-389. ISBN: 84-458-0613-0.

Giovannini, Peter. "Medicinal plants of the Achuar (Jivaro) of Amazonian Ecuador: Ethnobotanical survey and comparison with other Amazonian pharmacopoeias". *Amazonian pharmacopoeias*. [En línea], 2015, (164(4), págs. 1-33. [Consulta: 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/272099900_Medicinal_plants_of_the_Achuar_Jivaro_of_Amazonian_Ecuador_Ethnobotanical_survey_and_comparison_with_other_Amazonian_pharmacopoeias

Gómez, Harold; et al. "Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. [En línea] 2011, (Santiago de Chile), 10(3), pp. 182-217. [Consulta: 04 de junio de 2018]. ISSN 0717 7917. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85618379003.pdf>

Gómez, M.; et al. "Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular". *Nutrición hospitalaria*. [En línea], 2011, (Madrid) 26(2), pp. 289-292. ISSN 0212-1611 . [Consulta: 23 de noviembre de 2017]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000200007

Hernández, Ingrid; et al. "Estudio farmacognóstico preliminar de tallo y raíz de la especie Moringa oleífera Lam cosechada en Machala.. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. [En línea], 2017, (La Habana) 22(1), pp. 1-14. [Consulta: 24 de diciembre de 2017]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962017000100013

Hernández, s. " El modelo animal en las investigaciones biomédicas". *Biomedicina*. [En línea], 2006, 2(3), pp. 252-256. ISSN: 1510-9747. [Consulta: 23 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3/modelo.pdf>

Jara, Adriana; et al. "Antioxidant activity and total phenolics of plants used in traditional medicine in Ecuador". *The 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*. [En línea], 2013, (Suiza).pp. 1-6. [Consulta: 23 de octubre de 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/269202887_Antioxidant_activity_and_total_phenolics_of_plants_used_in_traditional_medicine_in_Ecuador

Kalvatchev, Zlatko; et al. *THEOBROMA CACAO L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud.. Revista Agroalimentaria*. [En línea], 1998, (Caracas) 6, pp. 23-25. ISSN-e 1316-0354. [Consulta: 23 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3233588>

Kukliski, Claudia. 1999. *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. s.l. : Omega, 1999. pp. 94-116

LEÓN, Milagros; et al. "Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares". *Finlay*. [En línea], 2015, 5(1), págs. 47-62. ISSN 2221-2434. [Consulta: 23 de noviembre de 2017]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24342015000100006

Leyva, Rocío; et al. " Efectos secundarios de los antiinflamatorios no esteroideos a nivel gastrointestinal, renal y cardiovascular en pacientes con artritis reumatoidea". *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. [En línea], 2007, (México) 12(1), pp. 41-45. ISSN: 1665-7330. [Consulta: 23 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/473/47311958007.pdf>

Luna, Lorena; et al. "Phenolic Compounds: A good choice against chronic degenerative diseases". *Studies in Natural Products Chemistry*. México : Elsevier, 2018, pp. 79-100.

Machado, Jorge; et al. "Estudio farmacoepidemiológico de uso de antiinflamatorios no esteroideos en pacientes de alto riesgo cardiovascular".*Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. [En línea] , 2013, (Lima) 30(4), pp. 626-629. ISSN 1726-4634. [Consulta: 16 de marzo de 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000400014

MANZANO, Patricia; et al."Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae) endémica de Ecuador". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. [En línea], 2013,(La Habana)18 (1), pp. 131-139. [Consulta: 16 de junio de 2018]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000100015

Manzano, Patricia; et al. "Estudio químico de los compuestos lipídicos de las hojas, tallos y flores de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae)". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. [En línea], 2013, (La Habana)18(4), pp. 575-585. [Consulta: 20 de diciembre de 2017]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400009

Manzano, Patricia; et al. "Effect of drying methods on physical and chemical properties of *Ilex guayusa* leaves" *Revista Nacional de Agronomía*. [En línea], 2018, (Medellín) 71(1), pp. 8617-8622. [Consulta: 29 de noviembre de 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/327428419_Effect_of_drying_methods_on_physical_and_chemical_properties_of_Ilex_guayusa_leaves

Martínez Quiroz, Elitta Melissa. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de hojas de *Vernonanthura patens* (kunth) H. Rob (Asteraceae).[En línea] (tesis)(Pregrado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, 2017. pp. 26-29. [Consulta: 28 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/20140>

Martins, Dainei; et al. "Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae)". *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. [En línea], 2014, (Manaus) 2(6), pp. 158-171. ISSN 0719-4250. [Consulta: 15 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/271076848> Tamizaje fitoquimico y evaluacion de las actividades biologicas de Duroia macrophylla Rubiaceae Phytochemical prospection and biological activity of Duroia macrophylla Rubiaceae

Mcgettigan, Patricia & Henry, David. 2013. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High-Income Countries. [En línea], 2013. [Consulta: 28 de enero de 2018.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001388>.

