



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
CITOTOXICIDAD *in vitro* DE *Bidens andicola*”.**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: LÓPEZ ROMO ESTEFANÍA BELÉN

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

Riobamba-Ecuador

2016

© 2016, Estefanía Belén López Romo

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

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

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTOXICIDAD *in vitro* DE *Bidens andicola*” de responsabilidad de la señorita egresada Estefanía Belén López Romo, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza, M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Lcda. Karen Acosta, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Adriana Rincón.

DELEGADO(A) DEL DECANO

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

NOTA DE TRABAJO DE TITULACIÓN

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

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

Riobamba, 26 de octubre de 2016

ESTEFANÍA BELÉN LÓPEZ ROMO
180466444-7

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación realizado lo dedico en primer lugar a Dios, por darme la fuerza para seguir adelante ante todos los obstáculos que han existido en el camino y por darme señales de que siempre está conmigo.

A mi madre Marlene, por darme el apoyo tanto emocional como económico para poder cumplir todas mis metas y mis sueños y por estar siempre conmigo sin importar la magnitud de los problemas.

A mi padre Luis, por apoyarme y por preocuparse siempre por mí.

A mi familia, tíos, tías, primos y primas que siempre han estado presentes para ayudarme y apoyarme con sus consejos y con su comprensión, guiándome al igual que mis padres en el camino para poder cumplir con mis metas.

A mis profesores, que fueron una guía durante el transcurso de mi carrera y que me inculcaron el amor y la pasión por la misma.

Estefanía.

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por haber sido el pilar fundamental de mi formación profesional y haberme ayudado a llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

Agradezco, además, a mi tutor BQF. Diego Vinueza por haber guiado el presente trabajo de investigación y haberme ayudado con las inquietudes que se han presentado durante el desarrollo del mismo y de igual forma a la Lcda. Karen Acosta por haberme guiado con la escritura de dicho trabajo, colaborando así con la finalización de la investigación.

Estefanía.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. <i>Bidens andicola</i>	5
1.1.1. <i>Usos terapéuticos</i>	5
1.1.2. <i>Composición, principios activos y actividad farmacológica relacionada</i>	6
1.2. Flavonoides	7
1.2.1. <i>Estructura Química</i>	7
1.2.2. <i>Metabolismo de los flavonoides</i>	8
1.2.3. <i>Mecanismo antiinflamatorio de los flavonoides</i>	9
1.2.4. <i>Toxicidad de los flavonoides</i>	9
1.3. Inflamación	9
1.3.1. <i>Fases de la inflamación</i>	10
1.3.1.1. <i>Liberación de mediadores de la inflamación</i>	10
1.3.1.2. <i>Efecto de los mediadores de la inflamación</i>	11
1.3.1.3. <i>Llegada de moléculas y células inmunes al lugar de la inflamación</i>	12
1.3.1.4. <i>Regulación de la respuesta inflamatoria</i>	13
1.3.1.5. <i>Proceso de reparación</i>	13
1.3.2. <i>Tipos de inflamación</i>	14
1.3.2.1. <i>Inflamación aguda</i>	14
1.3.2.2. <i>Inflamación crónica</i>	14
1.3.3. <i>Finalidad de la inflamación</i>	14
1.4. Antiinflamatorios no esteroideos	15
1.4.1. <i>Mecanismo de acción</i>	15
1.4.2. <i>Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos</i>	15
1.4.3. <i>Efectos adversos</i>	16
1.5. <i>Ácido acetilsalicílico</i>	17

1.5.1.	<i>Efecto terapéutico</i>	17
1.5.2.	<i>Mecanismo de acción</i>	17
1.5.3.	<i>Posología</i>	17
1.5.4.	<i>Reacciones adversas</i>	17
1.6.	Estudios <i>in vitro</i> que evalúan la actividad antiinflamatoria	18
1.6.1.	<i>Ensayos in vitro colorimétricos con sales de tetrazolio</i>	18
1.6.2.	<i>Ensayos in vitro mediante cuantificación de enzimas y mediadores de la inflamación</i>	19
1.7.	Estudios <i>in vitro</i> que evalúan la citotoxicidad	19
1.7.1.	<i>Viabilidad Celular</i>	19
1.7.2.	<i>Estudios in vitro colorimétricos con sales de tetrazolio</i>	19
1.7.3.	<i>Estudios in vitro con azul de triptano</i>	20
1.7.4.	<i>Bioensayo de toxicidad en Artemia salina</i>	20
CAPÍTULO II		
2.	MARCO METODOLÓGICO	21
2.1.	Lugar de la investigación	21
2.2.	Recolección del material vegetal	21
2.3.	Identificación del material vegetal	21
2.4.	Materiales, equipos y reactivos	21
2.4.1.	<i>Material Vegetal</i>	21
2.4.2.	<i>Material Biológico</i>	22
2.4.3.	<i>Material farmacológico</i>	22
2.4.4.	<i>Materiales de laboratorio utilizados</i>	22
2.4.5.	<i>Equipos</i>	24
2.4.6.	<i>Reactivos</i>	25
2.5.	Técnicas y métodos	26
2.5.1.	<i>Determinación de los parámetros de control de calidad de droga cruda</i>	26
2.5.1.1.	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	26
2.5.1.2.	<i>Determinación de cenizas totales</i>	27
2.5.1.3.	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	28
2.5.1.4.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	29
2.5.2.	<i>Tamizaje fitoquímico</i>	30
2.5.2.1.	<i>Ensayo de Sudán</i>	33
2.5.2.2.	<i>Ensayo de Dragendorff</i>	33
2.5.2.3.	<i>Ensayo de Mayer</i>	33
2.5.2.4.	<i>Ensayo de Wagner</i>	33

2.5.2.5.	<i>Ensayo de Baljet</i>	33
2.5.2.6.	<i>Ensayo de Liebermann-Burchard</i>	34
2.5.2.7.	<i>Ensayo de resinas</i>	34
2.5.2.8.	<i>Ensayo de la espuma</i>	34
2.5.2.10.	<i>Ensayo de Shinoda</i>	35
2.5.2.11.	<i>Ensayo de Catequinas</i>	35
2.5.2.12.	<i>Ensayo de Borntrager</i>	35
2.5.2.13.	<i>Ensayo de Fehling</i>	36
2.5.3.	<i>Preparación del extracto hidroalcohólico de Bidens andicola</i>	36
2.5.4.	<i>Control de calidad del extracto hidroalcohólico de Bidens andicola</i>	37
2.5.4.1.	<i>Requisitos organolépticos</i>	37
2.5.4.2.	<i>Determinación de densidad relativa</i>	37
2.5.4.3.	<i>Índice de refracción</i>	38
2.5.4.4.	<i>Medición del pH</i>	38
2.5.4.5.	<i>Determinación de sólidos totales</i>	39
2.5.5.	<i>Cromatografía en capa fina</i>	40
2.5.5.1.	<i>Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica del extracto hidroalcohólico</i>	40
2.5.5.2.	<i>Cromatografía en capa fina del extracto hidrolizado</i>	41
2.5.6.	<i>Aislamiento, purificación e identificación del compuesto aislado</i>	42
2.5.6.1.	<i>Cromatografía en capa fina del compuesto aislado</i>	43
2.5.6.2.	<i>Espectroscopia UV del compuesto aislado</i>	44
2.5.6.3.	<i>Análisis infrarrojo</i>	44
2.5.7.	<i>Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu</i>	44
2.5.8.	<i>Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico</i>	45
2.5.9.	<i>Ensayo antiinflamatorio y citotóxico</i>	45
2.5.9.1.	<i>Aislamiento de neutrófilos</i>	46
2.5.9.2.	<i>Ensayo antiinflamatorio in vitro</i>	47
2.5.9.3.	<i>Ensayo de citotoxicidad in vitro</i>	48
CAPÍTULO III		
3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
3.1.	Parámetros de control de calidad de la droga cruda	50
3.2.	Tamizaje fitoquímico	51
3.3.	Control de calidad del extracto hidroalcohólico de <i>B. andicola</i>	53
3.4.	Cromatografía en capa fina	54
3.4.1.	<i>Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica del extracto hidroalcohólico</i>	

<i>no hidrolizado</i>	54
3.4.2. <i>Cromatografía en capa fina del extracto etanólico hidrolizado</i>	55
3.5. Aislamiento, purificación e identificación del compuesto flavónico	57
3.5.1. <i>Cromatografía en capa fina del compuesto aislado</i>	57
3.5.2. <i>Espectroscopia UV</i>	58
3.5.3. <i>Análisis infrarrojo</i>	61
3.6. Cuantificación de fenoles por el método de Folin - Ciocalteau	62
3.7. Cuantificación de flavonoides totales	62
3.8. Ensayo antiinflamatorio y citotóxico <i>in vitro</i>	63
3.8.1. <i>Ensayo antiinflamatorio in vitro</i>	63
3.8.2. <i>Ensayo citotóxico in vitro</i>	67
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Descripción botánica de <i>Bidens andicola</i>	5
Tabla 2-1	Clasificación química de los Antiinflamatorios no esteroides	16
Tabla 1-2	Descripción de los materiales de laboratorio utilizados	22
Tabla 2-2	Equipos utilizados en la investigación	24
Tabla 3-2	Descripción de los reactivos utilizados	25
Tabla 4-2	Esquema para la realización del ensayo antiinflamatorio <i>in vitro</i> de <i>Bidens andicola</i>	47
Tabla 5-2	Esquema para la realización del ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> de <i>Bidens andicola</i>	49
Tabla 1-3	Resultados obtenidos del control de calidad de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	50
Tabla 2-3	Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	51
Tabla 3-3	Determinación de los parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	53
Tabla 4-3	Resultados de la cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	55
Tabla 5-3	Resultados de la cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i> , del extracto hidrolizado	56
Tabla 6-3	Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	62
Tabla 7-3	Resultados de la cuantificación de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	63
Tabla 8-3	Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto	64
Tabla 9-3	Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> , expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del compuesto aislado	66
Tabla 10-3	Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> , expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del compuesto aislado	68

Tabla 11-3 Resultados de la evaluación de la citotoxicidad in vitro expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del compuesto aislado	70
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Flor de <i>Bidens andicola</i>	6
Figura 2-1 Estructura básica de un flavonoide.....	8
Figura 3-1 Cuadro de las células que intervienen en el proceso inflamatorio	10
Figura 4-1 Figura de las vías que activan a las células que intervienen en el proceso inflamatorio	14
Figura 5-1 Mecanismo de acción de los Antiinflamatorios no esteroideos	15
Figura 1-2 Protocolo para elaborar los extractos para el tamizaje fitoquímico	31
Figura 2-2 Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.....	32
Figura 3-2 Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico	32
Figura 4-2 Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.....	32
Figura 5-2 Protocolo de elaboración del extracto etanólico de <i>B. andicola</i>	37
Figura 6-2 Obtención del extracto hidrolizado de <i>B. andicola</i>	41
Figura 7-2 Diagrama del procedimiento de aislamiento y purificación del flavonoide aislado de <i>Bidens andicola</i>	43
Figura 8-2 Obtención del extracto liofilizado de <i>Bidens andicola</i>	46
Figura 1-3 Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de <i>Bidens andicola</i> , vista a la lámpara UV 254nm (A) y revelados con AlCl ₃ (B)	54
Figura 2-3 Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos del extracto hidrolizado de <i>Bidens andicola</i> , vista a la lámpara UV 254nm (A) y revelados con AlCl ₃ (B)	56
Figura 3-3 Cromatografía en capa fina del compuesto aislado, visto a la lámpara UV 254nm	57
Figura 4-3 Barrido UV de 200-500nm del compuesto aislado en metanol a 100ppm sin reactivos de desplazamiento.....	58
Figura 5-3 Barrido UV de 200-500nm del compuesto aislado en metanol a 100ppm con acetato de sodio.....	59
Figura 6-3 Barrido UV de 200-500nm del compuesto aislado en metanol a 100ppm con tricloruro de aluminio.....	60
Figura 7-3 Barrido UV de 200-500nm del compuesto aislado en metanol a 100ppm con tricloruro de aluminio y ácido clorhídrico.....	60
Figura 8-3 Espectro IR del compuesto aislado de <i>Bidens andicola</i>	61
Figura 9-3 Curva obtenida del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto hidroalcohólico.....	64

Figura 10-3 Curva obtenida del porcentaje de inhibición inflamatoria del compuesto aislado	66
Figura 11-3 Curva obtenida del porcentaje de viabilidad celular del extracto hidroalcohólico.....	68
Figura 12-3 Curva obtenida del porcentaje de viabilidad celular del compuesto aislado	69

ÍNDICE DE ANEXOS.

- ANEXO A** Recolección del material vegetal
- ANEXO B** Determinación del contenido de humedad de la droga cruda
- ANEXO C** Determinación de Cenizas totales de la droga cruda (Gráfico 1C) y determinación de cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico (Gráfico 2C).
- ANEXO D** Tamizaje fitoquímico.
- ANEXO E** Preparación del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *B. andicola* (Gráfico 1E), cromatografía en columna (Gráfico 2E) y obtención del extracto hidrolizado (Gráfico 3E).
- ANEXO F** Aislamiento y Purificación del compuesto aislado.
- ANEXO G** Espectrofotómetro con el que se realizó los análisis para la identificación del compuesto aislado (Gráfico 1G) e infrarrojo (Gráfico 2G).
- ANEXO H.** Curva de calibración de ácido gálico usada para la cuantificación de fenoles (Gráfico 1H) y curva de calibración de quercetina usada para la cuantificación de flavonoides totales (Gráfico 2H).
- ANEXO I.** Aislamiento de los neutrófilos.
- ANEXO J.** Ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1J) y citotoxicidad (Gráfico 2J) *in vitro*.
- ANEXO K.** Prueba de normalidad de los datos obtenidos en el ensayo antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1K) y del compuesto (Gráfico 2K) y prueba de normalidad de los datos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad del extracto hidroalcohólico (Gráfico 3K) y del compuesto aislado (Gráfico 4K).
- ANEXO L.** Prueba de Homogeneidad de varianzas, de los datos obtenidos en el ensayo antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1L) y del compuesto aislado (Gráfico 2L) y prueba de Homogeneidad de varianzas, de los datos obtenidos en el de citotoxicidad del extracto hidroalcohólico (Gráfico 3L) y del compuesto aislado (Gráfico 4L).
- ANEXO M.** Análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo antiinflamatorio del extracto (Gráfico 1M) y del compuesto (Gráfico 2M) frente a la concentración y análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo antiinflamatorio del extracto (Gráfico 3M) y del compuesto (Gráfico 4M) frente al ácido acetilsalicílico a 200ppm
- ANEXO N.** Análisis Tukey para los datos del ensayo antiinflamatorio del extracto (Gráfico 1N) y del compuesto (Gráfico 2N) frente a la concentración.

