



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE  
*Ilex guayusa* (Loes), *Vernonanthura patens* (Kunth) Y *Theobroma  
cacao* (Linneo) EN EL MODELO ANIMAL RATA (*Rattus  
norvegicus*) DE LABORATORIO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN:**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: MARÍA NARCISA PALCHIZACA PINGUIL**

**DIRECTORA: DRA. SUSANA ABDO LÓPEZ, M.Sc.**

**Riobamba - Ecuador**

**2019**

©2019, María Narcisa Palchizaca Pinguil

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

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

El Tribunal del trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de Titulación Tipo: Trabajo experimental “**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE *Ilex guayusa* (Loes), *Vernonanthura patens* (Kunth) Y *Theobroma cacao* (Linneo) EN EL MODELO ANIMAL RATA (*Rattus norvegicus*) DE LABORATORIO**” de responsabilidad del señorita. María Narcisa Palchizaca Pinguil, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dra. Susana del Pilar Abdo López, M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Lcda. Karen Lisseth Acosta León, M.Sc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

María Narcisa Palchizaca Pinguil

030200509-5

## **DEDICATORIA**

Mi trabajo de titulación la dedico con todo mi amor y afecto a Dios por haberme dado la vida, salud y por haberme permitido cumplir este anhelo.

A mis padres Segundo y María quienes con su amor, paciencia y sacrificio me apoyaron a lo largo de toda esta trayectoria de formación profesional.

A mi esposo Felipe gracias por estar siempre en esos momentos difíciles brindándome su amor, comprensión y paciencia.

A mi preciosa hija Paulina por ser mi fuente de inspiración y motivación para poder sobresalir cada día y así poder luchar para que la vida ofrezca futuro mejor.

A mis hermanas Manuela Y Blanca por estar siempre presente brindándonos su apoyo moral.

Narcy

## AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi gratitud a Dios por bendecirnos la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, por ser apoyo y fortaleza. Gracias a mis padres: Segundo y María por ser los principales promotores de mi sueño, por confiar y creer en mis perspectivas, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

A mi esposo por ser apoyo incondicional en mi vida, que con su amor y respaldo, me ayuda alcanzar mi sueño.

A mi preciosa Paulina por ser mi fuerza y fortaleza, y a mi pequeño Angelito que cuidas desde cielo, dándome energía y aliento, gracias te extraño amor.

A mis docentes de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por haberme compartido sus conocimientos a lo largo de la formación de mi profesión, de manera especial a la Dra. Susana Abdo tutor de mi trabajo e titulación y Licda. Karen Acosta colaborado quienes han guiado con sus valiosos conocimientos, gracias a ustedes con su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Narcy

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| Ag-Ac           | Antígeno-anticuerpo                       |
| CD62L           | L-selectina                               |
| CD62P           | P-selectina                               |
| MEC             | Matriz extracelular                       |
| PG              | Prostaglandinas                           |
| LT              | Leucotrienos                              |
| PGL             | Prostaciclina                             |
| PGE2            | Prostaglandina E2                         |
| PGF             | Prostaglandina F2                         |
| FNT             | Factor de necrosis tumoral                |
| COX             | Ciclooxigenasa                            |
| AINES           | Antiinflamatorios no esteroides           |
| DAP             | Altura del pecho                          |
| NADPH           | Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato |
| cm <sup>3</sup> | Centímetros cúbicos                       |

## TABLA DE CONTENIDO

|               |      |
|---------------|------|
| RESUMEN.....  | xii  |
| SUMMARY ..... | xiii |

### CAPÍTULO I

#### 1. MARCO TEÓRICO

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>1.1</b>      | <b>Inflamación</b> .....                             | 4  |
| <i>1.1.1.</i>   | <i>Definición</i> .....                              | 4  |
| <i>1.1.2.</i>   | <i>Signos clínica</i> .....                          | 5  |
| <i>1.1.3.</i>   | <i>Clasificación</i> .....                           | 5  |
| <i>1.1.3.1.</i> | <i>Por tiempo de persistencia</i> .....              | 5  |
| <i>1.1.3.2.</i> | <i>Por el carácter de exudado.</i> .....             | 6  |
| <i>1.1.3.3.</i> | <i>Por las causas.</i> .....                         | 6  |
| <i>1.1.3.4.</i> | <i>Por sus características morfológicas.</i> .....   | 6  |
| <i>1.1.4.</i>   | <i>Fisiopatología</i> .....                          | 7  |
| <i>1.1.4.1.</i> | <i>Cambios vasculares</i> .....                      | 7  |
| <i>1.1.4.2.</i> | <i>Cambios celulares</i> .....                       | 8  |
| <i>1.1.5.</i>   | <i>Mediadores celulares de la inflamación.</i> ..... | 9  |
| <i>1.1.6.</i>   | <i>Mediadores químicos de la inflamación.</i> .....  | 10 |
| <i>1.1.6.1.</i> | <i>Acido araquidónico</i> .....                      | 10 |
| <i>1.1.6.2.</i> | <i>Histamina</i> .....                               | 11 |
| <i>1.1.6.3.</i> | <i>Serotonina</i> .....                              | 12 |
| <i>1.1.6.4.</i> | <i>Sistema del complemento</i> .....                 | 12 |
| <i>1.1.6.5.</i> | <i>Coagulación</i> .....                             | 12 |
| <i>1.1.6.6.</i> | <i>Citosinas</i> .....                               | 12 |
| <i>1.1.6.7.</i> | <i>Factor activador de las plaquetas</i> .....       | 13 |
| <i>1.1.6.8.</i> | <i>Reparación</i> .....                              | 13 |
| <b>1.2.</b>     | <b>Fármacos antiinflamatorios</b> .....              | 13 |
| <i>1.2.1.</i>   | <i>Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)</i> ..... | 13 |
| <i>1.2.1.1.</i> | <i>Mecanismo de acción</i> .....                     | 13 |
| <i>1.2.1.2.</i> | <i>Efectos adversos</i> .....                        | 14 |
| <i>1.2.2.</i>   | <i>Glucocorticoides</i> .....                        | 14 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.2.3.   | <i>Diclofenaco sódico</i> .....                                      | 14 |
| 1.2.3.1. | <i>Mecanismo de acción</i> .....                                     | 15 |
| 1.3.     | <b>Guayusa (<i>Ilex guayusa loes</i> )</b> .....                     | 15 |
| 1.3.1.   | <i>Distribución geográfica</i> .....                                 | 15 |
| 1.3.2.   | <i>Taxonomía</i> .....   | 16 |
| 1.3.3.   | <i>Descripción botánica</i> .....                                    | 16 |
| 1.3.4.   | <i>Composición</i> .....   | 16 |
| 1.3.5.   | <i>Propiedades y usos</i> .....                                      | 17 |
| 1.4.     | <b><i>Theobroma cacao</i></b> .....                                  | 17 |
| 1.4.1.   | <i>Distribución geográfica</i> .....                                 | 18 |
| 1.4.2.   | <i>Taxonomía</i> .....   | 18 |
| 1.4.3.   | <i>Descripción botánica</i> .....                                    | 18 |
| 1.4.4.   | <i>Composición</i> .....   | 19 |
| 1.4.5.   | <i>Propiedades y usos</i> .....                                      | 19 |
| 1.5.     | <b><i>Vernonanthura patens</i></b> .....                             | 19 |
| 1.5.1.   | <i>Distribución geográfica</i> .....                                 | 20 |
| 1.5.2.   | <i>Taxonomía</i> .....   | 20 |
| 1.5.3.   | <i>Descripción botánica</i> .....                                    | 20 |
| 1.5.4.   | <i>Composición</i> .....   | 21 |
| 1.6.     | <b>Compuestos fenólicos</b> .....                                    | 21 |
| 1.7.     | <b>Flavonoides</b> .....   | 22 |
| 1.7.1.   | <i>Mecanismo de acción antiinflamatoria de los flavonoides</i> ..... | 23 |
| 1.8.     | <b>Alcaloides</b> .....  | 23 |
| 1.9.     | <b>Edema plantar inducida por carragenina</b> .....                  | 23 |

## CAPÍTULO II

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.       | <b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....                             | 25 |
| 2.1.     | <b>Lugar de investigación</b> .....                         | 25 |
| 2.2.     | <b>Obtención de la muestra</b> .....                        | 25 |
| 2.3.     | <b>Reactivos biológicos</b> .....                           | 25 |
| 2.3.1.   | <i>Descripción</i> .....                                    | 25 |
| 2.3.2.   | <i>Condiciones</i> .....                                    | 26 |
| 2.4.     | <b>Equipos, materiales y reactivos</b> .....                | 26 |
| 2.5.     | <b>Técnicas y métodos</b> .....                             | 27 |
| 2.5.1.   | <b><i>Control de la calidad de la droga cruda</i></b> ..... | 27 |
| 2.5.1.1. | <i>Determinación de humedad</i> .....                       | 27 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.5.1.2. | <i>Determinación de las cenizas totales</i> .....                   | 28 |
| 2.5.1.3. | <i>Determinación de cenizas solubles en agua</i> .....              | 28 |
| 2.5.1.4. | <i>Determinación de cenizas solubles en ácido clorhídrico</i> ..... | 29 |
| 2.5.2.   | <b>Tamizaje fitoquímico</b> .....                                   | 30 |
| 2.5.3.   | <b>Obtención del extracto blando</b> .....                          | 30 |
| 2.5.3.1. | <i>Determinación de los requisitos organolépticos</i> .....         | 31 |
| 2.5.3.2. | <i>Determinación de pH</i> .....                                    | 31 |
| 2.5.3.3. | <i>Determinación de solidos totales</i> .....                       | 31 |
| 2.5.4.   | <b>Cuantificación de fenoles totales</b> .....                      | 31 |
| 2.5.5.   | <b>Cuantificación de flavonoides totales</b> .....                  | 32 |
| 2.6.     | <b>Evaluación de la actividad antiinflamatoria</b> .....            | 33 |
| 2.6.1.   | <b>Análisis estadístico</b> .....                                   | 35 |

### CAPÍTULO III

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.     | <b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....                                 | 37 |
| 3.1.   | <b>Control de calidad de la droga vegetal</b> .....                   | 37 |
| 3.1.1. | <i>Determinación de humedad</i> .....                                 | 37 |
| 3.1.2. | <i>Determinación de cenizas totales</i> .....                         | 38 |
| 3.1.3. | <i>Determinación de cenizas solubles en agua</i> .....                | 38 |
| 3.1.4. | <i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i> ..... | 39 |
| 3.2.   | <b>Tamizaje fitoquímico</b> .....                                     | 39 |
| 3.3.   | <b>Control de calidad de extracto blando</b> .....                    | 42 |
| 3.4.   | <b>Cuantificación de fenoles</b> .....                                | 43 |
| 3.5.   | <b>Cuantificación de los flavonoides totales</b> .....                | 44 |
| 3.6.   | <b>Cuantificación de alcaloides</b> .....                             | 45 |
| 3.7.   | <b>Efecto antiinflamatorio de los extractos</b> .....                 | 46 |
| 3.7.1. | <i>Resultados de la administración de los extractos</i> .....         | 46 |
| 3.7.2. | <i>Análisis estadístico</i> .....                                     | 47 |
|        | <b>CONCLUSIONES</b> .....   | 50 |
|        | <b>RECOMENDACIONES</b> .....  | 52 |

### BIBLIOGRAFÍA

### ANEXOS

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1-1:</b> Taxonomía de <i>Ilex guayusa</i> .....   | 16 |
| <b>Tabla 2-1:</b> Taxonomía de <i>Theobroma cacao</i> .....  | 18 |
| <b>Tabla 3-1:</b> Taxonomía de <i>Vernonanthura patens</i> .....   | 20 |
| <b>Tabla 1-2:</b> Descripción de las ratas ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....   | 25 |
| <b>Tabla 2-2:</b> Condiciones para ratas ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....  | 26 |
| <b>Tabla 3-2:</b> Equipos, materiales y reactivos utilizados en trabajo de investigación.....  | 26 |
| <b>Tabla 4-2:</b> Modelo experimental para la evaluación del efecto antiinflamatorio.....  | 35 |
| <b>Tabla 1-3:</b> Resultado de determinación de la humedad de las drogas vegetales <i>Ilex guayusa</i> ,<br><i>Vernonanthura patens</i> y de <i>Theobroma cacao</i> .....                              | 37 |
| <b>Tabla 2-3:</b> Resultado de determinación de cenizas totales de las drogas vegetales <i>Ilex guayusa</i> ,<br><i>Vernonanthura patens</i> y de <i>Theobroma cacao</i> .....                         | 38 |
| <b>Tabla 3-3:</b> Resultado de determinación de cenizas solubles en agua de las drogas vegetales <i>Ilex</i><br><i>guayusa</i> , <i>Vernonanthura patens</i> y de <i>Theobroma cacao</i> .....         | 38 |
| <b>Tabla 4-3:</b> Resultado de determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico de las drogas<br>vegetales <i>Ilex guayusa</i> , <i>Vernonanthura patens</i> y de <i>Theobroma cacao</i> ..... | 39 |
| <b>Tabla 5-3:</b> Resultados de tamizaje fitoquímico de <i>Ilex guayusa</i> .....  | 39 |
| <b>Tabla 6-3:</b> Resultados de tamizaje fitoquímico de <i>Vernonanthura patens</i> .....  | 40 |
| <b>Tabla 7-3:</b> Resultados de tamizaje fitoquímico de <i>Theobroma cacao</i> .....   | 41 |
| <b>Tabla 8-3:</b> Resultados de parámetros organolépticos de los extractos blandos de las especies <i>Ilex</i><br><i>guayusa</i> , <i>Vernonanthura patens</i> y <i>Theobroma cacao</i> .....          | 42 |
| <b>Tabla 9-3:</b> Resultados de parámetros físico-Químico de los extractos blando .....  | 42 |
| <b>Tabla 10-3:</b> Cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría.....   | 43 |
| <b>Tabla 11-3:</b> Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría.....   | 44 |
| <b>Tabla 12-3:</b> Cuantificación de alcaloides.....   | 45 |
| <b>Tabla 13-3:</b> Resultados del volumen promedio de inflamación (cm) .....   | 46 |
| <b>Tabla 14-3:</b> Resultados del porcentaje de inhibición de la inflamación .....   | 47 |
| <b>Tabla 15-3:</b> Test modelo lineal general para los diferentes tratamientos.....  | 49 |
| <b>Tabla 16-3:</b> Test de Duncan del efecto antiinflamatorio de los grupos tratados en diferentes<br>tiempos.....   | 49 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1-1:</b> Esquema general de la reacción inflamatoria. ....  | 4  |
| <b>Figura 2-1:</b> Derivados de ácido araquidónico.....   | 11 |
| <b>Figura 3-1:</b> Especie ( <i>Ilex guayusa</i> L.).....   | 15 |
| <b>Figura 4-1:</b> Especie <i>Theobroma cacao</i> L.....  | 17 |
| <b>Figura 5-1:</b> Especies <i>Vernonanthura patens</i> .....   | 19 |
| <b>Figura 6-1:</b> Clasificación de varios flavonoides (A) Flavanos (B) Flavonas (C) Flavonoles (D) Flavanonas (E) Flavanonoles (F) Flavan-3-ols, y (G) Isoflavonas ..... | 22 |
| <b>Figura 1-3:</b> Porcentaje de inhibición de la inflamación de los diferentes grupos experimentales vs tiempo de los grupos tratados .....                              | 47 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

**ANEXO A.** droga vegetal de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*

**ANEXO B.** Control de calidad de la droga vegetal

**ANEXO C.** Tamizaje fitoquímico de los extractos

**ANEXO D.** Concentración de los extractos de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*.

**ANEXO E.** Cuantificación de los fenoles totales y flavonoides en espectrofotometría de los extractos de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*.

**ANEXO F.** Preparación de reactivo de Folin- Ciocalteu

**ANEXO G.** Cuantificación de los alcaloides de los extractos de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*.

**ANEXO H.** Dosis de administración a las ratas dependiendo su peso.

**ANEXO I.** Cuidado y mantenimiento de las ratas de experimentación

**ANEXO J.** Rata (*Rattus norvegicus*) de experimentación

**ANEXO K.** Administración vía oral de los extractos

**ANEXO L.** Inducción de solución de carragenina (0.1ml) al 1% en suero fisiológico.

**ANEXO M.** Volúmenes calculados de las patas de las ratas de los extractos de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*, control positivo Diclofenaco sódico y de vehículo.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de titulación fue comprobar la actividad antiinflamatoria de los extractos de las hojas de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*, aplicando dos dosis. Este trabajo se realizó en colaboración con Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, ESPOL. Se realizó control de calidad de la droga tipo fenólicos, flavonoides, alcaloides saponinas. El contenido de los fenoles totales, flavonoides y alcaloides se determinó a través de técnicas espectrofotométricas. La evolución del efecto antiinflamatorio se basó en el método de edema subplantar inducido por carragenina. La inflamación fue provocada por inducción de carragenina al 1%, bajo la aponeurosis plantar de la pata izquierda de la rata. Se emplearon 24 ratas, las mismas que fueron seleccionadas al azar y divididas en 8 grupos de 3 ratas. Se utilizó como control positivo (diclofenaco sódico) y el control negativo (agua destilada), extractos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao* a concentración de 100 mg/kg y 300 mg/kg. La administración de los tratamientos fue por vía oral 30 minutos antes de la inducción de patología. Se midió el volumen de la pata y se calculó el porcentaje de inhibición de la inflamación mediante el programa de programa Microsoft Office Excel 2013. Para el análisis estadístico se aplicó test de univariados y DUNCAN. Los extractos de *Ilex guayusa* y *Theobroma cacao* (300 mg/kg) presentaron mayor efecto antiinflamatorio en tiempo de 24 horas después de la inducción de la patología, y *Vernonanthura patens* (100 mg/kg) presentó menor porcentaje de inhibición, además, no existe diferencia significativa entre *T. cacao* a 300 mg/kg y el control positivo. Se recomienda realizar estudios toxicológicos de las tres especies.