Méndez, Luisa & Pérez, Andrés. "Del laboratorio al campo abierto: el uso de protocolos de adaptación y socialización en *Rattus norvegicus*" *Suma psicológica*. [En línea], 2011, (Rosario)18(1), pp. 127-129. ISSN 0121-4381. [Consulta: 16 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/262555768> Del laboratorio al campo abierto el uso de protocolos de adaptacion y socializacion en Rattus Norvegicus

Muñoz, José; et al. "La habilidad para sujetar y manejar animales de laboratorio no se adquiere fácilmente". *Revista electrónica de veterinaria*. [En línea], 2011. (Zacatecas) 12(5), pp. 1-11. [Consulta: 23 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050511B/051116.pdf>

Navarro, Jaime; et al. *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales*. México : Samsara, 2012. ISBN 978-970-94-2830-8. pp.49-120

Ochoa, Ania; et al. "Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana". *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. [En línea], 2013, (México) 1(44), págs. 1-9. [Consulta: 25 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57929946007.pdf>

Olivas, Francisco; et al. "Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud". *Nutrición hospitalaria*. [En línea], 2015, (México) 31(1), pp. 55-66. ISSN 0212-1611. [Consulta: 20 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v31n1/05revision05.pdf>

Organización Mundial de la Salud. 2017. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). [En línea]. 2017. [Citado el: 04 de 11 de 2018.]. Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)).

Panak, Jelena; et al. "Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application". *Molecules*. [En línea], 2018, (Osijek), 24(1404), pp. 1-14. [Consulta: 10 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29890752>

Pardau, Madelein; et al. "Antioxidant and anti-inflammatory properties of Ilex guayusa tea preparations: a comparison to Camellia sinensis teas". *Food & Function*, 2017, (Pretoria) 8(12), pp. 4601-4610.[Consulta: 14 de octubre de 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/321056415_Antioxidant_and_anti-inflammatory_properties_of_Ilex_guayusa_tea_preparations_a_comparison_to_Camellia_sinensis_teas

Perea, Arturo; et al. "Antiinflamatorios no esteroideos y sus aplicaciones terapéuticas. Parte I". *Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora*. [En línea], 2016, (Oaxaca), 33(2), pp. 73-82.[Consulta: 28 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=69428>

Porth, C. *Fisiopatología Salud-Enfermedad: Un enfoque conceptual*. s.l. : Editorial médica Panamericana, 2006. pp.387-395

Prieto, M. "Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs). ¿Dónde estamos y hacia dónde nos dirigimos?". *Científica dental: Revista científica de formación continuada*. [En línea], 2007, (La Rioja) 4(3), pp. 29-38. [Consulta: 12 de abril de 2018]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5368024>

Radice, Matteo & Vidari, Giovanni. "Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial" *Revista de ciencias de la vida*. [En línea], 2007, (Cuenca) (6) , pp. 3-11. [Consulta: 12 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047390002.pdf>

Radice, Matteo; et al. "Ilex guayusa: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities". *Mol2Net*. [En línea], 2016, (Puyo) 2, pp. 2-8. [Consulta: 12 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://sciforum.net/conference/mol2net-02>

Richard, Mitchell; et al. *Patologic Basis of Disease*. Quinta. Philadelphia : Elsevier, 2012. pp. 44-70

Robbins, Stanley. *Patología estructural y funcional*. México : Nueva Editorial Interamericana, 1975.

Rojas, Luisa; et al. *Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios en plantas*. Machala : Universidad Técnica de Machala, 2015. ISBN: 978-9978-316-62-7. pp.32-46

Rowe, Raymond; et al. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Quinta. Londres : Pharmaceutical Press, 2006. ISBN 0 85369 618 7 . p. 124

Ruiz, J. "Factores fisiológicos que modifican la acción de los fármacos en medicina veterinaria". *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. [En línea] , 2001, (14(1), págs. 36-48. [Consulta: 10 de enero de 2019]. Disponible en: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/323750>

Sangronis, Elba; et al. "Cascarilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones" . *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. [En línea], 2014, (Caracas) 64 (4), pp. 123-130. ISSN 0004-0622. [Consulta: 16 de enero de 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222014000200007

Sequeda, Luis; et al. "Ilex guayusa (Aquifoliaceae): Amazon and Andean Native Plant". *Pharmacologyonline*. [En línea], 2016, (Bogotá) 3, pp. 193-202. SSN: 1827-8620. [Consulta: 12 de octubre de 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/311981728_Ilex_guayusa_Aquifoliaceae_Amazon_and_Andean_Native_Plant

Sharp, Patrick y La Regina, Marie. *The Laboratory Rat*. Boca Ratón : CRC Press, 1998. pp. 40-60.