- ANEXO Ñ.** Análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo de citotoxicidad del extracto (Gráfico 1Ñ) y del compuesto (Gráfico 2Ñ) frente a la concentración y análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo de citotoxicidad del extracto (Gráfico 3Ñ) y del compuesto (Gráfico 4Ñ) frente al ácido acetilsalicílico a 200ppm
- ANEXO O.** Análisis Tukey para los datos del ensayo de citotoxicidad del extracto (Gráfico 1O) y del compuesto (Gráfico 2O) frente a la concentración.
- ANEXO P.** Análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1P) y para el ensayo de citotoxicidad (Gráfico 2P) del extracto frente al compuesto aislado.
- ANEXO Q.** Gráficas que muestran la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1Q) y del compuesto aislado (Gráfico 2Q)
- ANEXO R.** Gráfica del porcentaje de viabilidad celular y de citotoxicidad del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1R) y del compuesto aislado (Gráfico 2R).
- ANEXO S.** Cuadro de las absorbancias obtenidas del ensayo de actividad antiinflamatoria *in vitro*, tanto del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1S) como del compuesto aislado (Gráfico 2S).
- ANEXO T.** Cuadro de las absorbancias obtenidas del ensayo de citotoxicidad *in vitro*, tanto del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1T) como del compuesto aislado (Gráfico 2T).

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antiinflamatoria y citotoxicidad *in vitro* tanto del extracto hidroalcohólico, como de un compuesto aislado (presumiblemente quercetina-3-O-metil éter) ambos obtenidos a partir de la porción aérea de *Bidens andicola*. Se comprobó la calidad tanto de la droga cruda como del extracto hidroalcohólico. Se realizó el tamizaje fitoquímico, con el fin de identificar los metabolitos más abundantes. Mediante cromatografía en capa fina, se obtuvo un perfil cromatográfico del extracto hidroalcohólico sin hidrolizar e hidrolizado. El compuesto aislado a partir del extracto hidrolizado fue identificado mediante técnicas cromatográficas y espectrofotométricas. Se determinaron cuantitativamente los compuestos fenólicos y flavónicos presentes en el extracto hidroalcohólico. Para evaluar la actividad antiinflamatoria y citotoxicidad *in vitro*, se utilizó una sal de tetrazolio (WST-1), expresando los resultados como porcentaje de inhibición antiinflamatoria y viabilidad celular respectivamente. Se comprobó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, coumarinas, catequinas, saponinas y compuestos grasos, mediante el tamizaje fitoquímico. En la cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico se identificaron flavonoides del tipo glicósido, quercetina 3-O-glicósidos, quercetina 3-O-Ramnósido, isoquercetina, isoquercitrina y ácido clorogénico. En el extracto hidrolizado se identificó la presencia de quercetina. El compuesto aislado fue identificado presuntamente como quercetina 3-O-metil éter. El contenido de fenoles totales del extracto hidroalcohólico fue $12,058 \pm 0,274\%$, mientras que el de flavonoides totales fue $9,987 \pm 0,12\%$. El extracto hidroalcohólico tiene mayor porcentaje de inhibición antiinflamatoria con respecto al compuesto aislado. El compuesto aislado tiene menor citotoxicidad que el extracto. Se recomienda realizar la elucidación estructural de los compuestos de *B. andicola*.

Palabras Clave: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO>, <FLAVONOIDES TOTALES>, <SALES DE TETRAZOLIO (WST-1)>, <INHIBICIÓN INFLAMATORIA>, <VIABILIDAD CELULAR>, <PARTES AÉREAS (*Bidens andicola*)>

SUMMARY

This research was aimed in order to evaluate the anti-inflammatory activity and cytotoxicity *in vitro* both the hydro-alcoholic extract, as a (presumably quercetin-3-O-methyl ether) isolated compound both obtained from the aerial portion of *Bidens andicola*. The quality of both the raw drug as the alcoholic extract was found. Phytochemical screening was performed in order to identify the most abundant metabolites. By thin layer chromatography, a chromatographic profile of the hydro-alcoholic extract unhydrolyzed and hydrolyzed was obtained. The compound isolated was identified from the hydrolysate extract by chromatographic and spectrophotometric techniques. Flavones and phenolic compounds present were determined in the hydroalcoholic extract quantitatively. A tetrazolium salt (WST-1) was used, the results expressed as percent inhibition and cellular antiinflammatory respectively viability to assess the anti-inflammatory activity and *in vitro* cytotoxicity. The presence of phenolic compounds, flavonoids, coumarins, catechins, saponins and fatty compounds, by screening was tested fitoquic. In the thin layer chromatography of the hydroalcoholic extract flavonoid glycoside type they were identified, quercetin 3-O-glycoside, quercetin 3-O-rhamnoside, isoquercetin, isoquercitrin and chlorogenic acid. Hydrolyzed extract in the presence of quercetin was identified. The isolated compound was identified as quercetin allegedly 3-O-methyl ether. The total phenolic content of the extract was hydroalcoholic $12,058 \pm 0.274\%$, while the total flavonoids was $9,987 \pm 0,12\%$. The hydroalcoholic extract has anti-inflammatory greater percentage of inhibition relative to aised compound. The isolated compound has lower cytotoxicity than the extract. It is recommended to carry into the structural elucidation of compounds from *Bidens andicola*.

Keywords: <TECHNOLOGY AND ENGINEERING SCIENCES>, <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <ALCOHOL EXTRACT>, <FLAVONOIDS TOTAL>, <TETRAZOLIUM SALTS (WST-1)>, <INHIBIT INFLAMMATORY>, < CELL VIABILITY>, <AERIAL PARTS (*Bidens andicola*)>

INTRODUCCIÓN

Los procesos inflamatorios son mecanismos que el cuerpo utiliza y que pueden describirse como una reacción defensiva local integrada por alteración, exudación y proliferación. Esta reacción del organismo es producida en respuesta a estímulos físicos, químicos, y a infecciones por microorganismos como bacterias, hongos o parásitos. Los procesos inflamatorios generalmente suelen producir cuadros de hiperemia, dolor, exudado y cambios de pH de los tejidos circundantes (Chuaqui y González, 2007)..

Los diferentes procesos inflamatorios se llevan a cabo mediante la liberación de mediadores de la inflamación, que se encuentran contenidos en gránulos, como mediadores preformados, dentro de células como son los mastocitos, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos, (Chuaqui y González, 2007a).

Estas células los contiene en el citoplasma, cuando se activan se liberan estos factores, que pertenecen a diferentes clases químicas, tales como aminas biógenas (histamina, serotonina), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citoquinas, factores de crecimiento, factores activadores de colonia, factores de complemento, anticuerpos, quininas), especies reactivas de oxígeno (ROS, anión superóxido, hidroperóxido, radicales hidroxilos), y lípidos (factores activadores de plaquetas, prostanoides, leucotrienos), (Chuaqui y González, 2007b).

Los procesos inflamatorios a largo plazo pueden causar incluso la muerte o daño permanente, en caso de que estos afecten órganos vitales, si no son controlados a tiempo. Para la cura de un proceso inflamatorio el cuerpo debe atravesar por tres etapas: la eliminación del agente causal, reabsorción total del exudado y la regeneración de los tejidos destruidos; si no se dan estas condiciones, no se produce la curación completa. En caso de no eliminarse el agente causal, la inflamación se convierte en crónica. (Chuaqui y González, 2007c).

Finalmente, el proceso de regeneración puede fallar por la cantidad o por la calidad de los tejidos destruidos, produciéndose un proceso reparativo que termina con una cicatriz. (Gómez, et al., 2011: pp. 182-217).

Los procesos inflamatorios presentan adicionalmente condiciones crónicas como son; fatiga crónica, gastritis, colitis, también se pueden manifestar ansiedad, falta de energía y depresión. Cuando a pesar de que estos procesos son tratados y no logran el estado de salud deseado, la

problemática se agrava, llevando a cuadros inflamatorios crónicos, surgiendo así patologías graves como es el caso del cáncer, (Gómez, et al., 2011a: pp. 182-217).

Cuando un proceso inflamatorio se presenta nivel sistémico puede acarrear una serie de patologías como coronariopatía, el ictus, la hipertensión, el cáncer, la depresión, la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades vasculares del colágeno; por ello, la prevención o reducción de la inflamación disminuiría la morbimortalidad cardiovascular y la carga en el sistema sanitario que suponen estas enfermedades en todo el mundo. (Gómez, et al., 2011b: pp. 182-217).

El estudio de la inflamación celular ha llevado a entender a la enfermedad como el resultado de una serie de factores que la forman en conjunto, atacando a la raíz del problema que en la mayoría de los casos es la inflamación a nivel celular (Gómez, et al., 2011c: pp. 182-217).

Debido al daño que los procesos inflamatorios causan en la salud de los pacientes, sobre todo cuando estos se producen en órganos vitales y a las graves reacciones adversas que causan los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), que están siendo usados actualmente, sobre todo cuando se administran a largo plazo; surge la necesidad de buscar moléculas que brinden los mismos resultados terapéuticos, pero sin los efectos adversos que estos poseen. Es ahí donde estudios muestran que compuestos existentes en las plantas de género *Bidens* pueden ayudar tratar las inflamaciones (Lastra y Ponce, 2001: pp. 28-33).

En la actualidad, existen muchos medicamentos que son capaces de combatir la inflamación; sin embargo, estos poseen un sin número de reacciones adversas ligadas a la administración de los mismos, entre la más común de ellas se encuentran daños a la mucosa gástrica como irritación de la misma y ulceraciones, (Galván y Neri, 2006).

La relación que existe entre AINES y daño digestivo se comprueba por la alta prevalencia, de entre un 15 y 20%, que presentan úlcera gástrica o duodenal en usuarios consumidores de AINES, dentro de los cuales más del 50% se presentan asintomáticos y entre el 1 y 3% se complican con hemorragias y perforaciones (Galván y Neri, 2006a).

El problema realmente surge cuando pacientes con enfermedades crónicas que necesitan utilizar estos medicamentos de forma prolongada, como por ejemplo en la artritis reumatoide, suelen ser afectados por los efectos adversos anteriormente mencionados, por lo cual surge la necesidad de buscar moléculas que presenten propiedades antiinflamatorias tanto a nivel sistémico como tópico y que no tengan efectos adversos que afecten la calidad de vida de las personas.

Estudios realizados en plantas del género *Bidens*, entre ellas *Bidens andicola*, indican que tienen un alto contenido de compuestos fenólicos en su mayor porcentaje flavonoides, a los cuales se les ha atribuido efectos terapéuticos entre ellos antiinflamatorios y antioxidantes (Martínez et al, 2002: pp. 271-278).

En esta investigación se ha planteado realizar la evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotoxicidad *in vitro* específicamente de la planta *Bidens andicola*, ya que carece de estudios científicos realizados previamente acerca de estas actividades. La planta *Bidens andicola*, es una especie endémica de nuestra región y que puede ser fácilmente encontrada y cultivada, tanto en zonas urbanas como rurales, de ahí la importancia de su estudio como un posible y potente antiinflamatorio, gracias a su alto contenido de flavonoides (De Tomassi et al.,1998, pp. 10-14).

Debido a la dificultad del acceso a servicios de salud, por parte de la población rural a causa de su ubicación geográfica, es de extrema importancia hallar plantas que contengan componentes activos, en este caso antiinflamatorios, que les sirvan como paliativo para ciertas dolencias hasta que puedan acceder a algún tipo de servicio de salud y así también fomentar la medicina ancestral, promoviendo su uso como materia prima y posiblemente su posterior industrialización, transformando la matriz productiva del país.

En la actualidad, especies de *Bidens* están marcando precedente en cuanto a la búsqueda de nuevas moléculas orgánicas con propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y anticancerígenas, pudiéndose en un futuro convertirse en nuevas cabezas de moléculas ayudando en tratamientos de enfermedades (Martínez et al, 2002a, pp. 271-278).

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de *Bidens andicola*.

Objetivos Específicos.

- Determinar la calidad y composición fitoquímica de la droga vegetal seca, obtenida a partir de las partes aéreas de *Bidens andicola* mediante los ensayos de control de calidad y tamizaje fitoquímico.

- Identificar compuestos de tipo flavónico, presentes en el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Bidens andicola*, mediante cromatografía en capa fina.
- Aislar, purificar e identificar un compuesto, a partir del extracto hidrolizado de las partes aéreas de *Bidens andicola*.
- Cuantificar la cantidad de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *B. andicola*, mediante espectrofotometría.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto hidroalcohólico y del compuesto aislado de *Bidens andicola*, mediante la determinación del porcentaje de inhibición inflamatoria.
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico y del compuesto aislado de *Bidens andicola*, mediante la determinación del porcentaje de viabilidad celular.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Bidens andicola*.

Bidens andicola es una hierba anual de 30 cm de alto, tiene inflorescencias de 4 a 5 cm de diámetro. Esta planta está ampliamente propagada en la zona Andina y florece de octubre a julio a alturas de 2500 a 4500 msnm. Su tallo es delgado y ramificado, las hojas son opuestas; tiene capítulos terminales, las flores son marginales, amarillas; los estambres con anteras unidas, el ovario es ínfero, estilo apical, dividido en dos ramas (Marín y Parra, 2015, p.170).

Tabla 1-1: Descripción botánica de *Bidens andicola*.

Reino: Plantae	División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida	Orden: Asterales
Familia: Asteraceae	Subfamilia: Asteroideae
Tribu: Coreoideae	Género: Bidens
Epíteto Específico: andicola	Autor Epíteto Específico: Kunth
	Nombre vulgar: Nachag (Kichwa), nachak, sisa, ñachi, ñakachay, flor de ñachak.

Fuente: (Marín y Parra, 2015, p.170)

Realizado por: Estefanía López, 2016

1.1.1. *Usos terapéuticos.*

Desde hace algunos años se han realizado estudios para probar actividad farmacológica de plantas del género *Bidens*; ya que, debido a su elevado contenido de flavonoides, ha llamado la atención (Solis et al., 1991, pp. 121-123).

Aunque no existen estudios suficientes que prueben actividad farmacológica fehaciente de *Bidens andicola* específicamente, esta planta ha sido usada en la medicina tradicional para tratar procesos inflamatorios de diversa índole, como: insolación, inflamación interna, fiebre, ardor de estómago, resfrío, colerina y diarrea de niños (Solis et al., 1991a, pp. 121-123).

También añadiendo las flores al hervir la leche, para mejorar su sabor. Finalmente se utilizan también los pétalos que contienen luteína para teñir lana, fibra y tejidos (Solis et al., 1991b, pp. 121-123).