**Palabras claves:** BIOQUÍMICA, FARMACIA, GUAYUSA (*Ilex guayusa*), LARITACO (*Vernonanthura patens*), CACAO (*Theobroma cacao*), FENOLES, FLAVONOIDES, ALCALOIDES, ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

## SUMMARY

The objective of the present titration work was to verify the anti-inflammatory activity of the extracts of the leaves of *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* and *Theobroma cacao*, applying two doses. This work was carried out in collaboration with the Center for Biotechnological Research of Ecuador, ESPOL. Control of the quality of the drug phenolic type, flavonoids, alkaloids saponins. The content of the total flavonoids and alkaloid phenols was determined by spectrophotometric techniques. The evolution of the anti-inflammatory effect was based on the method subplantar edema induced by carrageenan at 15, under the plantar aponeurosis of the left leg of the rat. Twenty-four rats were used, which were randomly selected and divided into 8 groups of 3 rats. It was used as a positive control (diclofenac sodium) and negative control (distilled water), extracts of *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* and *Theobroma cacao* concentration of 100 mg/kg and 300 mg/kg. The administration of the treatments was orally 30 minutes before the induction of the pathology. The paw volume was measured and the inhibition percentage of inflammation was calculated by means of the program Microsoft office Excel 2013. For the statistical analysis, the univariate and DUNCAN test were applied. The extracts of *Ilex guayusa* and *Theobroma cacao* (300 mg/kg) had a greater anti-inflammatory effect in 24 hours after the induction of the pathology, and *Vernonanthura patens* (100 mg/kg) presented a lower percentage of inhibition, there is no difference significant difference between *T. cacao* at 300 mg /kg and the positive control. It is recommended to carry out toxicological studies of the three species.

Keywords: BIOQUIMICA, FARMACIA, GUAYUSA (*Ilex guayusa*), LARITACO (*Vernonanthura patens*), CACAO (*Theobroma cacao*), PHENOLS, FLAVONOIDS, ALCALOIDES, ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY.

## INTRODUCCIÓN

La inflamación es la reacción del organismo en respuesta a un traumatismo o a una infección. La inflamación es un proceso reactivo, confuso, inespecífico, que se caracteriza por alteraciones locales, coordinadas, de los vasos sanguíneos y tejido conjuntivo, que puede alterar la homeostasis general y cuya función es localizar, excluir, o al menos aislar el agente lesivo, que finaliza en la reparación del tejido lesionado (Serrano & Valencia, 2014, pp. 48-60).

Las enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, cáncer, diabetes, gota, asma, dermatitis y diversas dolencias menores, constituyen un problema de salud importante, debido a falta de medicamentos eficaces para su uso por períodos prolongado (Regalado & Sánchez, 2015, pp. 5-6).

Los medicamentos utilizados clásicamente para tratar enfermedades inflamatorias como antiinflamatorios no esteroides, muestran algunas reacciones adversas, el uso prolongado de estos fármacos, la mayoría de naturaleza digestiva, como anorexia, náuseas, dolor abdominal y diarrea (Perea & López , 2016, pp. 75-77)

El uso de plantas medicinales como un reemplazo terapéutico natural a los Antiinflamatorios no esteroides ha sido siempre considerado una alternativa razonable a ser estudiada, debido a las evidencias de metabolitos secundarios, que han demostrado efectos antiinflamatorios similares a los fármacos Antinflamatorios no esteroides (Shojaii, et. al. , 2015, pp. 1-6).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió como Medicina Tradicional al conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS, 2000).

Las plantas terapéuticas tienen una sustancial contribución en el sistema de salud de comunidades locales ya que son utilizadas de modo habitual, por la mayoría de los nativos. Ecuador es considerado uno de los países con mayor diversidad en el mundo, donde el 80% de la población utiliza la Medicina Tradicional y por consiguiente las plantas o sus productos naturales (Paredes et. al., 2015, pp. 39-40)

Actualmente, el Ministerio de Salud busca fortalecer y consolidar la salud intercultural, incorporando la medicina ancestral y alternativa al Sistema Nacional de Salud, mediante

estrategias para potenciar la práctica de la medicina ancestral, tradicional y alternativa, mediante la investigación, para su buena práctica (MSP, 2013).

*Ilex guayusa* L. es una planta de hojas perenne perteneciente a la familia Aquifoliaceae, nativa amazónica y andina, abundantemente distribuida en la región amazónica de Ecuador (Radice et al. 2017) . En la medicina popular atribuye como estimulante nerviosa, y muscular, digestivo, expectorante y reductor del nivel de azúcar en la sangre (Torres, 2013, pp. 2-3).

*Vernonanthura patens* es un arbusto de la familia Asteraceae que crece en ciertas regiones del Ecuador. La medicina tradicional indica que la cocción de las hojas tiene efectos antipalúdicos, antihelmínticos, mientras que los estudios científicos han demostrado que las hojas de *Vernonanthura patens* contienen actividad antileishmanial y antioxidante (Chóez, et. al., 2018).

*Theobroma cacao* es una planta tropical que crece naturalmente en la selva tropical, que pertenece a la familia Malvaceae. El consumo de cacao es beneficioso para la salud de los humanos. Además en la medicina popular informa que el cacao tiene efecto antiséptico, diurético y antiparasitario (Nisthal & Méndez, 2013).

Este trabajo de investigación ha sido realizado en colaboración con el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, quienes han proporcionado las muestras para la evaluación del efecto antiinflamatorio de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y cáscaras de *Theobroma cacao*, plantas que se encuentran en regiones tropicales, para evaluar sus efectos antiinflamatorios, con el propósito de confirmar el uso popular de estas especies, debido a que las plantas contienen compuestos antioxidantes como compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Evaluar el efecto antiinflamatorio de extractos *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao* en el modelo animal rata (*Rattus norvegicus*) en laboratorio.

### Objetivo específicos.

- Realizar el control de calidad de las drogas secas y de los extractos de las especies *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*.
- Efectuar la cuantificación de los compuestos químicos presentes en las especies con efecto antiinflamatorio mediante métodos apropiados (fenoles, flavonoides y alcaloides).
- Comprobar y comparar el efecto antiinflamatorio de las especies *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*.

# CAPÍTULO I

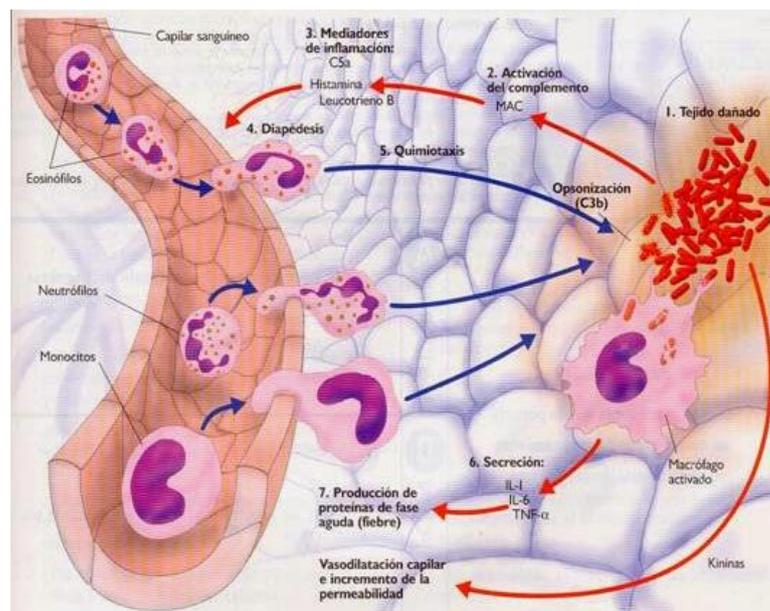
## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Inflamación

#### 1.1.1. Definición

La inflamación es una reacción a la irritación en el tejido conjuntivo vascular como respuesta a los agentes endógenos o exógenos, mediante la intervención de los factores solubles y células llamados mediadores inflamatorios (Duce, 2004, p. 50).

La inflamación es la respuesta normal de sistema inmunológico, que protege contra infección, la irritación, las toxinas y otras moléculas extrañas, mediante proceso de reclutamiento de glóbulo blanco y proteínas plasmáticas desde la sangre, su reserva en los tejidos y su activación para destruir de los microorganismos (Abbas, et al., 2015, p. 9).



**Figura 1-1:** Esquema general de la reacción inflamatoria.

Fuente: (Marín, 2015)

### **1.1.2. Signos clínica**

Las manifestaciones clínicas de la inflamación pueden clasificarse en locales y sistémicas.

*El rubor o eritema* se debe al acúmulo de sangre como consecuencia de la vasodilatación y de la estasis vascular de la región inflamada.

El *tumor* o aumento de tamaño es consecuencia del acúmulo de exudado inflamatorio y de sangre.

El *calor* está producido también por la vasodilatación más el aumento del metabolismo que se desarrolla a este nivel.

El *dolor* está producido por la irritación de las fibras nerviosas en el área lesionada, como consecuencia del daño producido por el agente etiológico, así por la medición de sustancias como la bradicinina, la histamina y la prostaglandina E2.

*La impotencia potencial* es la incapacidad del órgano afectado para realizar adecuadamente su función como consecuencia de las alteraciones que en él se han producido. (Duce, 2004, p. 53).

### **1.1.3. Clasificación**

Las características de la inflamación son diversas y permite su clasificación, tomando en cuenta el tiempo de duración, el carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización.

#### **1.1.3.1. Por tiempo de persistencia.**

*Agudas:* es la inflamación con una respuesta inmediata al agente agresor su finalidad es liberar mediadores de defensa del organismo en el área de la lesión cuya iniciación es rápida y cursa una duración corta (Villalba, 2014). Sus características fundamentales son la exudación de líquidos, de proteínas plasmáticas como la formación de edema y la migración de leucocitos principalmente de la migración de neutrófilos (León, et. al., 2015, pp. 47-49).

*Crónicas:* es un proceso prolongado que puede durar entre semanas y años, existiendo en ese tiempo destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación (Villalba, 2014). Las características de la inflamación crónica son la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular (León, et. al., 2015, pp. 47-49).

#### *1.1.3.2. Por el carácter de exudado.*

*Trasudado.* Se caracteriza por la presencia de líquido extravascular con bajo contenido proteico, producto de un ligero cambio en la permeabilidad vascular (Villalba, 2014). También éste produce un aumento de la presión hidrostática intravascular que favorece la salida de líquidos y moléculas de bajo peso desde el interior del vaso hacia el intersticio (Duce, 2004, p. 53).

*Exudado.* se caracteriza por la presencia de líquido inflamatorio extravascular con alto contenido de proteína, lo cual denota bastante permeabilidad en los vasos sanguíneos . Con la característica de la formación de unas aperturas en la pared de los vasos por las que salen las células, las proteínas y los líquidos se acumulan en el espacio intersticial, un fluido rico en proteínas (Duce, 2004, pp. 50-58).

#### *1.1.3.3. Por las causas.*

- Causas infecciosas ya sea por bacterias, virus, hongos, parásitos y por las toxinas de los microorganismos.
- Traumáticas como golpes intensos como respuesta inmediata o de tardía como ocurre con las torceduras o higromas.
- Térmicas, consecuencia de quemaduras por el calor o por las bajas temperaturas como el congelamiento.
- Irradiaciones causadas por los rayos ultra violeta, rayos X, infrarrojo.
- Presencia de cuerpos extraños como las astillas.
- Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad a alérgenos comunes o procesos colagenopáticos (Villalba, 2014).

#### *1.1.3.4. Por sus características morfológicas.*

*Serosa,* por el acúmulo de líquido tisular de bajo contenido proteico (Villalba, 2014). Además está compuesto por la plasma con escasa fibrina y leucocitos, también denominada edema inflamatorio (Duce, 2004, pp. 50-58).

*Fibrinosa* con la presencia de exudado con grandes cantidades de fibrinógeno (Villalba, 2014). También es cuando la lesión es más rápida y se produce un aumento de la permeabilidad vascular permitiendo la salida de fibrina o bien existe un estímulo procoagulante en el intersticio, mediante la acumulación de fibrina (Duce, 2004, pp. 50-58).

*Supurativo o purulento* es la producción de exudado purulento que consta de leucocitos y células necróticas. Es rico en células polimorfas nucleares y restos de las fagocitosis de bacterias piógenas. Esto aparece como un líquido amarillo verdoso, espeso, opaco con escasa presencia de fibrina, que se puede acompañar con olor putrefacto característico, producto de necrosis tisular o de residuo (Duce, 2004, pp. 50-58).

*Inflamación hemorrágica*, la cual es rica en los glóbulos rojos extravasados como consecuencia de la lesión vascular por el efecto del agente lesivo o por la alteración de la secundaria de la inflamación (Villalba, 2014). También es el infiltrado celular abundan los hematíes que salen pasivamente, lo que implica la existencia de lesiones vasculares. Se produce por acciones bacterianas y reacciones Ag-Ac. Se forma un cúmulo de líquido rico en hematíes (Duce, 2004, pp. 50-58).

#### **1.1.4. Fisiopatología**

##### *1.1.4.1. Cambios vasculares*

*Cambios en el calibre y flujo vascular.* Los cambios en los vasos sanguíneos comienza después de una lesión o infección puede desarrollarse a velocidades variables dependiendo de la naturaleza e intensidad del estímulo inflamatorio.

Después de una vasoconstricción transitoria se produce una vasodilatación arterial, lo que da lugar a un aumento localizado de flujo de sangre y a una congestión de los lechos capilares en el sentido posterior, esta expansión vascular es la causa del enrojecimiento y aumento de calor.

A medida que la microvasculatura se vuelve más permeable, el líquido rico en proteínas pasa a los tejidos extravasculares. Se produce así una mayor concentración de eritrocitos, desarrollando la viscosidad de la sangre y produciendo un enlentecimiento de la circulación.

A medida que se desarrolla la estasis los leucocitos empiezan a acumularse en la superficie del endotelio vascular. Es la primera etapa en el viaje de los leucocitos a través de la pared vascular hacia el interior del tejido intersticia (Kumar et. al., 2008, pp. 30-40).

*Aumento de la permeabilidad vascular.* Se produce un desplazamiento de líquido rico en proteínas y de las células de la sangre hacia los tejidos extravasculares, este incrementa la presión osmótica del líquido intersticial, lo que permite un mayor flujo de salida de agua de la sangre hacia los tejidos (Kumar et. al., 2008, pp. 30-40).

#### *1.1.4.2. Cambios celulares*

Es el paso de acontecimiento de los leucocitos a partir de la luz vascular al espacio extravascular, con los siguientes pasos principales:

*Marginación.* Al segregarse la sangre de los capilares a las vénulas, las células circulantes son lanzadas por el flujo laminar contra la pared vascular. Los eritrocitos tienden a moverse más rápido que los leucocitos, donde los leucocitos son empujados fuera de la columna axial central tiene así una mejor oportunidad para interactuar con las células endoteliales de revestimiento (Kumar et. al., 2008, pp. 30-40).

*Rodadura.* Los leucocitos ruedan sobre la superficie endotelial, transitoriamente adhiriéndose a lo largo del camino, facilitando aún más la agregación de las células nucleadas mediante las moléculas de adhesión denominadas selectinas (CD62E y CD62P) que se encuentran en las células del endotelio (Kumar et al. 2013:pp. 30-40) con un dominio extravascular que se une a azúcares (Kumar et. al., 2008, pp. 30-40).

*Adhesión.* Es la reacción de leucocitos, es una firme adhesión a la superficie endoteliales, mediante la interacción entre las integrinas que se expresan sobre las superficies de los leucocitos y los respectivos ligandos en las células endoteliales. Donde las integrinas son glucoproteínas heterodímeros transmembranosos que miden en la adhesión de los leucocitos al endotelio y de distintas células a la MEC (Kumar et. al., 2008, pp. 30-40).

*Transmigración o diapédesis.* Después de detenerse en la superficie endotelial, los leucocitos migran a través de la pared vascular, deslizando entre las células en la zona de uniones intercelulares. Esta extravasación de los leucocitos se produce en las vénulas de la vasculatura sistémica (Kumar et. al., 2008, pp. 30-40).

*Quimiotaxia.* Después de extravasarse de la sangre, los leucocitos se desplazan hacia los lugares de infección o lesión a lo largo de gradiente químico. Entre las sustancias endógenas o exógenas que pueden ser quimiotácticos para los leucocitos entre productos bacterianos sobre todo péptidos, citosinas como las familias de las quimiocinas, componentes del sistema complemento,

como el C5, productos de la vía de las lipooxigenasas del metabolismo de ácido araquidónico como los leucotrienos (Kumar et. al., 2008, pp. 30-40).

#### ***1.1.5. Mediadores celulares de la inflamación.***

Existe un gran número de células implicadas en la inflamación, las células que tienen un papel principal son de tipo fagocítico. Estas células son los polimorfos nucleares, neutrófilos y los monocitos, cuando abandonan la sangre, estos últimos reciben el nombre genérico de macrófagos (Kumar et. al., 2008, pp. 30-40).

*Neutrófilos* representan el 60-70% de los leucocitos circulantes y constituyen la primera línea de la defensa y, por tanto, son los primeros en llegar al foco inflamatorio.

*Monocitos-macrófagos* intervienen en las funciones de fagocitosis más complejas, en las que frecuentemente intervienen también los linfocitos T. Representan la segunda línea de defensa y son indispensables para la destrucción de gérmenes intracelulares y para la eliminación de los restos tisulares.

*Células endoteliales* no sólo forman un tapiz en el interior de los vasos, sino que también intervienen en multitud de funciones de manera activa. Tal vez la alteración endotelial sea el fenómeno inicial en la inflamación.

*Linfocitos* son responsables del componente inmunitario, de defensa específica, que suele acompañar a la inflamación.

*Plaquetas* se adhieren al vaso y se agregan entre ellas, con lo que se activan. Dicha activación trae como consecuencia la liberación de gran número de mediadores inflamatorios.