Solanki, Himanshu; et al. "Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats". *International Journal of Biological Macromolecules*[En línea], 2015, (India) 72(1), pp. 1277–1282, [Consulta: 31 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316426>.

The United States Pharmacopeial Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. Trigésima. Rockville : Port City Press, 2007. p. 600.

Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. [En línea]. México. 27 de 05 de 2010. [Consulta: 16 de enero de 2018.] Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn45837>.

Vega, César y Kwik-Urbe, Catherine. "Theobroma cacao- An introducción to the plant, its composition, uses and health benefits". [ed.] Nissim Garti y Neil Widlak. *Cocoa Butter and related compounds*. Maryland : AOCS press, 2012, págs. 35-56.

Villacís, J. "Etnobotánica y sistemas tradicionales de salud en ecuador. Enfoque en la guayusa (*Ilex guayusa* loes)". *Revista Etnobiología* . [En línea], 2017, (Quito) 15(3), pp. 79-88. ISSN 1665-2703. [Consulta: 30 de junio de 2018] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/322208679_Etnobotanica_y_sistemas_tradicionales_de_salud_en_Ecuador_Enfoque_en_la_Guayusa_Ilex_guayusa_Loes

Villalba, E. "Inflamación I". *Revista de actualización clínica*. [En línea], 2014, (Bolivia) 43, pp. 2261-2265. ISSN 2304-3768. [Consulta: 23 de noviembre de 2017]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci_abstract

Vivanco, Erick; et al. "Caracterización físico-química de la cascarilla de theobroma cacao L. Variedades Nacional y CCN-511". *Conference Proceedings UTMACH*. [En línea], 2017,(Machala) 2, pp. 213-221. [Consulta: 28 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://investigacion.utmachala.edu.ec/proceedings/index.php/utmach/article/view/309>

Waizel, Salomón; et al. "Cacao y chocolate: seducción y terapéutica". *Anales Médicos de la Asociación médica de la Clínica ABC*. [En línea], 2012, (México) 57(3), pp. 236-245. [Consulta: 11 de diciembre de 2017]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/abc/bc-2012/bc123k.pdf>

Winter, C.; et al. "Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs". *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*. [En línea], 1963, (West Point) 111(3), pp. 544-547. [Consulta: 15 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://garfield.library.upenn.edu/classics1983/A1983PZ17000002.pdf>

World Health Organization Geneva. Quality control methods for medicinal plant materials. [En línea]. Génova. WHO.1998. [Consulta: 22 de mayo de 2018.] Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41986/9241545100.pdf;jsessionid=D78136DF0024F983CAD97C31C594D3D6?sequence=1>.

Zeballos, L. "Inflamación". *Revista Actualización Clínica*, [En línea], 2011, (La Paz)13, pp. 675-681. ISSN 2304-3768. [Consulta: 23 de noviembre de 2017]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682011001000010&script=sci_arttext

ANEXOS

ANEXO A: Control de calidad de la droga cruda. Determinaciones físicas.

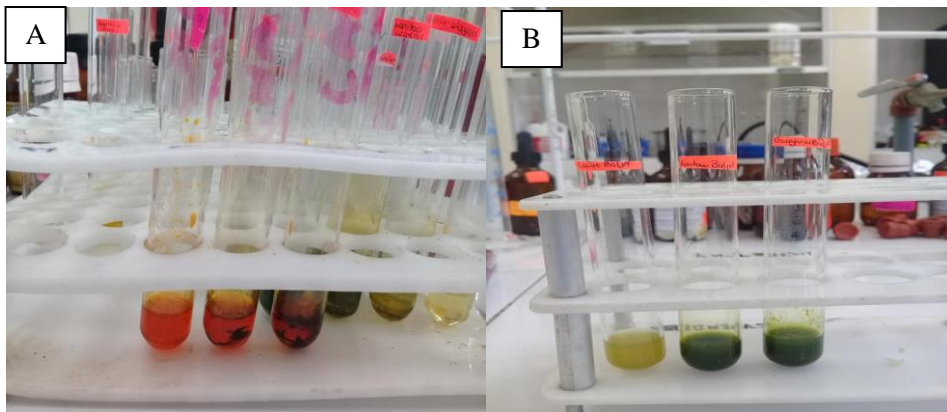


Fotografía 1- 1: Determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico.

