



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA PLANTA *Roupala montana* Aubl. MEDIANTE INHIBICIÓN DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATONES (*Mus musculus*)”

TRABAJO DE TITULACIÓN:

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: BRYAN OMAR ZURITA SANCHEZ

DIRECTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA., M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2019

© 2019, Bryan Omar Zurita Sánchez

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.

Yo, Bryan Omar Zurita Sánchez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos del documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 13 de diciembre del 2019



Bryan Omar Zurita Sánchez




160048333-1

ESCUELA SUPERIRO POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Experimental, “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA PLANTA *Roupala montana* Aubl. MEDIANTE INHIBICIÓN DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATONES (*Mus musculus*)**”, realizado por el señor: **BRYAN OMAR ZURITA SÁNCHEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	Firma	Fecha
Dra. Adriana Carolina Rincón Alarcón PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2019-12-11
BQF. Diego Renato Vinueza Tapia., M.Sc. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACION		2019-12-11
Lcda. Karen Lisseth Acosta León., M.Sc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2019-12-11

DEDICATORIA

Este trabajo va en nombre de mi madre Rosa Elvia Sánchez y de mi padre Hugo Oswaldo Zurita, que son los pilares fundamentales en los que se cimentó el alcance de esta meta académica, gracias a su apoyo y amor incondicional que forjaron el camino para llegar a convertirme en Bioquímico Farmacéutico.

Bryan

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios que puso en mi camino obstáculos que me permitieron crecer como persona y como profesional, además de mantenerme con vida y salud para cumplir mi meta.

A mis padres que a pesar de las adversidades que se encontraron en el camino vieron la manera para seguirme apoyando para poder terminar mi carrera universitaria.

A mi hermano Marlon Zurita que es un modelo a seguir, tanto en lo profesional como en lo ético y moral, que con su apoyo en la universidad nunca me dejó solo.

A Patricia Rojas la mujer que se convirtió en mi compañera de vida, que con su amor, apoyo y comprensión fue, es y será un pilar fundamental en mi vida, ya que, de ella aprendí qué es el amor. Sobre todo, gracias por darme a nuestra pequeña hija Fernanda Pauleth que vino a alegrar nuestras vidas, una razón importante para siempre seguir adelante.

A Benjamín Andrés Román Santos, persona, compañero y sobre todo amigo que desde el inicio de la carrera estuvo ahí inculcándome valores como la responsabilidad, puntualidad, sinceridad, respeto, humildad, lealtad y la solidaridad. Gracias amigo.

A Diego Vinueza, un excelente docente y sobre todo investigador, que me ha inculcado la pasión a la investigación, gracias por los conocimientos compartidos.

Bryan

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	3

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 Actividad antiinflamatoria.....	4
1.1.1 <i>Inflamación</i>	4
1.1.2 <i>Respuesta inflamatoria</i>	4
1.1.3 <i>Fisiopatología de la inflamación</i>	5
1.1.4 <i>Manifestaciones clínicas</i>	6
1.1.5 <i>Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica</i>	6
1.1.6 <i>Mediadores de la Inflamación</i>.....	7
1.1.7 <i>Clasificación de la inflamación</i>.....	10
1.1.7.1 <i>Inflamación aguda</i>	10
1.1.7.2 <i>Inflamación crónica</i>	11
1.2 Antiinflamatorios.....	13
1.2.1 <i>Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES)</i>	13
1.2.1.1 <i>Mecanismo de acción</i>	13
1.2.1.2 <i>Clasificación de AINES</i>	14
1.2.2 <i>Diclofenaco Sódico</i>	14
1.2.2.1 <i>Mecanismo de acción</i>	15
1.2.2.2 <i>Propiedad farmacocinética</i>	15
1.2.2.3 <i>Posología</i>	16

1.3	Familia <i>Proteaceae</i>	16
1.3.1	<i>Roupala montana</i> Aubl.	17
1.3.1.1	<i>Taxonomía</i>	17
1.3.1.2	<i>Descripción</i>	17
1.3.1.3	<i>Hábitat</i>	18
1.3.1.4	<i>Usos</i>	18
1.3.1.5	<i>Estudios</i>	18

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	20
2.1	Lugar de investigación	20
2.2	Población de estudio	20
2.3	Tamaño de la muestra	20
2.4	Selección de la muestra	20
2.5	Recolección del material vegetal	20
2.6	Reactivo biológico	21
2.6.1	<i>Descripción de animales de experimentación</i>	21
2.6.2	<i>Condiciones ambientales</i>	21
2.7	Equipos, Materiales y Reactivos	21
2.7.1	<i>Equipos</i>	21
2.7.2	<i>Materiales</i>	22
2.7.2	<i>Reactivos</i>	23
2.8	Métodos y Técnicas	24
2.8.1	<i>Secado y Molienda del material vegetal</i>	24
2.8.2	<i>Control de calidad de la materia prima</i>	25
2.8.2.1	<i>Determinación del contenido de Humedad</i>	25
2.8.2.2	<i>Determinación de Cenizas Totales</i>	26
2.8.2.3	<i>Determinación de Cenizas Solubles en agua</i>	26
2.8.2.4	<i>Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico</i>	27
2.8.3	<i>Obtención del extracto hidro-alcohólico</i>	28
2.8.4	<i>Control de calidad del extracto hidroalcohólico</i>	28
2.8.5	<i>Tamizaje fitoquímico</i>	28
2.8.6	<i>Cromatografía en capa fina para flavonoides</i>	30
2.8.7	<i>Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu</i>	31
2.8.9	<i>Ensayos de capacidad antioxidante</i>	32

2.8.9.1	<i>Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH</i>	32
2.8.10	Evaluación de la actividad antiinflamatoria	32
2.8.10.1	<i>Diseño experimental</i>	33
2.8.10.2	<i>Modelo experimental</i>	34
2.8.11	Análisis estadístico	34

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIONES	36
3.1	Control de calidad de la materia vegetal	36
3.2	Tamizaje Fitoquímico	37
3.3	Estandarización del extracto de <i>R. montana</i> Aubl.	38
3.4	Cromatografía en capa fina (TLC)	39
3.5	Determinación de fenoles totales	40
3.6	Determinación de flavonoides totales	41
3.7	Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH	43
3.8	Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	45
3.8.1	<i>Análisis estadístico</i>	46
3.9	Discusión	48
	CONCLUSIONES	49
	RECOMENDACIONES	50
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda.....	11
Tabla 2-1: Clasificación de los AINE según su estructura química	14
Tabla 1-2: Tratamientos a realizar con número de repeticiones.....	34
Tabla 1-3: Resultados de los parámetros de calidad de hojas de <i>R. montana</i> Audl.....	36
Tabla 2-3: Tamizaje fitoquímico de hojas de <i>R. montana</i> Audl.....	37
Tabla 3-3: Estandarización del extracto hidroalcohólico de <i>R. montana</i> Audl.....	38
Tabla 4-3: Compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>R. montana</i> Audl.....	39
Tabla 5-3: Resultados de la absorbancia del estándar ácido gálico.....	40
Tabla 6-3: Resultados del contenido de fenoles totales del extracto seco de <i>R. montana</i> Audl..	41
Tabla 7-3: Resultados de la absorbancia del estándar quercetina.....	42
Tabla 8-3: Resultados del contenido de flavonoides del extracto seco de <i>R. montana</i> Audl.....	43
Tabla 9-3: Capacidad captadora de radical libre DPPH de ácido ascórbico.....	43
Tabla 10-3: Capacidad captadora de radical libre DPPH del extracto de <i>R. montana</i> Audl.....	44
Tabla 11-3: Porcentaje de inflación de los tratamientos utilizados en los diferentes tiempos de medición.....	45
Tabla 12-3: Análisis estadístico Test de ANOVA para los tratamientos en el tiempo de medición 6 (t6).....	47
Tabla 13-3: Análisis estadístico Test de Tukey de la medición 6.....	47
Tabla 14-3: Análisis de las medias que son significativamente diferentes.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Fases evolutivas de los procesos inflamatorios.....	7
Figura 2-1. Estructura química del diclofenaco sódico.....	15
Figura 3-1. <i>Roupala montana</i> Audl.....	17
Figura 1-2. Procedimiento para la realización del tamizaje fotoquímico del material vegetal...	29
Figura 2-2. Ensayos a realizar en el extracto Etéreo.....	29
Figura 3-2. Ensayos a realizar en el extracto Alcohólico.....	30
Figura 4-2. Ensayos a realizar en el extracto Alcohólico.....	30
Figura 1-3. Cromatografía capa fina del extracto hidroalcohólico de <i>R. montana</i> Audl.....	39

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Curva de calibración de las absorbancias del estándar de ácido gálico.....	41
Gráfico 2-3: Curva de calibración de las absorbancias del estándar de quercetina.....	42
Gráfico 3-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC50 de ácido ascórbico.....	44
Gráfico 4-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC50 del extracto de <i>R. montana</i> Audl.....	44
Gráfico 5-3: Porcentaje de captación de radicales DPPH según la concentración del extracto..	45
Gráfico 6-3: Porcentaje de inflación de los tratamientos utilizados en los diferentes tiempos de medición.....	46

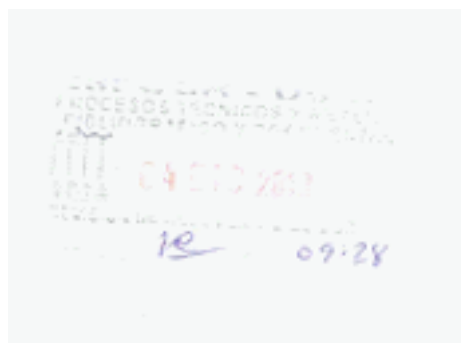
ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Molienda de las hojas secas de *Roupala montana* Audl.
- ANEXO B:** Control de calidad de las hojas de *Roupala montana* Audl.
- ANEXO C:** Tamizaje Fitoquímico.
- ANEXO D:** Cromatografía capa fina para flavonoides.
- ANEXO E:** Concentración del extracto seco de *Roupala montana* Audl.
- ANEXO F:** Cuantificación de fenoles totales.
- ANEXO G:** Cuantificación de flavonoides totales.
- ANEXO H:** Método DPPH.
- ANEXO I:** Estudio *in vivo* del extracto seco de *Roupala montana* Audl.
- ANEXO J:** Tablas de dosificación en ratones
- ANEXO K:** Tablas de la actividad antiinflamatoria.
- ANEXO L:** Permiso de movilización de la materia vegetal.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad antiinflamatoria in vivo del extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *Roupala montana* Aubl., mediante el registro de la inhibición del edema plantar inducido por carragenina sobre ratones albinos de laboratorio de la cepa BALB/c *Mus musculus*. Para la obtención del extracto se dejó macerar el material vegetal (hojas) en etanol 70% por 48 horas, seguido de lo cual se concentró en rotavapor para obtener el extracto seco de *R. montana* Audl., que posteriormente se vehiculizó en carboximetilcelulosa 0,5% a tres niveles de concentración 25, 100 y 300 mg/kg. El análisis in vivo se realizó inyectando carragenina al 0,5% en la pata derecha de los individuos experimentales para inducir la inflamación, el análisis del grado de inflamación se realizó con el programa ImageJ, calculando el área de la pata inflamada, para posteriormente hacer el estudio estadístico de los datos en el programa MiniTab19, aplicando un ANOVA y el post-test Tukey para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Los ensayos in vitro que se realizaron, determinaron en el tamizaje fitoquímico la presencia de flavonoides, taninos de tipo pirocatecólicos y pirogalotánicos, triterpenos, quinonas que fue corroborado con la cromatografía de capa fina la presencia de posibles 5 tipos de flavonoides entre ellos moléculas de agrupamiento tipo rutina e hiperósido. La cuantificación de flavonoides y fenoles mostraron que la planta posee gran cantidad de estos metabolitos secundarios, así como, una gran actividad antioxidante. Dando como resultado que las tres dosis utilizadas tienen la capacidad de desinflamar casi en su totalidad en un tiempo de 6 horas el edema plantar inducido, siendo la dosis de 300 mg/kg la más efectiva con un porcentaje de inflamación del 0,7%. Se puede concluir que la planta posee una actividad antiinflamatoria de eficacia significativa, por lo que, se recomienda realizar estudios posteriores para evaluar la toxicidad y otras actividades farmacológicas, para el desarrollo a futuro de un medicamento.

Palabras clave: <BIOQUIMICA>, <FITOQUIMICA>, <*Roupala montana* Aubl.>, <RATÓN (*Mus musculus*)>, <ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA>, <EDEMA PLANTAR>, <FLAVONOIDES>, <FENOLES>, <ANTIOXIDANTE>



SUMMARY

The objective of the investigation was to determine the *in vivo* anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of the plant species *Roupala montana* Aubl., By recording the inhibition of carrageenan-induced plantar edema on albino laboratory mice of the BALB /c *Mus musculus* strain. To obtain the extract, the plant material (leaves) was allowed to macerate in 70% ethanol for 48 hours, followed by which it was concentrated in a rotary evaporator to obtain the dry extract of *R montana* Audl., Which was subsequently transported in 0.5% carboxymethyl cellulose at three concentration levels 25, 100 and 300 mg/kg. The *in vivo* analysis was performed by injecting 0.5% carrageenan in the right leg of the experimental individuals to induce inflammation, the analysis of the degree of inflammation was performed with the *ImageJ* program, calculating the area of the inflamed leg, to subsequently make the statistical study of the data in the MiniTab19 program, applying an ANOVA and the Tukey post-test to verify the existence of significant differences between the treatments. The *in vitro* tests that were carried out determined in the phytochemical screening the presence of flavonoids, pyrocatechol, and pyroglutamic tannins, triterpenes, quinones that was corroborated with thin layer chromatography the presence of possible five types of flavonoids among them clustering molecules Routine and hyperoxide type. The quantification of flavonoids and phenols showed that the plant has a large amount of these secondary metabolites, as well as a great antioxidant activity. As a result, the three doses used can deflate almost entirely. In 6 hours, the induced plantar edema, the treatment is 700 mg/kg, the six effectives with a percentage of inflammation of 0.7%. It can be concluded that the plant has an anti-inflammatory activity of significant efficacy, so it is recommended to carry out further studies to evaluate the toxicity and other pharmacological activities, for the future development of a medicine.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PYTOCHEMISTRY>, <*Roupala Montana Aubl*>, <MOUSE (*Mus Musculus*)>, <ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY>, <PLANTAR EDEMA>, <FLAVONOIDS>, <PHENOLS>, <ANTIOXIDANT>



INTRODUCCIÓN

Actualmente, los procesos inflamatorios se han convertido en una de las afecciones más frecuentes a nivel mundial, siendo procesos tisulares constituido por una serie de fenómenos moleculares, vasculares y celulares con la finalidad de defensa frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Clásicamente, la inflamación se ha considerado integrada por los cuatros signos de Celso: Calor, Rubor, Tumor y Dolor (Bordés et al. 1999, p.1).