*Mastocitos* y los basófilos también se acumulan en los focos inflamatorios, aunque si bien pueden acelerar la eliminación del agente casual también, de forma paradójica, pueden cronificar la respuesta inflamatoria.

*Eosinófilos* están especializados en la defensa contra los parásitos a través de las proteínas que contienen en sus gránulos específicos.

*Fibroblastos* constituyen una de las principales células en la tercera oleada celular de los fenómenos inflamatorios, a la que contribuyen también las células endoteliales y otras células

mesénquimas. Se encargarían de regenerar la matriz extracelular. Los fibroblastos también están implicados en la quimiotaxis celular (Duce, 2004, pp. 50-58).

#### ***1.1.6. Mediadores químicos de la inflamación.***

Los mediadores químicos de la inflamación pueden estar presentes en el plasma en forma de precursores, estar almacenados en los gránulos de las células inflamatorias o generarse *de novo* en el tejido lesionado. Su acción se realiza generalmente mediante su unión a un receptor específico de la célula diana, aunque también puede ser una acción directa, bien de tipo oxidativa o enzimática. Su efecto suele ser muy fugaz, de manera que se establece muy pronto un sistema de control y regulación en su acción. A pesar de ello, muchos mediadores pueden producir efectos perjudiciales para el tejido inflamado (Duce, 2004, pp. 50-58).

##### *1.1.6.1. Acido araquidónico*

Es un ácido graso insaturado, procedente de la dieta o del metabolismo de ácido linoleico. No se encuentra forma libre, si no se encuentra en los fosfolípidos de la membrana celular. Para su uso por debe ser liberado de fosfolípidos mediante la activación de fosfolipasa. Una vez liberada, el ácido araquidónico puede seguir dos vías (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19):

Vía de la ciclooxigenasa que da lugar a las prostaglandinas (PG).

Vía de la lipooxigenasa que origina leucotrienos (LT)

*Prostaglandinas.* Se encuentran en números tejidos, siendo inactivados de manera espontánea o enzimáticamente. En el foco inflamatorio actúa como mediadores y reguladores de la inflamación (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19).

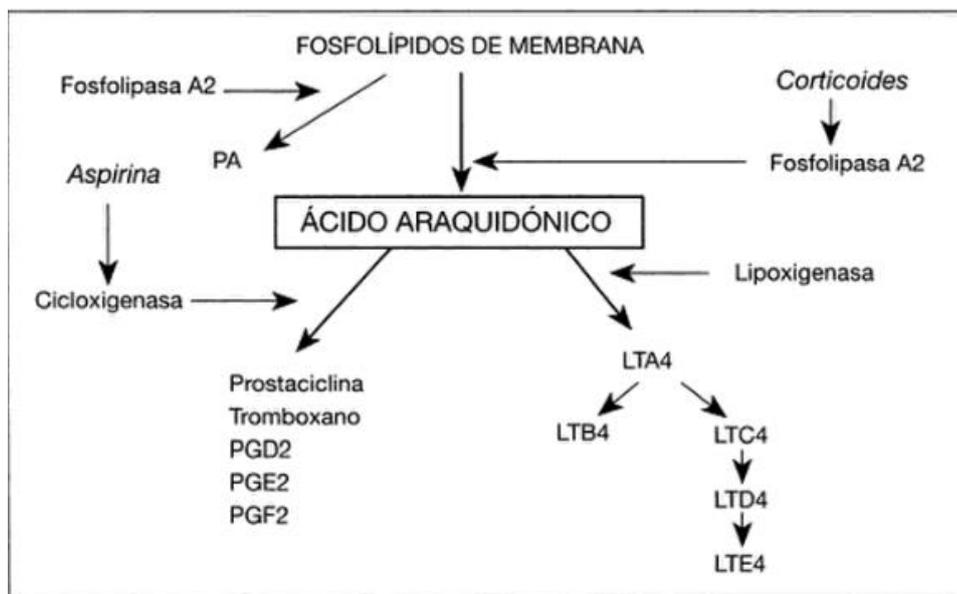
La ciclooxigenasa convierte el ácido araquidónico en un endoperóxido: la PGG<sub>2</sub>, que es convertido por oxidación enzimática en PGH<sub>2</sub>. Las dos prostaglandinas producen agregación plaquetaria y la contracción del músculo liso. Las PGH se transforman en tres sustancias según su localización (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19).

PGL<sub>2</sub> o prostaciclina que se encuentra en la pared vascular. Es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y posee acción vasodilatadora.

Tromboxano A2. Se localiza en plaquetas, tienen acción muy corta con un efecto antagónico, favorece la agregación plaquetaria y la vasoconstricción.

PGE2, PGD2, PGF2, son prostaglandinas más estables, presentes en tejidos y sus acciones de vasodilatación que favorece el edema en el foco inflamatorio (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19).

*Leucotrienos.* Bajo la acción de la lipooxigenasa se convierte en una serie de productos de leucotrienos, por haber sido aislados inicialmente en los leucotrienos también de los macrófagos, células cebadas y de otras células del tejido conjuntivo. Los leucotrienos (LTB4, LTD4, LTE4) producen broncoespasmo, vasoconstricción y el aumento de la permeabilidad. El LTE4 tiene acción similar a histamina pero más potente. Estas sustancias actúan sobre los leucocitos, promoviendo la adherencia de los mismos al endotelio de las vénulas y su extravasación al espacio tisular. El LTB4 es un potente quimiotáctico para neutrófilos, monocitos, eosinófilos, además favorece la liberación de las enzimas lisosómicas (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19).



**Figura 2-1:** Derivados de ácido araquidónico

**Fuente:** (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19)

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018.

### 1.1.6.2. Histamina

La histamina se encuentra en la fase inicial de la inflamación. Se almacena en forma inactiva, en los gránulos de las células cebadas, basófilos, eosinófilos, leucocitos y plaquetas. La histamina produce dilatación de las vénulas y los capilares, aumento de la permeabilidad de las vénulas y la contracción del músculo liso. Es el principal mediador de la primera fase de la inflamación (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19)

#### *1.1.6.3. Serotonina*

La 5-hidroxitriptamina es un mediador vasoactivo preformado que produce efectos similares a la histamina. Está presente en las plaquetas y se estimula cuando entra en contacto con el colágeno, trombina, adenosin difosfato y complejo antígeno-anticuerpo, provocando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular (Toledo, 2014, pp. 2266-2268).

#### *1.1.6.4. Sistema del complemento*

El complemento está formado por más de 20 proteínas plasmáticas incluidas las sustancias inhibitoras. Los fundamentales están numeradas de 1 al 9 y se encuentran en plasma en forma inactiva. Su activación se puede realizar por vía clásica o por vía alterna. De la activación en cascada de complemento por ambas vías se liberan una serie de factores que tienen diversas acciones en el foco inflamatorio (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19), como se lo indica:

C3a y C5a (anafilotoxinas), estos dos elementos modifican el calibre vascular debido a que liberan histamina. C5a también activa la vía de la lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico generando leucotrienos a partir de las células inflamatorias.

C5a es un potente agente quimiotáctico que ayuda a la adherencia de leucocitos al endotelio al activar las moléculas de adherencia leucocitaria; C5b. actúa como opsonina, favoreciendo el fenómeno de la fagocitosis (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19).

#### *1.1.6.5. Coagulación*

Las proteínas que forma este sistema se activan por el factor de Hageman. El punto final es la transformación del fibrinógeno en fibrina, con la liberación de fibrinopéptidos que originan el aumento de la permeabilidad vascular y quimiotaxis de los leucocitos (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19).

#### *1.1.6.6. Citosinas*

Son una serie de polipéptidos producidos por varios tipos de células, fundamentalmente de los linfocitos y monocitos. Actúan como moduladores de la función de otras células. Las principales citosinas que actúan como mediadores de la reacción inflamatoria, son la interleuquina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa y beta (FNT). Los dos son segregados por macrófagos activos y también por las células endoteliales y linfocitos. Ejerce su acción principal sobre los leucocitos

y las células endoteliales, favoreciendo su adherencia, actúan como factores de crecimiento de los fibroblastos, estimula la proliferación celular y la síntesis del colágeno (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19)

#### *1.1.6.7. Factor activador de las plaquetas*

También son mediadores derivados de los fosfolípidos. Ejercen una acción más potente que la histamina sobre la permeabilidad vascular, y a concentraciones bajas produce vasodilatación. Aumenta la adherencia leucocitaria al endotelio, quimiotaxis, liberación de encimas lisosomiales y broncoespasmo (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19)

#### *1.1.6.8. Reparación*

Cuando la destrucción tisular es extensa o el tejido está constituido por células que han perdido la capacidad de derivarse. El tejido necrosado ha de ser sustituido por tejido conjuntivo. Esta remodelación del tejido de granulación conduce a la formación de un nuevo tejido más resistente y menos celular llamado tejido de cicatriz (Escobar & Ramos , 1997, pp. 10-19)

## **1.2. Fármacos antiinflamatorios**

### *1.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)*

Son un grupo heterogéneo de fármacos que se encargan de reducir, la respuesta inflamatoria. Su actividad farmacológica tiene un amplio espectro y en ella lo más destacado es la inhibición de la ciclooxigenasa, tanto la tipo-1 como la tipo-2. Además, intervienen a diferentes niveles en la respuesta inflamatoria, ya que producen una disminución de la migración de granulocitos y monocitos, disminuyen la fagocitosis y alteran la respuesta linfocitaria. Los fármacos de este grupo tienen también una actividad analgésica y antipirética. Las prostaglandinas se encargan de subir el punto de ajuste hipotalámico que marca la elevación de la temperatura corporal mediante órdenes que se transmiten periféricamente y consigue un doble efecto; que se genera calor y que no se pierda (Duce, 2004, pp. 50-58).

#### *1.2.1.1. Mecanismo de acción*

Los AINES inhiben la enzima ciclooxigenasa (COX), lo cual reduce la producción de citosinas proinflamatorias a partir del ciclo del ácido araquidónico. Existe dos isoformas de COX: COX-1, que se encarga en la mayoría de los tejidos y tipos celulares, está involucrado en funciones

homeostáticas como la protección gástrica o el funcionamiento normal de las plaquetas. COX -2, que se expresa en células y tejidos que participan en el proceso inflamatorio. La inhibición de la COX-2 es el mecanismo por el que los AINES ejercen su eficacia clínica (Pérez, 2016, pp. 32-36)

#### *1.2.1.2. Efectos adversos*

El efecto secundario principal de todo el grupo es la gastropatía con riesgo de úlcera y hemorragia gástrica como consecuencia de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en la mucosa gástrica.

Existen factores de riesgo para su desarrollo como la edad mayor de 65 años, antecedentes de úlcera péptica, dispepsia por AINE, toma concomitante de esteroides u otro AINE, coagulopatía o patología grave asociada. En los pacientes con alteración de la función renal, cardíaca o hepática puede desarrollarse deterioro de la función renal. Otros efectos secundarios más infrecuentes se relacionan con reacciones de hipersensibilidad o con trastornos neurológicos (Duce, 2004, pp. 50-58).

#### *1.2.2. Glucocorticoides*

Ejercen su efecto antiinflamatorio mediante la regeneración en la expresión de diferentes genes. Producen una reacción en la producción de citosinas, prostaglandinas y óxido nítrico, inhibición de la expresión de moléculas de adhesión con lo que las células inflamatorias no pueden migrar al foco inflamatorio, y además inducen la muerte programada de células inflamatorias como neutrófilos y linfocitos. En general se prefieren preparados con vida media intermedia, como prednisona o metilprednisolona, si no se desea reducir el efecto mineralcorticoide (reabsorción de agua y sal en el riñón) su uso se ve limitado por sus frecuentes y graves efectos secundarios (Duce, 2004, pp. 50-58).

#### *1.2.3. Diclofenaco sódico*

El diclofenaco sódico es un medicamento antiinflamatorio no esteroide (AINE), que posee propiedades antiinflamatorias y antipiréticas, está indicado por vía oral e intramuscular para el tratamiento de enfermedades reumáticas agudas, artrosis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, lumbalgia, gota en fase aguda inflamación postraumática y postoperatorio, entre otras enfermedades (Spain, 2016).

### 1.2.3.1. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del diclofenaco sódico, no se conoce por completo, pero parece estar implicado en la inhibición de las vías de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), inhibición además la biosíntesis de prostaglandinas. También inhiben la migración leucocitaria y alerta los procesos celulares e inmunológicas en los tejidos mesenquimatoso y conectivo, lo cual puede ayudar a aumentar sus efectos antiinflamatorios (Spain, 2016).

### 1.3. Guayusa (*Ilex guayusa* Loes )



**Figura 3-1:** Especie (*Ilex guayusa* L.)

**Fuente:** (Tiempo, 2018)

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018.

#### 1.3.1. Distribución geográfica

*Ilex guayusa* es una planta nativa de la Amazonía andina, con distribución natural en los países de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, como la planta más importante en la vida cotidiana de los amazónicos *kichwa*, comunidades y agricultores locales de comunidades por sus varios usos en la medicina popular. Conocida comúnmente como guayusa, guañusa, huayusa, aguayusa y wuayusa (Radice et. al., 2017, pp. 2-8).

En el Ecuador, de acuerdo a los registros del Herbario de Loja, esta planta se encuentra en las provincias de Zamora Chinchipe, Napo, Pastaza, Sucumbíos, Morona Santiago. También se encuentra en las provincias de Pichincha y Tungurahua. Se localiza desde el nivel de mar hasta los 1500 m.s.n.m (Collahuazo, 2012).

### 1.3.2. Taxonomía

**Tabla 1-1:** Taxonomía de *Ilex guayusa* Loes

|                |                          |
|----------------|--------------------------|
| <b>Reino</b>   | <b>Plantae</b>           |
| <b>Pylum</b>   | Magnoliophyta            |
| <b>Clase</b>   | Magnoliopsida            |
| <b>Orden</b>   | Celastrales              |
| <b>Familia</b> | Aquifoliaceae            |
| <b>Genero</b>  | <i>Ilex</i>              |
| <b>Especie</b> | <i>Ilex guayusa</i> Loes |

Fuente: (Radice et. al., 2017, pp. 2-8).

### 1.3.3. Descripción botánica

Es un árbol perenne nativo de la región amazónica, también está presente en lugares subtropicales de la región andina en estado cultivado. Los individuos de esta especie alcanzan un tamaño de 10 m de altura, con un diámetro a la altura del pecho (DAP) de 50-80cm, de copa irregular y amplia cobertura de follaje. En la provincia de Morona Santiago en la localidad de San Luis, cerca de Sevilla Don Bosco, existe un bosque natural de árboles de guayusa con individuos que alcanzan una altura de 20 m y tiene 1 diámetro a la altura de pecho (DAP) de 80-90cm (Radice et. al., 2017, pp. 2-8).

El tronco tiene un fuste a menudo bifurcado a la altura de pecho, corteza blanca y textura lisa, las ramas son extendidas y flexibles. Las hojas son de textura coriáceas, verde oscuro, enteras, oblogo-elípticas, simples, dentadas, coriáceas, alternas sin estípulas, sin pubescencias en el haz y envés, ápice acuminado, base aguda, 15 a 21 cm de largo, 5 a 7,5 cm de ancho, peciolo corto de 1 cm de largo. La flor posee una corola blanca verdosa con pétalos obtusos, estambres en igual número que los pétalos, anteras oblongas, ovarios sésil subgloboso y usualmente con 4 a 6 cavidades. El fruto es una baya globosa de casi un cm de ancho y verde (Radice et. al., 2017, pp. 2-8).

### 1.3.4. Composición

Las hojas de *Ilex guayusa* contienen cafeína, teobromina, compuestos fenólicos y flavonoides como componentes principales, también se puede encontrar guanidina. Otras investigaciones realizadas de los extractos de las hojas se determinaron la presencia de aminoácidos, triterpenoides pentacíclicos (oleanólico y ácido ursólico), compuestos reductores, antocianinas y saponinas (Radice et. al., 2017, pp. 2-8).

### **1.3.5. Propiedades y usos**

Conocida especialmente por sus aplicaciones medicinales en diversas etnias y nacionalidades indígenas, principalmente por Jívaros. Estudios etnobotánicos demuestran la importancia de *Ilex guayusa* dentro del sistema de conocimiento ancestral por su capacidad de efecto tónico o como elemento mágico, purificador, estimulante y purgante (Villacís, 2017, pp. 82-84).

Los aborígenes de esta región han empleado *Ilex guayusa* como agente diurético, hipoglucemiante, estimulante y ceremonias rituales. Tradicionalmente se usa para desinflamar la próstata, purgante de sistema digestivo, las mujeres utilizaban la infusión como remedio contra infertilidad, contra la diarrea, hipoglucemiante, curación de las heridas, remedio para la gripe. Se puede usar para tratar el asma o como expectorante. También se puede utilizar como enjuague bucal, contra la gastritis, aliviar dolor de cabeza, y cuerpo (Villacís, 2017, pp. 82-84).

Otros atributos medicinales incluyen en ayudar en la formación de cicatriz y como un diaforético. Se puede usar para tratar el asma o como expectorante, sus propiedades antiinflamatorias son conocidas, por lo que puede usarse contra el reumatismo, también se puede utilizar como enjuague bucal, contra la gastritis, como hemático, digestivo o diurético (Villacís, 2017, pp. 82-84).

Se sabe que reduce dolores de cabeza y cuerpo, el dolor muscular y los síntomas de la gripe. Entre sus diversos usos se encuentran el emenagogo durante el período de lactancia, para tratar enfermedades venéreas, por disipación y pérdida de peso. También se puede consumir como té de hierbas, es un agente fortificante de la sangre, un regulador de presión, sanguínea con propiedades hipoglucémicas y antioxidantes (Villacís, 2017, pp. 82-84).