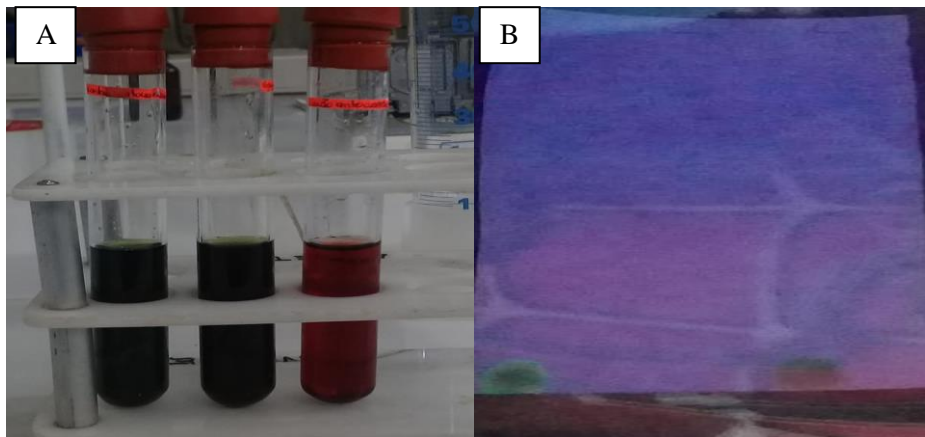


Fotografía 2-1: Determinación de humedad

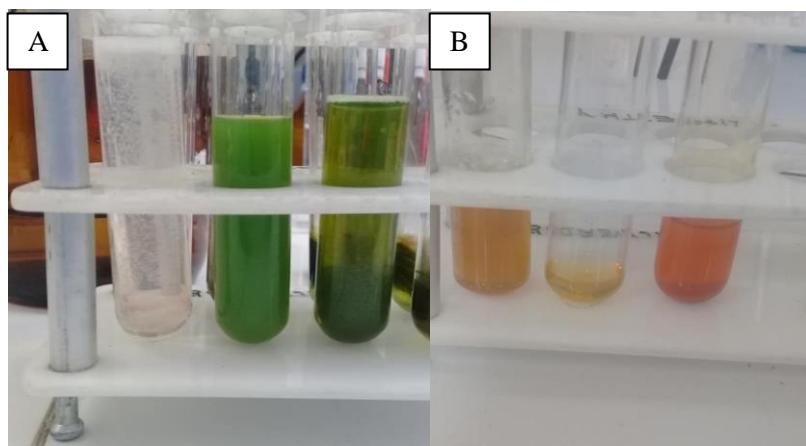
ANEXO B: Control de calidad de la droga cruda. Tamizaje fitoquímico



Fotografía 3-1: Extracto hexánico (A: Ensayo de Mayer, alcaloides. B: Ensayo de Baljet, cumarinas)

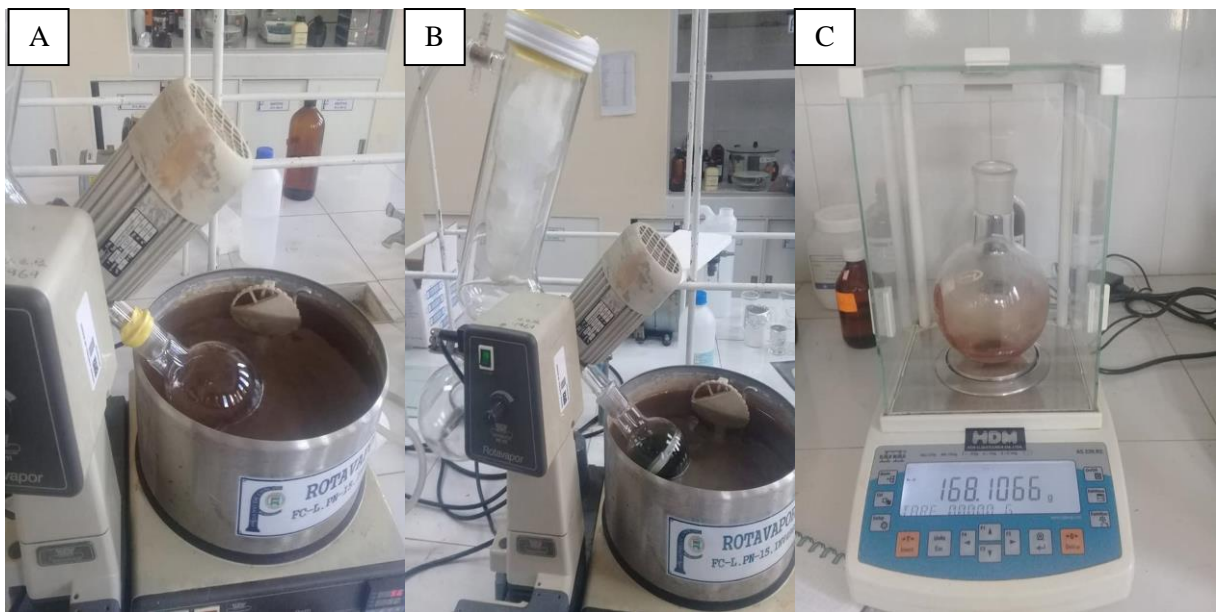


Fotografía 4-1: Extracto etanólico (A: Ensayo de antocianidinas. B: Ensayo de catequinas)