La magnitud de una respuesta inflamatoria depende principalmente del sitio, la proporción y el tiempo de exposición con el agente causal, que ejerce un daño sobre el organismo. Debido a esto puede convertirse en la causante de un grupo muy importante de enfermedades. Que puede ir desde dolencias menores, en respuesta hacia traumas físicos y alérgicos, hasta enfermedades graves como la gota, la artritis reumatoide, trastornos neurodegenerativos, cáncer entre otros.

El cáncer es un problema de importancia mundial que hasta el momento no se ha encontrado un tratamiento que lo combata. Esta patología posee una estrecha relación con la actividad inflamatoria crónica. Los procesos inflamatorios afectan a cualquier parte del cuerpo, provocando daños en la estructura del ADN, y en los últimos años se ha demostrado su relación con el cáncer de colon (Gómez et al. 2008,p.469).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), son uno de los grupos de fármacos más prescritos a nivel mundial. Son útiles en el dolor reumático, tanto en enfermedades inflamatorias como degenerativas y por su poder analgésico, también se usan con frecuencia en enfermedades no reumáticas como la migraña, dolor dental y en general en cualquier proceso doloroso (Gómez et al. 2008,p.469).

Los efectos secundarios originados por los AINEs afectan a diversos órganos, pero los originados a nivel gastrointestinal son los de máxima frecuencia. Aproximadamente, un 2-3% de los pacientes que toman AINEs durante un año desarrollan una complicación gastrointestinal como hemorragia o perforación alta o baja. Durante ese periodo de tiempo, un 5-10% desarrollan úlceras sintomáticas y un 30-50% desarrollan dispepsia que requiere atención médica (Lanas 2001,p.561).

Es necesario buscar alternativas para poder solucionar los problemas de salud, encontrando en diversas plantas metabolitos secundarios que presentan una potencial actividad antiinflamatoria como son los flavonoides. Desde hace algunos años, tanto los países altamente desarrollados como aquellos del tercer mundo con escasos recursos económicos, han retomado y desarrollado el uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos en lo que se ha llamado la Revolución Verde de la Medicina (García Bacallao et al. 2002, p215).

La OMS apoya el uso de las medicinas tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo. La atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional, por tradición cultural o porque no existen otras opciones (OMS, 2004).

Ecuador es uno de los países más biodiversos del mundo, su flora presenta una gran gama de especies nativas y foráneas que se adaptan y se desarrollan fácilmente al entorno. Según los conocimientos etnobotánicos, diferentes familias de plantas se destacan por los usos farmacológicos que estas otorgan a la humanidad. Este es el caso de la familia vegetal Proteaceae, que se usa tradicionalmente en forma de infusión de raíces, corteza, hojas o flores de diversas especies, para dolores de cabeza, tos, disentería, diarreas, indigestión, úlceras de estómago y enfermedades renales. Por ello, resulta de gran interés determinar la actividad antiinflamatoria de la planta *Roupala montana* Aubl., una especie de la familia Proteaceae, que se desarrolla en la amazonia ecuatoriana en un clima húmedo - nublado.

Según estudios realizados demuestran que el extracto de diclorometano de *Roupala montana* previene el daño cromosómico y de ADN inducido químicamente *in vivo* en las condiciones probadas. La actividad antigenotóxica de *R. montana* probablemente se puede atribuir a la actividad de varios antioxidantes, como los flavonoides, glucósidos, presentes en el extracto. Se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo de acción de *R. montana* para permitir el desarrollo de un producto farmacéutico (Oliveira et al. 2014, p.98).

Existe una necesidad de tener conocimiento más afondo acerca de esta planta (*Roupala montana* Aubl.) y la familia a la cual pertenece, por ello, es fundamental iniciar estudios ésta. Al ser una especie que se encuentra en el territorio ecuatoriano, facilita su investigación, además que, puede ser la clave y respuesta a diferentes enfermedades que aquejan a la humanidad.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* del extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *Roupala montana* Aubl., mediante el registro de la inhibición del edema plantar inducido por carragenina sobre ratones de laboratorio de la cepa BALB/c *Mus musculus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el control de calidad de las hojas de la especie vegetal *Roupala montana* Aubl., mediante ensayos físicos-químicos
- Identificar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *Roupala montana* Aubl., mediante tamizaje fitoquímico.
- Determinar cuantitativamente los fenoles presentes en el extracto hidroalcohólico de la planta *Roupala montana* Aubl., mediante el método de Folin-Ciocalteu.
- Determinar cuantitativamente los flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de la planta *Roupala montana* Aubl.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* del extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *Roupala montana* Aubl., a tres niveles de concentración.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Actividad antiinflamatoria

1.1.1 *Inflamación*

La inflamación es una reacción o proceso defensivo natural del sistema inmunológico del organismo como respuesta al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por agentes lesivos como ser microorganismos, traumatismos, necrosis, agentes químicos o físicos, o reacciones inmunitarias entre otros. Esencialmente, es una respuesta protectora que surge con el fin de aislar, contener la lesión, destruir al agente agresor y posteriormente preparar al tejido dañado para su reparación, proceso que consta de cambios vasculares y celulares mediados por factores químicos que se manifiestan clínicamente (Villalba, 2014, p.2261).

La inflamación es la respuesta del organismo al daño físico que entraña reacciones vasculares, humorales y celulares en el sitio de la lesión. Sirve para destruir, diluir o tabicar el agente lesivo y las células destruidas. Desencadena una serie compleja de acontecimientos, que en lo posible cura y reconstruye el tejido dañado. Es ante todo un proceso único, inmediato y continuo (Montero González, Hurtado de Mendoza Amat y Cabrera Rosell 2001, p.78).

1.1.2 *Respuesta inflamatoria*

La respuesta inflamatoria como proceso es la mejor defensa del huésped, pero en exceso provoca una reacción dañina en el organismo, a pesar de los mecanismos naturales que la controlan. Presentando como resultado cuatro síntomas: calor, rubor, tumor y dolor (Montero González, Hurtado de Mendoza Amat y Cabrera Rosell, 2001,p.79).

La respuesta inflamatoria es inducida por varios agentes, resultando en daño tisular y desencadenando actividades inmunes. Estas respuestas pueden mejorarse mediante un proceso cíclico, promoviendo efectos inductores de angiogénesis, como la facilitación del tumor crecimiento y metástasis. El proceso inflamatorio expone el cuerpo a niveles prolongados de ROS, lo que lleva a la acumulación de daño oxidativo en los tejidos. Una clase de receptores vinculados a la regulación de la inflamación y la angiogénesis son peroxisomas receptores activados por proliferador (PPAR), que regulan la expresión en muchos genes, incluyendo COX-2, óxido nítrico sintasa y vascular factor de crecimiento endotelial (VEGF), entre otros (Gomes Castro et al. 2014).

1.1.3 Fisiopatología de la inflamación

La inflamación es la respuesta inicial e inespecificada del organismo ante estímulos mecánicos, químicos o microbianos. Es una respuesta rápida y ampliada, controlada humoral y celularmente (complemento, cininas, coagulación y cascada fibrinolítica) y desencadenada por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales. Es una respuesta beneficiosa si el proceso inflamatorio mantiene un equilibrio entre células y mediadores (García de Lorenzo y Mateos, López Martínez y Sánchez Castilla 2000, p.354).

A. Cambio vascular

Aparece vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación/adhesión celular e hipercoagulabilidad. La vasodilatación y el incremento de la permeabilidad microvascular en el lugar de la inflamación aumentan la disponibilidad local de nutrientes y de oxígeno, produciendo calor, hinchazón y edema tisular. Los cambios hemodinámicos producen los cuatro síntomas clásicos asociados a la inflamación local: rubor (eritema), tumor (edema), calor y dolor (García de Lorenzo y Mateos, López Martínez y Sánchez Castilla, 2000,p.354).

B. Cambio celular

Los leucocitos deben viajar desde la luz de los vasos sanguíneos al sitio de la lesión y ejecutar ahí sus funciones de defensa, es decir, fagocitar al agente patógeno. A este proceso se le denomina extravasación y consta de tres etapas:

- Marginación, rodadura y adhesión al endotelio.
- Diapédesis.
- Migración a los tejidos intersticiales.

Para que los leucocitos migren a través de las uniones interendoteliales hacia el sitio de la lesión siguen el curso de una locomoción orientada por un gradiente químico, que es la quimiotaxis; los leucocitos “saben a dónde ir” gracias a los agentes quimiotácticos, los cuales a su vez causan la activación leucocitaria. Los leucocitos ya activados cumplirán su función principal, eliminar al agente agresor del foco inflamatorio mediante la fagocitosis, que se dará en tres etapas, el reconocimiento y unión de partículas, interiorización con formación de vacuola fagocítica, y muerte o degradación del material patógeno ingerido (Villalba, 2014,p.2263).

Los mediadores de la inflamación “atraen” a las células defensivas para que ejerzan sus funciones específicas:

- Neutrófilos: lisis bacteriana
- Macrófagos: fagocitosis
- Eosinófilos: desactivación de sustancias extrañas

- Linfocitos: reacciones de rechazo y enfermedades autoinmunes, defensa frente a virus, etc (García Alonso, p.2).

1.1.4 *Manifestaciones clínicas*

La propia agresión, los mediadores de la inflamación y el aumento de presión producido por el engrosamiento de los tejidos estimulan las terminaciones nerviosas y originan el dolor. El aumento del flujo vascular es responsable del enrojecimiento de la zona (rubor) y del aumento local de la temperatura (calor); aunque este último signo también se origina en parte por el incremento del metabolismo en el tejido lesionado. El aumento de la permeabilidad capilar, unido al hiper-flujo de sangre, se traduce en el acúmulo de agua en el intersticio (edema), que se traduce desde fuera en un incremento de volumen, bulto o tumor. Por último, el dolor (directamente y por medio de la contractura refleja de los músculos que origina) añade un quinto síntoma a los cuatro descritos por Celso: la impotencia funcional (García Alonso, p.2)

1.1.5 *Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica*

En la fase I, como respuesta a la agresión, se liberan localmente citocinas que inducen la respuesta inflamatoria, reparan los tejidos y reclutan células del sistema retículo-endotelial (García, López y Sánchez 2000, p.354).

En la fase II, se liberan pequeñas cantidades de citocinas a la circulación para aumentar la respuesta local. Se reclutan macrófagos y plaquetas y se generan factores de crecimiento. Se inicia una respuesta de fase aguda, con disminución de los mediadores pro-inflamatorios y liberación de los antagonistas endógenos. Estos mediadores modulan la respuesta inflamatoria inicial. Esta situación se mantiene hasta completar la cicatrización, resolver la infección y restablecer la homeostasis (García, López y Sánchez 2000, p.354).

Si la homeostasis no se restablece aparece la fase III o reacción sistémica masiva. Las citocinas activan numerosas cascadas humorales de mediadores inflamatorios que perpetúan la activación del sistema retículo endotelial, con pérdida de la integridad micro-circulatoria y lesión en órganos diversos y distantes (García, López y Sánchez 2000, p.355).

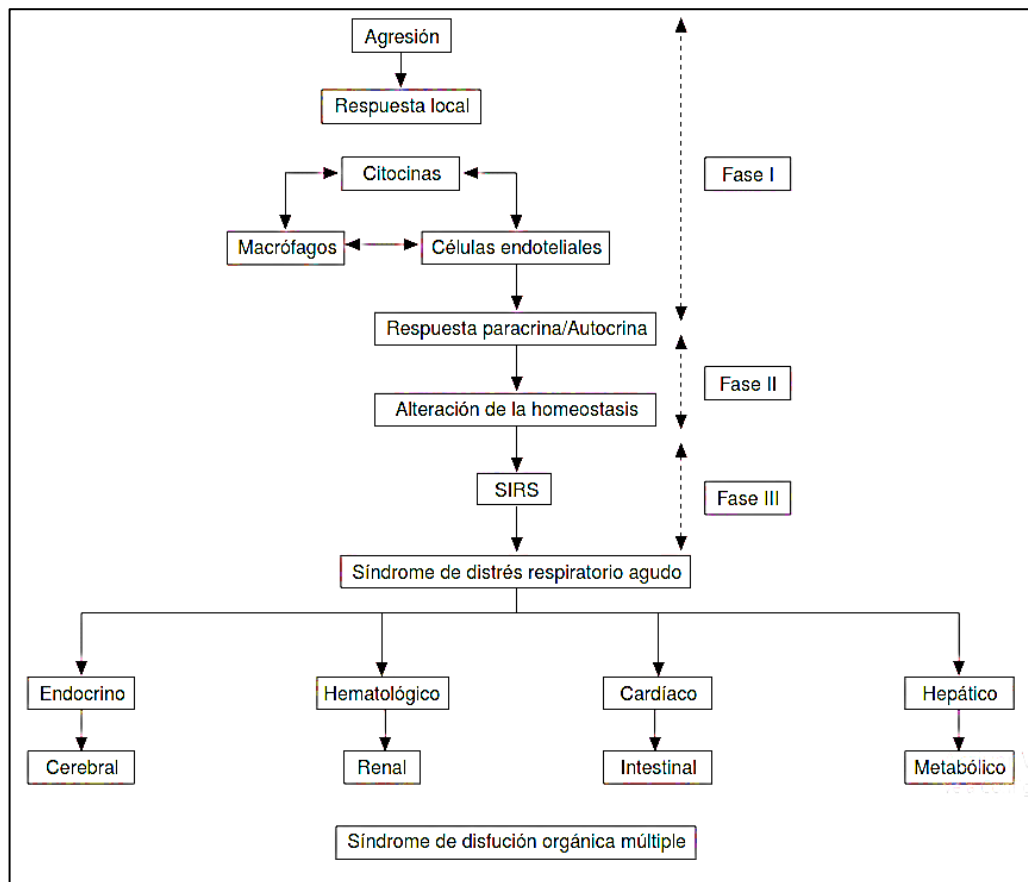


Figura 1-1. Fases evolutivas de los procesos inflamatorios

Realizado por: (García, López y Sánchez 2000, p.355)

1.1.6 Mediadores de la Inflamación

a. Mediadores preformados

- Histamina. Es un mediador ampliamente distribuido por el organismo, aunque se detecta principalmente en el mastocito y basófilo. Deriva, por descarboxilación, del aminoácido histidina. Actuando sobre los receptores H1 (histamina 1) de los vasos produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad. Como veremos posteriormente, cuando la histamina actúa sobre receptores H2 (histamina 2) produce efectos inhibidores o reguladores de la inflamación.
- Enzimas proteolíticas. De las distintas enzimas proteolíticas liberadas por el mastocito, quizás la más interesante sea la kininogenasa que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre y denominadas kininógenos, produciendo su ruptura en péptidos más pequeños denominados kininas. Las kininas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor.