Figura 1-1. Flor de *Bidens andicola*

Realizado por: Estefanía López.

1.1.2. Composición, principios activos y actividad farmacológica relacionada.

Existen estudios realizados de “screening” fitoquímico que han podido determinar los metabolitos que poseen las plantas del género *Bidens*, identificando una gran cantidad de compuestos de tipo fenólico, sobre todo flavonoides; compuestos a los cuales se les ha atribuido muchas propiedades farmacológicas (Lastra y Ponce, 2001a: pp. 28-33).

Estudios realizados para determinar los compuestos de tipo fenólico que posee *Bidens andicola*, han podido identificar, mediante métodos cromatográficos y espectrofotométricos, muchos metabolitos pertenecientes al componente flavónico como taninos, y flavonoides, específicamente flavonoles 7-O-glicosidos que tienen quercetina y quercetina 3-metil éter como aglicona, con cadenas de azúcar formadas por tres o cuatro azúcares, incluidas la beta-D-glucopiranososa, alfa-L-rhamnopyranose, y beta-D-xilopiranososa (De Tomassi et al., 1998a, pp. 10-14).

Glicósidos de éster de chalcona como chalcona 4'-O-β-D-(4''- acetil – 6''- p –coumaroyl) glucopiranosido, chalcona 4'-O-β-D-6'' acetilglucopiranosido, chalcona 4'-O-β-D-3'',6''

diacetilglucopiranosido y chalcona 4'-O- β -D-3'',4'',6'' triacetilglucopiranosido, y otros ésteres de chalcona que poseen a la Okanina como aglicona (De Tomassi et al., 1998b, pp. 10-14).

1.2. Flavonoides.

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran presentes en los vegetales como pigmentos, cuya función principal es proteger al organismo del daño que ocasionan las sustancias oxidantes o generadoras de radicales libres y también, los rayos ultravioleta (Martínez et al, 2002b, pp. 271-278).

El cuerpo humano no puede sintetizar estas sustancias de forma natural; por lo cual, es necesario consumirlas en la ingesta diaria de alimentos y bebidas; aunque numerosos estudios indican que la acción farmacológica de la mayoría de los flavonoides se produce únicamente a elevadas dosis, comprobándose en la mayoría efectos antiinflamatorios, antivirales, antialérgicos y protectores contra enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Martínez et al, 2002c, pp. 271-278).

1.2.1. Estructura Química

Los flavonoides químicamente se caracterizan por ser compuestos de bajo peso molecular, que tienen un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), con dos anillos fenilos A y B, unidos a través de un anillo C. Además, los flavonoides poseen un número variable de grupos hidroxilo lo cual les otorga propiedades de quelación del hierro; esto les confiere su capacidad antioxidante.

Por otra parte, la biogénesis de los flavonoides es mixta ya que el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B y C de la ruta del ácido shikímico. En función de sus características estructurales que presentan variaciones en el anillo central C los flavonoides se pueden clasificar en: flavonas, flavanos, como la catequina; flavonoles, representados por la quercetina, flavonas, antocianidinas, catequinas, auronas, isoflavonoides (Martínez et al, 2002d, pp. 271-278).

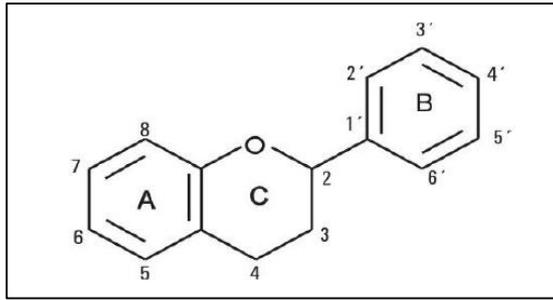


Figura 2-1. Estructura básica de un flavonoide

Fuente: (Martínez, 2005, p. 14).

Existen diversos tipos de flavonoides en función de las cadenas de azúcares que se unen a ellos o si se encuentran libres únicamente como aglicona. Estas cadenas de azúcares que se unen a los flavonoides lo hacen generalmente en las posiciones C3 o C7 y los más frecuentes son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa y el ácido D-glucurónico.

Los flavonoides glicosídicos son más solubles en agua, pero menos reactivos frente a los radicales libres que su aglicona (Martínez et al, 2002e, pp. 271-278).

1.2.2. Metabolismo de los flavonoides.

Los flavonoides en el organismo sufren biotransformación en dos localizaciones, la primera es en el hígado; en donde se introducen o exponen grupos polares y en el colon; donde los microorganismos degradan a los flavonoides no absorbidos. Tanto los flavonoides como sus metabolitos precedentes del colon se conjugan con ácido glucurónico, sulfatos, o glicina; siendo estos más solubles en agua y excretándose por la orina (Martínez et al, 2002f, pp. 271-278).

Los efectos biológicos de los flavonoides que han sido evaluados, dependen en su mayor parte de la biodisponibilidad; donde influyen factores como la estructura química, la absorción, distribución y la eliminación

En estudios comparativos entre la quercetina y la catequina, se ha establecido que la quercetina en el organismo experimenta mayor metilación en plasma que la catequina; además los metabolitos de la catequina son glucoronidados, mientras que los de la quercetina son también sulfatados afectando; de esta forma, su solubilidad en los fluidos orgánicos y su forma de eliminación; ya que, la catequina se elimina principalmente por la orina mientras que la quercetina se elimina por la bilis (Martínez et al, 2002g, pp. 271-278).

1.2.3. Mecanismo antiinflamatorio de los flavonoides

El mecanismo antiinflamatorio de los flavonoides se debe a que inhiben diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico, principalmente ciclooxigenasas y lipooxigenasas; además, reducen el estrés oxidativo ocasionado por los radicales libres (Enciso y Arroyo, 2011, pp. 231-237).

Los flavonoides polihidroxiados actúan por la vía 5-lipooxigenasa, mientras que los menos hidroxiados, inhiben el ciclo de la vía ciclooxigenasa en estudios *in vitro*; mientras que *in vivo*, los flavonoides pueden comportarse como inhibidores duales, debido a los procesos de biotransformación que sufren en el organismo (Enciso y Arroyo, 2011a, pp. 231-237).

Otros mecanismos antiinflamatorios mediante los cuales actúan los flavonoides son la inhibición de la liberación de la histamina, inhibición de la migración celular hacia el foco inflamatorio, que es en donde se liberan eicosanoides y agentes proinflamatorios; tienen acción antiradicalaria, efecto protector vascular, ya que actúan disminuyendo la exudación (Enciso y Arroyo, 2011b, pp. 231-237).

Muchos flavonoides y fenoles, también actúan inhibiendo la prostaglandina sintetasa, impidiendo la síntesis de prostaglandinas, responsable también de la inflamación (Enciso y Arroyo, 2011c, pp. 231-237).

1.2.4. Toxicidad de los flavonoides.

Se han realizado diversos estudios para comprobar la ausencia de toxicidad en los flavonoides, encontrándose que; aun a elevadas dosis parecen no presentar efectos secundarios fuertes. Es por este motivo que el interés en estas moléculas ha aumentado, principalmente como agentes antioxidantes y radioprotectores (Martínez et al, 2002h, pp. 271-278).

1.3. Inflamación.

La inflamación es una respuesta inmunológica del organismo y que tiene el objetivo de defenderse contra las agresiones físicas, químicas o biológicas. Según Celso los cuatro signos principales de la inflamación son: calor, rubor, tumor y dolor. La inflamación es una respuesta de reparación que implica un enorme gasto de energía metabólica; cuando la inflamación no es tratada a tiempo o es mal tratada puede transcurrir a enfermedades degenerativas como la artritis, arterosclerosis o el cáncer (Bordés et al. 2005).

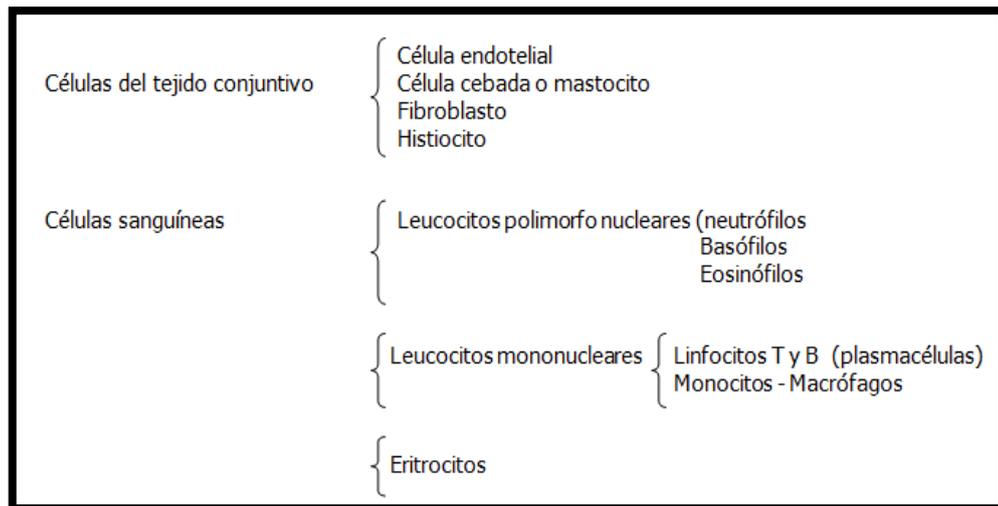


Figura 3-1. Cuadro de las células que intervienen en el proceso inflamatorio.

Fuente: (Bordés et al. 2005)

1.3.1. Fases de la inflamación.

La inflamación es un proceso complejo que se tienen cinco fases, las mismas que serán descritas a continuación:

1.3.1.1. Liberación de mediadores de la inflamación.

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

Otro mecanismo por el cual se activaría el mastocito para que libere los mediadores, sería mediante la IgE, la misma que es captada por la membrana del mastocito. Los mediadores que se encuentran preformados en los gránulos en el mastocito, son principalmente histamina, el factor quimiotáctico del eosinófilo, factor quimiotáctico del neutrófilo y la heparina.

El ácido araquidónico que se forma, sigue dos vías metabólicas; el ciclo de la enzima ciclooxigenasa mediante la cual se producen prostaglandinas y tromboxanos y el ciclo de la lipooxigenasa que produce leucotrienos. Todos estos compuestos mencionados son un segundo grupo importante de mediadores de la inflamación de carácter lipídico y que se sintetizan en el

mastocito. Otra célula responsable de la liberación de mediadores de la inflamación es el basófilo y se activa por los mismos mecanismos que el mastocito (Bordés et al. 2005a).

1.3.1.2. Efecto de los mediadores de la inflamación.

Cuando los mediadores son liberados producen alteraciones y efectos quimiotácticos para que las células inmunes puedan llegar al lugar de la inflamación. Los mediadores más importantes que actúan en el proceso de la inflamación se detallan a continuación:

- Histamina: Es un mediador que es liberado principalmente por el mastocito y el basófilo y actúa sobre los receptores H1 de los vasos, produciendo vasodilatación e incremento de la permeabilidad; cuando actúa sobre los receptores H2 produce efectos inhibidores o reguladores de la inflamación.
- Enzimas proteolíticas: La más importante de las enzimas liberadas por el mastocito es la kininogenasa; la misma que actúa sobre proteínas de la sangre llamadas kininógenos que se desdobra en péptidos denominados kininas, que producen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor.
- Factores quimiotácticos de la inflamación: Se encargan de activar y atraer tanto eosinófilos como neutrófilos al lugar de la inflamación.
- Heparina: Se encarga de inhibir la coagulación por lo que facilita la llegada al lugar de la inflamación de los mediadores y las células.
- Prostaglandina E2: Esta prostaglandina es la más importante que actúa en el proceso de la inflamación, produciendo vasodilatación y dolor. La aspirina bloquea la vía de la ciclooxigenasa que se encarga de sintetizar esta prostaglandina, de ahí su efecto farmacológico antiinflamatorio.
- Leucotrieno B4: Es un factor quimiotáctico de los eosinófilos, mastocitos, macrófagos y neutrófilos.
- Factor activador de plaquetas: Se encarga de activar las plaquetas para liberar mediadores e iniciar procesos de coagulación. Es un factor quimiotáctico y activador de neutrófilos (Bordés et al. 2005b).

1.3.1.3. Llegada de moléculas y células inmunes al lugar de la inflamación.

Estas moléculas y células provienen de la sangre y de tejidos cercanos al de la inflamación. Las células inmunes y los mediadores llegan al lugar de la inflamación en dos fases; las mismas que describen a continuación:

- *Fase inicial:* Esta fase indica como las moléculas de la sangre llegan al lugar de la inflamación, mediante mecanismos de alteración vascular, que facilitan el trasvase de dichas moléculas y mecanismos de generación del edema. Las moléculas que intervienen en esta fase son:
 - Inmunoglobulinas. Se unen al agente para bloquearlo. Tanto la IgM y IgG activan al complemento por la vía clásica; además, la IgG se une a los fagocitos para potenciar la fagocitosis.
 - Factores del complemento. El complemento se activa por la vía alternativa, alcanzando la vía común y produciendo la lisis del antígeno.
 - Proteína C reactiva (PCR). Activa el complemento por la vía clásica y fija antígenos como el neumococo (Bordés et al. 2005c).
- *Fase tardía:* Las alteraciones vasculares y la liberación de mediadores de la inflamación determinan la llegada de las células inmunes. En esta fase actúan las células sanguíneas, cuya función se describe a continuación:
 - Basófilo. Contribuye en la liberación de mediadores.
 - Neutrófilos. Cumple con funciones relacionadas con la fagocitosis del antígeno.
 - Monocito. Cumple también con funciones relacionadas a la fagocitosis. El monocito en los tejidos se diferencia en macrófago, célula que además de cumplir con la fagocitosis de antígenos, también actúa como célula presentadora del antígeno a las células T y B.
 - Linfocitos T y B. Las células B sintetizan IgE que conjuntamente con el basófilo, potencian la inflamación. Por otro lado, las células T producen linfoquinas que promueven la respuesta inmune.

- Eosinófilo. En el proceso inflamatorio, tiene una función reguladora (Bordés et al. 2005d).

1.3.1.4. Regulación de la respuesta inflamatoria.

Esta fase de la inflamación se encarga de regular la respuesta de la inflamación evitando que esta sea exagerada. A continuación, se detalla los mediadores y la función que estos tienen para inhibir y equilibrar la respuesta inflamatoria.