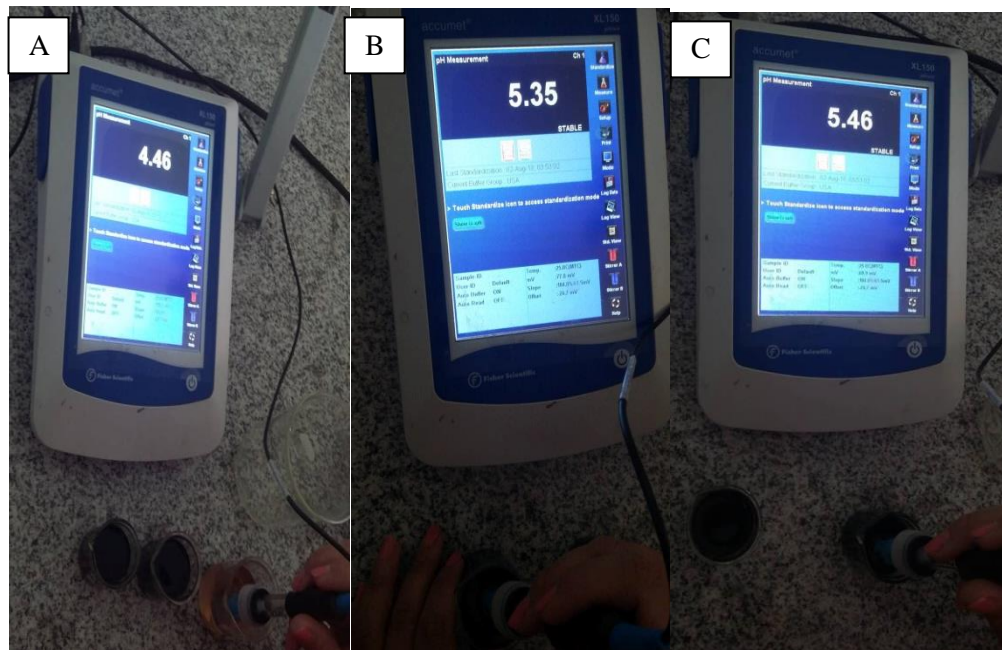
Fotografía 5-1: Extracto acuoso (A: Ensayo de espuma. B: Ensayos para alcaloides)

ANEXO C: Concentración de los extractos etanólicos.



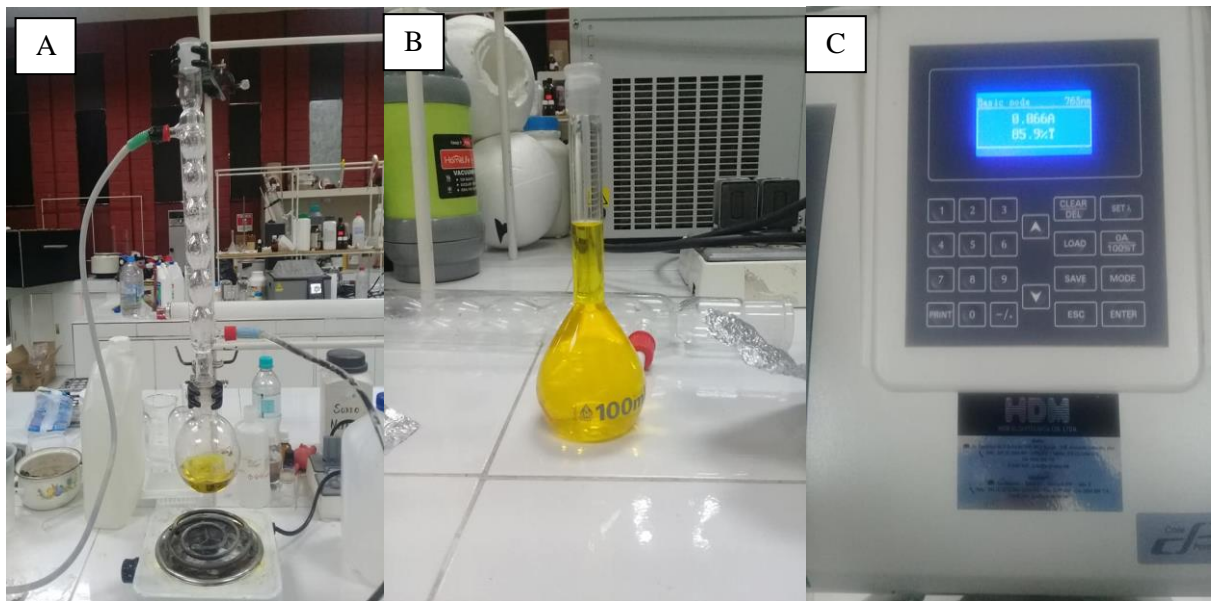
Fotografía 6-1: Concentración de extractos mediante el uso del rotavapor (A: *T. cacao*. B: *I. guayusa*); C: Extracto blando de *T. cacao*

ANEXO D: Control de calidad de los extractos blandos. Medición de pH.