- Factores quimiotácticos. El ECF-A incluye dos tetrapéptidos de alrededor 500 d. de peso molecular que atraen eosinófilos al foco inflamatorio, induciendo simultáneamente la activación de estas células. El NCF es una proteína de un peso molecular superior a 750.000 Da. con capacidad de atraer y activar al neutrófilo.
- Heparina. Al inhibir la coagulación, favorece la llegada al foco inflamatorio desde la sangre de moléculas y células. Es, además, un factor regulador, por lo que será estudiado en el apartado correspondiente (Bordés et al. 1999, p.2).

b. Mediadores sintetizados *de novo*

- PGE₂. Es la prostaglandina más importante en el proceso inflamatorio. Produce vasodilatación y dolor. En coordinación con el factor C5a y LTB₄ aumenta la permeabilidad vascular. El efecto antiinflamatorio de la aspirina se debe a que al bloquear la vía de la ciclooxigenasa impide la formación de esta prostaglandina.
- LTB₄. Es un factor quimiotáctico para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos.
- Factor activador de plaquetas (PAF: Platelets Activating Factor). Este factor tiene varias propiedades. Activa las plaquetas determinando su agregación, con la liberación de mediadores por parte de estos cuerpos e inicio de los procesos de coagulación. Produce, además, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Es, por otra parte, un potente factor quimiotáctico y activador de neutrófilos (Bordés et al. 1999, p.2).

Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

a. Fase inicial. Llegada de moléculas

- Inmunoglobulinas. Los anticuerpos se unen y bloquean el germen y sus toxinas. La IgM e IgG activan el complemento por la vía clásica. La IgG, a su vez, se une a los receptores por la porción Fc (FcR) que presentan los fagocitos en su membrana, potenciando la fagocitosis.
- Factores del complemento. Además de la activación de la vía clásica indicada anteriormente, el complemento se puede activar por la vía alternativa, por productos liberados directamente por el germen. Cuando el complemento, siguiendo una u otra vía, alcanza la vía común produce la lisis del germen o la célula extraña inductora de la inflamación. Los factores C3a y C5a, actuando sobre receptores de membrana, activan al mastocito y basófilo induciendo la liberación de mediadores y amplificando, de esta forma, el fenómeno inflamatorio. El C5a es un potente factor quimiotáctico, mientras que el C3b, uniéndose a receptores de membrana de los fagocitos, potencia la fagocitosis.
- Kininógenos. Sobre estas moléculas actúan las kininogenasas liberadas por el mastocito y basófilo dando lugar a las kininas.

- Proteínas de la fase aguda. Destacaremos entre ellas a la proteína C Reactiva (PCR) que tiene la capacidad de fijar determinados gérmenes como el neumococo y de activar el complemento por la vía clásica.
- Factores de la coagulación (Bordés et al. 1999, p.3).

b. Fase tardía. Llegada de células

- Basófilo. Contribuye, junto con el mastocito, a la liberación de mediadores.
- Neutrófilo. Es de las primeras células en llegar al foco inflamatorio. Elimina al germen mediante fagocitosis o liberando factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos y produciéndole, así, una muerte extracelular.
- Monocito/Macrófago. Procedente de la sangre el monocito, y de los tejidos cercanos el macrófago, llegan al foco más tardíamente. El monocito, en los tejidos, se diferencia en macrófago. Esta célula presenta idénticas funciones a las señaladas para el neutrófilo. Actúa, además, como célula presentadora del antígeno a las células específicas T y B, iniciando, de esta forma, la respuesta específica. El macrófago sintetiza un péptido inespecífico, la interleucina 1 (IL-1), que es una auténtica hormona del Sistema Inmune, ya que pasando a la sangre produce efectos sobre distintas partes del organismo. Determina la aparición de fiebre, probablemente induciendo la síntesis de PGE en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del hipotálamo; a su vez la PGE actúa sobre el centro termorregulador. Sobre la médula ósea favorece la producción y liberación de neutrófilos, con la consiguiente neutrofilia. En el hígado incrementa la síntesis de proteínas de la fase aguda. A nivel local, la IL-1 activa la proliferación y diferenciación de las células T y B contribuyendo, así a la respuesta específica. También activa la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, fenómenos incluidos en la fase de reparación de la inflamación.
- Linfocitos T y B. Potenciados por el macrófago inician la respuesta específica. Las células B procedentes de los tejidos linfoides asociados a tejidos o mucosas sintetizan IgE, que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación. Por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada.
- Eosinófilo. Aunque es una célula citotóxica en las infecciones parasitarias, parece además tener en la inflamación una función reguladora, por lo que será estudiada en el siguiente apartado (Bordés et al. 1999, p.3).

1.1.7 Clasificación de la inflamación

1.1.7.1 Inflamación aguda

La inflamación aguda constituye una respuesta inmediata que se produce frente a un agente nocivo y que comienza con una cascada compleja de interacciones bioquímicas y celulares, que provocan cambios en la microvasculatura, así como un aumento de leucocitos en la zona de la lesión, y finalmente los signos de la respuesta inflamatoria aguda (León et al. 2015, p.47).

Secundario a una lesión tisular se desencadenan una serie de reacciones químicas y celulares en el área dañada, que determinan potentes cambios vasculares (vasodilatación, incremento de la permeabilidad), que resultan en un aumento del exudado; estos acontecimientos están regulados exclusivamente por mediadores químicos (principalmente histamina, leucotrienos, IL-1, TNF). Simultáneamente a los cambios vasculares, tiene lugar el movimiento de leucocitos desde la luz vascular hacia la zona de la lesión, pasando estos por pasos secuenciales: adhesión, transmigración y quimiotaxis, teniendo lugar la activación leucocitaria, inducida por los factores quimiotácticos, por la fagocitosis y/o por los complejos antígeno-anticuerpo. El paso final en la fagocitosis de las bacterias es su destrucción y degradación, esto ocurre principalmente por mecanismos dependientes de oxígeno, teniendo lugar la producción de metabolitos reactivos del oxígeno. De los mediadores químicos, la IL-1 y el TNF tienen gran relevancia al provocar las reacciones de fase aguda, tienen efectos endoteliales, y efectos sobre los fibroblastos y los leucocitos. Los mediadores son activados por productos bacterianos, inmunocomplejos, toxinas y otras citoquinas. Los signos están determinados por el papel de varios mediadores de la inflamación, así el dolor, es causado principalmente por la actividad de prostaglandinas, bradicinina y sustancia P; el calor, por la hiperemia en el sitio de lesión como consecuencia de vasodilatación; el rubor, por la propia hiperemia; el tumor, por la aparición del edema (condicionado por prostaglandinas, óxido nítrico, aminas vasoactivas, bradicinina, sustancia P y leucotrienos) (León et al. 2015, p.61).

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

Mediador químico	Acción
Histamina y serotonina (aminas vasoactivas)	Incremento de la permeabilidad
Bradicinina	Incremento de la permeabilidad y dolor
C3a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad opsonina
C5a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Prostaglandinas (metabolitos del ácido araquidónico)	Vasodilatación, dolor, fiebre, activa a otros mediadores
Leucotrieno B ₄ (metabolito del ácido araquidónico)	Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Leucotrieno C ₄ , D ₄ , E ₄ (metabolitos del ácido araquidónico)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, vasoconstricción
Metabolitos del oxígeno (radicales libres)	Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular
Factor activador de plaquetas (PAF)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, cebado de leucocitos
Interleucina-1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral (TNF) (citocinas)	Reacciones de fase aguda, activación endotelial, quimiotaxis
Óxido nítrico	Incremento de la permeabilidad, vasodilatación, citotoxicidad

Fuente: (León et al. 2015, p.49)

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

1.1.7.2 *Inflamación crónica*

En la inflamación crónica, el proceso inflamatorio puede empezar aun cuando no haya lesión, y no termina cuando debería terminar. No siempre se sabe por qué continúa la inflamación. La inflamación crónica puede ser causada por infecciones que no desaparecen, por reacciones inmunitarias anormales a los tejidos normales o por estados como la obesidad. Con el tiempo, la inflamación crónica puede causar daño al ADN y llevar al cáncer. Por ejemplo, la gente con enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, tiene un riesgo mayor de cáncer de colon («Inflamación crónica», 2015).

Clínicamente, el dolor frecuentemente está ausente o es mínimo. La inflamación crónica puede pasar desapercibida para el paciente hasta que es demasiado tarde para salvar el órgano o los órganos afectados. La inflamación crónica no tiene los puntos cardinales de la inflamación aguda tan prominentes (calor, rubor, tumor, dolor y disminución de la función) (Rivas, 2013).

Una inflamación aguda puede transformarse en crónica. Un buen ejemplo sería un absceso crónico. Un absceso es una colección localizada de supuración que incluye neutrófilos viables. Este es una respuesta inflamatoria aguda típica. Con el tiempo, la cavidad del absceso que contiene el pus se recubre con tejido conectivo inmaduro conteniendo fibras colágenas y vasos sanguíneos de neoformación. Y ahora tenemos una inflamación crónica, puesto que se ha convertido en una lesión persistente y, además, el área central de necrosis por licuefacción (pus) está envuelto por una pared de tejido inflamatorio crónico (Rivas, 2013).

a. Respuesta de tejido de granulación.

El tejido de granulación se forma por la proliferación de nuevos capilares a partir de los vasos sanguíneos dañados en la zona lesionada. Paralelamente, existe otra proliferación de jóvenes fibroblastos, desde el tejido conjuntivo lesionado y desde los vasos sanguíneos que han sufrido el trauma (Rivas 2013).

A medida que la lesión envejece, el tejido fibroso se colageniza y de manera gradual constituye un muro alrededor de la lesión. Esta reacción de tejido granuloso es la base de la respuesta inflamatoria crónica y cumple tres finalidades: rodea, canaliza y bloquea el irritante; su rico aporte sanguíneo permite que las células fagocíticas, las enzimas y las sustancias inmunológicas específicas y no específicas se pongan en contacto con el irritante; los elementos del tejido fibroso logran la reparación cuando se ha eliminado el irritante (Rivas 2013).

b. Respuesta celular.

Las células se derivan tanto del torrente de los vasos sanguíneos de la zona afectada como de los tejidos. Los procedentes de la sangre son principalmente linfocitos y monocitos (macrófagos), denominados colectivamente como infiltración de células redondas o mononucleares, y en los estados de hipersensibilidad, eosinófilos. Las células derivadas de los tejidos son primordialmente los fibroblastos, las del sistema retículoendotelial, epitelioides, del plasma y linfocitos (Rivas 2013).

Las células epitelioides, monocitos, histiocitos y células gigantes ejercen todos sus efectos fagocitando al irritante. Las células plasmáticas y los linfocitos intervienen en la producción de anticuerpos o el transporte (Rivas 2013).

1.2 Antiinflamatorios

Los antiinflamatorios son medicamentos utilizados para prevenir, disminuir y/o eliminar el proceso inflamatorio en los tejidos.

1.2.1 *Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES)*

Los AINEs representan uno de los grupos farmacológicos más consumidos en el mundo. Sin embargo, en muchas ocasiones son infrautilizados o se abusa de ellos, siendo a veces innecesaria su prescripción (Prieto, 2007, p.).

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) son fármacos con una estructura química heterogénea que comparten actividad antipirética, antiinflamatoria y analgésica a través de su capacidad para inhibir la producción de prostaglandinas proinflamatorias (Loza, 2011, p.88).

Se utilizan principalmente en el tratamiento de la inflamación, dolor, fiebre y edema, así como también en las osteoartritis, artritis reumatoides y trastornos musculoesqueléticos. Esta clase heterogénea de fármacos incluye la aspirina y variados otros agentes inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), selectivos o no (Batlouni, 2010, p.538).

1.2.1.1 *Mecanismo de acción*

Inhibición de la ciclo-oxigenasa (COX): Es el mecanismo principal, evitando la producción de prostaglandinas, que actúan como mediadores de la inflamación a nivel periférico y central. Inhiben la prostaglandina-sintetasa, afectando a la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano. Se conocen 2 formas de la enzima COX: COX-1 y COX-2:

- COX-1. Es una enzima constitutiva que se encuentra en la mayoría de los tejidos. Se encarga de regular procesos como la protección gástrica, agregación plaquetaria, función renal y la homeostasis vascular. Por tanto, su inhibición puede provocar efectos secundarios a estos niveles.
- COX-2. Esta enzima habitualmente no se detecta en los tejidos y aparece de forma inducida en estados de inflamación. Su expresión se inhibe por todos los AINE y también por los corticoides. En estos casos, los llamados AINE selectivos, al inhibir preferentemente la COX-2, consiguen una acción antiinflamatoria sin los efectos secundarios, especialmente gástricos, al no inhibir la enzima COX-1 (Gómez et al., 2008, p.469).

Efectos no mediados por prostaglandinas: Hay estudios que resaltan estos efectos, en relación a propiedades fisicoquímicas de los AINE necesarias para la función celular, inhibición de la

función de los neutrófilos en la inflamación o la inhibición de mediadores pro-inflamatorios como el óxido nítrico inducido por citoquinas (Gómez et al., 2008, p.469).

Apoptosis: Las prostaglandinas inhiben la apoptosis y este hecho puede explicar, al menos en parte, que la aspirina y otros AINE se relacionen con la reducción del riesgo del cáncer de colon (Gómez et al., 2008, p.469).

1.2.1.2 Clasificación de AINES

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

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

Fuente: (Gómez et al. 2008, p.470)

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

1.2.2 Diclofenaco Sódico

El diclofenaco sódico es el ingrediente activo de Voltaren®, un medicamento antiinflamatorio no esteroideo diseñado mediante la selección de propiedades fisicoquímicas y estériles apropiadas. Su actividad farmacológica, específicamente sus efectos en la inflamación aguda y subcrónica, y su actividad analgésica se han evaluado en modelos animales. La tolerabilidad del compuesto según varios parámetros (es decir, relación entre la dosis letal aguda o la dosis que induce la pérdida de sangre gastrointestinal y la actividad farmacológica deseada) es favorable en comparación con otros medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, el diclofenaco sódico actúa potentemente en la inhibición del ciclo-oxigenasa, reducción de la liberación de ácido araquidónico y mejora de la absorción de ácido araquidónico. De este modo, se produce un doble efecto inhibitorio tanto en el ciclo de la oxigenasa como en las vías de la lipoxigenasa (Scholer et al., 1986, p.34).