### **1.4. *Theobroma cacao***



**Figura 4-1:** Especie *theobroma cacao* L.

**Fuente:** (Agudelo, et al., 2018, pp. 223-232)

#### 1.4.1. Distribución geográfica

*Theobroma cacao* L. pertenece a la familia esterculiáceas, es un árbol tropical originario de las regiones tropicales húmedas de América de Sur, específicamente de las cuencas hidrográficas del Alta Amazonas y Orinoco. Estudios recientes describen la zona de origen en el triángulo amazónico entre Colombia, Ecuador y Perú (Oscorio et. al., 2017, pp. 75-77)

#### 1.4.2. Taxonomía

**Tabla 2-1:** Taxonomía de *Theobroma cacao*

|                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| <b>Reino</b>    | <b>Vegetal</b>  |
| <b>Clase</b>    | Angiospermas    |
| <b>Subclase</b> | Monocotiledónea |
| <b>Orden</b>    | Malvales        |
| <b>Familia</b>  | Esterculiácea   |
| <b>Genero</b>   | Theobroma       |
| <b>Especie</b>  | Cacao           |

Fuente: (Yamangomez, 2005, p. 4)

#### 1.4.3. Descripción botánica

*Theobroma cacao* es un árbol de tamaño promedio de 5 a 8 m aunque puede alcanzar hasta 10 m, presenta un sistema radicular pivotante a la vez formada por raíces secundarias, las mismas se encuentran dentro de 30 cm del suelo. Con el tronco principal que se ramifica en un verticilo de 3 a 5 ramas laterales principales. Las hojas son simples con peciolo cortos o largos. Las flores son pequeñas de 1 a 2 cm de diámetro, es hermafrodita, pentámera de ovario supero (Enríquez, 1985, pp. 19-22).

Sus frutos son ovoides con bayas oblongas de color variable, la pared es dura y gruesa, los surcos son alargados hasta 30 cm de largo y con 10 cm de diámetro que contiene de 20 a 40 semillas de color rojo o rojizo al exterior. Está cubierta por una pulpa blanca aromática la cual procede de sus membranas y comestible (Miguel, 2015, pp. 5-6).

#### **1.4.4. Composición**

Las semillas de *Theobroma cacao* químicamente están constituidas por grasa, agua, nitrógeno total, teobromina, metil-xantina, polifenoles (flavonoides: catequinas o flavan-3-oles, antocianinas, y proantocianidinas), cafeína, alcaloides, carbohidratos, pectina. Además, en estudios recientes se ha descubierto la anandamida, N-oleoil-etanol-amina y N-linoleoil-etanol-amina, que reducen la sensibilidad de dolor en el cerebro (Dostert et. al., 2011, pp. 4-15)

#### **1.4.5. Propiedades y usos**

Una serie de estudios ha demostrado que el consumo de *Theobroma cacao* y los productos derivados tienen efectos positivos para la salud de los humanos. Es la partida de la producción de chocolate. Se conoce en la medicina popular como antiséptico, diurético y antiparasitario (Gálvez et. al., 2013, pp. 202-203).

Debido a su contenido de flavonoides el *Theobroma cacao* posee múltiples propiedades beneficiosas para la salud, entre ellas como antioxidante, antiinflamatorio y antidepresivas, sistema cardiovascular y nervioso (Waizel et. al. , 2012).

Por sus diversos beneficios, *Theobroma cacao* es utilizada en la industria farmacéutica, remedios naturales, en fabricación de productos de belleza como cremas, labiales protectores, pomadas, jabones ( Nisthal & Méndez, 2013).

#### **1.5. *Vernonanthura patens***



**Figura 5-1:** Especies *Vernonanthura patens*.

**Fuente:** (Fern, 2014)

### 1.5.1. Distribución geográfica

*Vernonanthura patens* es un arbusto silvestre originario de Sudamérica, distribuido desde el Sur de México hasta el Río de la Plata. En el Ecuador, crece entre 0 a 2000 msnm en las provincias de Azuay, Bolívar, Chimborazo, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Loja, Los Ríos y Zamora Chinchipe.

### 1.5.2. Taxonomía

**Tabla 3-1:** Taxonomía de *Vernonanthura patens*

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Reino</b>                | <b>Plantae</b>   |
| <b>Familia</b>              | Asteraceae   |
| <b>Subfamilia</b>           | Cichorioideae  |
| <b>Genero</b>               | Vernonanthura  |
| <b>Clase</b>                | Magnoliopsida  |
| <b>Epíteto específico</b>   | patens   |
| <b>Filo</b>                 | Magnoliopsida  |
| <b>Sinónimos</b>            | Vernonia patens kunth (basionym)   |
| <b>Nombre científico</b>    | <i>Vernonanthura patens</i> (Kunth) H. Rob.  |
| <b>Nombre común</b>         | Chilca o laritaco  |
| <b>Lugar de publicación</b> | Fitología 73:72, 1992  |
| <b>Nombre verificado</b>    | 02-jun-2008 por botánicos sistemáticos de ARS.<br>Última actualización: 02-jun-2008 (ARS-GRIN, 2009) |

**Fuente:** (Manzano et. al. , 2012, pp. 404-509)

### 1.5.3. Descripción botánica

*Vernonanthura patens* es un arbusto caducifolio de 6 m de altura y 10 cm de DAP (diámetro a la altura de pecho). Fuerte muy ramificado. Ramitas terminales poligonales. Corteza externa gris oscuro, ligeramente estriada, café claro, con manchas oscuras. Copa irregular, abierta. Hojas simples, alternas, esparcidas, láminas de 3-15 cm de longitud y 1-2 cm de ancho, lanceoladas o angostamente oblongas, con ápice agudo o acuminado; venación reticulada, con 12-15 pares de nervios secundarios; haz áspero y en envés densamente pubescente. Flores hermafroditas, blancas; corola tubular de 5 mm de longitud, con 5 lóbulos, agrupadas en inflorescencias panículas o cabezuelas con 20-30 flores por cabezuela; involucro campanulado. Fruto aquenio, angostamente turbinado, de 1,3-1,8 mm de longitud, color verde (tierno) y café (maduro). Es una especie pionera invasora (Manzano et. al. , 2012, pp. 404-509).

#### **1.5.4. Composición**

Los primeros estudios preliminares realizados indicaron la ausencia de lactonas sesquiterpénicas y sesquiterpenos presentes en las partes aéreas. Otras investigaciones fitoquímicas realizadas indicaron la presencia de diterpenos, flavonoides, taninos, fenoles, quinonas, triterpenos, saponinas, y lactonas sesquiterpénicas, esteroides.

Estos compuestos químicos, se han asociado a propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoarias y citotóxicas por lo tanto tienen potencial terapéutico (Manzano et. al. , 2015, pp. 85-89).

#### **1.5.5. Propiedades y usos**

En la medicina popular es utilizada la cocción de las hojas para combatir el paludismo, malaria, para el tratamiento de pre y posparto y para curar las heridas infectadas. Los habitantes del suroeste de Loja, y la región de la Marcabelí de la provincia de El Oro reconocen tanto su poder curativo como su acción analgésica. Usan las hojas para lavar las heridas y aliviar los dolores de cabeza. También es utilizada como antiinflamatorio para calmar la tos y contra cierto tipo de cáncer. Se emplea para el tratamiento de leishmaniasis, preparación de antiveneno y como cataplasma de hojas para combatir el pie de atleta (Manzano et. al. , 2015, pp. 85-89).

También en la comunidad bolivariana de Tacama, el jugo de tallo de la *Vernonanthura patens* es utilizado contra la conjuntivitis. En Colombia las infusiones acuosas de las partes aéreas mezcladas con panela, el vino blanco y romero se usan contra la malaria (Manzano et. al. , 2015, pp. 85-89).

### **1.6. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos o polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad. Contienen anillos de benceno, con uno o más sustituyentes hidroxilo, y van desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos altamente polimerizados. Los fenólicos son los metabolitos secundarios más pronunciados que se encuentran en las plantas, y su distribución se muestra a lo largo de todo el proceso metabólico (Lin et. al. , 2016, pp. 1-19)

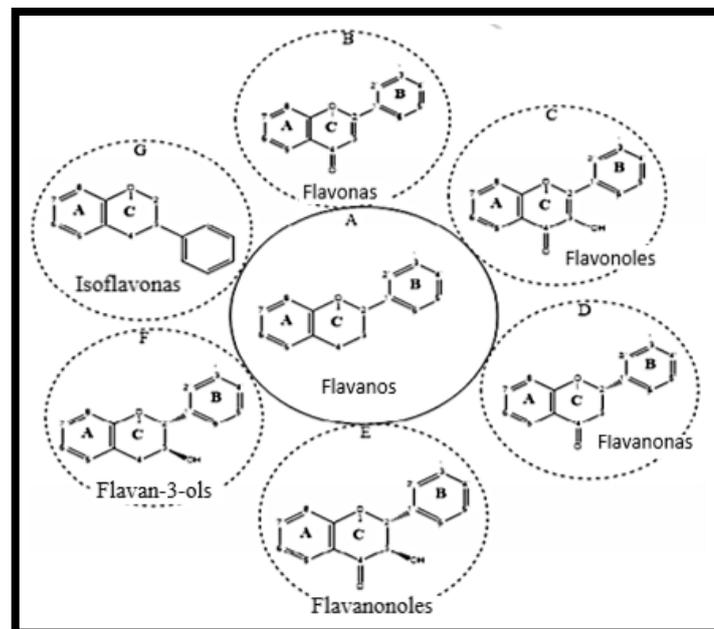
Estas sustancias fenólicas, o polifenoles, contienen numerosas variedades de compuestos: flavonoides simples, ácidos fenólicos, flavonoides complejos y antocianinas coloreadas. Estos compuestos fenólicos suelen estar relacionados con respuestas de defensa en la planta. Sin embargo, los metabolitos fenólicos desempeñan un papel importante en otros procesos, por

ejemplo, incorporando sustancias atractivas para acelerar la polinización, la coloración para el camuflaje y la defensa contra herbívoros, así como actividades antibacterianas y antifúngicas (Lin et. al. , 2016, pp. 1-19).

### 1.7. Flavonoides

Los flavonoides son polifenoles heterogéneos que se encuentran en una amplia variedad de plantas, principalmente en frutas y verduras (García et al. 2018). Son compuestos que durante mucho tiempo han sido reconocidos como posibles moléculas antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, antimicrobianas y antialérgicas. Los flavonoides proporcionan un importante componente nutracéutico a nuestra dieta. Aunque existe estudio en el uso de apigenina, una flavona vegetal natural en el tratamiento de la inflamación (Funakoshi et. al. , 2015, pp. 135-136).

La estructura de los flavonoides tiene dos anillos aromáticos, A y B, unidos por un puente de 3 carbonos, generalmente en forma de un anillo heterocíclico, C. Las variaciones en los patrones de sustitución al anillo C dan lugar a más clases de flavonoides, como flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (o catequinas), flavan-3,4-diol, isoflavonas y antocianidinas. Estos metabolitos han brindado protección efectiva y mejorado el proceso de reparación mediante el control de diferentes vías moleculares, que regulan la expresión y supresión de genes, actividades de proteínas y el ciclo celular (García et. al. , 2018, pp. 9-10).



**Figura 6-1:** Clasificación de varios flavonoides (A) Flavanos (B) Flavonas (C) Flavonoles (D) Flavanonas (E) Flavanoles (F) Flavan-3-ols, y (G) Isoflavonas

**Fuente:** (Khan et. al., 2018)

### **1.7.1. Mecanismo de acción antiinflamatoria de los flavonoides**

La acción antiinflamatoria de los flavonoides se relaciona con la inhibición de diversas enzimas, en el metabolismo del ácido araquidónico como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa, fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH) oxidasa, de radicales libres, y reducen el estrés oxidativo (Enciso & Arroyo , 2013, pp. 3-5).

Existen estudios que indican que los flavonoides polihidroxilados actúan por la vía de 5-lipooxigenasa, mientras que los menos hidroxilados inhiben la vía de ciclooxigenasa. Otros mecanismos implicados en la acción antiinflamatoria de los flavonoides son la inhibición de la liberación de histamina, inhibición de la migración celular, acción antirradicalaria (ejerciendo frente a los radicales libres que se originan en la inflamación), efecto protector vascular (Enciso & Arroyo , 2013, pp. 3-5).

## **1.8. Alcaloides**

Los alcaloides son metabolitos secundarios de las plantas que son sintetizados a través de aminoácidos, son moléculas nitrogenadas de bajo peso molecular con una amplia variedad de estructuras químicas y actividad biológica (De La Cruz Chacón et. al. , 2012, pp. 2-8)

Los alcaloides poseen estructuras químicas muy diversas. Generalmente actúan sobre el sistema nervioso central como la morfina, otros alcaloides muestran actividad sobre el sistema nervioso autónomo con actividad anticolinérgica que actúa como antagonista competitivo de las sustancias que estimulan el parasimpático. También los alcaloides actúan como diuréticos, sedantes, antiinflamatorios, antitusivos, antiespasmódicos, con aplicaciones dermatológicas (Martínez & Cano., 2009, pp. 125-163).

## **1.9. Edema plantar inducido por carragenina**

Es un método utilizado ampliamente para la detección y evaluación de los fármacos antiinflamatorios. El método de edema plantar inducido por carragenina se basa en la administración subcutánea de una solución de carragenina (un mucopolisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondus crispus*) a nivel de la aponeurosis plantar de ratas. Se caracteriza por una fase temprana (0-1 h), mediada por la liberación de diversos elementos como histamina, serotonina, prostaglandinas, seguido de una fase tardía (1-6 h) se asocia por diversos factores del complemento que están implicados en la amplificación de la respuesta como las prostaglandinas, proteasas y lisosomas. La respuesta vascular máxima ocurre alrededor de 5 horas después de la

inyección de la solución y es modulada por los inhibidores de moléculas específicas dentro de la cascada inflamatoria (Winter et. al., 1962, pp. 544-545).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Lugar de investigación

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

#### 2.2. Obtención de la muestra

Las muestras de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao* fueron proporcionados por el Centro de Investigación Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), ESPOL. La investigación de estas especies se encuentra dentro del Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica Denominado “Estudio de la Biodiversidad en el Ecuador, Ecología, Conservación y su Potencial Uso Sostenible” (MAE-DNB-CM-2018-0086) establecido entre el Ministerio del Ambiente y la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Anexo Y). Además, se contó con la guía de movilización de especies Nro. DPAP.UPN.VC.2019.007 (Anexo N).

#### 2.3. Reactivos biológicos

Para la investigación del efecto antiinflamatorio se utilizaron un total de 24 ratas albinas (*Rattus norvegicus*) del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

##### 2.3.1. Descripción

**Tabla 1-2:** Descripción de las ratas (*Rattus norvegicus*)

|                     |   |
|---------------------|---|
| Peso Corporal       | 160 kg – 220 kg   |
| Edad                | 6 a 8 semanas   |
| Sexo                | Hembras/machos  |
| Lugar de nacimiento | Bioterio de experimentación de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH. |

Realizado por: Narcisa Palchizaca, 2018

### 2.3.2. Condiciones

**Tabla 2-2:** Condiciones para ratas (*Rattus norvegicus*)

|                            |                                  |
|----------------------------|----------------------------------|
| Humedad                    | 45 ± 5 %                         |
| Temperatura                | 25 ± 2 °C                        |
| Fotoperiodo                | 12 horas luz- 12 horas oscuridad |
| Agua y comida              | <i>ad libitum</i>                |
| Cama con tamo esterilizado | cambio cada 48 horas             |
| Tiempo de ambientación     | 30 días                          |

Realizado por: Narcisa Palchizaca, 2018.

### 2.4. Equipos, materiales y reactivos

**Tabla 3-2:** Equipos, materiales y reactivos utilizados en trabajo de investigación

| Equipos                                | Materiales  | Reactivos                       |
|--|---|---------------------------------|
| Rotavapor BUCHI CH-9239 FLAWIL-SCHWEIZ | Vasos de precipitación 25, 50, 100, 250 y 500 mL        | Agua destilada                  |
| Bomba de vacío                         | Pipetas 1,5 y 10 mL                                     | Alcohol antiséptico             |
| Sonicador Cole-Parmer                  | Cápsula de porcelana                                    | Alcohol a 96 %                  |
| Refractómetro de Abbé                  | Espátula  | Éter etílico                    |
| pH-metro (accumet XL 150)              | Crisoles  | Reactivo de Sudan III           |
| Espectrofotómetro Cole-Parmer          | Pinzas para cápsulas                                    | Reactivo de Dragendorff         |
| Vórtex mixer mrc                       | Probetas 10 y 25 mL                                     | Ácido clorhídrico al 1 %        |
| Cámara UV                              | Balón esmerilado de 250 y 500 mL                        | Ácido clorhídrico concentrado   |
| Congelador                             | Balones de aforo de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL | Reactivo de Mayer               |
|  | Trípode   | Cloruro de sodio en polvo       |
|  | Reverbero   | Reactivo de Wagner              |
|  | Varilla de agitación                                    | Reactivo de Baljet              |
|  | Matraces aforado mL                                     | Reactivo Borntrager             |
|  | Tubos de vidrio 10 mL                                   | Cloroformo                      |
|  | Embudo de separación 250 mL                             | Hidróxido de sodio              |
|  | Embudo simple   | Hidróxido de potasio            |
|  |   | Amonio al 5 % en agua           |
|  |   | Reactivo de Liebermann-Burchard |
|  |   | Anhídrido acético               |
|  |   | Ácido sulfúrico                 |

|  |                              |                                  |
|--|------------------------------|----------------------------------|
|  | Picnómetro                   | Reactivo de Fehling              |
|  | Pinzas de tubos              | Cloruro férrico                  |
|  | Capilares                    | Reactivo de Shinoda              |
|  | Piseta                       | Magnesio metálico                |
|  | Frascos de vidrio ámbar      | Alcohol amílico                  |
|  | Papel filtro                 | Nitrito de sodio 5 %             |
|  | Papel aluminio               | Cloruro de aluminio 10 %         |
|  | Cánula                       | Reactivo de Folin-Ciocalteu 20 % |
|  | Jeringuillas de 1, 3 mL      |                                  |
|  | Algodón                      | Carbonato de sodio 7.5 %         |
|  | Guantes, mascarilla, zapatos | Ácido cítrico monohidratado      |
|  |                              | Verde de bromocresol             |
|  |                              | Fosfato ácido de sodio.          |
|  |                              | Carragenina                      |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

## 2.5. Técnicas y métodos

### 2.5.1. Control de la calidad de la droga cruda

El Control de Calidad se realizó para confirmar la identidad y calidad de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*, tomando en cuenta las Normas Ramales para Drogas Crudas y Tinturas ( Normas Ramales para Drogas Crudas y Tinturas, 1992).