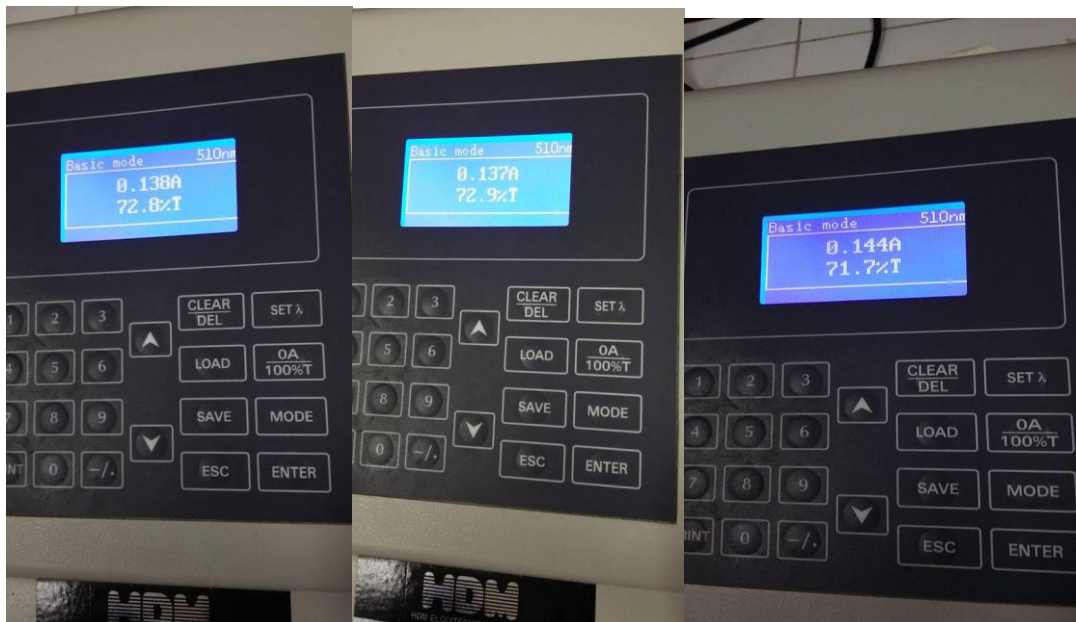
Fotografía 7-1: Medición de pH en los extractos etanólicos (A: *T. cacao*. B: *I. guayusa*. C: *V. patens*)

ANEXO E: Cuantificación de fenoles



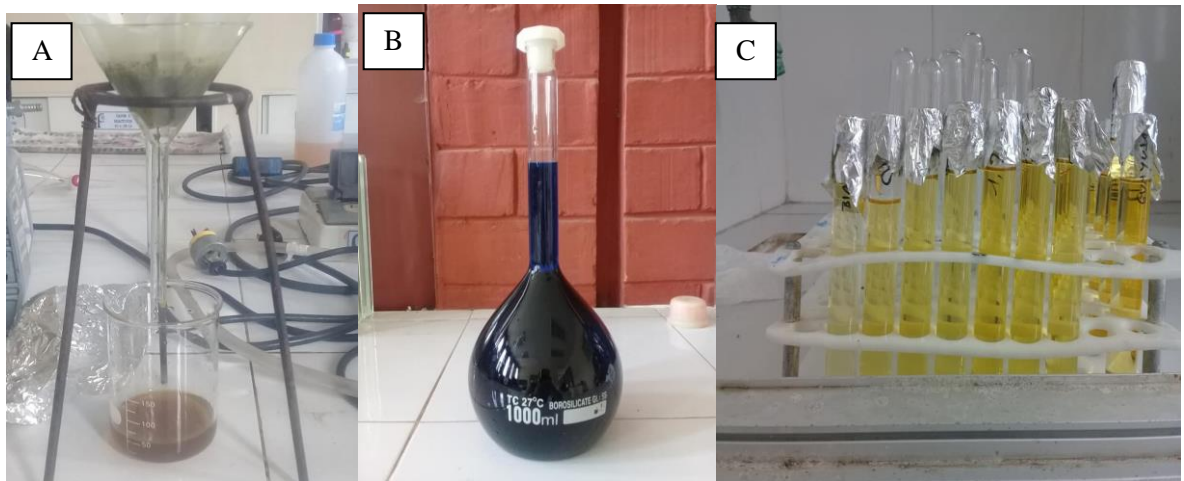
Fotografía 9-1: Preparación de reactivos(A: Equipo para preparar el reactivo de Folin-Ciocalteu. B: Reactivo de Folin-Ciocalteu); C: Lectura de muestras en el espectrofotómetro UV Visible a una longitud de onda de 765 nm.