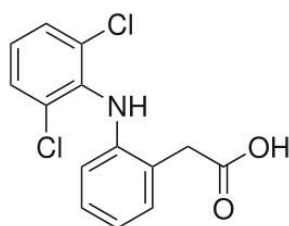


Figura 2-1. Estructura química del diclofenaco sódico
Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

1.2.2.1 *Mecanismo de acción*

Bloquea la producción de prostaglandinas a través de la inhibición selectiva de COX. También inhiben la síntesis de ADN bacteriano mediante efectos bacteriostático. Tienen una labor fundamental en el tratamiento farmacológico de dolor agudo y crónico. El diclofenaco es un derivado del ácido benceno-acético con propiedades antiinflamatorias. Como el diclofenaco es un Antiinflamatorio no esteroideo (AINE), se une a ambas formas de COX (COX-1 y COX-2) e inhibe la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas pro-inflamatorias por medio de reacción de quelación. El diclofenaco es eficaz en la superación del dolor y la inflamación cuando inhibe la COX-2.

1.2.2.2 *Propiedad farmacocinética*

El diclofenaco se absorbe rápida y eficientemente después de la administración oral, rectal o intramuscular convencional. Después de la administración intramuscular, las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan después de 10 a 30 minutos. Con la formulación con recubrimiento entérico, las concentraciones máximas se alcanzan después de 1.5 a 2.5 horas, y esto se retrasa por los alimentos a 2.5 a 12 horas (Todd y Sorkin, 1988, p.245).

Al igual que otros AINE, el diclofenaco está altamente ($\geq 99.5\%$) unido a proteínas. El volumen total medio de distribución es de 0,12 a 0,17 l/kg y el del compartimento central es de 0,04 l/kg. La droga penetra eficientemente el líquido sinovial inflamado donde se mantienen altas concentraciones en comparación con las concentraciones plasmáticas. El diclofenaco y sus metabolitos atraviesan la placenta en los animales, y se pueden encontrar pequeñas cantidades en la leche materna de las mujeres (Todd y Sorkin 1988, p.245).

El diclofenaco sufre un importante metabolismo de primer paso y solo el 60% del fármaco alcanza la circulación sistémica sin cambios después de la administración oral. Se elimina principalmente

por el metabolismo hepático y la posterior excreción urinaria y biliar. La cantidad excretada en orina representa del 20 al 30% de la dosis y la de la bilis del 10 al 20%. La vida media de eliminación después de una dosis radiomarcada es de aproximadamente 30 horas (Todd y Sorokin, 1988, p246).

1.2.2.3 Posología

- Adultos: en casos leves, así como en tratamientos prolongados se recomienda administrar 75 mg-100 mg al día. La dosis máxima diaria inicial en el tratamiento con diclofenaco sódico es de 100-150 mg. Resulta adecuada la administración en 2-3 tomas diarias. En la dismenorrea primaria, la dosis diaria, que deberá ajustarse individualmente, es de 50-200 mg. Se administrará una dosis inicial de 50-100 mg y si es necesario se aumentará en los siguientes ciclos menstruales.
- Ancianos: la farmacocinética de diclofenaco sódico 50 mg Comprimidos entéricos no se altera en los pacientes ancianos, por lo que no se considera necesario modificar la dosis ni la frecuencia de administración.
- Niños: la seguridad y eficacia de diclofenaco 50 mg Comprimidos entéricos no se ha establecido en este grupo de pacientes, por lo que no se recomienda su uso en niños («DICLOFENACO EN VADEMECUM», 2014).

1.3 Familia *Proteaceae*

Las plantas compuestas por esta familia se encuentran constituidas por árboles o matas, las cuales se caracterizan por poseer hojas simples, verticales alternas. Las flores de este tipo de plantas son desarrolladas mediante racimos, cabezuelas. El tallo se constituye mediante cuatro partes las cuales pueden ser constituidas mediante cuatro partes estas pueden ser libres o unidas. El fruto es un conducto del cual se desarrollan unas cápsulas leñosas y las semillas se caracterizan por ser varias (Pavón y Soto, 1993, p.1).

La familia de las Proteaceae se la considera como las destacadas del hemisferio Sur, se encuentra establecido alrededor de 75 géneros de las cuales existen una serie de especies extendidas en las regiones subtropicales y tropicales. Existe una mayor concentración de estas plantas en Australia, Sur África como Sur América (Pavón y Soto, 1993, p.2).

1.3.1 *Roupala montana* Aubl.

1.3.1.1 *Taxonomía*



Figura 3-1. *Roupala montana* Aubl.

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Proteales
Familia:	Proteaceae
Género:	<i>Roupala</i>
Especie:	<i>R. montana</i> Aubl.

1.3.1.2 *Descripción*

Arbustos o árboles hasta 10 m de alto, ramitas jóvenes ferrugíneo-estrigosas. Hojas dimorfas, las juveniles pinnaticompuestas, folíolos elíptico-lanceolados a ovado-lanceolados, 3–15 cm de largo, ápice agudo a acuminado, base asimétrica, margen gruesamente serrado, hojas maduras simples, mayormente ovadas, 6–12 cm de largo y 4–10 cm de ancho, ápice acuminado a obtuso, margen irregularmente dentado. Inflorescencia axilar, racemosa, hasta 18 cm de largo, blanco-estrigosa, flores apareadas, sésiles o en pedúnculos cortos; perianto actinomorfo, tépalos 7–8.5

mm de largo, reflexos; ovario blanco-estrigoso con estilo glabro y erecto. Fruto un folículo 2–3.5 cm de largo, aplanado, 2-valvado, estilo decíduo; semillas 2, aladas («Roupala montana Aubl.», 2009).

1.3.1.3 *Hábitat*

Se encuentra en la amazonia del Ecuador, en la provincia de Pastaza, cantón Mera, en la reserva Sumak Kawsay In Situ.

1.3.1.4 *Usos*

- Agroforestales: Como árboles aislados en potreros (refugio y sombra para el ganado), cercas vivas, cortinas rompevientos y delimitación de linderos.
- Ecológicos: Conservación de suelos, estabilización de cauces fluviales, protección contra la erosión y de mantos acuíferos y restauración de yermos.
- Industriales: La madera se usa para construir muebles, esculturas y en construcciones navales, también como combustible (leña). Adicionalmente los árboles de esta especie podrían emplearse en proyectos de arboricultura y melicultura.
- Medicinales: La infusión de la corteza se usa como estimulante nervioso.

1.3.1.5 *Estudios*

Según el estudio realizado por Oliveira et al. (2014) sobre Antigenotoxicidad del extracto de *Roupala montana*, concluye que, los resultados demuestran que el extracto de diclorometano de *R. montana* previene el daño cromosómico y de ADN inducido químicamente in vivo en las condiciones probadas. La actividad antigenotóxica de *R. montana* probablemente puede atribuirse a la actividad de varios antioxidantes, como los flavonoides glucósidos, presentes en el extracto. Se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo de acción de *R. montana* para permitir el desarrollo de un producto farmacéutico (Oliveira et al., 2014, p.98).

El estudio fitoquímico del extracto de diclorometano de *R. montana* por HPLC reveló la presencia de los flavonoides:

- quercetina 3-Ob-D-glucósido
- quercetina 3-ObD-glucopiranosil- (1-2) -a-Lrhamnopyranoside
- isorhamnetin 3-ObD-glucopyranosyl-(1- 2)-aL-rhamnopyranoside,

Como compuestos principales. Por lo tanto, creemos que el mecanismo quimiopreventivo del extracto de diclorometano de *R. montana* es, al menos en parte, el resultado de la actividad de los flavonoides presentes en el extracto (Oliveira et al., 2014, p.98).

Los flavonoides son conocidos por su propiedad antioxidante, entre otras actividades biológicas, que se asocia con la prevención de enfermedades emergentes en los países en desarrollo, como algunos tipos de cáncer. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estos compuestos ejercen su actividad preventiva en ciertas enfermedades no se han establecido completamente. La actividad antioxidante de los flavonoides es el resultado de su capacidad para eliminar los radicales libres y actuar como un donante de hidrógeno, reduciendo la posible aparición de enfermedades degenerativas crónicas (Oliveira et al. 2014, p.98).

La quercetina pertenece a la clase de flavonoides que puede presentarse principalmente en forma unida, con azúcares, ácidos fenólicos y alcoholes. Una molécula de quercetina contiene cinco grupos hidroxilo cuya presencia determina la actividad biológica del compuesto y el posible número de derivados. Los principales grupos de derivados de quercetina son los glucósidos y éteres, así como los sustituyentes de sulfato y prenilo que ocurren con menos frecuencia (Oliveira et al., 2014, p.98)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de investigación

- Comprobación e identificación taxonómica: Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
- Control de calidad de la planta y el extracto en el laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el Bioterio de La Facultad de Ciencias de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

2.2 Población de estudio

Hojas de la planta *Roupala montana* Aubl.

2.3 Tamaño de la muestra

Para determinar el tamaño se realiza muestreos aleatorios, obteniendo aproximadamente 1 kg de planta fresca de la especie vegetal *Roupala montana* Aubl.

2.4 Selección de la muestra

Criterios de inclusión: Las mejores especies vegetales que presenten buen estado, vigorosidad, estén frescas y con superficies integras en hojas y tallos. Plantas jóvenes con un tamaño adecuado y accesibles. Criterios de exclusión: Aquellas plantas que presenten daños por acción de animales o condiciones externas. Ejemplares que muestren deterioro por agua o viento. Plantas que se encuentren en proceso de descomposición.

2.5 Recolección del material vegetal

Las muestras vegetales se recolectarán en la provincia de Pastaza, cantón Mera, en la reserva *Sumak Kawsay in Situ*.

2.6 Reactivo biológico

Para la investigación de la actividad antiinflamatoria se utilizó como reactivo biológico ratones albinos de laboratorio de la cepa BALB/c (*Mus musculus*) que según la Organización Panamericana de la Salud expresó en su XI reunión realizada en 1980 que “los países que han logrado un gran avance en el control de las enfermedades humanas y animales son los que han establecido entidades que se dedican al desarrollo de la Ciencia de los Animales de Laboratorio” (Barassi, Benavides y Ceccarelli, 1996, p.1).

2.6.1 Descripción de animales de experimentación

- Peso promedio: 20-25g
- Edad: 3-4 meses
- Sexo: Machos
- Lugar de nacimiento: Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSPI)

2.6.2 Condiciones ambientales

- Temperatura: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$
- Humedad Relativa: $45\pm 5\%$
- Fotoperíodo: 12 horas luz – 12 horas oscuridad
- Agua y comida: *ad libitum*
- Cama con tamo esterilizado: cambio cada 48 horas.
- Tiempo de ambientación: 15 días

2.7 Equipos, Materiales y Reactivos

2.7.1 Equipos

- Balanza analítica Radwag S 220.R2
- Molino Arthur H. Thomas
- Estufa RE 115
- Mufla SNOL 8,2
- Desecador
- Rotavapor BUCHI CH-9230 FLAWIL-SCHWEIZ
- Bomba de vacío
- Sonicador Cole-Parmer
- Refractómetro de Abbé
- pH-metro (HANNA INSTRUMENT)

- Espectrofotómetro Cole-Parmer
- Vórtex
- Centrífuga Clay Adams
- Cámara UV
- Cámara fotográfica (Samsung)
- Computadora HP
- Congelador

2.7.2 *Materiales*

- Soporte Universal
- Pinzas Universales
- Embudos de Separación de 250 mL
- Picnómetros
- Balones aforados de 10, 50, 100 y 200mL
- Balón esmerilado de 500mL
- Vasos de precipitación de 25, 50, 100, 250 y 500mL
- Probetas de 10, 25, 50 y 100 mL
- Pipetas de 1, 5, 10mL
- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Cápsulas de porcelana
- Crisol
- Piseta
- Embudos
- Trípodes
- Termómetro
- Espátulas
- Pera de succión
- Varilla de vidrio
- Pinzas para cápsula
- Pinza para tubos
- Matraz 250ml
- Mangueras para refrigerante
- Tubos de ensayo
- Reverbero Eléctrico
- Malla metálica

- Gradilla
- Equipo de destilación
- Refrigerante
- Papel filtro
- Papel Aluminio
- Guantes estériles
- Mascarillas
- Zapatones
- Jeringuillas de 1 y 3 mL (NYPRO)
- Cánulas
- Papel milimetrado
- Franela
- Micropipeta automática de 1000uL
- Micropipeta automática de 100uL
- Puntas azules de 1000uL
- Puntas amarillas de 100UI

2.7.2 Reactivos

- Sílica gel 60F254 (Merck)
- Metanol
- Acetato de etilo
- Formol al 40%
- Acetato de etilo
- Ácido acético glacial
- Cloruro de Aluminio
- Polietilenglicol
- Soluciones de ácido gálico
- Nitrito de Sodio 5%
- Tricloruro de aluminio 10%
- Hidróxido de sodio 1M
- Soluciones de quercetina
- Carbonato de sodio al 20%
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 20%
- Solución de DPPH* (60 μ M)
- Solución de carragenina al 1%

- Solución de Diclofenaco Sódico
- Carboximetilcelulosa (CMC)
- Alcohol 96%
- Alcohol antiséptico
- Gel antiséptico
- Éter dietílico
- Ácido acético
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Cloroformo
- Ácido sulfúrico
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de potasio
- Amonio 5% agua
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Sudan III
- Cloruro férrico
- Cloruro de sodio
- Magnesio metálico
- Alcohol amílico
- Reactivo de Fehling

2.8 Métodos y Técnicas

2.8.1 *Secado y Molienda del material vegetal*

Se descartaron las hojas deteriorados, se limpiaron con una franela húmeda el material vegetal recolectado y luego se procedió al secado de las hojas en una estufa con circulación de aire a una temperatura de 40 °C durante tres días.

Posteriormente se realizó la molienda de las hojas secas en un molino con cuchilla giratoria y se almacena en una funda plástica a temperatura ambiente.