Para lo cual las muestras fueron facilitadas por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, en forma de hojas secas, para posterior realizar los análisis.

#### 2.5.1.1. Determinación de humedad

Para esta determinación se utilizó el método gravimétrico, para lo cual se pesó 2 g de muestra pulverizada (hojas), y se pasó a una capsula de porcelana previamente tarada a 105 °C (desechada hasta masa contante), inmediatamente se desecó a 105 °C durante 3 horas. Se dejó enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente, se pesó, reiteradamente se colocó 1 hora en la estufa, se volvió a enfriar en el desecador hasta obtener masa constante y se calculó el porcentaje de humedad ( Normas Ramales para Drogas Crudas y Tinturas, 1992).

Fórmula

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

Donde:

%Hg: pérdida en peso por desecación (%).

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

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

#### 2.5.1.2. Determinación de las cenizas totales

Para la determinación de cenizas totales se usó método gravimétrico. Se pesaron 2 g de muestra pulverizada y se pasó a un crisol de porcelana previamente tarada. Se calentó en un reverbero hasta carbonización, a continuación, se pasó a la mufla por 3 horas a 750 °C, hasta la aparición de ceniza, se dejó enfriar en un desecador y se pesó hasta la obtener masa constante y se determinó el porcentaje de cenizas ( Normas Ramales para Drogas Crudas y Tinturas, 1992).

Fórmula

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

Donde:

%C: porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M: masa del crisol vacío (g)

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

M2: masa del crisol con la ceniza (g)

#### 2.5.1.3. Determinación de cenizas solubles en agua

A las cenizas totales obtenidas, se le añadieron 15 mL de agua destilada. El crisol se tapó y se llevó a ebullición por 5 minutos. La solución se filtró y a través de papel filtro libre de cenizas, se

transfirió al crisol, se carbonizó en el reverbero, luego se incineró en la mufla a 750 °C por 2 horas. Posteriormente, se colocó en desecador hasta temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar masa contante. Se realizó los cálculos obteniéndose el porcentaje de su contenido ( Normas Ramales para Drogas Crudas yTinturas, 1992).

Fórmula:

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

Donde:

%Ca: porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

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

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

M1: masa del crisol con la muestra en (g)

M: masa del crisol vacío.

#### *2.5.1.4. Determinación de cenizas solubles en ácido clorhídrico*

A las cenizas totales obtenidas, se añadieron 2 ml de ácido clorhídrico al 10%, se tapó el crisol con un vidrio reloj y se procedió a hervir en baño de agua por diez minutos. Se lavó la luna de reloj con 5 ml de agua caliente y se trasladó al crisol. Se filtró el contenido del crisol, se lavó el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico (se añadieron 1 o 2 gotas de la solución de AgNO<sub>3</sub> 0.1 mol/L) no presente cloruros. El filtrado con residuo se desecó a 105 °C y se transfirió al crisol inicial en el cual se procedió a incinerar en una mufla a 750 °C por dos horas. Luego se colocó en desecador hasta temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el procedimiento hasta obtener masa contante. Se realizó los cálculos obteniéndose el porcentaje de su contenido ( Normas Ramales para Drogas Crudas yTinturas, 1992).

Fórmula:

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

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

M: muestra utilizada en (g)

M1: masa del crisol con la muestra (g)

M2: masa del crisol con la ceniza insolubles en ácido clorhídrico (g)

### **2.5.2. Tamizaje fitoquímico**

Para el tamizaje fitoquímico de las hojas de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y de las cáscaras de *Theobroma cacao*, se pesaron 10 g de muestra y se realizaron extracciones con solventes de polaridad creciente: éter, etanol y agua, respectivamente (Martínez et. al. , 2012, pp. 3-4)

Los ensayos que se realizaron en el tamizaje fitoquímico son métodos que permite determinar cualitativamente los diferentes tipos de metabolitos secundarios, donde se evidencian por el cambio de coloración y la aparición de precipitación.

Se realizaron en el extracto etéreo los ensayos de Sudan (Aceites y grasas), Dragendorff (alcaloides), Mayer (alcaloides), Wagner (alcaloides) y Liebermann-Buchard (triterpenos o esteroides). En el extracto etanólico se llevaron a cabo los ensayos de Catequinas, Resinas, Fehling (azúcares reductores), Baljet (lactonas), Liebermann-Buchard (triterpenos o esteroides), Espuma (saponinas), Borntrager (quinonas), Shinoda (flavonoides), Antocianidina, Dragendorff (alcaloides), Mayer (alcaloides) y Wagner (alcaloides). En el extracto acuoso se realizaron los ensayos de Fehling (azúcares reductores), Cloruro férrico (fenoles y taninos), Espuma (saponinas), Shinoda (flavonoides), Dragendorff (alcaloides), Mayer (alcaloides) y Wagner (alcaloides) ( Normas Ramales para Drogas Crudas yTinturas, 1992).

### **2.5.3. Obtención del extracto blando**

Para la obtención de los extractos, se procedió a pesar 40 g de cada planta y se añadió etanol al 95 % tres veces superior a la muestra (120mL). Se dejó en maceración por 48 horas, se filtró y se evaporó el solvente en un rotavapor hasta la eliminación total del solvente. Los procesos anteriores mencionados se realizaron en tres ocasiones, con el fin de obtener más volumen del extracto ( Normas Ramales para Drogas Crudas yTinturas, 1992).

Con los extractos blandos se procedió a realizar ensayos de control de calidad, a través de las pruebas que se encuentran a continuación.

### *2.5.3.1. Determinación de los requisitos organolépticos*

Determinación de olor: se tomó una tira de papel secante de 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introdujo en los extractos. Se procedió a oler para determinar las características propias del extracto obtenido (Miranda, 2006, p. 27).

Determinación de color: en un tubo de ensayo limpio y seco, se llenaron tres cuarta partes con la muestra de ensayo (extracto de hojas) y se observó la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas (Miranda, 2006, p. 27).

### *2.5.3.2. Determinación de pH*

La determinación se efectuó en un pH-metro accumet XL 150, para lo cual se ajustó el equipo con la solución reguladora y se procedió a medir el pH. En una alícuota de muestra se introdujo el pH-metro ( Normas Ramales para Drogas Crudas yTinturas, 1992).

### *2.5.3.3. Determinación de sólidos totales*

La determinación de sólidos totales es la variación de la masa debido a la pérdida de sustancias volátiles por acción del calor. Para ello, en una cápsula previamente tarada se transfirió 5 ml del extracto y llevó a baño de agua hasta residuo aparentemente seco. Se pasó a una estufa a una temperatura de 45 °C y se dejó hasta obtener un peso contante. Posteriormente, se colocó en un desecador hasta que alcance temperatura ambiente ( Normas Ramales para Drogas Crudas yTinturas, 1992).

Fórmula:

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

Pr: masa de la cápsula más el residuo (g)

P: masa de la cápsula vacía (g)

V: volumen de la porción de ensayo.

### *2.5.4. Cuantificación de fenoles totales*

Para realizar la cuantificación de los fenoles totales se tomó 1 mL de muestra previamente preparada (25 mg del extracto blando en 25 ml de etanol al 96%) y se añadieron 15 mL de agua

destilada en conjunto con 1.25 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se dejó reposar durante 8 minutos, luego se adicionaron 3.75 ml de carbonato de sodio 7.5%; posteriormente, se aforó a volumen final (25 ml) con agua destilada. Se vortizó por 1 minuto y se dejó en reposo por 2 horas bajo oscuridad. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 765 nm en un espectrofotómetro (Hennebelle et. al., 2008, pp. 39-46).

#### **2.5.5. Cuantificación de flavonoides totales**

Para realizar la cuantificación de flavonoides totales se tomó 1 ml de muestra prepara (25 mg del extracto blando en 25 ml de etanol al 96%) y se añadieron 4 ml de agua destilada en conjunto con 0.3 ml de nitrito de sodio al 5 %. Se dejó reposar durante 5 minutos, luego se adicionaron 0.3 ml de una solución de cloruro de aluminio al 10 %, se vortizó por 1 minuto y se dejó en reposo por 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 2 ml de NaOH 1M y se homogenizó. Las absorbancias respectivas fueron medidas 510 nm en un espectrofotómetro (Hennebelle et. al., 2008, pp. 39-46).

#### **2.5.6. Cuantificación de los alcaloides**

La cuantificación de alcaloides es un método que se fundamenta en la reacción de alcaloides, que contienen nitrógeno en el interior de su estructura con verde de bromocresol, dando lugar a un complejo de transferencia de cargas alcaloides-verde de bromocresol de color amarillo, susceptibles de una determinación espectrofotométrica a 470 nm (Jaramillo et. al., 2016, pp. 3-8).

Para la preparación de verde bromocresol (BCG) se pesaron 69.8 mg del reactivo y se agregó en un vaso de precipitación, se adicionaron 3ml de NaOH de concentración de 2 mol/L y 5 ml de agua destilada, hasta estar completamente disuelto y la solución de diluye hasta 1000 ml en un balón de aforo.

Para la preparación del buffer de fosfato ácido de sodio, se pesaron 7.16 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y se disolvió con agua destilada, se aforó a 100 mL y se ajustó el pH con la solución de ácido cítrico hasta un pH de 4.7.

Se empleó como solución estándar atropina se aforo 1mg/ml de atropina en 10 ml de agua destilada. Se transfirió alícuotas de esta solución en los diferentes volúmenes: 0, 0.3, 0.6, 0.9, y 1.2 mL. Se adicionó 5 mL solución del buffer fosfato y solución de verde de bromocresol. Por último se adicionó cloroformo hasta extracción total de alcaloides. (Jaramillo-Jaramillo et al. 2016:pp. 3-8).

Se preparó como solución estándar la atropina para la elaboración de la curva de calibración ( $y=0.298x+0.1266$ ). Posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro UV visible.

### *Procedimiento*

Se transfirieron 5 ml del extracto a un embudo de separación con 5 ml de la solución de verde bromocresol y 5ml de solución del buffer fosfato. A continuación, se adicionaron 2 ml de cloroformo. La fase clorofórmica se separó en un balón de 10 ml. Se siguió adicionando consecutivamente al embudo de separación 2 ml de cloroformo y luego se siguió adicionando dos veces más 3 ml de cloroformo. A continuación, se completó el volumen con cloroformo a 10 mL (Jaramillo et. al., 2016, pp. 3-8).

Los resultados fueron expresados fueron expresos en mg de atropina por g de extracto seco.

### **2.6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria**

Para el estudio se utilizó *Rattus norvegicus* hembras y machos con un peso corporal entre 180 a 210 g y de edad promedio de 6-8 semanas. Las ratas fueron adquiridas en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias del ESPOCH. Todas las ratas fueron aisladas en jaulas bajo condiciones de temperatura constante de  $25 \pm 2$  °C, humedad relativa de  $45 \pm 5$  % y el fotociclo (luz/oscuridad) de 12 horas, para su ambientación por un tiempo de 15 días. Además, tuvieron acceso libre de agua y fueron alimentadas en cantidades de 25 g de balanceado para ratas, una vez al día.

Luego de haber culminado con el proceso adecuado de ambientación, se procedió a realizar el ensayo de actividad antiinflamatoria, para ello fue necesario que todas las ratas se encontrasen en ayunas por 12 h, con libre acceso a agua.

Para la evaluación de efecto antiinflamatorio, inicialmente, se obtuvo el peso de cada una de las ratas con la ayuda de una balanza electrónica digital, con el fin de calcular las dosis adecuadas de extractos y de control positivo. Los grupos de tratamiento fueron:

Grupo de Blanco: vehículo, agua destilada

Grupo de control positivo: diclofenaco sódico 150 mg/kg.

Grupo tratamiento 1: extracto blando de *Ilex guayusa*, 100 mg/kg

Grupo tratamiento 2: extracto blando de *Ilex guayusa*, 300 mg/kg

Grupo tratamiento 3: extracto blando de *Vernonanthura patens*, 100 mg/kg

Grupo tratamiento 4: extracto blando de *Vernonanthura patens*, 300 mg/kg

Grupo tratamiento 5: extracto blando de *Theobroma cacao*, 100 mg/kg

Grupo tratamiento 6: extracto blando de *Theobroma cacao*, 300 mg/kg

Posteriormente, se realizó el cálculo de volumen plantar basal de la pata dorsal izquierda de la rata, para obtener el valor real de volumen, se introdujo la pata en una probeta con 95ml de agua, se pudo observar que el volumen del líquido aumenta una cierta cantidad al introducir la pata, el valor aumentado viene a ser el volumen calculado de la pata. Los valores de volumen calculado se detallan en el anexo J.

A continuación, se administró por vía oral mediante sonda, el vehículo, el control positivo y los extractos de las tres especies de cada grupo, respectivamente. Después de 30 minutos de la administración, se administró carragenina (0.1 ml de solución carragenina al 1% en suero fisiológico) mediante inyección por vía subcutánea dentro de la aponeurosis de la pata izquierda, provocando una reacción inflamatoria (Winter et. al., 1962, pp. 544-545) en todas las ratas de experimentación. La medida de la evolución del edema se realizó a las 0, 1, 2, 3, 4 y 24 horas después de la administración de carragenina mediante la medición del volumen de la pata.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la inflamación utilizando la siguiente fórmula.

$$\%inhibición = \frac{(Ct - Co)control - (Ct - Co)tratado}{(Ct - Co)control} \times 100$$

Donde

Ct = volumen de la pata inflamada a un tiempo x

Co = volumen normal (antes de la administración de carragenina)

En la tabla 4-2 se manifiesta el modelo experimental utilizado para evaluar el efecto antiinflamatorio *in vivo* de los extractos blandos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*.

**Tabla 4-2:** Modelo experimental para la evaluación del efecto antiinflamatorio

| TRATAMIENTOS | REPETICIONES |    |    |
|--------------|--------------|----|----|
| T1           | R1           | R2 | R3 |
| T2           | R1           | R2 | R3 |
| T3           | R1           | R2 | R3 |
| T4           | R1           | R2 | R3 |
| T5           | R1           | R2 | R3 |
| T6           | R1           | R2 | R3 |
| T7           | R1           | R2 | R3 |
| T8           | R1           | R2 | R3 |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

Donde:

T1= Edema plantar + vehículo (agua destilada)

T2= Edema plantar + fármaco estándar (diclofenaco sódico 150 mg/kg)

T3= Edema plantar + Dosis equivalente de *Ilex guayusa* contenida en el extracto: 100 mg/kg

T4= Edema plantar + Dosis equivalente de *Ilex guayusa* contenida en el extracto: 300 mg/kg

T5= Edema plantar + Dosis equivalente de *Vernonanthura patens* contenida en el extracto: 100 mg/kg

T6= Edema plantar + Dosis equivalente de *Vernonanthura patens* contenida en el extracto: 300 mg/kg

T7= Edema plantar + Dosis equivalente de *Theobroma cacao* contenido en el extracto: 100 mg/kg

T8= Edema plantar + Dosis equivalente de *Theobroma cacao* contenido en el extracto: 300 mg/kg

Para la evaluación del efecto antiinflamatorio se utilizaron un total de 24 ratas de experimentación, utilizando para cada tratamiento 3 ratas. El estudio se realizó con tres replicas.

### **2.6.1. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa IBM SPSS Statistics versión 23, en el cual se aplicó el test de modelo lineal general univariado para comprobar si existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, en base a este parámetro se planteó la siguiente hipótesis estadística.

**H<sub>0</sub>:** No existe diferencia entre cada uno de los tratamientos administrados a las ratas de experimentación tras la inducción de edema plantar.  $p \geq 0,05$

**H<sub>1</sub>:** Al menos uno de los tratamientos administrados es diferente.  $p < 0,05$

Si se acepta la hipótesis nula se concluye que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, pero si se rechaza se confirma que al menos uno de los tratamientos administrados es diferente, por lo que se deriva a aplicar el test de Duncan que determina si existen diferencias significativas entre los tratamientos administrados según su porcentaje de inhibición.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1. Control de calidad de la droga vegetal

Control de calidad es de gran importancia ya que permite garantizar la eficacia de las drogas vegetales.

##### 3.1.1. Determinación de humedad

**Tabla 1-3:** Resultado de determinación de la humedad de las drogas vegetales *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y de *Theobroma cacao*

| Material Vegetal            | % Humedad | Límites De Humedad |
|-----------------------------|-----------|--------------------|
| <i>Ilex guayusa</i>         | 5.68      | Hasta 14%          |
| <i>Vernonanthura patens</i> | 10.56     | Hasta 14%          |
| <i>Theobroma cacao</i>      | 6.29      | Hasta 14%          |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

Para la conservación de las drogas se elimina el exceso de agua para evitar la proliferación microbiana, el deterioro y la hidrólisis de sus componentes (Gutiérrez et. al. , 2011, pp. 18-20)

En la tabla 1-3 se detallan los resultados obtenidos del ensayo de humedad residual de las drogas vegetales de las tres especies estudiadas, indicando que los valores se encuentran dentro de los parámetros establecidos en la farmacopea para las drogas, misma que oscila entre un 8 a 14% (Real Farmacopea Española , 2004)por lo tanto estos resultados nos muestran que las drogas se pueden conservar libres de microorganismos por un tiempo moderado, siendo favorable para el estudio.

Para *Ilex guayusa* no coinciden con los resultados obtenidos por Tuquinga (2013) y Gualli (2015) indican que poseen un promedio de humedad de 8.64% y 8,65% respectivamente, datos que son mayores con lo obtenido en el presente estudio.

En cuando a *Vernonanthura patens*, los resultados coinciden con lo obtenido por Manzano (2013), quien indica que el porcentaje de humedad, en las hojas de *Vernonanthura patens* es de 10%.