ANEXO F: Cuantificación de flavonoides

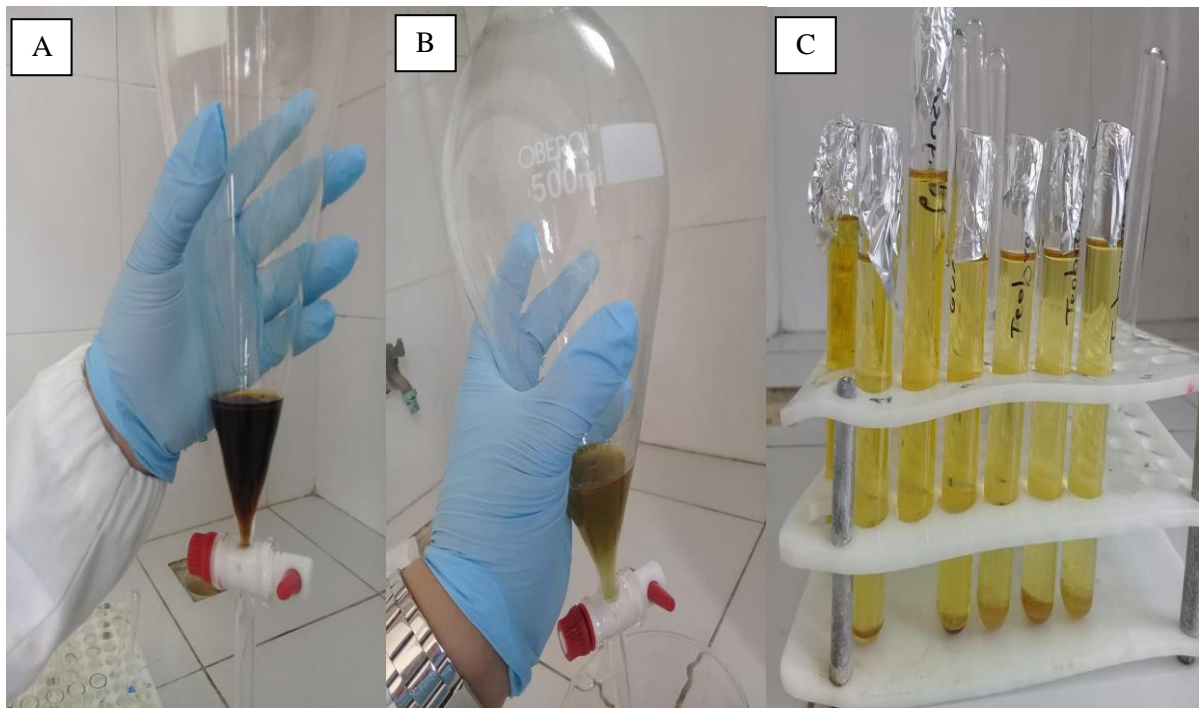


Fotografía 10-1: Lectura de las absorbancias de la muestra de *T. cacao* en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 510 nm.

ANEXO G: Cuantificación de alcaloides totales



Fotografía 11-1: (A: Obtención del extracto acuoso. B. Solución de verde de bromocresol. C. Soluciones patrón de atropina)



Fotografía 12-1: Extracción de alcaloides totales (A: *I. guayusa*. B: *T. cacao*); C. Muestras