2.8.2 Control de calidad de la materia prima

El control de calidad se realiza para confirmar la identidad y pureza de las hojas de *Roupala montana* Aubl. estos parámetros se basaron en las técnicas establecidas por la Farmacopea Española realizando las siguientes pruebas:

2.8.2.1 Determinación del contenido de Humedad

Se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida en masa que muestra una droga después de ser desecada en la estufa. Para este ensayo se empleó 2 gramos de planta seca y triturada, se colocó en una capsula de porcelana previamente tarada, luego se introdujo en una estufa por 3 horas a una temperatura de 105°C. Cumplido el tiempo se retiró la cápsula y se situó en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente. Nuevamente se trasladó la capsula a la estufa por alrededor de una hora y nuevamente se colocó en el desecador. Repitiéndose el proceso hasta alcanzar una masa constante. El porcentaje de contenido de humedad se determinó con la siguiente fórmula: (Miranda y Cuéllar, 2011, pp.34-35).

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Donde:

%H= Porcentaje de pérdida de peso por desecación (%)

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

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

M= masa de la cápsula vacía (g)

100= factor matemático

2.8.2.2 *Determinación de Cenizas Totales*

Para este ensayo fue necesario pesar en un crisol previamente tarado 2 g de muestra seca y triturada. La muestra se carbonizó en un reverbero hasta que no observar desprendimiento de humo, luego se incinera la muestra en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, durante 2 horas. Posteriormente se enfría en un desecador hasta que el crisol llegue a temperatura ambiente y posteriormente se pesó. Nuevamente se trasladó el crisol al horno mufla por una hora más, luego se introdujo en el desecador y se pesó. Este proceso se repitió hasta que las cenizas estén completamente blancas y su masa sea constante. Para determinar las cenizas totales se empleó la siguiente fórmula (Miranda y Cuéllar, 2011, p.32).

$$\%Ct = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Dónde:

%Ct = Porcentaje de cenizas totales (%)

M1 = masa del crisol con la muestra seca (g)

M2 = masa del crisol con las cenizas (g)

M = masa del crisol vacío (g)

100 = factor matemático

2.8.2.3 *Determinación de Cenizas Solubles en agua*

Se realizó mediante el método gravimétrico, donde se utilizó las cenizas totales obtenidas anteriormente, a las cuales se les adicionó 20±5 mL de agua destilada, luego se tapó con un vidrio reloj y se calentó en baño maría por un periodo de 5 minutos. Posteriormente, se filtró y el material retenido junto con el papel filtro se colocó en el crisol y se carbonizó en un reverbero hasta no observar desprendimiento de humo. La muestra carbonizada se introdujo en un horno mufla a 700±50 °C por 2 horas. Después se introdujo en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente y se pesó. Se continuó con este proceso a intervalos de media hora, hasta que las cenizas estén completamente blancas y su masa sea constante. Finalmente se calculó las cenizas insolubles en H₂O mediante la siguiente fórmula: (Miranda y Cuéllar, 2011, p.33)

$$\%Ca = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} \times 100$$

Dónde:

%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 H₂O (g)

M1 = masa del crisol con la muestra seca (g)

M = masa del crisol vacío (g)

100 = factor matemático

2.8.2.4 Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico

Se realizó mediante el método gravimétrico, donde se utilizó las cenizas totales obtenidas anteriormente, a estas se adicionó 2.5 ± 0.5 ml de HCl, posteriormente se tapó el crisol con un vidrio reloj y se calentó en baño maría por 10 minutos. El vidrio reloj fue lavado y la solución se unió al contenido del crisol. Luego se filtró y el residuo retenido se lavó con agua caliente hasta que en la solución filtrada no hubo presencia de cloruros después de añadir tres gotas de AgNO₃ 0.1 M. El filtrado junto con el material retenido en el papel filtro se secó en una estufa a 105°C, se trasvasó al crisol inicial y se introdujo en un horno mufla a 700 ± 50 °C por 2 horas. Después se introdujo en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente y se pesó. Se repitió este proceso cada media hora, hasta que las cenizas estén completamente blancas y su masa sea constante. Finalmente se calculó las cenizas insolubles en HCl mediante la siguiente fórmula (Miranda y Cuéllar, 2011, p.34).

$$\%B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Dónde:

%B = Porcentaje de cenizas insolubles en HCl en base hidratada (%)

M2 = masa del crisol con las cenizas insolubles en HCl (g)

M1 = masa del crisol con la muestra seca (g)

M = masa del crisol vacío (g)

100 = factor matemático

2.8.3 Obtención del extracto hidro-alcohólico

A 50 g de muestra seca y molida de *Roupala montana* Aubl. se depositó en un frasco de vidrio ámbar, añadiéndole 500mL de alcohol al 70%, esto se lo realizará por duplicado, cada maceración se dejará reposar por 48 horas con agitaciones permanentes.

La maceración obtenida se filtrará al vacío en un kitasato y un embudo Buchner, luego se concentrará la muestra en un rotavapor a una temperatura no mayor de 60 °C se controlará la temperatura, se evaporará toda la cantidad de alcohol obteniendo un extracto seco.

2.8.4 Control de calidad del extracto hidroalcohólico

El control de calidad del extracto etanólico se realiza en base a las Normas Ramales de Salud Pública de Drogas Crudas 312 de Cuba, y se efectuaron las siguientes pruebas:

- Requisitos Organolépticos: color, olor, turbidez, aspecto.

2.8.5 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es un conjunto de ensayos que permite determinar e identificar cualitativamente los principios activos presentes en el extracto de la planta *Roupala montana* Audl. Para lo cual, se pesó de 30 a 50g de material vegetal seco y triturado y se colocó un volumen 3 veces más de solvente. Iniciando con éter etílico, posteriormente alcohol y terminando con agua. Asegurando que las extracciones vayan de menor polaridad a mayor polaridad. En la figura 1-2 se detalla el proceso a seguir.

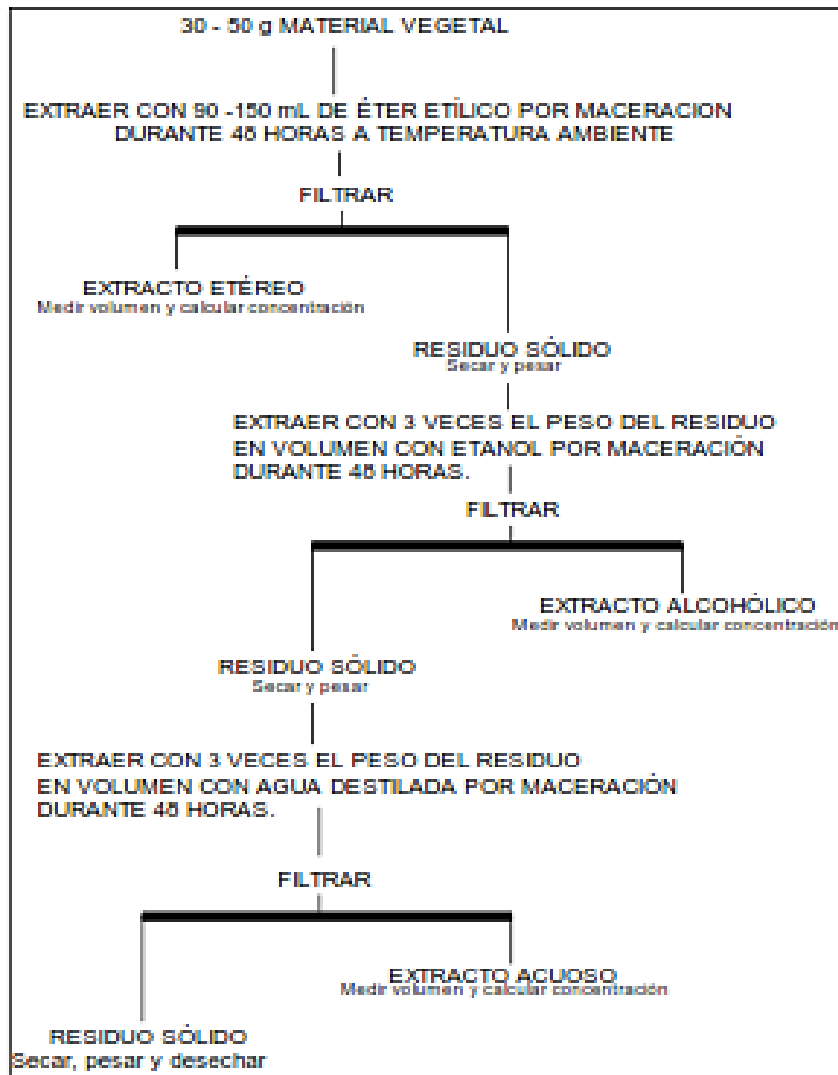


Figura 1-2. Procedimiento para la realización del tamizaje fotoquímico del material vegetal.

Fuente: (Miranda y Cuéllar, 2011, p.39)

Después de obtener los extractos, se realizaron los ensayos correspondientes para cada uno. Identificando cuantitativamente los metabolitos presentes en las hojas. Estos procesos se detallan en las siguientes figuras.

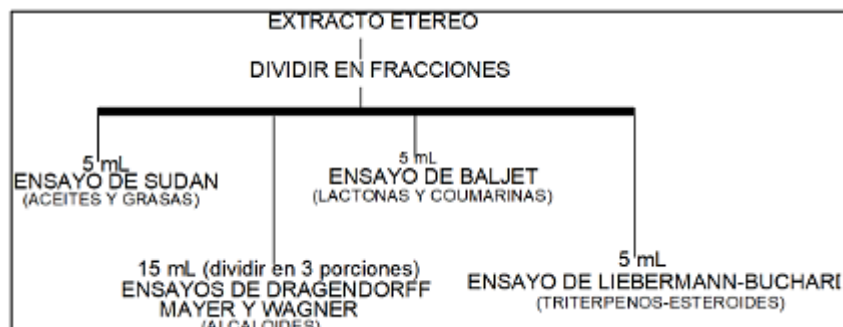


Figura 2-2. Ensayos a realizar en el extracto Etéreo.

Fuente: (Miranda y Cuéllar 2011, p.40)

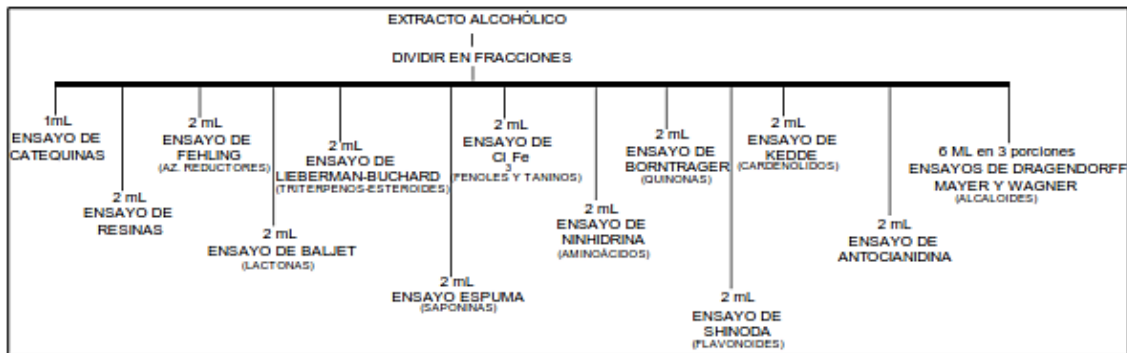


Figura 3-2. Ensayos a realizar en el extracto Alcohólico.

Fuente: (Miranda y Cuéllar 2011, p.40)

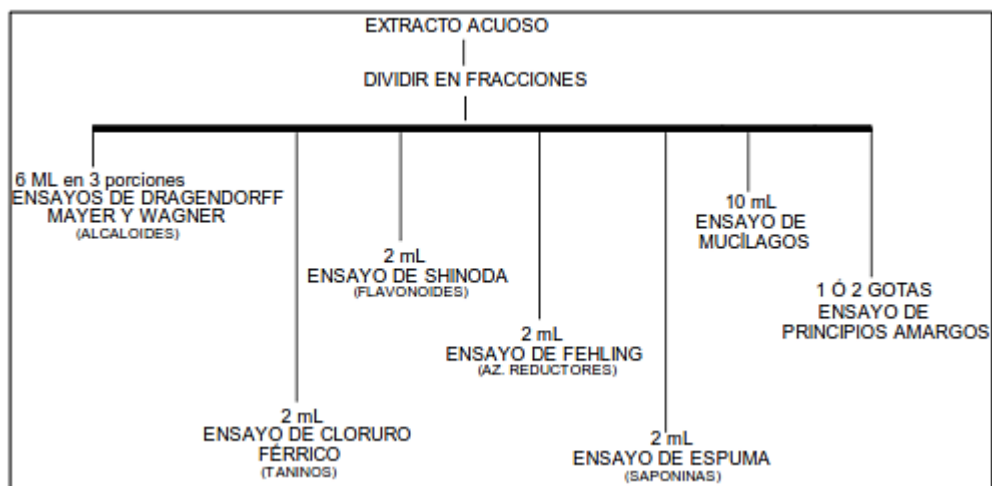


Figura 4-2. Ensayos a realizar en el extracto Alcohólico.

Fuente: (Miranda y Cuéllar 2011, p.41)

2.8.6 Cromatografía en capa fina para flavonoides

Para la detección de flavonoides en cromatografía de capa fina se realizó mediante el método de Hildebert Wagner y Sabine Bladt (Wagner y Bladt, 2001. p.196).

- Se pesó 0,02 g del extracto blando y se añade 10 mL de alcohol al 70%
- En una placa de Sílica gel 60 F254 (Merck) a un centímetro del borde inferior se coloca 10uL de la muestra con ayuda de un capilar. Se aplicó por 5 veces y se dejó secar a temperatura ambiente
- La fase móvil está compuesta de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26)

- Se retira la placa de silica de la cuba y dejó secar. Una vez seco se observa en la cámara UV a una longitud de onda 254nm
- Se revela la placa con cloruro de aluminio al 1%, se deja secar y luego se observa nuevamente en la cámara UV
- Para tener un mejor revelado de la placa se puede realizar con Polietilenglicol al 2%

Ecuación de resultados:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida de la muestra}}{\text{distancia recorrida del solvente}}$$

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

Primero se realizó una curva de calibración de ácido gálico, preparando soluciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. En balones de aforo de 25 mL se adicionó 250 µL de las soluciones de ácido gálico a diferentes concentraciones, se agregó 15 mL de agua desionizada y 1.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, con la ayuda de un agitador Vortex se homogenizó las muestras durante 30 segundos y se dejó en reposo por un periodo de 8 minutos. Luego se adicionó 3.75 mL de Na₂CO₃ al 7.5% y se aforó a 25 mL, se vortizó por 15 segundos y se dejó reposar por 120 minutos en un lugar oscuro. Por último, se realizó la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm (Hidalgo, 2019, pp. 26-27).