Estudios realizados para *Theobroma cacao* por otros autores indican con un rango de humedad entre 6 y 7%, el dato obtenido en estudio coincide con lo de referencia (Vera et. al. , 2014, pp. 26-27).

### 3.1.2. Determinación de cenizas totales

La determinación de cenizas es un índice de la calidad de la droga vegetal que permite evaluar la cantidad de cenizas fisiológicas derivadas de los tejidos de la propia planta y cenizas no fisiológicas que es residuo de materias extrañas (polvo, arena y tierra), que puede afectar la calidad de las droga vegetal (Cabrera et. al. , 2012, p. 8).

**Tabla 2-3:** Resultado de determinación de cenizas totales de las drogas vegetales *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y de *Theobroma cacao*

| Material Vegetal            | % Cenizas Totales | Límites de Cenizas Totales |
|-----------------------------|-------------------|----------------------------|
| <i>Ilex guayusa</i>         | 5.37              | Hasta 12%                  |
| <i>Vernonanthura patens</i> | 10.30             | Hasta 12%                  |
| <i>Theobroma cacao</i>      | 5.77              | Hasta 12%                  |

**Relazado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

En la tabla 2-3, se indica el contenido de cenizas totales de las especies *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos en la Farmacopea española (Real Farmacopea Española , 2004).

### 3.1.3. Determinación de cenizas solubles en agua

**Tabla 3-3:** Resultado de determinación de cenizas solubles en agua de las drogas vegetales *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y de *Theobroma cacao*

| Material Vegetal            | % Cenizas Solubles En Agua | Límites de % Cenizas Solubles En Agua |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| <i>Ilex guayusa</i>         | 1.45                       | Hasta 2%                              |
| <i>Vernonanthura patens</i> | 0.86                       | Hasta 2%                              |
| <i>Theobroma cacao</i>      | 1.92                       | Hasta 2%                              |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

Los resultados expresados en las tablas 2-3 y 3-3 indican el contenido de cenizas totales y solubles en agua, de las tres especies, que corresponde al material tipo orgánico (Sharapin, 2000, pp. 149-150) presente en la muestra. Los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos según la Farmacopea española que es 12% y del 2% para cenizas totales y solubles en agua (Real Farmacopea Española, 2004).

### 3.1.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

**Tabla 4-3:** Resultado de determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico de las drogas vegetales *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y de *Theobroma cacao*

| Material Vegetal            | % Cenizas Insolubles En Hcl | Límites de % Cenizas Insolubles En Hcl |
|-----------------------------|-----------------------------|--|
| <i>Ilex guayusa</i>         | 1.29                        | Hasta 1%                               |
| <i>Vernonanthura patens</i> | 1.5                         | Hasta 1%                               |
| <i>Theobroma cacao</i>      | 1.82                        | Hasta 1%                               |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

En los resultados indicados en la tabla 4-3, de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico de las tres especies, presentan valores elevados, según la Farmacopea española (Real Farmacopea Española, 2004). Pero según la Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos se encuentra dentro de los límites, cuyo valor de especificación es de 5%, lo que indica que las drogas vegetales presentan materia arenosa (Sharapin, 2000, pp. 149-150).

### 3.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas iniciales del estudio fitoquímico, que permite determinar cualitativamente, los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en cada extracto, de acuerdo a su solubilidad en cada uno de los solventes empleados (Mera, 2016, pp. 3-4).

**Tabla 5-3:** Resultados de tamizaje fitoquímico de *Ilex guayusa*

| Metabolitos          | Ensayo      | Extracto etéreo | Extracto etanólico | Extracto acuoso |
|----------------------|-------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| Aceites y grasa      | Sudan       | -               | N/A                | N/A             |
|                      | Dragendorff | +++             | +++                | +++             |
| Alcaloides           | Mayer       | -               | -                  | ++              |
|                      | Wagner      | -               | +                  | ++              |
| Lactonas y cumarinas | Baljet      | -               | -                  | N/A             |

|                        |                     |     |     |     |
|------------------------|---------------------|-----|-----|-----|
| Triterpenos-esteroides | Liebermann-Burchard | +   | +++ | N/A |
| Catequinas             | Catequinas          | N/A | +   | N/A |
| Resinas                | Resinas             | N/A | -   | N/A |
| Azúcares reductores    | Fehling             | N/A | +   | +   |
| Saponinas              | Espuma              | N/A | -   | +   |
| Fenoles y taninos      | Cl <sub>3</sub> Fe  | N/A | +++ | +++ |
| Quinonas               | Borntrager          | N/A | -   | N/A |
| Flavonoides            | Shinoda             | N/A | -   | +   |
| Flavonoides            | Antocianidinas      | N/A | -   | N/A |
| Polisacáridos          | Mucílagos           | N/A | N/A | -   |
| Principios amargos     | Principios amargos  | N/A | N/A | +/- |

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

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

En la tabla 5-3 se presentan los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos etéreo, etanólico y acuoso de las hojas de *Ilex guayusa*, indicando la existencia de varias familias de metabolitos secundarios de interés biológico y farmacológico.

Los grupos de los metabolitos secundarios encontrados con mayor frecuencia fueron alcaloides, triterpenos-esteroides, flavonoides, fenoles, taninos, azúcares reductores y, en menor abundancia saponinas, catequinas y principios amargos. El extracto acuoso presentó mayor variedad de estas sustancias, resultados que coinciden con los encontrados por Manzano, S. 2018, quien además reportó la identificación de compuestos como quinonas y aceites/grasas (Manzano et. al , 2018, pp. 8620-8621).

**Tabla 6-3:** Resultados de tamizaje fitoquímico de *Vernonanthura patens*

| Metabolitos            | Ensayo              | Extracto etéreo | Extracto etanólico | Extracto acuoso |
|------------------------|---------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| Aceites y grasa        | Sudan               | -               | N/A                | N/A             |
|                        | Dragendorff         | -               | -                  | -               |
| Alcaloides             | Mayer               | -               | -                  | -               |
|                        | Wagner              | -               | -                  | +               |
| Lactonas y coumarinas  | Baljet              | -               | -                  | N/A             |
| Triterpenos-esteroides | Liebermann-Burchard | +               | +++                | N/A             |
| Caquenas               | Catequinas          | N/A             | -                  | N/A             |
| Resinas                | Resinas             | N/A             | -                  | N/A             |

|                     |                    |     |     |     |
|---------------------|--------------------|-----|-----|-----|
| Azúcares reductores | Fehling            | N/A | +   | +   |
| Saponinas           | espuma             | N/A | +   | -   |
| Fenoles y taninos   | Cl <sub>3</sub> Fe | N/A | +++ | +++ |
| Quinonas            | Borntrager         | N/A | -   | N/A |
| Flavonoides         | Shinoda            | N/A | +   | +   |
| Flavonoides         | Antocianidina      | N/A | -   | N/A |
| Polisacáridos       | Mucílagos          | N/A | N/A | -   |
| Principios amargos  | Principios amargos | N/A | N/A | +   |

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

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

En la tabla 6-3 se pueden apreciar los metabolitos secundarios identificados en la especie *Vernonanthura patens*, destacando la presencia de triterpenos-esteroides, flavonoides, taninos, azúcares reductores en mayor frecuencia, saponinas y principios amargos en menor cantidad, lo cual es coincidente con los reportes previos de Manzano, S. 2016, quien además reportó la presencia de catequinas, alcaloides y quinonas.

**Tabla 7-3:** Resultados de tamizaje fitoquímico de *Theobroma cacao*

| Metabolitos            | Ensayo              | Extracto etéreo | Extracto etanólicos | Extracto acuoso |
|------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Aceites y grasa        | Sudan               | +               | N/A                 | N/A             |
|                        | Dragendorff         | -               | -                   | +++             |
| Alcaloides             | Mayer               | -               | -                   | +               |
|                        | Wagner              | -               | -                   | ++              |
| Lactonas y cumarinas   | Baljet              | -               | -                   | N/A             |
| Triterpenos-esteroides | Liebermann-Burchard | -               | -                   | N/A             |
| Catequinas             | Catequinas          | N/A             | -                   | N/A             |
| Resinas                | Resinas             | N/A             | -                   | N/A             |
| Azucars reductores     | Fehling             | N/A             | +                   | +               |
| Saponinas              | Espuma              | N/A             | -                   | -               |
| Fenoles y taninos      | Cl <sub>3</sub> Fe  | N/A             | ++                  | +++             |
| Quinonas               | Borntrager          | N/A             | -                   | N/A             |
| Flavonoides            | Shinoda             | N/A             | +                   | +               |
| Flavonoides            | Antocianidina       | N/A             | +                   | N/A             |
| Polisacáridos          | Mucílagos           | N/A             | N/A                 | -               |
| Principios amargos     | Principios amargos  | N/A             | N/A                 | -               |

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

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

En la Tabla 7-3 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de la cascara de *Theobroma cacao*. Se puede observar la presencia de flavonoides, fenoles, taninos, azucars reductores, y alcaloides. Los resultados que coinciden con

los reportados según Santos, 2014. A excepción de la presencia de saponinas, ya que en este estudio dió positivo (Santos et. al. , 2014).

### 3.3. Control de calidad de extracto blando

**Tabla 8-3:** Resultados de parámetros organolépticos de los extractos blandos de las especies *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *theobroma cacao*

| <b>Características</b> | <b><i>Ilex guayusa</i></b>   | <b><i>Vernonanthura patens</i></b>                                  | <b><i>Theobroma cacao</i></b>                                    |
|------------------------|--|---|--|
| Color                  | Verde oscuro, transparente, sin partícula en suspensión y si separación de fases | Negro, opaco sin partículas en suspensión y sin separación de fases | Café claro, opaco con partículas en suspensión y fases separadas |
| Olor                   | Característico, agradable  | Característico,   | Suave y aromático  |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

En la tabla 8-3 se observa las características organolépticas de las especies en estudio, tomando en cuenta el color, la presencia o ausencia de partículas, transparencia, separación de fases y el olor.

**Tabla 9-3:** Resultados de parámetros físico-Químicos de los extractos blandos

| <b>Parámetros</b> | <b><i>Ilex guayusa</i></b> | <b><i>Vernonanthura patens</i></b> | <b><i>Theobroma cacao</i></b> |
|-------------------|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| pH                | 5.31                       | 5.35                               | 4.79                          |
| Sólidos totales   | 2.33                       | 2.16                               | 1.22                          |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

En la tabla 9-3, se indican los resultados de parámetros fisicoquímicos analizados en los extractos blandos de las tres especies. Los valores de pH obtenidos fueron de 5.31, 5.35 y 4.79 para *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*, respectivamente.

Los resultados obtenidos de los sólidos totales de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao* fueron de 2.33, 2.6 y 1.22, respectivamente; lo cual indica la cantidad de materia disuelta y mide el total de residuos sólidos filtrables, siendo mayor el proceso extractivo en *Ilex guayusa*, seguida por *Theobroma cacao* y, finalmente, *Vernonanthura patens*.

### 3.4 Cuantificación de fenoles

La cuantificación de los fenoles totales en los extractos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao* se determinó por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. Se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante. Para lo cual se realizó una curva de calibración del estándar de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, obteniendo una ecuación de la recta  $y(\text{absorbancia}) = 0.0014x(\text{concentración ácido gálico}) + 0.0144$ , cuyo coeficiente de relación fue de  $R^2=0.9997$ .

Se realizó la dilución de los extractos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*, con el fin de que las absorbancias obtenidas se encontrasen dentro de la curva de la calibración. Los resultados obtenidos fueron reemplazados en la ecuación de la recta del estándar de ácido gálico y expresados en mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto y en porcentaje masa-masa.

**Tabla 10-3:** Cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría

| Muestra analizada           | Fenoles totales expresados como mg EAG/ g de extracto | Porcentaje   |
|-----------------------------|---|--------------|
| <i>Ilex guayusa</i>         | 174.86 ± 0.00   | 17.49 ± 0.00 |
| <i>Vernonanthura patens</i> | 98.43 ± 0.00  | 9.84 ± 0.00  |
| <i>Theobroma cacao</i>      | 110.57 ± 0.00   | 11.06 ± 0.00 |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

Como se puede apreciar en la tabla 10-3, se muestran los resultados de la cuantificación de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Se observa para *Ilex guayusa* 174.86±0.00 mg/Eq de ácido gálico por g de extracto lo que corresponde a un porcentaje de 17.49%, *Vernonanthura patens* presenta 98.43±0.00 mg/Eq de ácido gálico por g de extracto con un porcentaje de 9.84%, y para el *Teobroma cacao* 110.57±0.00 mg/Eq de ácido gálico por g de extracto, con un porcentaje de 11.06%.

En lo que se refiere a la cuantificación de fenoles totales para *Ilex guayusa*, existe estudios realizados por García y colaboradores, 2017, donde obtuvieron un contenido de fenoles totales de 54.86 mg/Eq de ácido gálico por g, cuyos resultados fueron menores debido a esta investigación (García Ruiz et. al. , 2017, pp. 22-29). Este resultado indica que a pesar de ser la misma especie, puede existir variación en la concentración de fenoles totales debido a las condiciones ambientales, hábitat de la planta, entre otros ((Garcia, 2017, p. 51)

En cuanto a la cuantificación de fenoles totales para *Theobroma cacao*, los valores obtenidos asemejan a los resultados obtenidos por Oyeleke et al. 2018 que es de 114.93 mg/Eq de ácido gálico por g. En lo que se refiere a la cuantificación de fenoles totales para *Vernonanthura patens*, el valor es mucho menor a un estudio realizado previamente, en el cual se establece un contenido de 10.95 mg/Eq de ácido gálico por gramo (Manzano et. al., 2015, pp. 85-89)

### 3.5 Cuantificación de los flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó espectrofotométricamente mediante el método de tricloruro de aluminio, para lo cual se elaboró una curva de calibración del estándar de quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80,100 ppm, obteniendo una ecuación de la recta y (absorbancia)=0.0014x (concentración de quercetina)+0.0144, cuyo coeficiente de correlación fue de  $R^2 = 0.9997$ .

Los valores obtenidos fueron reemplazados en la ecuación de la recta del estándar de quercetina y expresados en mg equivalentes quercetina por gramos de extracto.

**Tabla 11-3:** Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría

| <b>Muestra analizada</b>    | <b>Flavonoides totales expresados como mg EQ/ g de extracto seco</b> | <b>Porcentaje</b> |
|-----------------------------|--|-------------------|
| <i>Ilex guayusa</i>         | 87.81 ± 0.41   | 8.78 ± 0.04       |
| <i>Vernonanthura patens</i> | 101.5 ± 0.00   | 10.15 ± 0.00      |
| <i>Theobroma cacao</i>      | 87.93 ± 0.41   | 8.78 ± 0.04       |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

En tabla 11-3 se observan los resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides totales de las tres especies, mostrando valores menores a los obtenidos en análisis de fenoles, lo que se encuentra dentro de lo esperado ya que los flavonoides son un subgrupo de compuestos fenólicos. En la actualidad, hay un gran interés en estos compuestos, debido a que son importantes en la salud humana, poseen efectos beneficiosos en prevención de las enfermedades relacionados con procesos inflamatorios, y desordenes cardiovasculares (García, 2013, p. 2). Además tienen actividad en los procesos inflamatorios. Son capaces de inhibir las enzimas ciclooxigenasa y la lipooxigenasa que actúan en el curso del proceso inflamatorio, reduciendo la formación de tromboxanos y leucotrienos (González et. al. , 2007, pp. 288-292).

Para la cuantificación de flavonoides totales para *Theobroma cacao*, en un estudio similar realizado por (Oyeleke et. al., 2018), se presentó un resultado de 116.40 mg/Eq quercetina por gramo

muestra, cuyos valores obtenidos superan ligeramente a la concentración obtenida en este estudio. Contreras, 2016, obtuvo un resultado de 8.12 mg/Eq quercetina por g muestra, lo cual es un valor mucho menor al obtenido (Contreras, 2016).

En cuanto a la cuantificación de flavonoides totales para *Ilex guayusa*, el resultado obtenido es mucho mayores, en comparación con los resultado obtenidos por (Noriega Rivera, 2017) y (Tuquinga Usca), los cuales son de 7.50 y 7.14 mg/Eq quercetina por gramo de planta, respectivamente, y lleva a la conclusión de que esta especie es rica en flavonoides.

En lo que se refiere a la cuantificación de flavonoides totales para *Vernonanthura patens*, no coinciden con el repordo (Martínez, 2017), que se observaron 260.69 mg/Eq de quercetina por gramo de muestra, cuyo resultado es mucho mayor a resultado obtenido.

### 3.6 Cuantificación de alcaloides

Para la cuantificación de alcaloides se utilizó el método basado en la reacción con verde de bromocresol, para lo cual se elaboró una curva de calibración estándar de atropina, obteniendo una ecuación de la recta y (absorbancia)=0.298x (concentración alcaloides)+0.1266, con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.9997$ .

Los valores obtenidos fueron reemplazados en la ecuación de la recta del estándar de atropina, expresados en mg de atropina por gramos de extracto seco.

**Tabla 12-3:** Cuantificación de alcaloides

| Muestra analizada      | Alcaloides expresados como mg EA/ g de planta |
|------------------------|---|
| <i>Ilex guayusa</i>    | 0.70 ± 0.12                                   |
| <i>Theobroma cacao</i> | 0.59 ± 0.02                                   |

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

En la tabla 12-3 se puede apreciar los valores obtenidos para la cuantificación de alcaloides, para *Ilex guayusa* obteniendo un resultado de 0.70 ± 0.12 mg por gramo de muestra y para *Theobroma cacao* con un de 0.59 ± 0.02 mg por gramo de muestra. Este fue el primer reporte de cuantificación de alcaloides por este método, en cuanto al contenido de alcaloides, solamente estudios cualitativos evidenciaron la presencia de alcaloides en extracto alcohólico y extracto acuoso.