- Histamina. Actúa sobre los receptores H₂, inhibe la liberación de mediadores por el basófilo y mastocito, inhibe la actividad del neutrófilo y activa las células T supresoras.
- Prostaglandina E. Inhibe los mediadores liberados por el mastocito y basófilo e inhibe la proliferación y diferenciación de linfocitos.
- Agonistas autonómicos. El mastocito y el basófilo presentan receptores α y β -adrenérgicos que regulan de forma autonómica la liberación de mediadores. El receptor β -adrenérgico produce inhibición mientras que el α -adrenérgico induce la estimulación.
- Heparina. Activa los factores del complemento e inhibe la coagulación.
- Eosinófilo. Esta célula acude al lugar de la inflamación para liberar enzimas que degradan mediadores de la inflamación; así tenemos, la histaminasa que actúa sobre la histamina, la arilsulfatasa sobre los leucotrienos y la fosfolipasa sobre el factor activador de plaquetas (Bordés et al. 2005e).

1.3.1.5. Proceso de reparación.

Una vez que el agente inflamatorio ha desaparecido se inician los procesos de la reparación. Este proceso inicia cuando al lugar donde ocurrió la inflamación llegan fibroblastos, activados por la interleucina-1, los mismos que proliferan y sintetizan colágeno, promueven la proliferación de células epiteliales y de vasos en la herida (Bordés et al. 2005f).

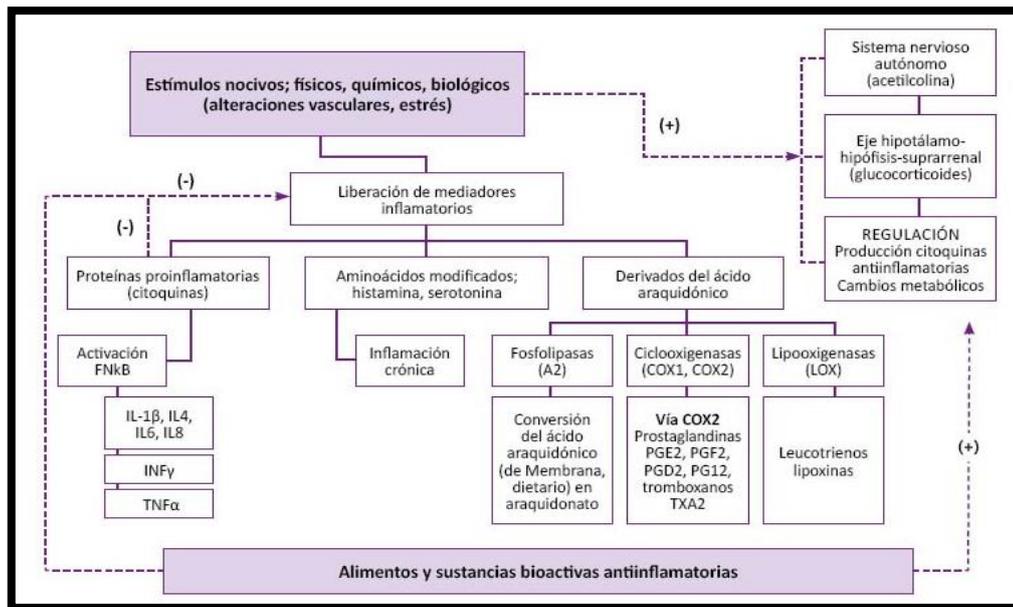


Figura 4-1. Mecanismo del proceso inflamatorio.

Fuente: (Jiménez et al, 2013, p. 7)

1.3.2. Tipos de inflamación.

1.3.2.1. Inflamación aguda.

Este tipo de inflamación tiene un tiempo de duración relativamente corto; se caracteriza por la migración de leucocitos, principalmente de neutrófilos al lugar de la inflamación y por la exudación de fluidos plasmáticos.

1.3.2.2. Inflamación crónica.

En este tipo de inflamación la respuesta inflamatoria es de curso prolongado en el tiempo; este tipo de inflamación puede ser resultado de la evolución de la inflamación aguda, cuando no se ha podido eliminar el agente que lo causa o no se ha impedido el proceso de reparación (Catelli, 2009).

1.3.3. Finalidad de la inflamación.

- Localizar y aislar el agente causal para eliminarlo y reparar el daño producido por el agente y por el proceso en sí.
- Evitar la propagación de la infección y del agente causal (Catelli, 2009b).

1.4. Antiinflamatorios no esteroideos.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) en la actualidad son los más usados para tratar dolencias de tipo inflamatorio, principalmente musculoesqueléticos y articulares. La mayor parte de los compuestos que están en este grupo no tienen relación química entre sí, pero comparten actividades terapéuticas y efectos secundarios (Hall et al., 2001, pp. 25-40) .

1.4.1. Mecanismo de acción.

Los antiinflamatorios no esteroideos o esteroidales, actúan inhibiendo la enzima ciclooxigenasa, disminuyendo así la formación de prostaglandinas y tromboxanos. Es así como el efecto terapéutico de estos fármacos esta dado inicialmente por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas e impactando en la disminución del dolor, la fiebre y la inflamación.

En el caso de las ciclooxigenasas la COX – 1 está relacionada con la participación de las prostaglandinas y tromboxanos en las funciones fisiológicas; mientras que la COX-2 es una enzima que actúa en la inflamación inducida por citoquinas y mediadores.

El objetivo principal de los AINES es inhibir la actividad enzimática tanto de la COX-1 como la COX-2; pero es en mayor medida que la inhibición de la COX-1 tienen como consecuencia la aparición de efectos secundarios a nivel gástrico, renal y en la coagulación (Hall et al., 2001a, pp. 25-40).

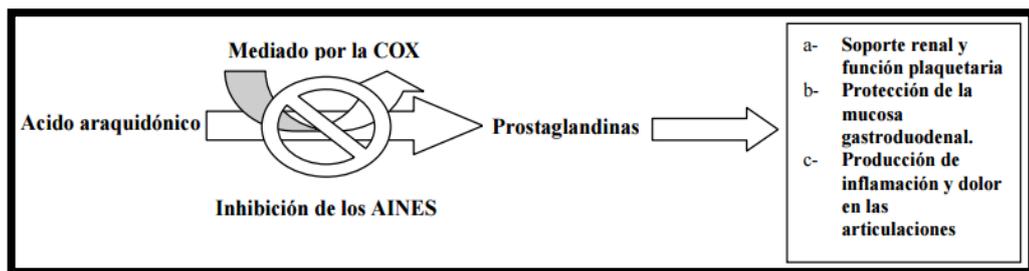


Figura 5-1. Mecanismo de acción de los Antiinflamatorios no esteroidales.

Fuente: (Hall et al., 2001, p. 25).

1.4.2. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroidales.

La clasificación química de los antiinflamatorios no esteroides si divide en ácidos y no ácidos y se presenta la tabla 2-1.

Tabla 2-1: Clasificación química de los Antiinflamatorios no esteroides.

Ácidos	
Salicílico:	Fármaco prototipo: Ácido acetilsalicílico.
Enólicos:	
Pirazolonas	Fármaco prototipo: Metamizol
Pirazolidindionas	Fármaco prototipo: Fenilbutazona
Oxicam	Fármaco prototipo: Piroxicam
Acético:	
• Indolacético	Fármaco prototipo: Indometacina
• Pirrolacético	Fármaco prototipo: Ketorolac
• Fenilacético	Fármaco prototipo: Diclofenaco
• Piranoindolacético	Fármaco prototipo: Etodolaco
Propiónico	Fármaco prototipo: Naproxeno
Antranílico:	Fármaco prototipo: Ácido mefenámico
Nicotínico:	Fármaco prototipo: Clonixina
No Ácidos	
Sulfonilidas:	Fármaco prototipo: Nimesulida
Alcanonas	Fármaco prototipo: Nabumetona
Paraaminofenoles:	Fármaco prototipo: Paracetamol

Fuente: (Hall et al., 2001, p. 31).

1.4.3. Efectos adversos.

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

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

- Efecto a nivel pulmonar: La neumonitis, alveolitis, infiltrado pulmonar y fibrosis pulmonar, indican una reacción inmune presentada hacia ciertos AINES como: naproxeno, fenilbutazona y ácido tolfenámico.
- Hipersensibilidad: Pueden ocasionar Rush, urticaria, rinitis, angioedema, broncoconstricción y shock anafiláctico; esto se produce, ya que al inhibir la COX los AINES desvían al ácido araquidónico a la vía de la lipooxigenasa, aumentando la producción de leucotrienos, mediador del broncoespasmo induciendo al asma (Hall et al., 2001b, pp. 25-40).

1.5. Ácido acetilsalicílico.

1.5.1. Efecto terapéutico.

El ácido acetilsalicílico, actúa reduciendo el dolor y la fiebre, está indicado en el alivio de dolores ocasionales leves o moderados, como cefaleas, dolores menstruales, musculares y estados febriles (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2015).

1.5.2. Mecanismo de acción.

El ácido acetilsalicílico inhibe de manera irreversible la enzima ciclooxigenasa inhibiendo tanto la COX-1 y la COX-2. Específicamente, el ácido acetilsalicílico acetila la serina en las dos isoformas de COX, ocasionando efectos antitrombóticos, ya que al inhibir la COX-1 generadora de tromboxano, que es un potente vasoconstrictor y agonista plaquetario. (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios 2015a).

1.5.3. Posología.

Para el control de síntomas relacionados al dolor o síntomas febriles; su uso está recomendado para adultos o personas mayores de 12 años y se recomienda administrar 0,5g cada 4 o 6 horas. En el caso de trastornos antitrombóticos, se administra en adultos y 100mg de forma diaria (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios 2015b).

1.5.4. Reacciones adversas.

- Gástricas: Se observan molestias gástricas en pacientes con historia de gastritis, úlcera péptica o duodenitis. Esto se debe a que el aumento del pH gástrico aumenta la fracción

ionizada del medicamento por lo que algunos compuestos antiácidos reducen estas molestias.

- Hipersensibilidad: Personas que tienen hipersensibilidad a la aspirina desarrollan reacciones alérgicas tres horas después de la administración, los síntomas son: urticaria, broncoespasmo, rinitis y hasta shock.
- Hepatotoxicidad: Un tratamiento prolongado puede causar una moderada necrosis celular y degeneración de los hepatocitos e inflamación portal.
- Renales: Este fármaco ocasiona una disminución del flujo renal y de la filtración glomerular en pacientes con insuficiencia renal. El tratamiento prolongado se ha relacionado con nefropatía y nefritis intersticial. Esto puede deberse a la inhibición de las prostaglandinas renales o a un efecto directamente citotóxico (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios 2015c).

1.6. Estudios *in vitro* que evalúan la actividad antiinflamatoria.

Estudios *in vitro* se han realizado en células leucocitarias y en macrófagos; ya que estos responden a estímulos ocasionando la producción y liberación extracelular de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; serie de reacciones conocidas como estallido oxidativo y catalizadas por oxidasas dependientes de NADPH. Los macrófagos actúan desencadenando y perpetuando la respuesta inflamatoria, gracias a su capacidad de sintetizar mediadores de la inflamación (Tan & Berridge, 2000, pp. 59-68).

1.6.1. Ensayos *in vitro* colorimétricos con sales de tetrazolio.

El estallido mediado por los neutrófilos, se mide espectrofotométricamente e histológicamente mediante el uso de sales de tetrazolio, el mismo que se reduce intracelularmente a formazán insoluble, reacción que es mediada por NADPH oxidasa. Los ensayos realizados con WST-1 muestran mayor sensibilidad debido a su mayor solubilidad, que los ensayos realizados con MMT. El uso de WST-1 en ensayos para determinar la actividad antiinflamatoria exhibe muy baja absorbancia de fondo y es eficientemente reducido por el superóxido a formazán soluble en agua con alta capacidad de absorción molar.

Las sales de tetrazolio han sido el reactivo más ampliamente usado para poder medir la actividad celular metabólicamente hablando. Los estudios revelan que el NADH, es responsable

de la mayor reducción de las sales de tetrazolio. Esta reducción está asociada no solo con las mitocondrias, sino también se relaciona con el citoplasma y con cada una de las membranas mitocondriales. Las implicaciones de estos nuevos descubrimientos, se discuten en términos del uso de sales de tetrazolio como indicadores del metabolismo celular y sus aplicaciones en la biología celular (Tan & Berridge, 2000a, pp. 59-68).

1.6.2. Ensayos in vitro mediante cuantificación de enzimas y mediadores de la inflamación.

Otros ensayos para determinar la actividad antiinflamatoria están dirigidos a medir la expresión enzimática o de mediadores que intervienen en los procesos inflamatorios, como: Enzima beta secretasa 1 (BACE-1), proteína C reactiva (PCR), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), la ornitina descarboxilasa(ODC), las señales de transducción y los activadores de proteínas de transcripción (STAT), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las moléculas de adhesión de las células vasculares (VCAM) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) entre los bioensayos más importantes (Gómez et al., 2011d, pp. 208-209).

1.7. Estudios in vitro que evalúan la citotoxicidad.

1.7.1. Viabilidad Celular.

Los ensayos in vitro de citotoxicidad que emplean sales de tetrazolio son medidos en términos de viabilidad celular. La viabilidad celular son términos que están relacionados a las células que son viables metabólicamente; es decir, que se encuentran metabólicamente activas y con su membrana completamente intacta.

La citotoxicidad es la cualidad de ser tóxico para las células, y puede ser causada por agentes químicos e incluso biológicos. Este daño producido a las células hace que esta pierda su viabilidad celular, es decir, que metabólicamente se vuelva inactiva debido a la pérdida de la integridad de sus organelas o membranas. Por lo tanto la viabilidad celular es un medio, para medir la citotoxicidad de una sustancia a nivel celular.

1.7.2. Estudios in vitro colorimétricos con sales de tetrazolio.

Las sales de tetrazolio más ampliamente usadas para determinar la citotoxicidad es el WST-1 por su solubilidad; estas sales son transformadas en formazán por la rotura de un enlace, mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa y es activo sólo en el

caso de células viables. Este ensayo determina la viabilidad celular espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia, relacionando la viabilidad celular con la absorbancia.

De esta forma, un elevado número de células produce una mayor actividad de deshidrogenasas y una mayor concentración de formazán, provocando un aumento de la absorbancia a 450nm. Por lo tanto, una baja viabilidad celular implica una menor absorbancia (Vendrell y Serra, 2008, pp. 41-43).

1.7.3. Estudios in vitro con azul de triptano.

El azul de triptano es un colorante que no es absorbido por las células viables sanas; por lo que, cuando están dañadas o muertas este tinte es absorbido permitiendo el conteo de las células afectadas (Universidad de Alcalá, 2008, pp. 1-4).