Después de obtener la curva de calibración del ácido gálico ($y = 0.0008x + 0.0133$) se preparó por triplicado muestras del extracto seco de las dos especies vegetales a una concentración de 100 ppm, utilizando como solvente etanol al 70%. Las muestras fueron procesadas de la misma forma que los estándares. Por último, se calculó el contenido de fenoles totales expresados como mg EAG /g extracto seco (miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco) (Hidalgo, 2019, p.27).

2.8.8 Cuantificación de flavonoides totales

Previamente a la determinación de flavonoides de los extractos, se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Primero se adicionó en tubos de ensayos apropiados 1000 µL de cada solución estándar, junto con 300 µL de NaNO₂ al 5%, se homogenizó e un agitador vortex y se dejó reposar por 5 minutos en un lugar oscuro. Luego se agregó 300 µL de AlCl₃, se vortizó por 60 segundos y nuevamente se dejó reposar en un lugar oscuro por 5 minutos. Después de este periodo de tiempo se agregó 2000 µL de NaOH a una concentración 1N, se homogenizó en un agitador vortex por 15 segundos

y se dejó reposar en un lugar oscuro durante 15 minutos, finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm (Hidalgo, 2019, p27).

Después de obtener la curva de calibración de la quercetina ($y = 0.002x + 0.0056$), se preparó por triplicado muestras del extracto seco en etanol al 70% a una concentración de 100ppm, y se procedió de la misma forma que los estándares. Finalmente se calculó el contenido de flavonoides totales expresados como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (mg EQ/g extracto seco) (Hidalgo 2019, p.27).

2.8.9 Ensayos de capacidad antioxidante

2.8.9.1 Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH

Se colocó 100 μ L de solución etanólica de DPPH (200 μ M) y se mezcló con el mismo volumen de extracto diluido o compuesto de referencia en una microplaca de 96 pocillos, reposar en oscuridad a 25 °C durante 30 minutos. La absorbancia se midió a 517 nm con un blanco que contenía DPPH y metanol. Se usó ácido ascórbico como compuesto de referencia (Reyes, 2019, p.44).

El porcentaje de captación de radicales DPPH se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad captadora de DPPH \%} = \frac{Abs_B - Abs_M}{Abs_B} \times 100$$

Donde:

Abs_B = Absorbancia del blanco

Abs_M = Absorbancia de la muestra

2.8.10 Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se utilizó la prueba de edema plantar inducido por carragenina que fue propuesto por Winter. El fundamento en esta técnica se basa en la administración subcutánea de una solución de carragenina a un nivel de la aponeurosis plantar de la rata, la carragenina produce una inflamación porque esta sustancia estimula la producción de prostaglandina, dicha producción se deriva del metabolismo del ácido araquidónico promoviendo los procesos inflamatorios-inmunológicos y angiogenicos. Para la investigación se utilizaron 24 ratas para 6 tratamientos diferentes cada uno de ellos con 4 animales de experimentación, realizando el ensayo con cuatro repeticiones como se indica en el diseño experimental.

Los grupos de tratamiento son:

- Control: administración subcutánea palmar de carragenina.
- Blanco: solución de Carboximetilcelulosa.
- Estandar: Diclofenaco sódico, 100 mg/Kg
- Grupo experimental 1: Extracto hidroalcohólico de *Roupala montana* Aubl., 300 mg/Kg
- Grupo experimental 2: Extracto hidroalcohólico de *Roupala montana* Aubl., 100 mg/Kg
- Grupo experimental 3: Extracto hidroalcohólico de *Roupala montana* Aubl., 25 mg/Kg

2.8.10.1 *Diseño experimental*

Antes de la aplicación de la dosis del tratamiento los animales se pueden encontrar con 12 horas de ayuno, esto ayudará a una mejor absorción del tratamiento. Se procede a la administración de las dosis de los tratamientos antes propuestos. Media hora después de la administración de los tratamientos, se induce el edema en la pata derecha de la rata inyectando 0,1 mL de solución acuosa de carragenina al 0,5%. Las mediciones de las patas inflamadas se obtienen a partir del programa ImageJ, el cual proporciona un área exacta y por lo tanto resultados confiables, para esto se fotografiaron las patas inflamadas de las ratas en un intervalo de tiempo de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas después de la inducción de la inflamación. Los resultados se expresan como porcentaje de inflamación utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inflamación} = \frac{At - Ao}{Ao} \times 100$$

Dónde:

At = área de la pata inflamada a un tiempo x

Ao = área normal (antes de la aplicación de la carragenina)

2.8.10.2 Modelo experimental

Tabla 1-2: Tratamientos a realizar con número de repeticiones.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			
T1	R1	R2	R3	R4
T2	R1	R2	R3	R4
T3	R1	R2	R3	R4
T4	R1	R2	R3	R4
T5	R1	R2	R3	R4
T6	R1	R2	R3	R4

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

Dónde:

T1= Edema plantar

T2= Edema plantar + vehículo

T3= Edema plantar + Fármaco estándar (Diclofenaco sódico 100mg/kg)

T4= Edema plantar+ Dosis equivalente de planta contenida en el extracto: 25 mg/kg

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

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

2.8.11 Análisis estadístico

Para este análisis se utilizó el programa MINITAB versión 2019, por medio del test ANOVA de un factor. Ayudando a identificar si existe diferencia significativa entre grupos de tratamiento investigados, con una probabilidad $p < 0,05$. Realizando el planteamiento de las hipótesis, siendo las siguientes:

H₀: no existe diferencia significativa en cada uno de los tratamientos administrados a los animales de experimentación por medio de la inducción del edema plantar. $P \geq 0,05$

H₁: existe diferencia significativa por lo menos en uno de los tratamientos administrados $p < 0,05$

Si se acepta la hipótesis nula se concluye que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, pero si se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa con la finalidad que uno de los tratamientos tiene diferencia se procede a realizar el test de Tukey-B donde se determina en cuál de los grupos de tratamiento existe una diferencia significativa.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIONES

3.1 Control de calidad de la materia vegetal

Tabla 1-3: Resultados de los parámetros de calidad de hojas de *R. montana* Aubl

Parámetro (%)	<i>Roupala montana</i> Aubl	Valores de referencia de acuerdo a la <i>Real</i> <i>Farmacopea Española 2002</i>
Humedad	7,119±0,111	14
Cenizas totales	3,754±0,094	5
Cenizas solubles en H ₂ O	0,644±0,022	1
Cenizas insolubles en HCl	1,265±0,075	2

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

El control de la calidad de la materia vegetal es fundamental para determinar que se encuentra en óptimas condiciones para la investigación correspondiente. El porcentaje de humedad es el principal responsable en el deterioro de las drogas, así como, en la proliferación de microorganismos. El tener un bajo contenido de agua ayuda a mantener una buena estabilidad de la planta seca. En cambio, las cenizas totales demuestran la presencia de sales minerales e inorgánicas. La ceniza soluble en agua permite conocer la cantidad de sales solubles y el porcentaje de cenizas insolubles en ácido permiten identificar la presencia de carbonatos u oxalatos. Los resultados de las hojas de *Roupala montana* Audb. expresados en la tabla 1-3, muestran que los parámetros de calidad se encuentran dentro de los rangos establecidos por la Farmacopea Española, con un porcentaje de humedad de $7,119 \pm 0,111$ (<14); un porcentaje de cenizas totales $3,754 \pm 0,094$ (<5); un porcentaje de cenizas solubles en H₂O de $0,644 \pm 0,022$ (<1) y un porcentaje de cenizas insolubles en HCl $1,265 \pm 0,075$ (<2), garantizando la idoneidad para ensayos posteriores y descartando la contaminación de la misma por algún objeto extraño.

3.2 Tamizaje Fitoquímico

Para el tamizaje fitoquímico se realizó una extracción continua en solventes de polaridad crecientes (éter, etanol, agua). Esto permitió la extracción e identificación cuantitativa de compuestos tanto hidrófilos como lipófilos, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 2-3: Tamizaje fitoquímico de hojas de *R. montana* Aubl

ENSAYOS	TIPO METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHOLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudan	Aceites y Grasas	+	NA	NA
Dragendorff	Alcaloides	-	-	-
Mayer	Alcaloides	-	-	NA
Wagner	Alcaloides	-	-	-
Baljet	Cumarinas	-	+	NA
Liebermann-Buchard	Triterpenos-Esteroides	+	verde intenso	NA
Catequinas	Catequinas	NA	+	NA
Resinas	Resinas	NA	-	NA
Fehling	Az. Reductores	NA	+	+
Espuma	Saponinas	NA	+	+
Cl ₃ Fe	Fenoles y Taninos	NA	verde intenso	azul
Borntrager	Quinonas	NA	+++	NA
Shinoda	Flavonoides	NA	+++	++
Antocianidina	Flavonoides	NA	+	+
Ninhidrina	Aminoácidos	NA	-	NA
Mucílagos	Polisacáridos	NA	NA	-
Principios amargos	Principios amargos	NA	NA	-

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

La actividad antiinflamatoria se debe a la presencia de flavonoides y fenoles que actúan también como antioxidantes. En el extracto alcohólico la prueba de cloruro férrico da como resultado un verde intenso, demostrando que existe la presencia de taninos de tipo pirocatecólicos y en extracto acuoso presenta una coloración azul determinando la presencia de taninos de tipo pirogalotánicos. En el ensayo de Shinoda que determina la presencia de flavonoides, da como resultado en el extracto alcohólico de las hojas de *R. montana* una gran presencia de este tipo de metabolitos. A sí mismo, en el ensayo de antocianina demuestra la presencia de flavonoides de tipo antocianos

tanto en el extracto alcohólico como en el acuoso. Además, la planta no presenta alcaloides debido a que tanto Dragendorff, Mayer y Wagner dieron resultados negativos.

La capacidad antioxidante de los flavonoides ha sido reconocida en diversos estudios, ya que estos compuestos pueden unirse a las enzimas transportadoras de hormonas y al DNA. Además, pueden quelar iones metálicos como el Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y depurar los radicales libres. Debido a su mecanismo de acción de estos fitoquímicos se han podido usar en patológicas como la diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, úlceras, así también se les ha dado un uso como antialérgicos, antitrombóticos e incluso como antiinflamatorios (Limón et al., 2010, p. 146).

3.3 Estandarización del extracto de *R. montana* Aubl.

Tabla 3-3: Estandarización del extracto hidroalcohólico de *R. montana* Aubl

Parámetro	Resultado
Olor	Herbáceo
Color	Verde oscuro
Sabor	Amargo y astringente
Rendimiento	9,58 %

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

La presencia de astringencia y amargura se debe a la existencia de polifenoles, que se relacionan con la presencia de flavonoides y compuesto fenólicos. Se obtuvo un rendimiento del extracto seco del 9,58%.

3.4 Cromatografía en capa fina (TLC)

Se realizó la cromatografía en capa fina con la finalidad de determinar que posibles compuestos presentes en las hojas de *R. montana*, cuyo resultado se muestran a continuación:

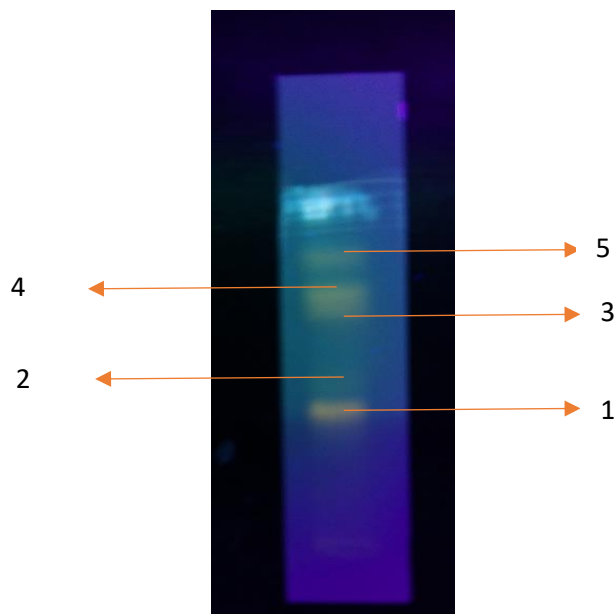


Figura 1-3. Cromatografía capa fina del extracto hidroalcohólico de *R. montana* Aubl

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

Tabla 4-3: Compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *R. montana* Aubl

MUESTRA	COMPUESTO	Rf	POSIBLE COMPUESTO IDENTIFICADO
Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Roupala montana</i> Aubl.	1	0,40	Q-3-O-rutinosida (rutin)
	2	0,45	Ácido clorogénico
	3	0,63	Q-3-O-galactosida (hiperosido)
	4	0,71	Q-3-O-glucosido vitexina
	5	0,82	Ácido isoclorogénico

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

Se ha utilizado como reseña literaria al libro de Wagner y Bladt (2001) que en su trabajo menciona los Rf de referencia de la mayoría de los flavonoides. Pudiendo identificar los 5 Rf que presenta la planta: rutina, hiperósido, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico y por último dos compuestos que comporten el mismo Rf que puede ser Q-3-O-glucósido o la vitexina.

Según estudios realizados por Oliveira et al. (2014, p.98) determinaron en el estudio fitoquímico de la planta *Roupala montana* por HPLC la presencia de flavonoides,

- quercetina 3-Ob-D-glucósido
- quercetina 3-ObD-glucopiranosil-(1-2)-a-L-rhamnopyranoside

- isorhamnetin 3-ObD-glucopyranosyl- (1- 2) -aL-rhamnopyranoside.

En especial la vitexina es una flavona que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento o proliferación de células tumorales malignas. Posee además actividad antioxidante bloqueando los radicales libres y la oxidación. Su poder para eliminar el dolor y la inflamación se debe a que produce inhibición de las citoquinas, células inflamatorias y hematopoyéticas (Zhang, Jiao y Liu , 2010).

3.5 Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó mediante método espectrofotométrico, basado en una reacción colorimétrica de óxido reducción, siendo el reactivo de Folin-Ciocalteu el agente oxidante. Para esto, se elaboró primero una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar, con concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, como se observa en la tabla 4-3 y en el gráfico 1-3. Se obtuvo la ecuación de la recta $y = 0.0008x + 0.0133$, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9992$, indicando una buena correlación entre las variables.