### 3.7. Efecto antiinflamatorio de los extractos

#### 3.7.1. Resultados de la administración de los extractos

En este estudio se analizaron los extractos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao*, en dos concentraciones (100 mg/kg y 300 mg/kg), para evaluar su efecto antiinflamatorio y conocer qué dosis presenta mayor efectividad. Se realizó el estudio en *Rattus norvegicus*, en las que se indujo una edema plantar de la pata posterior izquierda utilizando carragenina al 1%.

**Tabla 13-3:** Resultados del volumen promedio de inflamación (cm)

| Tiempo / grupos | T1 (Blanco)    | T2 (Diclofenaco sódico 150 mg/kg) | T3 ( <i>Ilex guayusa</i> 100 mg/kg) | T4 ( <i>Ilex guayusa</i> 300 mg/kg) | T5 ( <i>Vernonanthura patens</i> 100 mg/kg) | T6 ( <i>Vernonanthura patens</i> 300 mg/kg) | T7 ( <i>Theobroma cacao</i> 100 mg/kg) | T8 ( <i>Theobroma cacao</i> 300 mg/kg) |
|-----------------|----------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|---|--|--|
| Basal           | 0.667±<br>0.15 | 0.800±<br>0.10                    | 0.800±<br>0.17                      | 0.733±<br>0.06                      | 0.733±<br>0.21                              | 0.767±<br>0.15                              | 0.767±<br>0.23                         | 0.833±<br>0.06                         |
| H0              | 1.100±<br>0.00 | 1.133±<br>0.06                    | 1.200±<br>0.00                      | 1.100±<br>0.10                      | 1.033±<br>0.12                              | 1.067±<br>0.06                              | 1.100±<br>0.17                         | 1.167±<br>0.06                         |
| H1              | 1.067±<br>0.06 | 1.033±<br>0.12                    | 1.667±<br>0.07                      | 1.033±<br>0.15                      | 1.017±<br>0.10                              | 1.000±<br>0.10                              | 1.033±<br>0.12                         | 1.067±<br>0.06                         |
| H2              | 0.967±<br>0.06 | 0.967±<br>0.12                    | 1.050±<br>0.10                      | 0.967±<br>0.06                      | 0.983±<br>0.08                              | 0.933±<br>0.10                              | 0.950±<br>0.09                         | 0.967±<br>0.06                         |
| H3              | 0.933±<br>0.06 | 0.910±<br>0.06                    | 0.967±<br>0.06                      | 0.933±<br>0.06                      | 0.967±<br>0.10                              | 0.900±<br>0.10                              | 0.900±<br>0.10                         | 0.900±<br>0.00                         |
| H4              | 0.933±<br>0.06 | 0.898±<br>0.06                    | 0.933±<br>0.00                      | 0.867±<br>0.06                      | 0.905±<br>0.10                              | 0.900±<br>0.10                              | 0.900±<br>0.10                         | 0.867±<br>0.06                         |
| H24             | 0.900±<br>0.00 | 0.833±<br>0.00                    | 0.867±<br>0.00                      | 0.833±<br>0.12                      | 0.900<br>±0.17                              | 0.833±<br>0.10                              | 0.867±<br>0.10                         | 0.833±<br>0.06                         |

Realizado por: Narcisa Palchizaca, 2018

En la tabla 13-3, se muestran los resultados respecto al volumen promedio de inflamación de todas las ratas de experimentación obtenidas en cada experimento. Se determinó el volumen cada hora las primeras cuatro horas y, finalmente, a las veinticuatro horas. El grupo tratado con diclofenaco sódico (150 mg/kg) y los grupos tratados con los extractos, presentaron una disminución considerable respecto al Blanco (agua destilada).

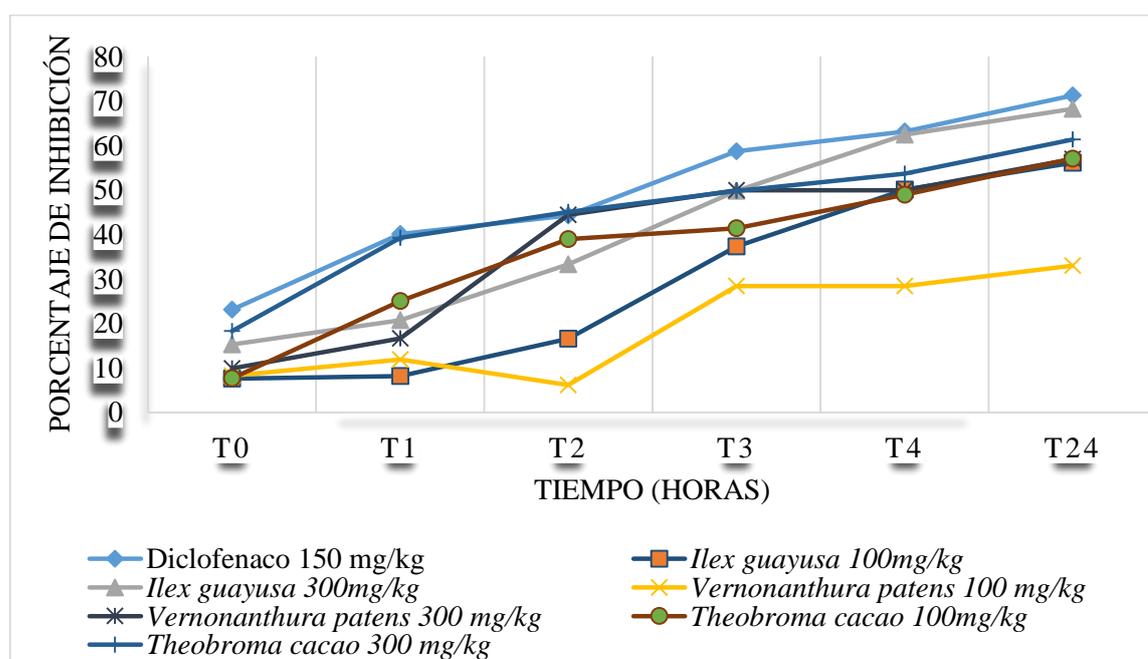
### 3.7.2. Análisis estadístico

A continuación, se muestran los resultados de porcentaje de inhibición de la inflamación correspondientes a los diferentes tratamientos: diclofenaco sódico (150 mg/kg), *Ilex guayusa* (100 mg/kg y 300 mg/kg), *Vernonanthura patens* (100 mg/kg y 300 mg/kg), *Theobroma cacao* (100 mg/kg y 300 mg/kg).

**Tabla 14-3:** Resultados del porcentaje de inhibición de la inflamación

| tiempo | T2 (Diclofenaco 150 mg/kg) | T3 ( <i>Ilex guayusa</i> 100mg/kg) | T4 ( <i>Ilex guayusa</i> 300mg/kg) | T5 ( <i>Vernonanthura patens</i> 100 mg/kg) | T6 ( <i>Vernonanthura patens</i> 300 mg/kg) | T7 ( <i>Theobroma cacao</i> 100mg/kg) | T8 ( <i>Theobroma cacao</i> 300 mg/kg) |
|--------|----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|---|---------------------------------------|--|
| T0     | 23.09                      | 7.62                               | 15.24                              | 8.25  | 9.86  | 7.69                                  | 18.31                                  |
| T1     | 40.1                       | 8.18                               | 20.69                              | 11.92                                       | 16.61                                       | 25.02                                 | 39.28                                  |
| T2     | 44.27                      | 16.58                              | 33.27                              | 6.15  | 44.41                                       | 38.94                                 | 45.05                                  |
| T3     | 58.69                      | 37.29                              | 49.81                              | 28.42                                       | 49.94                                       | 41.42                                 | 49.79                                  |
| T4     | 63.14                      | 50.06                              | 62.45                              | 28.42                                       | 49.94                                       | 48.93                                 | 53.66                                  |
| T24    | 71.24                      | 56.08                              | 68.24                              | 33  | 56.95                                       | 57.08                                 | 61.37                                  |

Fuente: Narcisa Palchizaca



**Figura 1-3:** Porcentaje de inhibición de la inflamación de los diferentes grupos experimentales vs tiempo de los grupos tratados

Realizado por: Narcisa Palchizaca, 2018

En la figura 6.3 se graficaron los resultados de porcentaje de inhibición de la inflamación que se obtuvieron con el medicamento de control y de los extractos en dos concentraciones de cada uno, en diferentes tiempos.

Se pueden observar que sí existe la disminución del porcentaje de inhibición, a medida que va pasando el tiempo, en los diferentes grupos tratados con los extractos. Es destacable observar que el porcentaje de inhibición de las muestras de *Ilex guayusa* (300mg/kg) y de *Theobroma cacao* (300mg/kg) se asemejan al grupo de control positivo (diclofenaco sódico (150mg/kg), en tiempo de 24 horas después de inducción de la patología.

Para los grupos de *Ilex guayusa* (100mg/kg), *Theobroma cacao* (100mg/kg) y *Vernonanthura patens* (300mg/kg) poseen un porcentaje de inhibición muy similar, después de 24 horas, mientras que *Vernonanthura patens* a dosis (100mg/kg), presenta el más bajo porcentaje de inhibición, se puede evidenciar que es menos efectivo.

Según la referencia *Ilex guayusa* es rica en compuestos como polifenoles y flavonoides que son los responsables de inhibir la biosíntesis de prostaglandinas en los procesos inflamatorios (García, 2017, pp. 10-15), además cuenta con la presencia de alcaloides como cafeína que intervienen en las enfermedades respiratorias mediante inhibición de las prostaglandinas.

En cuanto a *Theobroma cacao*, el principal componente antiinflamatorio está constituido por flavonoides tipo epicatequina, catequinas y polifenoles (Oyeleke et. al., 2018, pp. 10-24) los cuales están relacionados con la inhibición de la síntesis y las actividades de diferentes mediadores proinflamatorios como los eicosanoides, citoquinas, moléculas de adhesión y proteína C reactiva (Giacomtti, 2016, pp. 182-183).

En lo que se refiere a *Vernonanthura patens* por contener compuestos con propiedades antiinflamatorias como fenoles y flavonoides, actúan por el mismo mecanismo de acción antes mencionado.

Se aplicó el test de modelo lineal general univariado para comprobar si existen diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual se muestra a continuación.

**Tabla 15-3:** Test modelo lineal general para los diferentes tratamientos

| Pruebas de efectos inter-sujetos               |                               |    |                  |          |      |
|--|-------------------------------|----|------------------|----------|------|
| Variable dependiente: porcentaje de inhibición |                               |    |                  |          |      |
| Origen   | Tipo III de suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F        | Sig. |
| Modelo corregido                               | 14104.186 <sup>a</sup>        | 11 | 1282.199         | 32.034   | .000 |
| Intersección tratamiento                       | 57679.443                     | 1  | 57679.443        | 1441.024 | .000 |
| tiempo   | 3729.460                      | 6  | 621.577          | 15.529   | .000 |
| Error  | 10374.726                     | 5  | 2074.945         | 51.839   | .000 |
| Total  | 1200.801                      | 30 | 40.027           |          |      |
| Total corregido                                | 72984.429                     | 42 |                  |          |      |
|  | 15304.987                     | 41 |                  |          |      |

a. R al cuadrado = .922 (R al cuadrado ajustada = .893)

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

Según los resultados obtenidos en el análisis univariado, se procede a rechazar la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) siendo el valor de p (0.000) inferior al nivel de significancia y aceptar la hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>) (0.05), por lo tanto se dice que existe diferencia significativa entre los tratamientos, es decir al menos uno de los tratamientos administrados es diferente, por lo que se procedió a realizar el test de Duncan al 95% para establecer entre cuales de estos tratamientos demuestra diferencia significativa.

**Tabla 16-3:** Test de Duncan del efecto antiinflamatorio de los grupos tratados en diferentes tiempos.

| Porcentaje de inhibición              |   |             |         |         |         |
|---------------------------------------|---|-------------|---------|---------|---------|
| Duncan <sup>a,b</sup>                 |   |             |         |         |         |
| diferente tratamientos                | N | Subconjunto |         |         |         |
|                                       |   | 1           | 2       | 3       | 4       |
| <i>Vernonanthura patens</i> 100 mg/kg | 6 | 19.3600     |         |         |         |
| <i>Ilex guayusa</i> 100mg/kg          | 6 |             | 29.3017 |         |         |
| <i>Theobroma cacao</i> 100 mg/kg      | 6 |             | 36.5133 | 36.5133 |         |
| <i>Vernonanthura patens</i> 300 mg/kg | 6 |             |         | 37.9517 |         |
| <i>Ilex guayusa</i> 300 mg/kg         | 6 |             |         | 41.6167 |         |
| <i>Theobroma cacao</i> 300 mg/kg      | 6 |             |         | 44.5767 | 44.5767 |
| Diclofenaco sódico 150 mg/kg          | 6 |             |         |         | 50.0883 |
| Sig.                                  |   | 1.000       | .058    | .051    | .142    |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
 Se basa en las medias observadas.  
 El término de error es la media cuadrática (Error) = 40.027.  
 a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.  
 b. Alfa = 0.05.

**Realizado por:** Narcisa Palchizaca, 2018

La tabla 16.3 nos muestra cuatro subconjuntos homogéneos, el primero está formado por el tratamiento *Vernonanthura patens* (100 mg/kg). El segundo está formado por los tratamientos *Ilex guayusa* y *Theobroma cacao* (100 mg/kg) esto nos indica que no hay diferencia significativa entre ellos, por otro lado el tratamiento *Theobroma cacao* (100 mg/kg) también es similar a los tratamientos del subconjunto tres, formado por *Theobroma cacao* (100 mg/kg), *Vernonanthura patens*, *Ilex guayusa* y *Theobroma cacao* (300 mg/kg) indicando, como en el caso anterior que no hay diferencia significativa entre ellos. El cuarto subconjunto está formado por los tratamientos *Theobroma cacao* (300 mg/kg) y diclofenaco sódico (150 mg/kg), lo cual indica que este extracto es significativamente similar al fármaco utilizado como control positivo.

Esto se deduce que el *Theobroma cacao* (300 mg/kg) es el extracto más activo de las especies estudiadas con efecto similar al control positivo (diclofenaco sódico).

## CONCLUSIONES

Las drogas vegetales y los extractos secos obtenidos se hallan en condiciones de calidad adecuadas ya que los resultados de humedad y cenizas cumplen con las especificaciones requeridas por la farmacopea española (2002) y Normas Ecuatorianas de Fitoterápicos, garantizando así seguridad y eficacia.

Los metabolitos secundarios característicos en las hojas de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao* fueron compuestos fenólicos, flavonoides y azúcares reductores; además, en los extractos de *Ilex guayusa* y de *Theobroma cacao* se determinó la presencia de alcaloides. En los extractos de *Ilex guayusa* y de *Vernonanthura patens* también se evidenció la presencia de triterpenos.

Los fenoles totales fueron cuantificados mediante espectrofotometría, se obtuvo 174.86 mg GAE/g en *Ilex guayusa*, 98.43 mg GAE/g en *Vernonanthura patens* y 110.57 mg GAE/g en *Theobroma cacao*. Las cantidades de flavonoides totales fueron 87.81 mg EQ/g en *Ilex guayusa*, 101.5 mg EQ/g en *Vernonanthura patens* y 87.93 mg EQ/g en *Theobroma cacao*.

Los alcaloides fueron cuantificados mediante el método de reacción con verde de bromocresol, obteniendo 0.70 mg EA/g en *I. guayusa* y 0.59 mg EA/g en *T. cacao*.

Se evaluó el efecto antiinflamatorio de las hojas de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y *Theobroma cacao* expresados como porcentaje de inhibición inflamatoria, en el cual los extractos de *Ilex guayusa* y *Theobroma cacao* (300 mg/kg) presentaron mayor efecto antiinflamatorio en tiempo de 24 horas después de la inducción de la patología, y *Vernonanthura patens* (100 mg/kg) presentó menor porcentaje de inhibición.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda para futuros estudios aislar los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria; así como su mecanismo de acción.

Efectuar estudios toxicológicos de las tres especies para verificar si existe daño tisular.

Se sugiere utilizar otra vía de administración (tópica) de los extractos, de tal forma que se pueda evaluar el efecto antiinflamatorio de manera distinta.

Se recomienda continuar con la investigación sobre otras actividades biológicas de las tres especies.

## BIBLIOGRAFÍA

**Agudelo, Genero; et al.** Desempeño fisiológico de nueve genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo la sombra de tres especies forestales en Santander. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol. 12 (nº 1), 2018, (Colombia) pp. 224. ISSN 2422-3719. DOI 10.17584/rcch.2018v12i1.7341

**Congreso Nacional**, Resolución 423 de 22 de diciembre de 2006. *Ley Orgánica de la Salud* [en línea], 2006 [Ecuador]; Disponible en: <https://www.google.com/search?q=La+Ley+Org%C3%A1nica+de+la+Salud+dice%3A+Art.+7&ie=utf-8&oe=utf-8>

**De La Cruz, Iván; González, Alma & Riley Christian.** Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*, vol. 17 (nº 2), 2012, (México). pp. 190-192. ISSN 2027-1352, 0122-7483. DOI 10.11144/javeriana.SC17-2.bab.

**Dehesa, Marco.** “Control de Calidad de Fitofármacos”. Scielo, (2012), (Quito) pp. 139-151

**Duce, Antonio.** *Patología quirúrgica*. Elsevier España. Madrid España. 2004. pp. 50-58.

**Enciso, Edwin & Arroyo, Jorge.** Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matco de puna) en un modelo experimental en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, vol. 72 (nº4), 2013. (Perú) pp. 232. ISSN 1609-9419, 1025-5583. DOI 10.15381/anales.v72i4.1074

**Enríquez, Gustavo.** *Curso sobre el cultivo del cacao*. 22ª edición. Turrialba-Costa Rica. 1986. pp.19-22

**Escobar, Tamames & Martínez Ramos.** *Cirugía: fisiopatología general, aspectos básicos, manejo del paciente quirúrgico*. Ed. Médica Panamericana. Madrid-España. 1997. pp. 10-19.