ANEXO H: Curva de calibración de alcaloides totales

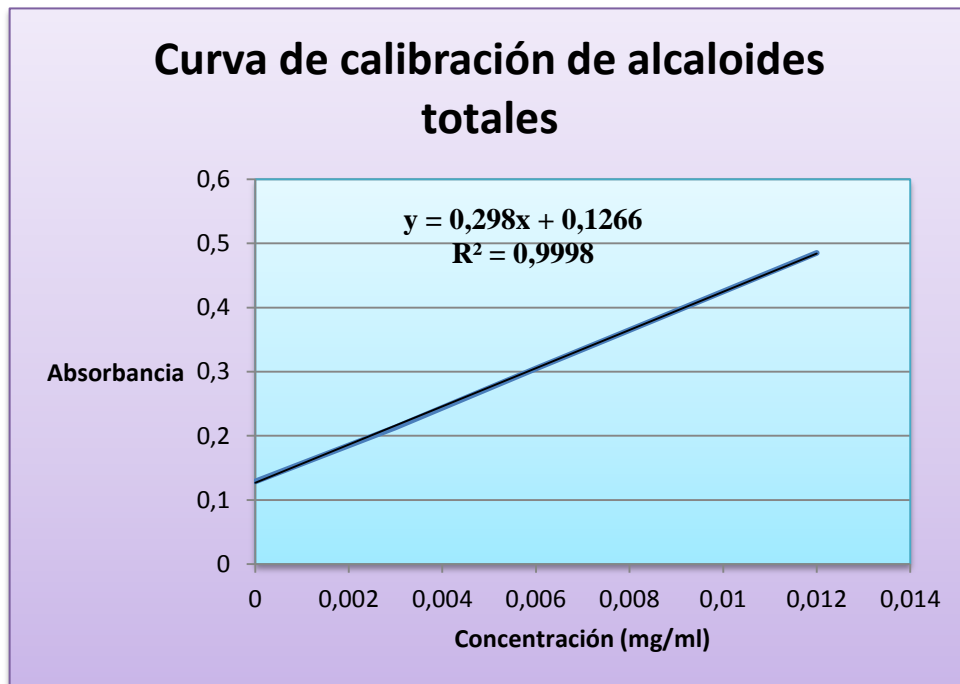


Gráfico 1-5: Curva de calibración para alcaloides totales.

Realizado por: Lissethy, Valverde. 2018

ANEXO I: Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos acuosos combinados *I. guayusa*, *V. patens* y *T. cacao* en modelo animal rata.



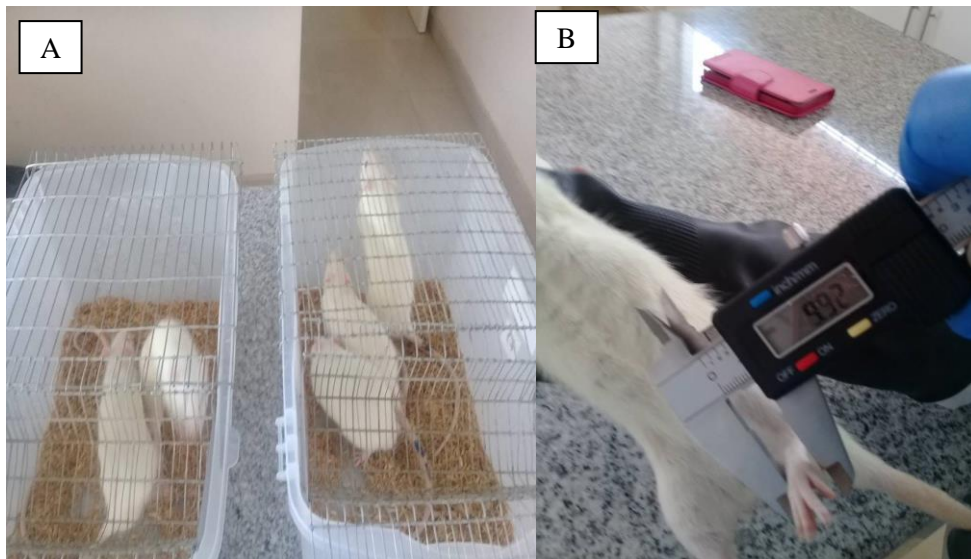
Fotografía 13-1: Ambientación de los animales de experimentación



Fotografía 14-1: Administración oral de los extractos



Fotografía 15-1: Administración subplantar de la solución de carragenina al 1%.



Fotografía 16-1: A. Animales de experimentación. B. Medición de la inflamación

ANEXO J: Guía de movilización de especies vegetales.

MINISTERIO DEL AMBIENTE



**GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y
FAUNA SILVESTRE**
Nro. DPAP-UPN-VC-2019-007

Fecha de emisión: 23/01/19

Fecha de movilización: 25/enero/2019-06h00 Válido hasta: 26/enero/2019 – 06h00

La Dirección Provincial de Pastaza, Autoriza a la MSc. Karen Acosta León. La movilización de muestras de flora, **Desde:** El Cantones Arajuno y Pastaza. Provincia de Pastaza, **Hacia:** La ciudad de Riobamba, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Según la siguiente lista:

No	Código	Nombre Científico	Cantidad	N° Envases
1	A1. LLex	<i>Llex guayusa</i>	300g	Fundas plásticas con cierre hermético
2	A2. Vernonthura	<i>Vernonthura patnes</i>	300g	Fundas plásticas con cierre hermético

Observaciones:

Los especímenes, muestras o elementos constitutivos se movilizarán en:


mpresa de transporte interprovincial, Touris San Francisco.

Los especímenes van en calidad de:

- Traslado de centro de manejo ()
Desde:
Hasta:
- Comercio: ()
- Investigación: (X) Nombre de la Investigación: "Estudio de la biodiversidad en el Ecuador, Ecología, Conservación y su Potencial Uso Sostenible".

Firmas de responsabilidad por la expedición:


.....
Ledo: Victor Curicama
Responsable de Biodiversidad DPAP.
C.I. 171909902-8


.....
Srta. Lissethy del Pilar Valverde Zumba
C.C. 1600506586