Tabla 5-3: Resultados de la absorbancia del estándar ácido gálico

[] ppm	Absorbancia
20	0,029
40	0,046
60	0,06
80	0,077
100	0,093

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

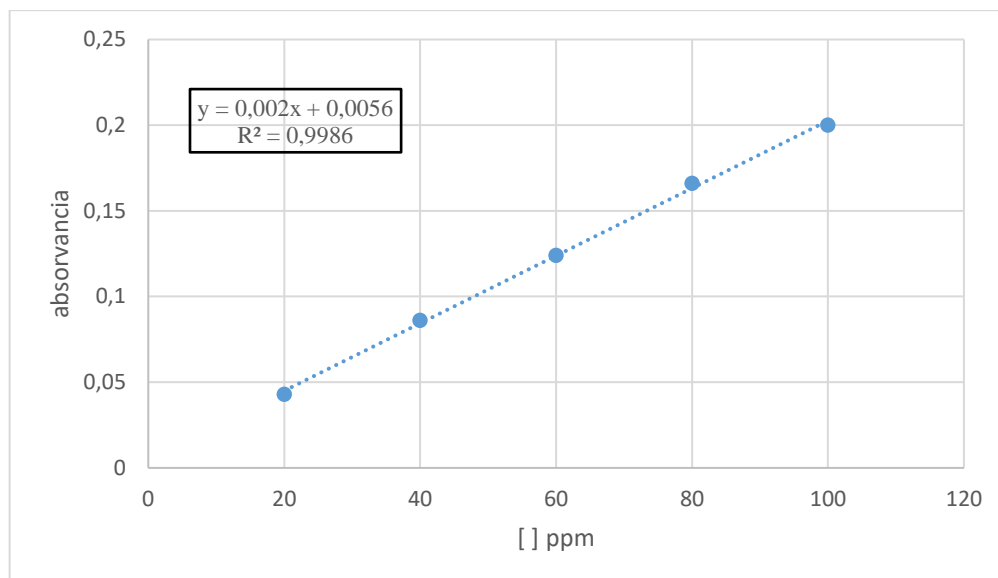


Gráfico 1-3: Curva de calibración de las absorbancias del estándar de ácido gálico.

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

La concentración de fenoles totales de las hojas de la planta *R. montana*. se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto seco (mg EAG/g extracto seco), como se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 6-3: Resultados del contenido de fenoles totales del extracto seco de *R. montana* Audb.

Sustancia	mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco
Extracto seco	5274,6±236

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

Se determinó que la cantidad de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de la planta *Roupala montana* Aubl. fue de 5274,6±236 mg EAG/g de extracto seco. Siendo que estos compuestos resultan de reemplazar un hidrógeno o más de su anillo aromático por uno o más OH, por lo cual, presentan una actividad antioxidante y antiinflamatoria.

3.6 Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó mediante método espectrofotométrico, basado en la formación de un complejo entre los flavonoides y el tricloruro de aluminio, dando como resultado una solución de color rosada.

Para esto se elaboró primero una curva de calibración utilizando quercetina como estándar, con concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, como se observa en la tabla 7-3 y en el gráfico 2-3. Dando como resulta la ecuación de la recta $y = 0.002x + 0.0056$, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.999$, indicando una buena correlación entre las variables.

Tabla 7-3: Resultados de la absorbancia del estándar quercetina

[] ppm	Absorbancia
20	0,043
40	0,086
60	0,124
80	0,166
100	0,200

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

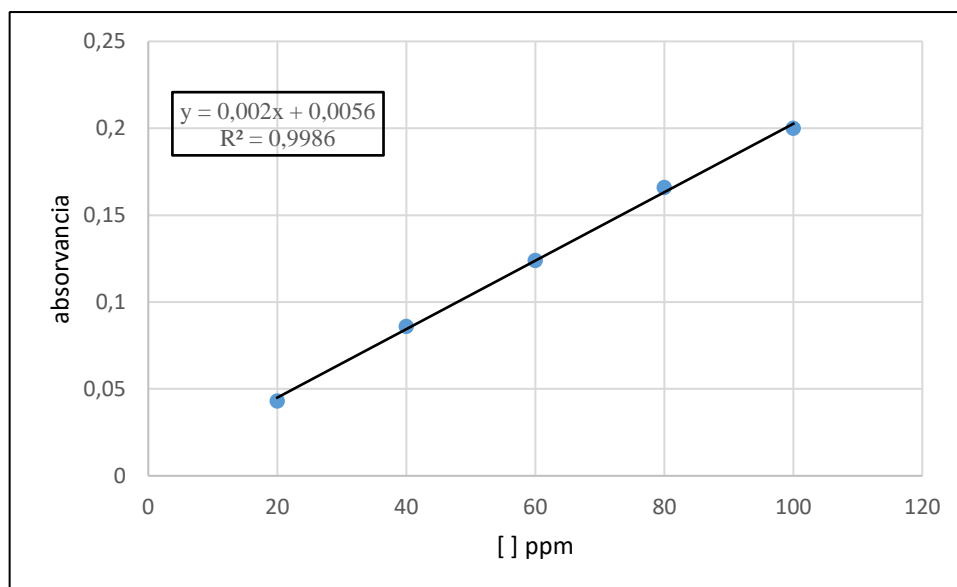


Gráfico 2-3: Curva de calibración de las absorbancias del estándar de quercetina.

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

La concentración de flavonoides totales de las hojas de la planta *R. montana* Aubl. se expresó como mg de equivalentes de quercetina por gramos de extracto seco (mg EQ/g extracto seco), como se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 8-3: Resultados del contenido de flavonoides totales del extracto seco de *R. montana* Aubl.

Sustancia	mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco
Extracto seco	1439,11±14,15

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

Se determinó que la cantidad de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de la planta *Roupala montana* Audl. fue de 1439,11±14,15 mg EAG/g de extracto seco.

De acuerdo a investigaciones realizadas por Oliveira et al., (2014) determinaron en el estudio fitoquímico de la planta *Roupala montana* por HPLC la presencia de flavonoides, quercetina 3-Ob-D-glucósido, quercetina 3-ObD-glucopiranosil- (1-2) -a-Lrhamnopyranoside e isorhamnetin 3-ObD-glucopyranosyl- (1- 2) -aL-rhamnopyranoside.

La presencia de flavonoides en el extracto hidroalcohólico se puede relacionar con actividad antiinflamatoria. Como menciona Martínez et al., (2002), los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Además, de que poseen la capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides, dando como resultado una actividad antiinflamatoria.

3.7 Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH

Tabla 9-3: Capacidad captadora de radical libre DPPH de ácido ascórbico.

Concentración, µg/mL	Captación de radical libre, %
0.25	6.90±0.84 ^a
0.50	17.27±1.06
1.50	34.60±1.01
2.50	47.23±0.81 ^b
3.50	67.69±0.26
5.00	85.85±0.31
IC ₅₀ = 1.92±0.057	

Realizado por: (Reyes, 2019, p.54)

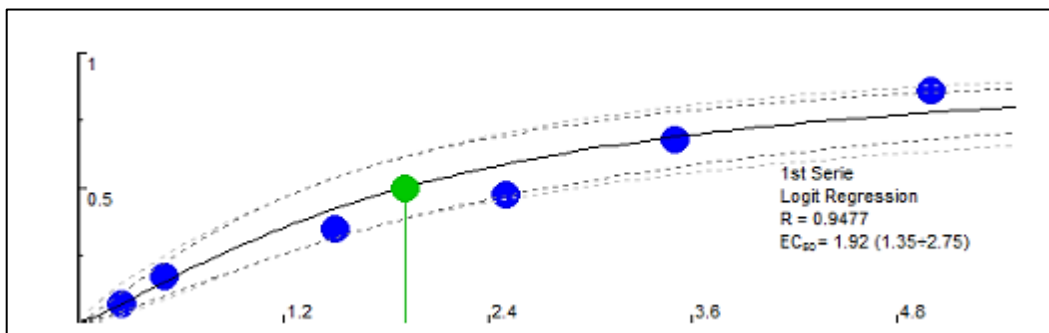


Gráfico 3-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC₅₀ de ácido ascórbico
Realizado por: (Reyes, 2019, p.54)

Tabla 10-3: Capacidad captadora de radical libre DPPH del extracto de *R. montana* Aubl.

Concentración µg/ml	Captación de radical libre, %
0,5	2,04±1,20
2,5	25,17±0,50
5,0	48,76±0,40
15,0	68,73±4,44
25,0	76,14±0,40
50,0	89,83±0,40
IC ₅₀ = 7.87	

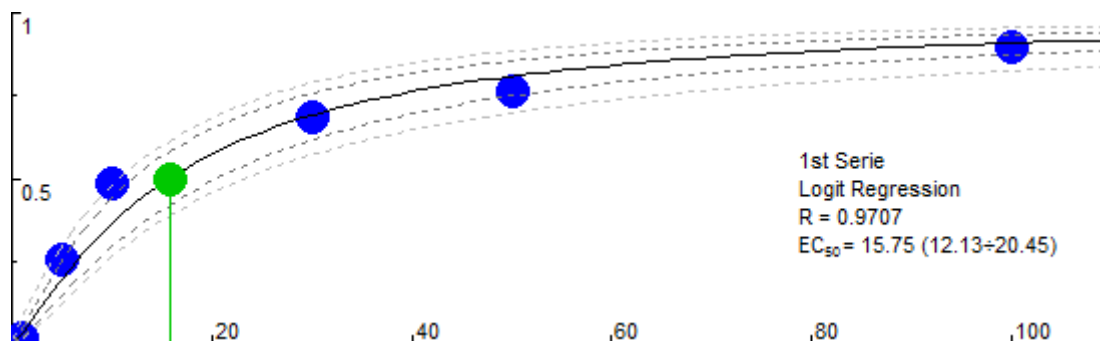


Gráfico 4-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC₅₀ del extracto de *R. montana* Aubl.

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

En correspondencia al ensayo de DPPH, el valor de IC₅₀ para el control positivo (ácido ascórbico) es menor al del extracto de *R. montana* Aubl., lo que implica que el ácido ascórbico tiene una mayor capacidad de captación de radical libre DPPH* con respecto al extracto seco de *R. montana* Aubl.

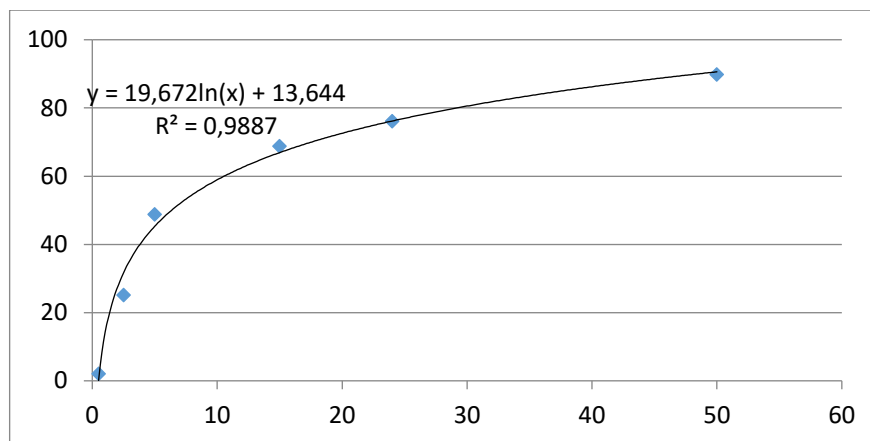


Gráfico 5-3: Porcentaje de captación de radicales DPPH según la concentración del extracto.

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

El poder antioxidante se debe a la capacidad de eliminar los radicales libres del agente oxidante. La gráfica 5-3 demuestra que el porcentaje de captación de radicales libres va aumentando según la concentración del extracto sea más alta.

3.8 Actividad antiinflamatoria *in vivo*

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria del extracto de hojas de *Roupala montana* Aubl. se utilizó el modelo experimental descrito en la tabla 1-2. Recolectando datos en diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6). Utilizando como modelo animal a ratones machos con peso de entre 20 y 25 g los cuales se escogieron aleatoriamente, para después ser codificados (pintando sus colas de diferentes colores) según el tratamiento que le correspondiese. Dando como resultado la tabla 11-3 que expresa el porcentaje de inflamación en cada tiempo.

Tabla 11-3: Porcentaje de inflamación de los tratamientos utilizados en los diferentes tiempos de medición.

PORCENTAJE DE INFLAMACIÓN						
TRATAMIENTO	TIEMPO DE MEDICIÓN					
	tiempo1	tiempo2	tiempo3	tiempo4	tiempo5	tiempo6
Control (carragenina)	22,06	37,42	44,42	43,38	40,67	38,52
Blanco (vehículo)	23,73	37,96	45,90	45,68	38,95	37,30
diclofenaco sódico 100mg/kg	22,67	42,93	27,12	10,61	7,01	1,50
ERmA. 25mg/kg	31,05	53,79	39,45	31,58	16,24	11,53
ERmA. 100mg/kg	27,15	51,41	28,67	10,71	7,29	2,63
ERmA. 300mg/kg	29,92	37,33	21,05	4,49	2,19	0,70

ERmA. (extracto de *Roupala montana* Audl.)

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

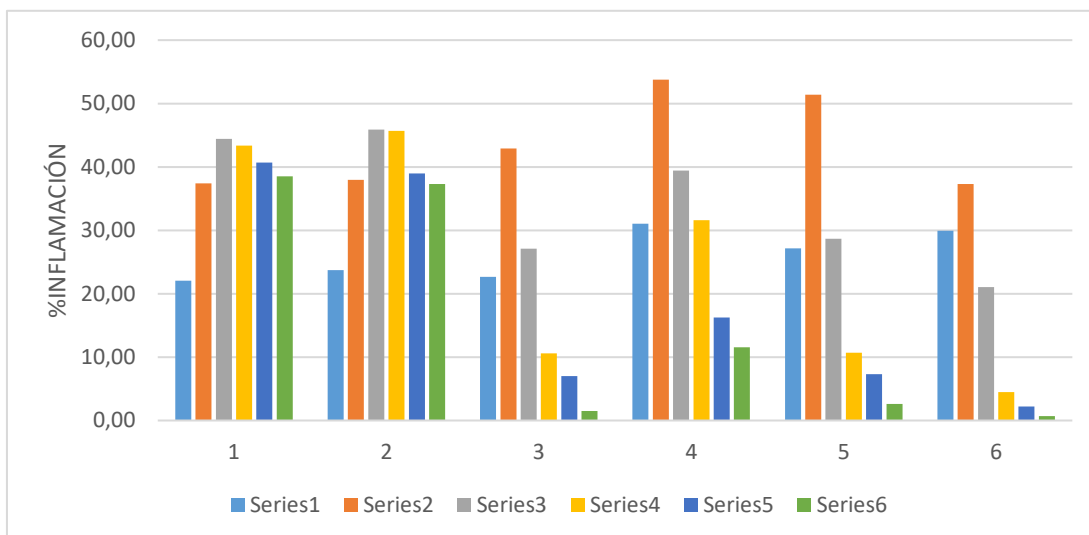


Gráfico 6-3: Porcentaje de inflamación de los tratamientos utilizados en los diferentes tiempos de medición.