**Funakoshi Tago; et al.** Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. *International Immunopharmacology*, vol. 25 (nº1), 2015. (Japón). pp. 135-136. ISSN 15675769. DOI 10.1016/j.intimp.2015.01.012

**Gálvez, Janet; et al.** Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). *Revista scielo*.vol.18. (nº2), 2013. (Cuba). pp. 202-203

**Garcia, Estefanny; et. al.** Flavonoids Effects on Hepatocellular Carcinoma in Murine Models: A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 18, (nº 23) 2018. (Brasil). pp. 2-3. ISSN 1741-427X, 1741-4288. DOI:10.1155/2018/6328970.

**García Ruiz; et. al.** Guayusa (*Ilex guayusa* L.). Phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity: Phytochemical composition of guayusa new tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 97 (n° 12), 2017. (España). pp. 27-29. ISSN 00225142. DOI:10.1002/jsfa.8255

**Gómez, Estrada; González, Ruiz & Domingo, Medina.** Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* [en línea], vol. 10 (n° 3), 2011. (Chile). pp. 205-206. ISSN 0717-7917. Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=85618379003>

**González, Gallego; et. al.** Propiedades antiinflamatorias de los flavonoides de la dieta. *Nutrición Hospitalaria* [en línea], vol. 22 (n°3). 2007. (España). pp. 288-292. ISSN 0212-1611. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v22n3/revision1.pdf>

**Gutiérrez María de Piar; et. al.** Control de Calidad del *Xanthium spinosum*, planta medicinal expendida en la ciudad de La Paz, Bolivia. *Revista bolivianas BIOFARBO*. [en línea], vol. 19 (1). 2011. (Bolivia) pp. 18.21. ISSN 1813-5363

**Chóez, Iván; et. al.** Antioxidant activity optimization and GC-MS profile of aqueous extracts of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Leaves. *Natural Product Research*, vol.17 (n° 7). 2018. (Ecuador). pp. 2-4. ISSN 1478-6419, 1478-6427. DOI:10.1080/14786419.2018.1539978

**Hennebelle, T; et. al.** Ethnopharmacology of *Lippia Alba*. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea] vol. 116. (n°2) 2008, (Alemania) pp. 211–222. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.044>

**Jaramillo, Jaramillo; et. al.** Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, vol. 64 (n° 3). 2016. (Venezuela). pp. 1173. ISSN 2215-2075, 0034-7744. DOI 10.15517/rbt.v64i3.19537

**Ken, Fern & Quinatoa, Rogelio.** Imágenes de *Vernonanthura patens*. *Plantas tropicales útiles* [en línea]. 2014. Disponible en: <http://tropical.theferns.info/plantimages/9/2/9297eb5b6471a77a5abab28b3396ca82e3a48a4e.jpg>

**Khan, H.; et al.** Evidence and prospective of plant-derived flavonoids as antiplatelet agents: Strong candidates to be drugs of future. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 119. 2018. (Australia). pp. 8-10. ISSN 02786915. DOI:10.1016/j.fct.2018.02.014

**Kumar, Vinay; et.al.** *Robbins. Patología humana. StudentConsult.* 9ª edición. Barcelona-España. 2013. pp. 30-40.

**León, Milagros; et al.** Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. *Revista Finlay*, [en línea] vol. 5 (n° 1), 2015. (Cuba). pp. 47-49. ISSN 2221-2434. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2221-24342015000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2221-24342015000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

**Lin, Daniel. et. al.** Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. *Molecules*, vol. 21 (n°10), 2016. (China). pp. 1-19. DOI 10.3390/molecules21101374

**Manzano, Patricia; et. al.** Advances in Studies of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Growing in Ecuador. *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, 2015. (Ecuador). pp. 85-89. DOI: 10.5772/59866

**Manzano, Patricia; et. al.** Effect of drying methods on physical and chemical properties of *Ilex guayusa* leaves. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, vol. 71 (n° 3), 2018. (Ecuador) pp. 8620-8621. ISSN 2248-7026, 0304-2847. DOI:10.15446/rfnam.v71n3.71667

**Manzano, Patricia. et. al.** Phytochemical Studies of Fractions and Compounds Present in *Vernonanthura Patens* with Antifungal Bioactivity and Potential as Antineoplastic. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, 2012. (Chile, Ecuador), pp. 504-509. DOI: 10.5772/28961

**Marín, Antón.** Inmunología. *Biología & Geología* [en línea]. 2015. Disponible en: <http://geologiaybiologiaos.blogspot.com/2015/05/inmunologia-concepto-de-infeccion-los.html>

**Martínez Aguilar; et. al.** Composición química y tamizaje fitoquímico del polvo de hojas y retoños del *Anacardium occidentale* L. (marañón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol.17 (n°1), 2012. (Cuba). pp. 3-4. ISSN 1028-4796

**Martínez, Carmen & Cano, Ana.** Plantas medicinales con alcaloides en la provincia de Jaén. *Instituto de Estudios Gennenses*, vol. 12 (n° 200), 2009. (Perú) pp. 125-163. ISSN 0561-3490.

**Osorio Mónica: et. al.** Crecimiento de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en diferentes tamaños de contenedor. *Revista de Ciencias Agrícolas*, vol. 34 (n° 2) 2017. (Colombia). pp. 75-77. ISSN 2256-2273, 0120-0135. DOI:10.22267/rcia.173402.73

**Oyeleke, SA; et al.** Anti-inflammatory activity of Theobroma cacao L. stem bark ethanol extract and its fractions in experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. **222**, 2018. (Nigeria). pp. 7-28 ISSN 03788741. DOI:10.1016/j.jep.2018.04.050

**Paredes, Daniel; et. al.** Usos de plantas medicinales en la comunidad San Jacinto del Cantón Ventanas, Los Ríos Ecuador. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* [en línea] vol. 18 (n° 1) 2015. (Ecuador). pp. 39-40 ISSN 2619-2551. Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/452>

**Perea, Martínez; et. al.** Antiinflamatorios no esteroideos y sus aplicaciones terapéuticas. *Bol Clin Hosp Infant Edo So* [en línea], vol. 33 (n°2) 2016. (México). pp. 75-77. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bolclinhosinfson/bis-2016/bis162e.pdf>

**Pérez, Porcel.** *Enfermedades sistémicas autoinmunes del adulto: conectivopatías y vasculitis*. Edición de Universitat de Lleida. 2006. Vilanova. pp. 32-36.

**Pontaza, Nisthal & Escobar, Méndez.** Uso del Theobroma cacao sp. (CACAO). Recolectado en el área de alta Verapaz para la fabricación de cuatro cosméticos. *Revista académica*, vol. 93. 2013. (Guatemala). pp. 40-51. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3451.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3451.pdf) pdf

**Radice, Matteo, Cossio, Neyfe & Scalvenzi Laura.** *Ilex guayusa: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. International Conference on Multidisciplinary Sciences, 2nd edition*, vol. 2. 2016. (Ecuador), pp. 1-8. DOI: 10.3390/mol2net-02-03868

**Real Farmacopea Española.** Método de farmacognosia. Madrid-España, S/N, 2003. p. 95.

**Santos, RX; et. al.** Antimicrobial activity of fermented Theobroma cacao pod husk extract. *Genetics and Molecular Research*, vol. **13** (n°3), 2014. (Brasil). pp. 7726-7727. ISSN 16765680. DOI:10.4238/2014.September.26.10

**Serrano, Bello; & Valencia, Mayoral.** *Patología: Inflamación y reparación tisular*. 1ª edición. Malaga-España .2014 pp. 48-60.

**Spain, Vidal Vademécum.** *Diclofenaco sódico*. [En línea]. 2016. (México). pp. 12-18 Disponible en: <https://www.vademecum.es//principios-activos-diclofenaco-m01ab05>

**Tiempo, El.** Guayusa es la bebida de Morona. *EL TIEMPO* [en línea]. 2018. (Ecuador) pp. 2. Disponible en: <http://tinyurl.com/ycf96obu>

**Toledo Carla.** INFLAMACION: MEDIADORES QUIMICOS. *Revista de Actualización Clínica Investiga* [En línea], vol. 43, 2014. (Bolivia). pp. 2266-2268. ISSN 2304-3768. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v43/v43\\_a05.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v43/v43_a05.pdf)

**Torre, Gonzalo;** El aprovechamiento de la guayusa (*Ilex guayusa*). *Fundación chankuap*. [En línea]. 2013. (Ecuador). pp. 2-3. Disponible en: <http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/Manual-de-buenas-practicas-de-la-Guayusa.pdf>

**Villacís, Chiriboga.** Etnobotánica y Sistemas Tradicionales de Salud en Ecuador. Enfoque en la Guayusa (*Ilex Guayusa* Loes). *ETNOBIOLOGÍA* [en línea], vol. 15 (n° 3), 2017. (Ecuador) pp. 82-83. ISSN 1665-2703. Disponible en: <http://asociacionetnobiologica.org.mx/revista/index.php/etno/article/view/217>

**Villalba, Herrera.** INFLAMACION I. *Revista de Actualización Clínica Investiga* [en línea], vol. 43. 2014. (Londres) pp. 2261-2264. ISSN 2304-3768. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=&lng=es&nrm=iso&tlng=](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=&lng=es&nrm=iso&tlng=)

**WAIZEL, HS.; et al.** Cacao y chocolate: seducción y terapéutica. *Anales Médicos*, [en línea], vol. 57 (n° 3). 2012. (México) pp. 234-238. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/abc/bc-2012/bc123k.pdf>

**Winter, Charles; et. al.** Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Experimental Biology and Medicine*, vol. 111 (n°3), 1962. (Harvard) pp. 545-546. ISSN 1535-3702, 1535-3699. DOI: 10.3181/00379727-111-27849

**Yamangomez, Fredi.** Establecimiento De Tres Clones De Cacao (*Theobroma Cacao* L.) Con Sangre Amazónico, Bajo Sistemas Agroforestales En La Provincia De Sucumbíos- Cantón Lago Agrio. 2005. (Ecuador) pp. 18-20

## ANEXOS

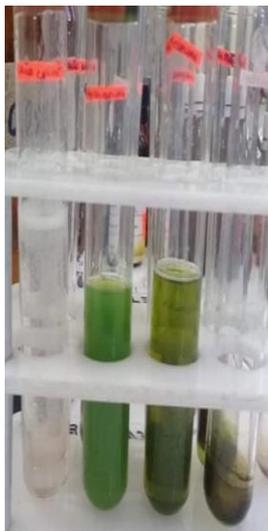
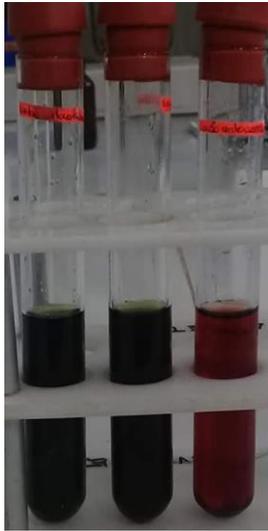
### ANEXO A. droga vegetal de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*



### ANEXO B. Control de calidad de la droga vegetal



ANEXO C. tamizaje fitoquímico de los extractos



**ANEXO D.** concentracion de los extractos de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*.



**ANEXO E.** cuantificacion de los fenoles totales y flavonoides en espectrofotometria de los extractos de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*.



**ANEXO F.** preparacion de reactivo de Folin- Ciocalteu



**ANEXO G.** cuantificacion de los alcaloides de los extractos de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*.



**ANEXO H.** dosis de administración a las ratas dependiendo su peso.

| Tratamientos                          | Parámetros y repeticiones |                              |                 |                              |                 |                              |
|---------------------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|
|                                       | Peso de la rata           | Volumen del principio activo | Peso de la rata | Volumen del principio activo | Peso de la rata | Volumen del principio activo |
| <i>Ilex guayusa</i> 100 mg/kg         | 220.1 g                   | 1ml                          | 210.9 g         | 1 ml                         | 203.7 g         | 1 ml                         |
| <i>Ilex guayusa</i> 300 mg/kg         | 206.6 g                   | 1ml                          | 167.3 g         | 0.8 ml                       | 201.9 g         | 1 ml                         |
| <i>Vernonanthura patens</i> 100 mg/kg | 193.3 g                   | 1ml                          | 198.2 g         | 1 ml                         | 166.5 g         | 0.8 ml                       |
| <i>Vernonanthura patens</i> 300 mg/kg | 204.5 g                   | 1ml                          | 183.1 g         | 0.9 ml                       | 160 g           | 0.8 ml                       |
| <i>Theobroma cacao</i> 100 mg/kg      | 202.5 g                   | 1ml                          | 164 g           | 0.8 ml                       | 176.5 g         | 0.9 ml                       |
| <i>Theobroma cacao</i> 300 mg/kg      | 207.1                     | 1ml                          | 163.7 g         | 0.8 ml                       | 163.6 g         | 0.8 ml                       |
| Diclofenaco sódico 150 mg/kg          | 210.1 g                   | 1ml                          | 169.4 g         | 0.8 ml                       | 195.3 g         | 1 ml                         |

**ANEXO I.** Cuidado y mantenimiento de las ratas de experimentación



**ANEXO J.** Rata (*Rattus norvegicus*) de experimentación



**ANEXO K.** Administración vía oral de los extractos



**ANEXO L.** inducción de solución de carragenina (0.1ml) al 1% en suero fisiológico.



**ANEXO M.** Volúmenes calculados de las patas de las ratas de los extractos de *Theobroma cacao*, *Vernonanthura patens* y *Ilex guayusa*, control positivo Diclofenaco sódico y de vehículo.

| <i>Ilex guayusa</i> 100mg/kg          |      |      |     | <i>Ilex guayusa</i> 300mg/kg         |     |     |     |
|---------------------------------------|------|------|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|
| tiempo                                | R1   | R2   | R3  | tiempo                               | R1  | R2  | R3  |
| BASAL                                 | 0.8  | 0.7  | 0.7 | BASAL                                | 0.6 | 0.7 | 0.8 |
| T0                                    | 1    | 1.1  | 1.1 | T0                                   | 1.1 | 1.1 | 1   |
| T1                                    | 1    | 1.05 | 1   | T1                                   | 0.9 | 1   | 1   |
| T2                                    | 0.9  | 0.9  | 0.9 | T2                                   | 0.9 | 0.8 | 0.9 |
| T3                                    | 0.9  | 0.8  | 0.9 | T3                                   | 0.8 | 0.8 | 0.9 |
| T4                                    | 0.8  | 0.8  | 0.9 | T4                                   | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| T24                                   | 0.8  | 0.8  | 0.9 | T24                                  | 0.7 | 0.8 | 0.8 |
| <i>Vernonanthura patens</i> 100 mg/kg |      |      |     | <i>Vernonanthura patens</i> 300mg/kg |     |     |     |
| tiempo                                | R1   | R2   | R3  | tiempo                               | R1  | R2  | R3  |
| BASAL                                 | 0.7  | 0.6  | 0.7 | BASAL                                | 0.8 | 0.6 | 0.7 |
| T0                                    | 1    | 1    | 1.1 | T0                                   | 1.1 | 1   | 1   |
| T1                                    | 1    | 0.9  | 1   | T1                                   | 1   | 1   | 0.9 |
| T2                                    | 0.9  | 0.8  | 0.9 | T2                                   | 0.9 | 0.8 | 0.9 |
| T3                                    | 0.9  | 0.8  | 0.8 | T3                                   | 0.9 | 0.8 | 0.9 |
| T4                                    | 0.8  | 0.8  | 0.8 | T4                                   | 1   | 0.7 | 0.8 |
| T24                                   | 0.7  | 0.7  | 0.8 | T24                                  | 0.9 | 0.6 | 0.7 |
| <i>Theobroma cacao</i> 100mg/kg       |      |      |     | <i>Theobroma cacao</i> 300mg/kg      |     |     |     |
| tiempo                                | R1   | R2   | R3  | tiempo                               | R1  | R2  | R3  |
| BASAL                                 | 0.9  | 0.7  | 0.8 | BASAL                                | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| T0                                    | 1.2  | 1.1  | 1.2 | T0                                   | 1   | 1.1 | 1   |
| T1                                    | 1.2  | 1.1  | 1.1 | T1                                   | 1   | 1   | 0.9 |
| T2                                    | 1.05 | 1    | 1   | T2                                   | 0.9 | 1   | 0.9 |
| T3                                    | 1    | 0.9  | 1   | T3                                   | 0.9 | 0.9 | 0.9 |
| T4                                    | 1    | 0.9  | 0.9 | T4                                   | 0.9 | 0.8 | 0.9 |
| T24                                   | 0.9  | 0.9  | 0.9 | T24                                  | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| Diclofenaco sódico 100mg/kg           |      |      |     | Vehículo (agua destilada) 1ml/kg     |     |     |     |
| tiempo                                | R1   | R2   | R3  | tiempo                               | R1  | R2  | R3  |
| BASAL                                 | 0.8  | 0.7  | 0.8 | BASAL                                | 0.7 | 0.7 | 0.7 |
| T0                                    | 1.2  | 1.1  | 1.1 | T0                                   | 1.1 | 1.1 | 1.1 |
| T1                                    | 1    | 0.9  | 1   | T1                                   | 1.1 | 1   | 1.1 |
| T2                                    | 0.9  | 0.9  | 0.9 | T2                                   | 0.9 | 1   | 1   |
| T3                                    | 0.8  | 0.9  | 0.9 | T3                                   | 0.9 | 0.9 | 1   |
| T4                                    | 0.8  | 0.8  | 0.9 | T4                                   | 1   | 0.9 | 0.9 |
| T24                                   | 0.8  | 0.8  | 0.8 | T24                                  | 0.9 | 0.9 | 0.9 |

ANEXO N. Guía de movilización de especímenes de flora y fauna silvestre Nro. DPAP-UPN-VC-2019-007

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 | Nº Envases                            |
|----|-------------------|-----------------------------|----------|---------------------------------------|
| 1  | A1. LLex          | <i>Llex guayusa</i>         | 300g     | Fundas plásticas con cierre hermético |
| 2  | A2. Vernonanthura | <i>Vernonanthura 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:

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

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