1.7.4. Bioensayo de toxicidad en Artemia salina.

Este ensayo es usado como vía inicial para determinar la citotoxicidad de extractos, fracciones o compuestos aislados, permitiendo discriminar los que tienen una elevada toxicidad. Este ensayo muestra una buena correlación con los ensayos de citotoxicidad *in vitro* (Galvis et al., 2011, pp.313-323).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO.

2.1. Lugar de la investigación.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Recolección del material vegetal.

Para llevar a cabo esta investigación se recolectaron muestras de la planta *Bidens andicola*, en la parroquia de San Andrés en el cantón de Guano, verificándose específicamente las coordenadas geográficas: X – 754060 y Y - 9825835 a 3124 msnm.

2.3. Identificación del material vegetal.

Para la identificación de la planta se tomaron dos muestras distintas del material vegetal las mismas que fueron identificadas en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a cargo del Ing. Jorge Caranqui, y posteriormente fueron trasladadas al Laboratorio de Productos Naturales.

2.4. Materiales, equipos y reactivos.

Para la presente investigación se usaron los siguientes materiales, equipos y reactivos; detallados a continuación:

2.4.1. Material Vegetal.

Se utilizaron las partes aéreas de la planta *Bidens andicola*, es decir; flores, hojas y tallos. La planta fue secada a temperatura ambiente bajo sombra y posteriormente fue triturada en un molino marca Arthur H. Thomas C.O hasta obtener partículas de 2 – 3 mm; esto se realizó con la finalidad de verificar los parámetros de calidad de la droga cruda, para la posterior obtención

de los extractos con los cuales se realizará el tamizaje fotoquímico, el ensayo antiinflamatorio y de citotoxicidad *in vitro* y del cual se aislará el compuesto.

La planta triturada fue almacenada en funda de papel las cuales fueron herméticamente selladas con cinta adhesiva.

2.4.2. *Material Biológico.*

Para el ensayo antiinflamatorio y citotóxico *in vitro* se aisló neutrófilos obtenidos a partir de sangre humana de un paciente sano.

2.4.3. *Material farmacológico.*

Se utilizó ácido acetilsalicílico 100mg como control positivo comparativo en el ensayo realizado para determinar la actividad antiinflamatoria.

2.4.4. *Materiales de laboratorio utilizados.*

Tabla 1-2: Descripción de los materiales de laboratorio utilizados.

CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA
• Cápsulas de porcelana
• Piseta
• Reverbero
• Crisoles de porcelana
• Pinzas para cápsulas
TAMIZAJE FITOQUÍMICO
• Frascos ámbar de 1000mL
• Embudos simples
• Trípodes
• Vasos de precipitación de 250mL
• Tubos de ensayo
• Gradilla
• Pipeta 10mL
• Pipeta de 5mL
• Pipeta de 1mL
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO
• Tubos de ensayo tapa rosca
• Embudo de separación
• Kitasato de 250 mL

• Embudo Buchner
• Probeta 50mL
• Probeta 100mL
• Pipeta 10 mL
• Pipeta 5mL
CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA
• Columna de vidrio de 50 x 3 cm
• Pipetas 10mL
• Vasos 50mL
• Probeta de 100mL
• Tubos de ensayo
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)
• Cuba cromatográfica
• Capilares
• Pipeta 5mL
• Vasos de precipitación 50mL
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO
• Refrigerante de bolas
• Balón esmerilado de 500mL
• Pinzas universales
• Mangueras
• Reverbero
• Cazuela
• Probeta 500mL
• Termómetro 200 °C
• Vasos 100mL
• Placa filtrante de vidrio
• Membrana para filtrar
• Kitasato 250mL
ESPECTROSCOPIA UV
• Tubos de ensayo de 10mL
• Frascos ámbar 50mL
• Pipetas 10 mL
• Jeringas 10mL
• Jeringa 5mL
• Micropipeta automática de 1000uL
• Micropipeta automática de 100uL
INFRARROJO (IR)
• Pipetas Pasteur
CUANTIFICACIÓN (ESPECTRO UV)
• Vasos de 50mL
• Balones aforados de 10mL

• Balones aforados de 50mL
• Probeta de 50mL
• Micropipeta automática de 1000uL
• Micropipeta automática de 100uL
• Tubos de vidrio de 10mL
• Puntas azules de 1000uL
• Puntas amarillas de 100uL
ENSAYO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTÓXICO
• Micropipeta automática de 1000uL
• Micropipeta automática de 100uL
• Puntas azules de 1000uL
• Puntas amarillas de 100uL
• Pocillos
• Jeringas 10mL
• Jeringa 5mL
• Jeringa 3mL
• Tubos de vidrio
• Torniquete
• Algodón
• Alcohol antiséptico

Realizado por: Estefanía López, 2016

2.4.5. Equipos.

Tabla 2-2: Equipos utilizados en la investigación.

ANÁLISIS	EQUIPOS
Control de calidad materia prima y Tamizaje Fitoquímico	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Sonicador Marca Branson 2510
	Estufa Memmert SNB400
	Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C
	Desecador
	Balanza analítica Radwag
Obtención del extracto	Vórtex mixer MRC S1 - 100
	Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath
	Congelador
	Liofilizador Thermo Scientific
Control de calidad del extracto	Refractómetro
	pH-metro
Extracción del compuesto aislado	Bomba de vacío
Cromatografía en capa fina (TLC)	Cámara UV Chromato vue modelo cc20
Espectroscopia UV	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220

	Balanza analítica Radwag
Infrarrojo (IR)	Espectrofotómetro infrarrojo Jasco 4100
Cuantificación de fenoles y flavonoides totales (espectro UV) y Ensayo antiinflamatorio y citotóxico	Balanza analítica Radwag
	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220
	Estufa Memmert SNB400
	Cronómetro
	Centrífuga

Realizado por: Estefanía López, 2016

2.4.6. Reactivos.

Tabla 3-2: Descripción de los reactivos utilizados.

ANÁLISIS	REACTIVOS
Tamizaje fitoquímico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reactivo de Dragendorff ▪ Reactivo de Mayer ▪ Reactivo de Wagner ▪ Reactivo de Baljet ▪ Reactivo de Lieberman Buchard ▪ Reactivo para Catequinas ▪ Reactivo para resinas ▪ Reactivo de Fehling ▪ Reactivo de FeCl₃ ▪ Reactivo de Borntrager ▪ Reactivo de Shinoda ▪ Reactivo de Antocianidinas ▪ Cloruro férrico ▪ Magnesio metálico ▪ Cloruro de sodio (polvo)
Obtención del extracto	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etanol 70% ▪ Agua destilada ▪ Hexano
Cromatografía en capa fina (TLC)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Papel cromatográfico ▪ Acetato de etilo ▪ Ácido acético glacial ▪ Ácido fórmico ▪ Agua destilada ▪ Metanol ▪ Cloroformo ▪ N-Butanol
Espectroscopía UV	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tricloruro de Aluminio 5% ▪ Acetato de Sodio ▪ Ácido clorhídrico acuoso al 20% ▪ Metanol 98%
Cuantificación de fenoles y flavonoides	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Soluciones de ácido gálico

<p>totales (espectro UV)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Metanol 98% ▪ Agua destilada ▪ Nitrito de Sodio 5% ▪ Tricloruro de aluminio 10% ▪ Hidróxido de sodio 1M ▪ Soluciones de quercetina ▪ Carbonato de sodio saturado ▪ Reactivo de Folin-Ciocalteu 20%
<p>Ensayo antiinflamatorio y citotóxico <i>in vitro</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua bidestilada ▪ Ficoll Paque ▪ Zimozan ▪ WST-1 ▪ Solución modificada de Hanks (9.5 g/L) ▪ Dimetilsulfóxido 5% ▪ Tritón 0.1% ▪ Solución Aspirina

Realizado por: Estefanía López, 2016

2.5. Técnicas y métodos.

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

Una vez recolectada la planta se procedió a realizar el control de calidad de la droga cruda para lo cual, se realizaron ensayos por triplicado, en base a métodos fisicoquímicos con el fin de garantizar la seguridad y eficacia de la droga que será analizada posteriormente. A continuación, se describen los parámetros analizados, cuyos procedimientos se encuentran establecidos en el folleto de Farmacognosia y Productos naturales (Miranda, 2006, pp. 38-64).

2.5.1.1. *Determinación del contenido de humedad.*

La determinación del contenido de humedad en la droga cruda es un ensayo necesario para determinar la calidad de la misma, ya que un elevado contenido de agua en las drogas vegetales aumenta el riesgo de contaminación microbiana y de hidrólisis de compuestos que posea la droga, provocando el deterioro de la misma.

Por esta razón es de gran importancia la determinación del contenido de humedad, como indicador de la estabilidad de los compuestos químicos presentes en las drogas vegetales, especialmente en aquellas que tienen un elevado contenido de humedad o que estén sujetas a absorber humedad con mayor facilidad.

El método gravimétrico es el más utilizado para esta determinación, debido a su sencillez; pero no es recomendable utilizarlo en drogas que contengan sustancias volátiles (Miranda, 2006a, pp. 38-64).

Procedimiento:

Se pesaron 2g de la droga cruda seca y molida con una desviación permisible de 0.5mg; siendo transferida a una cápsula de porcelana previamente tarada. La muestra dentro de la cápsula fue desecada a 105 °C durante 3 horas y seguidamente colocada en un desecador durante 15 minutos, donde se dejó enfriar a temperatura ambiente para ser pesada y nuevamente llevada a la estufa durante una hora más.

Posteriormente, la cápsula se colocó en el desecador para enfriarla hasta temperatura ambiente y se pesó hasta obtener masa constante. (Miranda, 2006, pp. 38-64). Para realizar el cálculo y determinar el contenido de humedad de la droga cruda se aplicó la siguiente ecuación:

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

Donde:

H = pérdida en peso por desecación.

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

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

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

2.5.1.2. Determinación de cenizas totales.

El porcentaje de cenizas totales determina el contenido total de minerales de la muestra de estudio; es el residuo inorgánico que queda tras eliminar los compuestos orgánicos de la muestra seca, mediante la calcinación. El porcentaje de cenizas totales se determinó gravimétricamente (Miranda, 2006b, pp. 38-64).

Procedimiento:

Se pesaron 2g de droga cruda seca y molida con una desviación de 0.5mg; la muestra pesada se colocó en un crisol de porcelana previamente tarado. Se carbonizó la muestra en el crisol y una

vez que se estuvo bien carbonizada la muestra fue colocada en una mufla a una temperatura de 700°C para su incineración, durante dos horas. Después de transcurrido ese tiempo, el crisol fue trasladado a una estufa a 105 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, el crisol se colocó en el desecador para enfriarlo hasta temperatura ambiente y se pesó hasta obtener masa constante; cabe recalcar que para alcanzar una masa constante los intervalos entre el calentamiento y el pesaje fueron de 30 minutos. Para realizar el cálculo y poder determinar el porcentaje de cenizas totales de la droga cruda se lo realiza con la siguiente ecuación (Miranda, 2006c, pp. 38-64):

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

Donde:

C = porcentaje de cenizas totales.

M = masa del crisol vacío (g)

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

M2= masa del crisol con la ceniza (g)

2.5.1.3. Determinación de cenizas solubles en agua.

El objetivo de este ensayo fue determinar la cantidad de material inorgánico que existe en las cenizas totales.

Procedimiento:

Se añadieron 15mL de agua al crisol con las cenizas totales obtenidas anteriormente; el crisol fue tapado con un vidrio reloj hervido durante 5 minutos. La solución obtenida fue filtrada a través de un papel filtro libre de cenizas. Este papel filtro fue colocado en el crisol utilizado inicialmente y calentado en el mismo hasta su carbonización; el crisol con la muestra fue colocado en una mufla a una temperatura de 700°C durante 2 horas; seguidamente, el crisol fue trasladado a una estufa a 105 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, el crisol se colocó en el desecador para enfriarlo hasta temperatura ambiente y se pesó hasta obtener masa constante; cabe recalcar que para alcanzar una masa constante los intervalos entre el calentamiento y el pesaje fueron de 30 minutos (Miranda, 2006d, pp. 38-64). Para

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

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

Donde:

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua.

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

M_a = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

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

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.5.1.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

El objetivo de este ensayo fue determinar el contenido de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico que contiene la droga vegetal. La materia arenosa presente en la droga vegetal es medida a través de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

Procedimiento:

Se añadieron 3 mL de ácido clorhídrico al 10% a las cenizas totales obtenidas anteriormente. Se calentó el crisol tapado con un vidrio reloj en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, se lavó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente uniéndolo al contenido del crisol. La solución obtenida fue filtrada a través de un papel filtro libre de cenizas, el residuo fue lavado con agua caliente repetidamente hasta que la solución filtrada acidulada con ácido nítrico (a la cual se añadió dos gotas de nitrato de plata 0.1 mol/L), no indique la presencia de cloruros.

El filtrado conjuntamente con el residuo fue desecado en una estufa a 105°C y posteriormente transferido al crisol de porcelana utilizado inicialmente. Se colocó el crisol con la muestra en una mufla a 700°C durante 2 horas. Después de transcurrido ese tiempo, el crisol se trasladó a una estufa a 105 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, el crisol se colocó en el desecador para enfriarlo hasta temperatura ambiente y se pesó hasta obtener masa constante; cabe recalcar que para alcanzar una masa constante los

intervalos entre el calentamiento y el pesaje fueron de 30 minutos (Miranda, 2006e, pp. 38-64). Para realizar el cálculo y poder determinar el porcentaje de cenizas totales de la droga cruda se lo realiza con la siguiente ecuación:

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

Donde:

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

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

M = masa del crisol vacío (g)

M₂= masa del crisol con las cenizas ácido clorhídrico (g)

100= factor matemático.

2.5.2. Tamizaje fitoquímico.

Las pruebas de “screening” o tamizaje fitoquímico permiten identificar los metabolitos primarios y secundarios que posee la droga vegetal mediante reacciones de coloración o precipitación y que son de interés fitoquímico.

Las pruebas de tamizaje fitoquímico se caracterizan por ser sencillas, rápidas y muy selectivas para la determinación de clases o grupos de compuestos químicos que contiene la droga vegetal, utilizando un mínimo de recursos instrumentales de laboratorio. Después de haber determinado los parámetros de calidad de la droga cruda se procedió a realizar los extractos para realizar el tamizaje fitoquímico de la planta.

Procedimiento:

Las partes aéreas de la planta seca (tallos, hojas y flores), se sometieron a extracciones sucesivas con solventes de diferente polaridad como se muestra en el esquema a continuación basado en Las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006f, pp. 38-64).