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

La tabla 11-3 muestra que efectivamente existe una actividad antiinflamatoria tanto del estándar (diclofenaco 100 mg/kg) y de los tratamientos del extracto seco de *R. montana* Audl. (25 mg/kg, 100 mg/kg y 300 mg/kg). Se observa que desde la medición t3 (3 horas después de la inducción de la inflamación) ya presentan una disminución de la inflamación. A diferencia del control y el blanco que desde t4 empieza a disminuir, pero en pequeño porcentaje. Esto puede deberse al sistema inmune propio del ratón que actúan para restaurar el tejido que fue atrofiado intencionalmente por carragenina.

En la gráfica 6-3, se observa de forma más visual cómo va disminuyendo la inflamación, determinando que los tres tratamientos de las hojas en estudio a diferentes dosis (25 mg/kg, 100 mg/kg y 300 mg/kg) presentan una actividad antiinflamatoria, lo cual se corrobora con los ensayos realizados anteriormente, en los que demuestran que, el extracto seco contiene una cantidad enorme de flavonoide y fenoles. Siendo estos los principales responsables para que la planta posea actividad antiinflamatoria.

3.8.1 Análisis estadístico

Se realizó el test de ANOVA de los tratamientos de la medición 6, debido a que es el tiempo donde se observa un menor porcentaje de inflamación. Para determinar si $p \geq 0,05$ se acepta la hipótesis nula concluyendo que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, pero si $p < 0,05$ se procede a realizar el test de Tukey-B donde se determina en cuál de los grupos de tratamiento existe una diferencia significativa. Dando como resultado la siguiente tabla

Tabla 12-3: Análisis estadístico Test de ANOVA para los tratamientos en el tiempo de medición 6 (t6)

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	4992,65	99,41%	4992,65	998,529	405,16	0,000
Error	12	29,57	0,59%	29,57	2,465		
Total	17	5022,22	100,00%				

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

Según el análisis realizado con un nivel de confianza del 95% dio como resultado que $p < 0,05$, por lo que se procede a rechazar la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa que menciona que existe diferencia significativa por lo menos en uno de los tratamientos administrados.

Se procede a realizar el test de Tukey con una confianza del 95% para determinar en cuál de los tratamientos existe una diferencia significativa. Dando como resultado las siguientes tablas:

Tabla 13-3: Análisis estadístico Test de Tukey de la medición 6

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Blanco (vehí - Control (car	0,18	1,28	(-4,13; 4,48)	0,14	1,000
Diclofenaco - Control (car	-37,02	1,28	(-41,32; -32,71)	-28,88	0,000
ERmA. 25mg/k - Control (car	-26,99	1,28	(-31,30; -22,69)	-21,06	0,000
ERmA. 100mg/ - Control (car	-35,89	1,28	(-40,19; -31,58)	-28,00	0,000
ERmA. 300mg/ - Control (car	-37,82	1,28	(-42,12; -33,51)	-29,50	0,000
Diclofenaco - Blanco (vehí	-37,20	1,28	(-41,50; -32,89)	-29,02	0,000
ERmA. 25mg/k - Blanco (vehí	-27,17	1,28	(-31,47; -22,86)	-21,20	0,000
ERmA. 100mg/ - Blanco (vehí	-36,06	1,28	(-40,37; -31,76)	-28,13	0,000
ERmA. 300mg/ - Blanco (vehí	-37,99	1,28	(-42,30; -33,69)	-29,64	0,000
ERmA. 25mg/k - Diclofenaco	10,03	1,28	(5,72; 14,33)	7,82	0,000
ERmA. 100mg/ - Diclofenaco	1,13	1,28	(-3,17; 5,44)	0,88	0,943
ERmA. 300mg/ - Diclofenaco	-0,80	1,28	(-5,10; 3,51)	-0,62	0,987
ERmA. 100mg/ - ERmA. 25mg/k	-8,90	1,28	(-13,20; -4,59)	-6,94	0,000
ERmA. 300mg/ - ERmA. 25mg/k	-10,83	1,28	(-15,13; -6,52)	-8,45	0,000
ERmA. 300mg/ - ERmA. 100mg/	-1,93	1,28	(-6,24; 2,37)	-1,51	0,667

Nivel de confianza individual = 99,43%. ERmA (extracto de *Roupala montana* Audl.)

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

Tabla 14-3: Análisis de las medias que son significativamente diferentes.

Factor	N	Media	Agrupación
Control (carragenina)	3	38,70	A
Blanco (vehículo)	3	38,520	A
ERmA. 25mg/kg	3	11,529	B
ERmA. 100mg/kg	3	2,634	C
Diclofenaco 100mg/kg	3	1,500	C
ERmA. 300mg/kg	3	0,703	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. ERmA (extracto de Roupala montana Audl.)

Realizado por: Zurita S., Bryan, 2019

Mediante el test de Tukey se determinó qué tratamientos fueron significativamente diferentes y los que tenían una estrecha relación. La tabla 14-3 muestra que el control y el blanco son diferentes a los demás tratamientos, debido a que estos no presentaron desinflamación. El tratamiento ERmA. de 25 mg/kg es diferente a todos, ya que, a pesar de presentar actividad antiinflamatoria esta no fue tan efectiva como los demás. En cambio, tanto el tratamiento de 100 mg/kg y 300 mg/kg de ERmA. no presentan diferencias significativas con el estándar escogido (Diclofenaco 100mg/kg), dando a entender que, son tan efectivos que el estándar.

3.9 Discusión

De los diferentes análisis y test estadísticos realizados se ha podido determinar que el extracto seco de las hojas de la planta *Roupala montana* Audl. posee actividad antiinflamatoria. Teniendo como resultado que todos los tratamientos del extracto en sus diferentes dosificaciones tuvieron una muy buena respuesta antiinflamatoria. Mencionando que el tratamiento del extracto con dosis de 300 mg/kg fue más efectivo que el estándar utilizado (diclofenaco sódico 100 mg/kg).

Según la literatura no existe estudios específicos sobre la actividad antiinflamatoria de la planta. De acuerdo a la bibliografía analizada mencionan que el extracto vegetal posee una alta actividad antioxidante. Que va ligada a que posee gran cantidad de flavonoides y fenoles, que son los responsables de que exista una respuesta antiinflamatoria. Esta aseveración, está sustentada en el estudio realizado por Oliveira et al. (2014) que evaluaron la antigenotoxicidad del extracto de *Roupala montana* en los ensayos de micronúcleos y cometas de ratones, en el cual identificaron por HPLC la presencia de flavonoides,

- quercetina 3-Ob-D-glucósido,
- quercetina 3-ObD-glucopiranosil- (1-2) -a-Lrhamnopyranoside
- isorhamnetin 3-ObD-glucopyranosyl- (1- 2) -aL-rhamnopyranoside.

CONCLUSIONES

- Una vez realizado el control de calidad de las hojas de *Roupala montana* Aubl., se pudo determinar que cumple con los límites establecidos por la Farmacopea Española para los parámetros de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido, presentando una calidad idónea para el estudio.
- El tamizaje fotoquímico de las hojas de *Roupala montana* Aubl determinó la presencia de metabolitos secundarios relacionados con la respuesta antiinflamatoria como: flavonoides, taninos de tipo pirocatecólicos y pirogalotánicos, triterpenos, quinonas, azúcares reductores, saponinas y cumarinas.
- Mediante el método de Folin-Ciocalteu, se determinó que la concentración de fenoles en la especie estudiada fue de $5274,6 \pm 236$ mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco, demostrando que posee una gran cantidad de fenoles totales.
- Se determinó una concentración de flavonoides totales del extracto seco de las hojas de *Roupala montana* Aubl. de $1439,11 \pm 14,15$ mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco, siendo una planta rica en flavonoides.
- Se demostró que el extracto seco de las hojas de *R. montana* Aubl. posee capacidad antioxidante, demostrado mediante el método DPPH, siendo la concentración media inhibitoria IC50 de $7,87 \mu\text{g/mL}$.
- Mediante los diferentes análisis y test estadísticos realizados se determinó que el extracto seco de las hojas de la planta *R. montana* Aubl posee actividad antiinflamatoria, siendo la dosis de 300 mg/kg la más efectiva, incluso más que el estándar utilizado. Cabe recalcar que todas las dosificaciones utilizadas (25,100 y 300 mg/kg) tuvieron actividad antiinflamatoria en cierto grado.

RECOMENDACIONES

- Dado el potencial antioxidante y antiinflamatorio que posee la planta, se recomienda que se realicen estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar su actividad como anticancerígeno.
- Se recomienda se realicen estudios de toxicidad para determinar la seguridad el extracto para futuras aplicaciones en la industria farmacéutica.
- Es fundamental reducir significativamente la presencia de luz al momento de realizar los estudios de flavonoides, fenoles y antioxidantes, para evitar lecturas erróneas.
- Ampliar la investigación utilizando otros métodos para corroborar la actividad antiinflamatoria de la planta y así encaminar para la realización de un fitofármaco.

BIBLIOGRAFIA

BARASSI, N., BENAVIDES, F. y CECCARELLI, A., 1996. ETICA EN EL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION. *MEDICINA*, vol. 56, no. 5/1, pp. 3.

BATLOUNI, M., 2010. Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. , pp. 538-546.

BORDÉS, R., MARTÍNEZ, M., GARCÍA, E. y GUIADO, R., 1999. EL PROCESO INFLAMATORIO. , pp. 4.

DICLOFENACO EN VADEMECUM. *Vademecum* [en línea], 2014. [Consulta: 26 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/d020.htm>.

GARCÍA, A., LÓPEZ, J. y SÁNCHEZ, M., 2000. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Med. intensiva (Madr., Ed. impr.)*, vol. 24, no. 8, pp. 353-360. ISSN 0210-5691.

GARCÍA ALONSO, I., 1998. INFLAMACION. *Inflamacion y Cirugia*, vol. 1, pp. 1-3.

GARCÍA BACALLAO, L., ROJO DOMÍNGUEZ, D.M., GARCÍA GÓMEZ, L.V. y HERNÁNDEZ ÁNGEL, M., 2002. Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 21, no. 3, pp. 214-216. ISSN 0864-0300.

GOMES CASTRO, A.J., E. P. WILL CASTRO, L.S., NASCIMENTO SANTOS, M.S.N., FAUSTINO, M.G.C., PINHEIRO, T.S., GUERRA DORE, C.M.P., BASEIA, I.G. y LISBOA LEITE, E., 2014. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and antioxidant activities of polysaccharide-rich extract from fungi *Caripia montagnei*. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, vol. 4, no. 2, pp. 121-129. ISSN 2210-5239. DOI 10.1016/j.bionut.2013.08.004.

GÓMEZ, J., SANTOS, G., MARTÍN, R., CORTÉS, R. y ÁLVAREZ, A., 2008. Capítulo 26: Antiinflamatorios no esteroideos. *Enfermedades reumáticas: Actualización SVR* [en línea]. Sociedad Valenciana de Reumatología. Valencia: IBÁÑEZ&PLAZA ASOCIADOS S.L, pp. 469-476. Disponible en: <https://svreumatologia.com/wp-content/uploads/2008/04/Cap-26-Antiinflamatorios-no-esteroideos.pdf>.

HIDALGO, B.M., 2019. *Evaluación de la seguridad in vitro de los extractos de Oreocallis grandiflora (Lam.) R.Br. y Passiflora manicata (Juss.) Pers., para su potencial aplicación en protectores solares.* [en línea]. Experimental. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de

Chimborazo. Disponible en:
<http://dspace.espe.edu.ec/bitstream/123456789/9707/1/56T00841.pdf>.

Inflamación crónica. *Instituto Nacional del Cáncer* [en línea], 2015. [Consulta: 26 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/inflamacion-cronica>.

LANAS, A., 2001. Efectos secundarios gastrointestinales por antiinflamatorios no esteroideos y costes en el Sistema Nacional de Salud. *ANALES DE MEDICINA INTERNA*, vol. 18, no. 11, pp. 561-563. ISSN 0212-7199.

LEÓN, M., ALVARADO, A., VARENS, J.A., ARMAS, J., MIRANDA, L. y CUESTA, J., 2015. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares Inflammatory Acute Response. Biochemical and Cellular Considerations. *Revista Finlay*, vol. 5, no. 1, pp. 47-62. ISSN 2221-2434.

LIMÓN, D., DÍAZ, A., MENDIETA, L., LUNA, F., ZENTENO, E. y GUEVARA, J., 2010. LOS FLAVONOIDES: MECANISMO DE ACCIÓN, NEUROPROTECCIÓN Y EFECTOS FARMACOLÓGICOS. , pp. 13.

LOZA, E., 2011. AINES en la práctica clínica: lo que hay que saber. *I.T del Sistema Nacional de Salud.*, vol. 35, no. 3, pp. 88-95.

MARTÍNEZ, S., GONZÁLEZ, J., CULEBRAS, J.M. y TUÑÓN, M.J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, pp. 271-278. ISSN 0212-1611.

MIRANDA, M. y CUÉLLAR, A., 2011. *Farmacognosia y productos naturales*. 1. La Habana: Editorial Félix Varela. ISBN 978-959-258-129-6.

MONTERO GONZÁLEZ, T., HURTADO DE MENDOZA AMAT, J. y CABRERA ROSELL, P., 2001. Daño múltiple de órganos: Morfología de la respuesta inflamatoria sistémica. *Revista Cubana de Medicina Militar*, vol. 30, pp. 77-88. ISSN 0138-6557.

OLIVEIRA, P.F. de, ACÉSIO, N.O., LEANDRO, L.F., CUNHA, N.L., UCHÔA, C.J. de M., JANUÁRIO, A.H. y TAVARES, D.C., 2014. Antigenotoxicity of Roupala montana extract in the mouse micronucleus and comet assays. *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 37, no. 1, pp. 93-99. ISSN 0148-0545. DOI 10.3109/01480545.2013.834346.