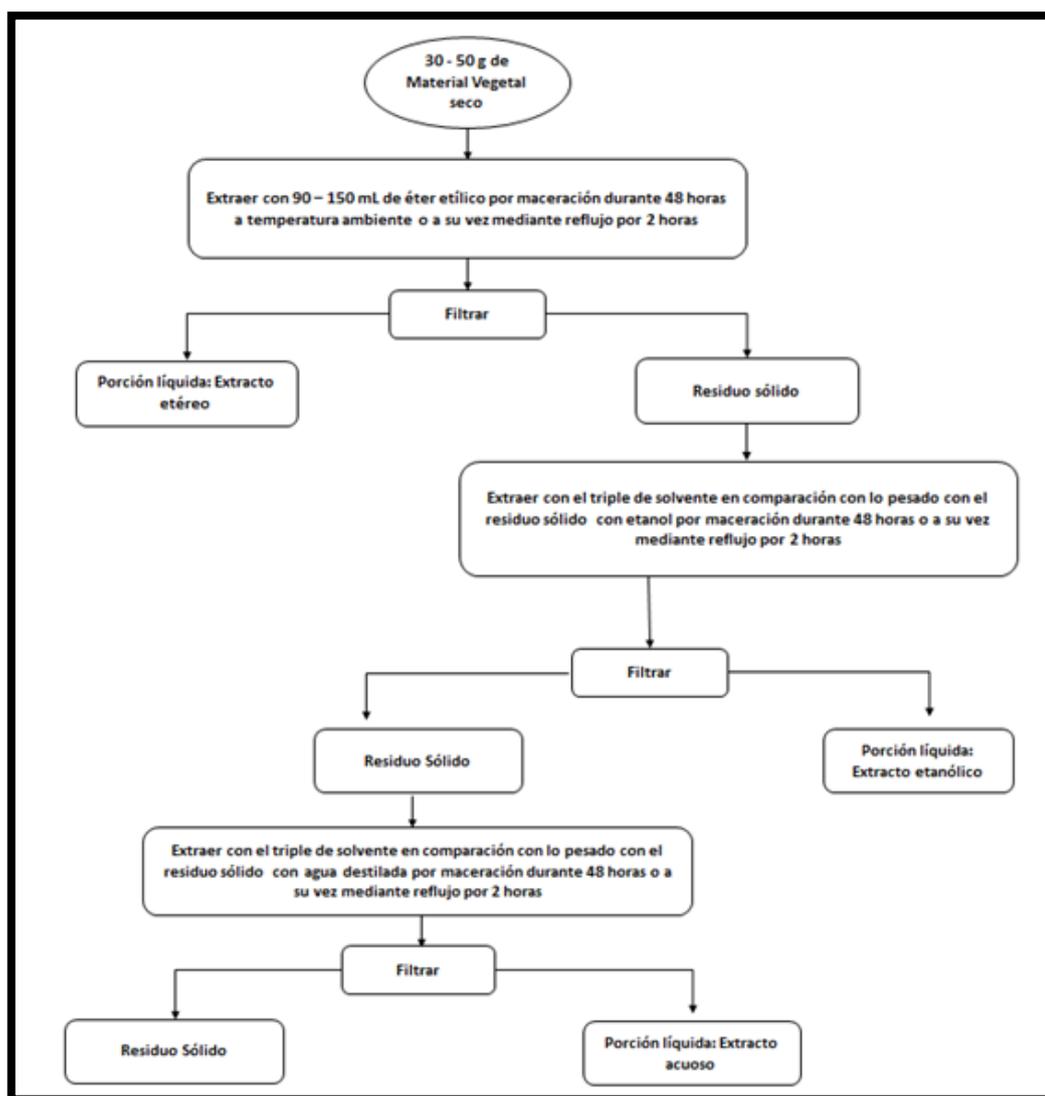


Figura 1-2. Protocolo para elaborar los extractos para el tamizaje fitoquímico.

Realizado por: Estefanía López, 2016

Obtenidos cada uno de los extractos se procedió a realizar las diferentes reacciones de identificación de metabolitos secundarios siguiéndose los esquemas basados en Las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006g, pp. 38-64).

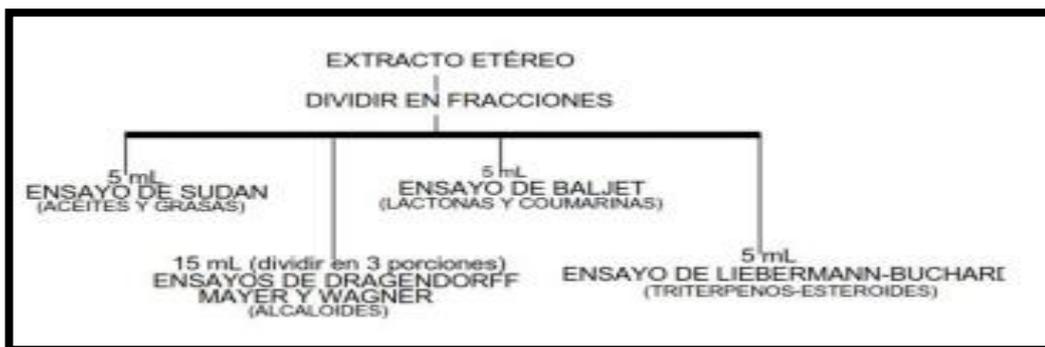


Figura 2-2. Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.

Fuente: (Miranda, 2006, p. 40)

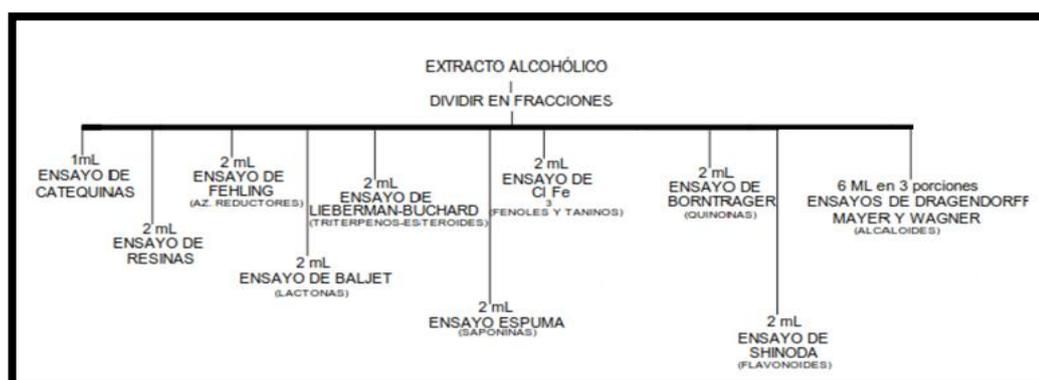


Figura 3-2. Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.

Fuente: (Miranda, 2006, p. 40)



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

Fuente: (Miranda, 2006, p. 41)

La metodología de los ensayos descritos anteriormente para la realización del tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos se detallan a continuación y se basan en las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006h, pp. 40-45).

2.5.2.1. Ensayo de Sudán.

Este ensayo detecta la existencia de compuestos grasos, para su efecto se tomaron 5 mL del extracto y se le añadió 1 mL de colorante de Sudán III o Sudán IV. Se calentó en un baño de agua hasta volatilizar el solvente. El ensayo se considera positivo si aparecen gotas o una laminilla coloreada de color rojo en el líquido o en las paredes del tubo de ensayo (Miranda, 2006i, pp. 40-45)

2.5.2.2. Ensayo de Dragendorff.

Este ensayo detecta la presencia de alcaloides, para lo cual se tomó una alícuota del extracto, se evaporizó el solvente y el residuo se disolvió en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. En el caso del extracto acuoso, se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado. A la solución acuosa ácida se adicionó 3 gotas del reactivo de Dragendorff. El ensayo se considera positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda, 2006j, pp. 40-45).

2.5.2.3. Ensayo de Mayer.

Este ensayo al igual que el descrito anteriormente detecta la presencia de alcaloides, para lo cual se procedió de la misma forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida. Posteriormente, se añadió una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y se filtró; finalmente, se agregaron 3 gotas del reactivo de Mayer. El ensayo se considera positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda, 2006k, pp. 40-45).

2.5.2.4. Ensayo de Wagner.

Este ensayo también detecta la presencia de alcaloides, para la realización de este ensayo se procedió de la misma forma que los ensayos descritos anteriormente hasta obtener la solución ácida; posteriormente, se añadió 3 gotas del reactivo. El ensayo se considera positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda, 2006l, pp. 40-45).

2.5.2.5. Ensayo de Baljet.

Este ensayo detecta la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, especialmente coumarinas. Para la realización de este ensayo se tomó una alícuota del extracto, se evaporó el

solvente en un baño de agua caliente y se redisolvió el residuo en 1 mL de alcohol etílico; posteriormente, se añadió 1 mL de reactivo. Se considera este ensayo positivo cuando aparece una coloración rojiza (++) o un precipitado rojo (+++) (Miranda, 2006m, pp. 40-45).

2.5.2.6. Ensayo de Liebermann-Burchard.

Este ensayo detecta la presencia de compuestos triterpenos y/o esteroides, ya que ambos poseen un núcleo de androstano, insaturado en el anillo B en la posición 5 y 6. Para la realización de este ensayo se tomó una alícuota del extracto, se evaporó el solvente en un baño de agua caliente y el residuo se redisolvió en 1 mL de cloroformo; posteriormente, se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló; finalmente, por las paredes del tubo de dejaron resbalar 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

Se considera este ensayo positivo cuando existe un cambio rápido de coloración como se detalla a continuación:

- Rosado - Azul (muy rápido).
- Verde intenso - visible (aunque rápido).
- Verde oscuro – negro - final de la reacción (Miranda, 2006n, pp. 40-45)

2.5.2.7. Ensayo de resinas.

Para este ensayo se tomó a una alícuota del extracto etanólico y se adicionaron 10 mL de agua destilada. El ensayo se considera positivo cuando se observa la aparición de precipitado (Miranda, 2006ñ, pp. 40-45).

2.5.2.8. Ensayo de la espuma.

Este ensayo detecta la existencia de saponinas tanto esteroidales como triterpénicas. Para realizar este ensayo se tomaron 2 mL del extracto etanólico y se diluyó con 5 veces su volumen en agua, se mezcló y se agitó durante 10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persiste por un tiempo mínimo de 2 minutos (Miranda, 2006o, pp. 40-45).

2.5.2.9. Ensayo de cloruro férrico.

Este ensayo permite reconocer la existencia de compuestos fenólicos y taninos específicamente en el extracto alcohólico y principalmente taninos en el extracto acuoso. Para la realización de

este ensayo se tomó una alícuota del extracto y se adicionó acetato de sodio para neutralizarlo y posteriormente se añadió 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. Se considera este ensayo positivo cuando existe un cambio de coloración como se detalla a continuación:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos (Miranda, 2006p, pp. 40-45).

2.5.2.10. Ensayo de Shinoda.

Este ensayo permite detectar la existencia de flavonoides en el extracto. Para realizar este ensayo se diluyó una alícuota del extracto alcohólico o acuoso en 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico.

Se esperó 5 minutos a que finalice la reacción y finalmente se adicionó alcohol amílico, se mezcló y se dejó reposar hasta que las fases se separen. El ensayo es positivo cuando el alcohol amílico se colorea amarillo, naranja, carmelita o rojo (Miranda, 2006q, pp. 40-45).

2.5.2.11. Ensayo de Catequinas.

Para realizar este ensayo se tomó una gota del extracto alcohólico con un capilar y se aplicó sobre papel filtro; seguidamente, se adicionó una gota de solución de carbonato de sodio sobre la mancha del extracto en el papel filtro. El ensayo se considera positivo cuando al observarse el papel filtro en una cámara UV parece una mancha verde carmelita. (Miranda, 2006r, pp. 40-45).

2.5.2.12. Ensayo de Borntrager.

Este ensayo detecta la presencia de quinonas en los extractos vegetales. Para realizar este ensayo se tomó una alícuota del extracto y se evaporó hasta sequedad en un baño de agua, el residuo se redisolvió con 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua. Se mezcló y se agitó, se dejó en reposo hasta la separación de las fases. El ensayo se considera positivo cuando la fase superior, es decir; la fase acuosa alcalina toma una coloración rosada (++) o roja (+++) (Miranda, 2006s, pp. 40-45).

2.5.2. 13. *Ensayo de Fehling.*

Este ensayo permite reconocer la existencia de azúcares reductores en el extracto. Para realizar este ensayo se evaporó el solvente, en caso de que este no se encuentra en agua, y se redisolvió el residuo en 2 mL de agua; posteriormente, se adicionó 2 mL de reactivo y se calentó en un baño de agua durante 10 minutos la mezcla. El ensayo es considerado positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo (Miranda, 2006t, pp. 40-45).

2.5.3. *Preparación del extracto hidroalcohólico de Bidens andicola.*

Después de haber realizado el tamizaje fitoquímico se procedió a obtener el extracto etanólico al 70% (hidroalcohólico), de *Bidens andicola*, para su posterior control de calidad y análisis. El extracto fue elaborado siguiendo el procedimiento citado a continuación y basado en el trabajo de Andersen y Markham (2006, pp. 1-10).

Procedimiento:

Se pesó 1g de droga cruda seca y molida, se colocó en un tubo de ensayo tapa rosca y se añadió 10 mL de etanol al 70 % en agua y 10 mL de hexano; posteriormente, se vortizó durante 15 minutos y se filtró.

El residuo sólido se lavó con 10 mL de etanol al 70% y con 10 mL de hexano; finalmente, de la solución filtrada se separó, el extracto hidroalcohólico de la fase hexánica. Se repitió este procedimiento hasta completar los 10 gramos de droga cruda. Finalmente se concentró el extracto a $\frac{1}{4}$ del volumen. (Andersen y Markham, 2006a, pp. 1-10).

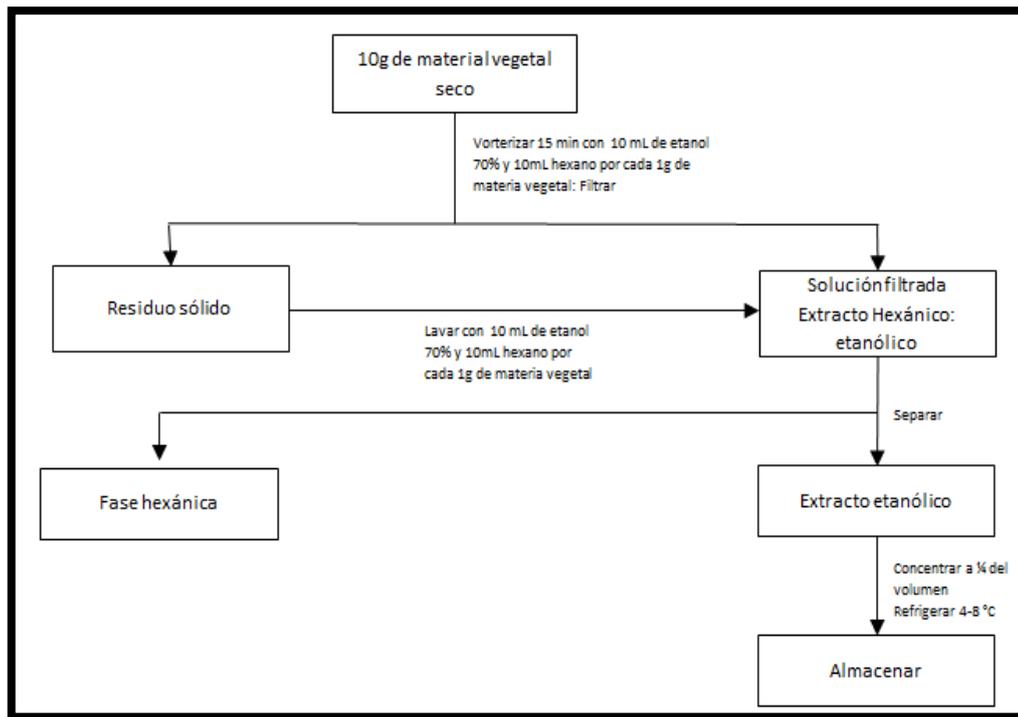


Figura 5-2. Protocolo de elaboración del extracto etanólico de *Bidens andicola*.

Realizado por: Estefanía López, 2016

2.5.4. Control de calidad del extracto hidroalcohólico de *Bidens andicola*.

2.5.4.1. Requisitos organolépticos

- Determinación de olor: Se tomó una tira de papel de 10 cm de largo y se introdució el extremo en la muestra de ensayo, se olió y se determinó la correspondencia con la característica del extracto. (Miranda, 2006u, pp. 56-60).
- Determinación del color: Se tomó un tubo de ensayo limpio y seco y se llenó las tres cuartas partes con la muestra de ensayo, se observó el color, la transparencia y la existencia o no de partículas. (Miranda, 2006v, pp. 56-60).

2.5.4.2. Determinación de densidad relativa.

Es la relación existente entre la masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Para determinar la densidad relativa inicialmente se pesó el picnómetro vacío y seco a 2°C y se llenó con la porción de ensayo manteniéndolo a 25 °C durante 15 minutos.

Se ajustó el líquido al nivel empleado finalmente se secó exteriormente el picnómetro y se pesó. Se repitió la misma operación con el agua destilada a 25°C. Este ensayo se realizó por triplicado. Para calcular la densidad del extracto se utilizó la siguiente ecuación (Miranda, 2006w, pp. 56-60):

$$D = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Donde:

M₁: Peso del picnómetro con la muestra (g)

M₂: Peso del picnómetro con el agua (g)

M: Peso el picnómetro vacío (g).

2.5.4.3. Índice de refracción.

El índice de refracción constituye la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Procedimiento:

Para realizar este ensayo se colocó en el prisma del refractómetro una gota de agua destilada, se ajustó el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Posteriormente se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, el termoprisma fue cerrado y se enfocó la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición. Este ensayo se realizó por triplicado (Miranda, 2006x, pp. 56-60).

2.5.4.4. Medición del pH.

El pH es un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógeno.

Procedimiento:

La medición del pH se realizó mediante un instrumento medidor de pH digital, para lo cual se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH, posteriormente se determinó el valor de pH de la muestra. Este ensayo se realizó por triplicado (Miranda, 2006y, pp. 56-60).

2.5.4.5. Determinación de sólidos totales.

Es la determinación de la variación de la masa debido a la pérdida de sustancias volátiles mediante un proceso de evaporación de la porción de ensayo y secado del residuo en una estufa.

Procedimiento:

Para el ensayo se tomaron 5 mL del extracto y se llevó a una cápsula previamente tarada, se evaporó hasta sequedad en un baño de agua caliente. La cápsula se trasladó hacia una estufa a 105°C durante aproximadamente 3 horas, después se colocó la cápsula en una desecadora para que se enfríe y alcance temperatura ambiente hasta masa constante, para lo cual se mantuvo un tiempo desecado de 1 hora. Este ensayo se realizó por triplicado (Miranda, 2006z, pp. 56-60).

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

$$ST = \frac{P_r - P}{V} \times 100$$

Donde:

P_r= masa de la cápsula más el residuo (g)

P= masa de la cápsula vacía (g)

V= volumen de la porción de ensayo.

100=factor matemático para el cálculo.

2.5.5. Cromatografía en capa fina.

2.5.5.1. Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica del extracto hidroalcohólico

Después de haber realizado el control de calidad del extracto se procedió a realizar el estudio cromatográfico en capa fina. Este estudio se llevó a cabo con la finalidad de identificar los flavonoides que posee la droga vegetal y que pueden presentar actividad antiinflamatoria. Los análisis cromatográficos realizados en capa fina fueron basados en los métodos descritos en el libro de Wagner & Bladt (2001, pp. 195-244).

Cromatografía en columna.

Con el fin de purificar la fracción flavónica se procedió a realizar una cromatografía en columna del extracto etanólico 70%, para lo cual se utilizó como fase móvil metanol 99,8% y como soporte poliamida. Después de empaquetada la columna con el soporte, se procedió a eluir el extracto etanólico y después la fase móvil. Se recolectó la solución metanólica eluída de la columna en un vaso de precipitación para una posterior concentración en el Rotavapor a una temperatura de 60°C (Andersen y Markham, 2006b, pp. 1-10).

Después de concentrada la fase metanólica se procedió a aplicar 20 µL con un capilar en una placa cromatográfica de Sílica gel con indicador fluorescente 254 nm; posteriormente, se procedió a colocar la placa cromatográfica en la cuba utilizándose la fase móvil conformada por: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100, 11, 11, 26) (Wagner y Bladt, 2001a, pp. 195-244).

Cuando la fase móvil corrió las tres cuartas partes de la placa cromatográfica se procede a retirarla de la cuba, se dejó secar a temperatura ambiente y se observó en la lámpara UV. Finalmente, se reveló con tricloruro de aluminio al 5% en metanol como lo describe en el trabajo realizado por Gutiérrez (2000, pp. 56-62).

Se midió el Rf de cada uno de los compuestos que se observaron. Para calcular el Rf de cada uno de los compuestos observados se utilizó la siguiente ecuación:

$$Rf = \frac{\text{Distancia por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

Donde:

Rf= Factor de retención.

2.5.5.2. Cromatografía en capa fina del extracto hidrolizado.

Preparación del extracto hidrolizado de *Bidens andicola*.

Se lo realizó de igual forma que el extracto descrito en el apartado anterior. Después de haber obtenido el extracto de los 10g de droga cruda se procede a su hidrólisis; para lo cual se midió el volumen de extracto obtenido y se añadió un volumen igual de una solución de HCl 2N en etanol; finalmente, se refluxó por dos horas, el residuo se lavó con 50mL etanol al 70% en agua y se concentró a $\frac{1}{4}$ del volumen inicial.

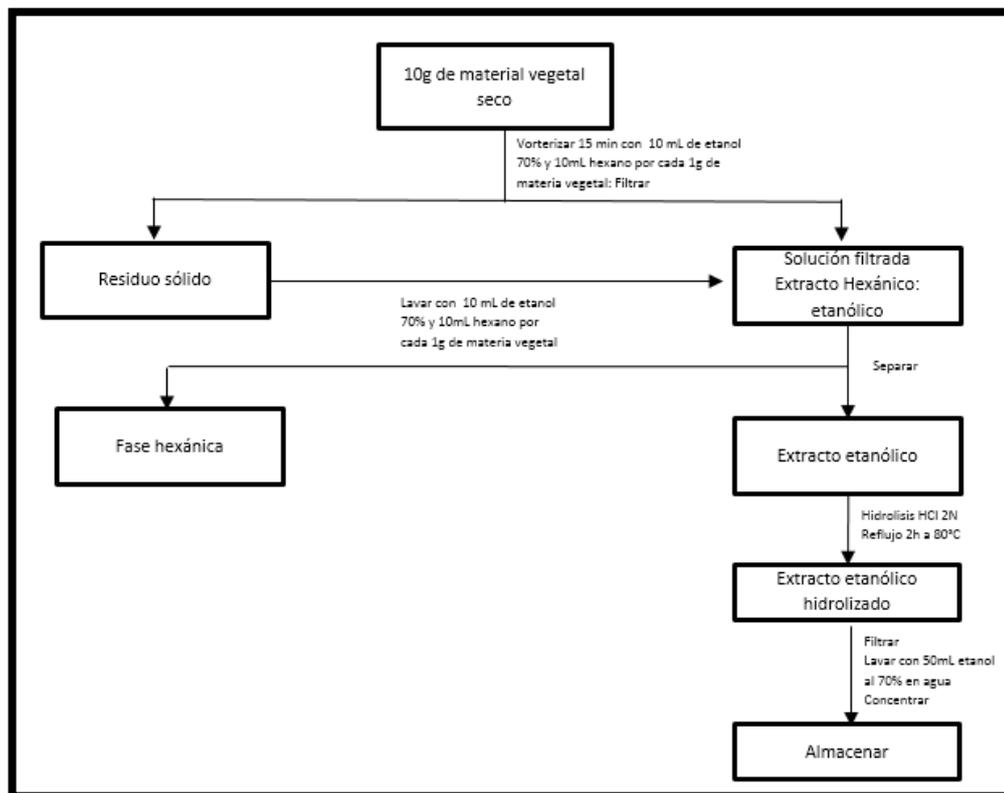


Figura 6-2. Obtención del extracto hidrolizado de *Bidens andicola*

Realizado por: Estefanía López, 2016

Cromatografía en capa fina del extracto hidrolizado.

Se tomó 100 μ L de extracto hidroalcohólico hidrolizado concentrado y se disolvió en 10 mL de metanol 99,8%, de esta solución se aplicó 20 μ L en una placa cromatográfica de Sílica gel con

indicador fluorescente 254 nm, posteriormente se procedió a colocar la placa cromatográfica en la cuba utilizándose la fase móvil conformada por: Cloroformo: Metanol: Agua (40:9:1), descrita en el libro de Wagner y Bladt (2001b, pp. 195-244).

Cuando la fase móvil corrió las tres cuartas partes de la placa cromatográfica se procede a retirarla de la cuba, se dejó secar a temperatura ambiente y se observó en la lámpara UV. Finalmente se reveló con tricloruro de aluminio al 5% en metanol como lo describe en el trabajo realizado por Gutiérrez (2000a, pp. 56-62).

2.5.6. Aislamiento, purificación e identificación del compuesto aislado.

Se realizó el extracto hidrolizado de 10g de droga cruda como se lo describió anteriormente. Una vez concentrado el extracto se procedió a realizar una extracción líquido - líquido con 100 mL de éter etílico y se separaron las fases; a la fase etérea se añadió 100mL de solución saturada de bórax en agua (4% w/w) y se trasladó a un embudo de separación. Se separó la fase acuosa (con la solución saturada de bórax) y se llevó a un pH de 6 con ácido clorhídrico 2N en agua.

La solución acuosa ligeramente ácida se extrajo nuevamente con 100mL de éter etílico y se separó ambas fases. La fase etérea extraída adquirió una coloración amarilla clara, la misma que fue evaporada a sequedad; el residuo se redisolvió con 100mL de acetona. Finalmente, se evaporó la acetona y el flavonoide fue cristalizado en 100mL de acetato de etilo.

El producto cristalizado fue filtrado a través de una membrana, fue secado para la posterior realización de las pruebas de identificación del flavonoide aislado y el ensayo antiinflamatorio y de citotoxicidad. Para el aislamiento y purificación del compuesto aislado se siguió la metodología presentada en el trabajo de Solís et al., (1991c, pp. 121-123).

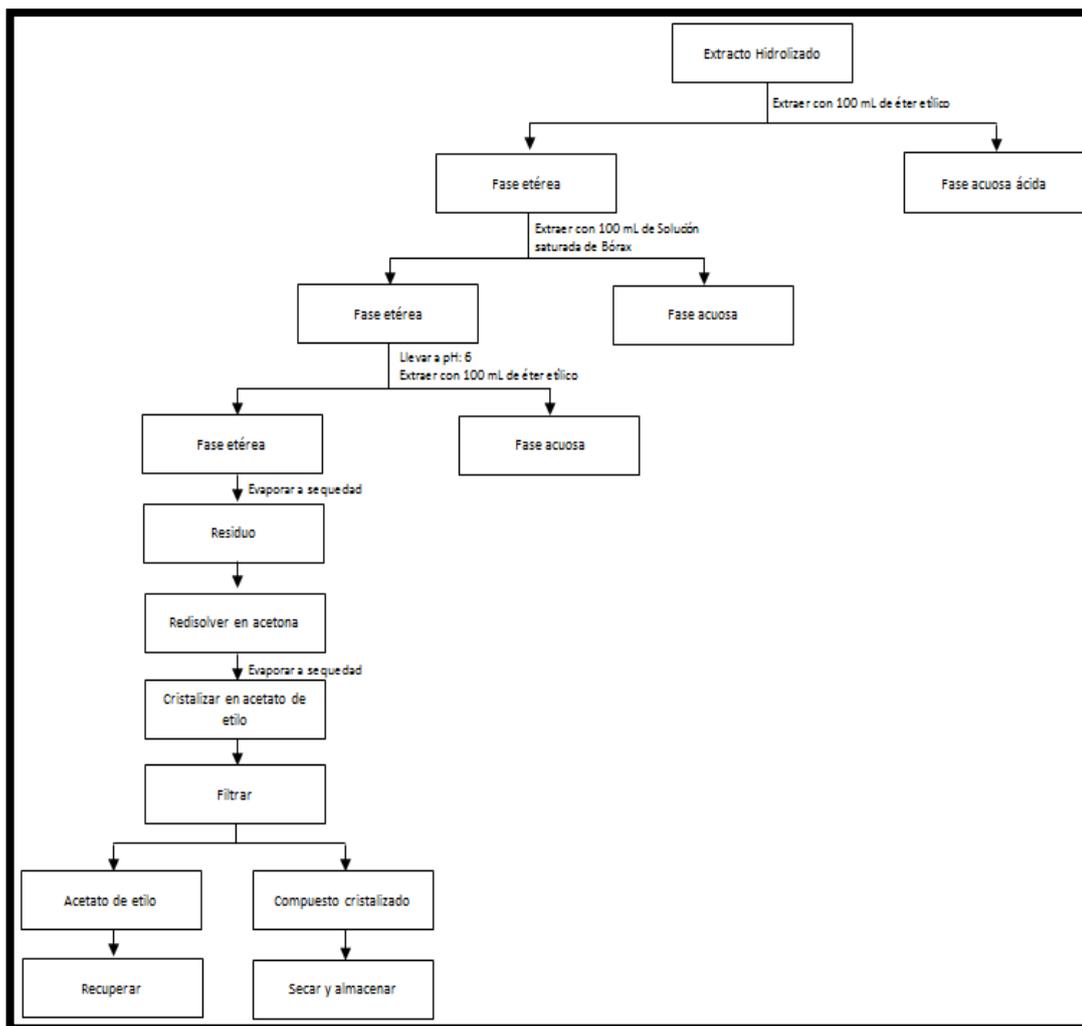


Figura 7-2: Diagrama del procedimiento de aislamiento y purificación del flavonoide aislado de *Bidens andicola*

Realizado por: Estefanía López, 2016

2.5.6.1. Cromatografía en capa fina del compuesto aislado.

La cromatografía en capa fina del compuesto aislado se realizó diluyendo en compuesto en metanol a una concentración de 100ppm, en una placa de Sílica gel con indicador fluorescente 254 nm, utilizándose una fase móvil del tipo BAW, compuesta por n – butanol: ácido acético: agua (3:4:2), para la separación de la quercetina y compuestos isoméricos monometil éter de la quercetina (Dolphin, 1983, p.408).

Cuando la fase móvil corrió los tres cuartos de la placa cromatográfica se procede a retirarla de la cuba, se dejó secar a temperatura ambiente y se observó en la lámpara UV. Finalmente se midió el Rf del compuesto observado, para lo cual se utilizó la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

Donde:

Rf= Factor de retención.

2.5.6.2. Espectroscopia UV del compuesto aislado.

El análisis espectral UV del flavonoide aislado se basó en la metodología presentada en el libro de Centre y Lane (2001, pp. 37-40). En primera instancia se preparó una solución de 100 ppm de compuesto aislado utilizando como solvente metanol; de esta solución preparada inicialmente se realizó un barrido inteligente en un rango de entre 200 a 500nm. Posteriormente se tomó 6mL de la solución y se dividió en dos grupos iguales.

Al primer grupo se le añadió 50mg de acetato de sodio anhidro y se agitó hasta su disolución y se realizó un barrido inteligente en el mismo rango longitud de onda planteada anteriormente.

Al segundo grupo se añadieron 2 gotas de una solución de AlCl₃ al 5% en metanol y se realizó el barrido inteligente entre los 200 y 500nm de longitud de onda; posteriormente, a esta misma solución se añadió 2 gotas de ácido clorhídrico acuoso al 20%, y se volvió a realizar un barrido inteligente.

2.5.6.3. Análisis infrarrojo.

Se colocó una pequeña porción de la muestra en el equipo con una pipeta Pasteur para obtener el espectro infrarrojo del compuesto aislado.

2.5.7. Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

La concentración de fenoles totales de los extractos tanto del hidrolizado como del no hidrolizado fue medida por espectrofotometría, esta técnica se basa en una reacción colorimétrica de óxido-reducción en el que el agente oxidante fue el reactivo de Folin-Ciocalteu. Inicialmente se preparó una curva de calibración para lo que se utilizó una solución estándar de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm (mg/L).

El procedimiento realizado fue el mismo tanto para los extractos como para las soluciones estándar.

Se tomaron 2 mL de las muestras y de la solución estándar de ácido gálico, se mezclaron 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 20%. Cinco minutos después, se añadió 0,5 mL de solución de Na_2CO_3 al 20% y 5 mL de agua destilada, se dejó reposar la mezcla durante una hora protegiendo de la luz y a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizó las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Se trazó la curva de calibración (Concentración Vs Absorbancias). (Huang y Lean, 2011: pp. 11150-11159).

Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por ml de tintura, por 100 gramos de planta y en porcentaje.

2.5.8. Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico.

La cuantificación de flavonoides totales del extracto, fue medido por espectrofotometría utilizando cloruro de aluminio. Inicialmente se preparó una curva de calibración para lo que se utilizó una solución estándar de quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. El procedimiento realizado fue el mismo tanto para los extractos como para las soluciones estándar.

Se tomó 1 mL de la muestra o de las soluciones patrones y se añadió 4mL de agua destilada y 0.3 mL de NaNO_2 al 5%. Después de 5 minutos se añadieron 0.3 mL de AlCl_3 al 10%. Seis minutos después se adicionaron 2mL de NaOH 1M. Finalmente se mezcló y se dejó en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo sombra. La absorbancia se leyó a 510 nm (Boukhris et al., 2013: pp. 1206-1213).

Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por ml de tintura, por 100 gramos de planta y en porcentaje.

2.5.9. Ensayo antiinflamatorio y citotóxico.

El ensayo antiinflamatorio y de citotoxicidad *in vitro*, fue realizado tanto con el extracto etanólico al 70%, liofilizado; así como con el compuesto aislado. El esquema que muestra cómo se obtuvo el extracto liofilizado se presenta a continuación:

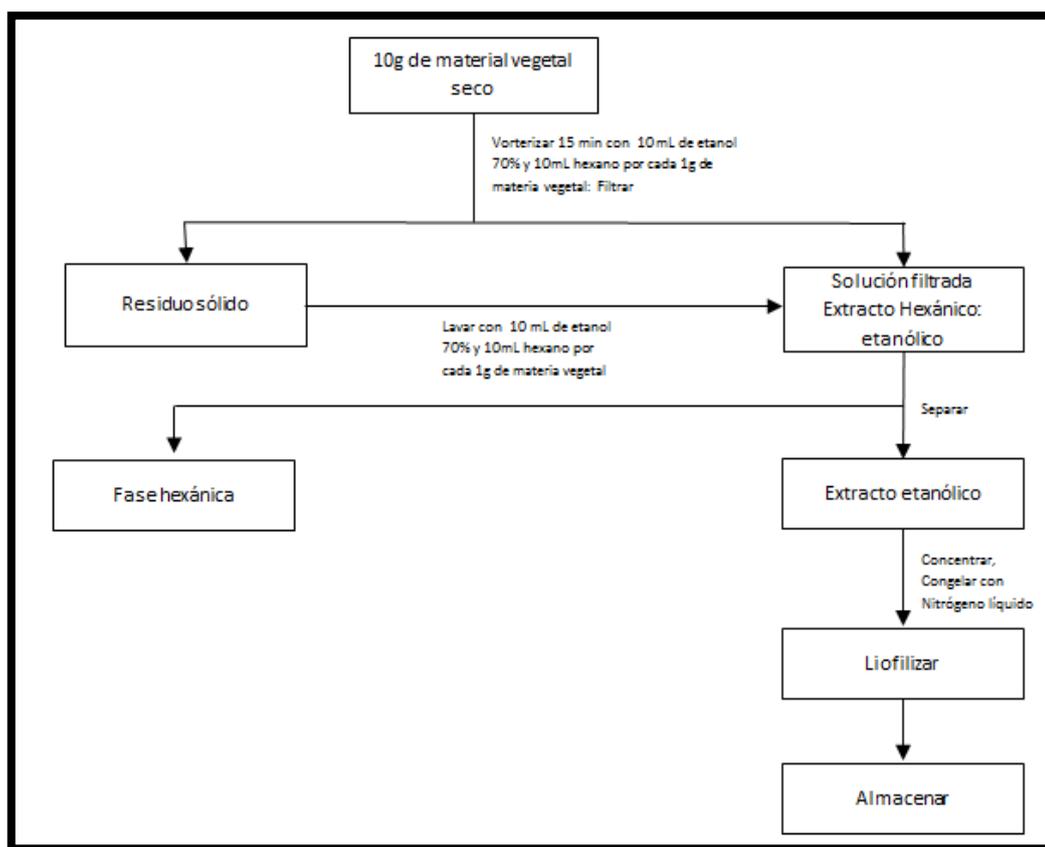


Figura 8-2. Obtención del extracto liofilizado de *Bidens andicola*

Realizado por: Estefanía López, 2016

2.5.9.1. Aislamiento de neutrófilos.

Se extrajeron 10 mL sangre venosa de un paciente sano en un tubo de ensayo, mezclándose con 1 mL de heparina sódica al 5%. Se colocó en cuatro tubos de ensayo 3 mL de Ficoll paque en cada uno; posteriormente, se añadieron lentamente 2.5 mL de la sangre extraída en cada tubo, sobre el Ficoll. Se dejó reposar durante 5 minutos y finalmente se centrifugaron los cuatro tubos durante 30 minutos a 1500 rpm.

Se separó el suero de los tubos y se incubó en una estufa a 37°C. Los neutrófilos también fueron separados y colocados en un solo tubo. El tubo que contiene los neutrófilos se mezcló con 2 mL de MHS y se sometió a centrifugación durante 30 minutos a 1500 rpm, se desechó el sobrenadante, se diluyó con 4 mL de MHS (solución modificada de Hanks') para llegar a una concentración de 10^4 neutrófilos/ μ L y se incubó en una estufa a 37°C durante 30 minutos (Tan & Berridge, 2000b, pp. 59-68).

2.5.9.2. Ensayo antiinflamatorio *in vitro*.

La actividad antiinflamatoria *in vitro* tanto del extracto hidroalcohólico de *Bidens andicola*, como del compuesto aislado, se realizó siguiendo el protocolo modificado basado en el ensayo de Tan y Berridge, (2000b: pp. 59-68).

Inicialmente, se requirió elaborar una solución diluyente de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS como disolvente tanto para los controles como para las soluciones de ensayo.

Se preparó una solución madre del extracto y del compuesto a ensayar, disolviendo 2 mg en 5 mL de solución diluyente para solubilizar el sólido; de la solución madre se realizaron las respectivas diluciones a 25, 50, 100, 200 ppm (mg/L). Posteriormente, se prepararon los controles y se detallan continuación:

- Control Positivo: Solución de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS
- Control negativo: Solución de Tritón X-100 0.1% en MHS
- Control positivo comparativo: Ácido acetilsalicílico a 200 ppm (mg/L) en solución diluyente.

La actividad antiinflamatoria *in vitro* se determinó mezclando en un pocillo 140µl de una suspensión de neutrófilos aislados en MHS (pH 7.4), 10 µl WST-1 y 100 µl de las diluciones a 25, 50, 100, 200 ppm (mg/L) de cada una de las sustancias a ensayar, el esquema que se siguió se muestra a continuación:

Tabla 4-2: Esquema para la realización del ensayo antiinflamatorio *in vitro* de *Bidens andicola*.

TRATAMIENTO	Compuesto de prueba/controles, µl	Suspensión de células, µl	WST – 1, µl
Control DMSO 5%	100	140	10
Control Tritón X – 100 0.1%	100	140	10
Control Aspirina 200 ppm	100	140	10
Dilución 1 , 200ppm	100	140	10
Dilución 2, 100ppm	100	140	10
Dilución 3, 50ppm	100	140	10
Dilución 4, 25ppm	100	140	10

Realizado por: Estefanía López.

Fuente: (Tan y Berridge, 2000: pp. 59-68)

Todos los compuestos fueron incubados en una estufa a 37 °C durante 5 minutos; posteriormente, los pocillos fueron retirados de la estufa y se añadieron 50 µL de una solución de Zymosan A opsonizado para iniciar la reacción.

Para la opsonización del Zymosan se adicionó 1.5 mL de suero por cada 3.8 mg de Zymosan, después se centrifugó a 3000rpm durante 5min y finalmente se resuspendió en MHS. Los pocillos con las muestra fueron incubados nuevamente a 37°C, durante una hora y finalmente se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 450nm. Para calcular el porcentaje de inhibición inflamatoria se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inh. Inflamatoria} = \frac{\text{Absorbancia DMSO 5\%} - \text{Absorbancia sustancia ensayo}}{\text{Absorbancia DMSO 5\%}} \times 100$$

2.5.9.3. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

La citotoxicidad *in vitro* tanto del extracto etanólico 70% de *Bidens andicola* así como del compuesto aislado se realizó siguiendo el protocolo modificado basado en el método de Berridge et al., (1996b: pp. 4-9).

Inicialmente, se requirió elaborar una solución diluyente de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS como disolvente tanto para los controles como para las soluciones de ensayo.

Se preparó una solución madre de extracto y del compuesto a ensayar, disolviendo 2 mg en 5 ml de solución diluyente para solubilizar el sólido, de la solución madre se realizaron las respectivas diluciones a 25, 50, 100, 200 ppm (mg/L). Posteriormente, se prepararon los controles y se detallan continuación:

- Control Positivo: Solución de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS
- Control negativo: Solución de Tritón X-100 0.1% en MHS
- Control positivo comparativo: Ácido acetilsalicílico a 200 ppm (mg/L) en solución diluyente.

La citotoxicidad *in vitro* se determinó mezclando en un pocillo 140µl de una suspensión de neutrófilos a aislados en MHS (pH 7.4), 10 µl WST-1 y 100 µl de las diluciones a 25, 50, 100,

200 ppm (mg/L) de las sustancias a ensayar, el esquema que se siguió se muestra a continuación:

Tabla 5-2: Esquema para la realización del ensayo de citotoxicidad *in vitro* de *Bidens andicola*.

TRATAMIENTO	Compuesto de prueba/controles, μl	Suspensión de células, μl	WST – 1, μl
Control DMSO 5%	100	140	10
Control Tritón X – 100 0.1%	100	140	10
Control Aspirina 200 ppm	100	140	10
Dilución 1 , 200ppm	100	140	10
Dilución 2, 100ppm	100	140	10
Dilución 3, 50ppm	100	140	10
Dilución 4, 25ppm	100	140	10

Fuente: (Berridge et al. 1996: pp. 4-9).

Realizado por: Estefanía López, 2016

Todos los compuestos fueron incubados en una estufa a 37 °C durante una hora y finalmente se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 450nm. Para calcular el porcentaje de inhibición inflamatoria se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad Celular} = \frac{\text{Absorbancia sustancia ensayo}}{\text{Absorbancia DMSO 5\%}} \times 100$$

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

3.1. Parámetros de control de calidad de la droga cruda

Después de haber realizado los diferentes ensayos al material vegetal se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 1-3: Resultados obtenidos del control de calidad de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Parámetro	Partes aéreas de <i>Bidens andicola</i> (%)	Referencia USP # 28
Contenido de humedad	9,78±0,01	7-14%
Cenizas totales	6,64±0,05	Hasta 12%
Cenizas solubles en agua	3,54±0,34	Hasta 7%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	0,23±0,03	Hasta 5%

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Dentro de los ensayos realizados para determinar los parámetros de control de calidad del material vegetal se determinó el contenido de humedad, el cual para las partes aéreas de *Bidens andicola* fue de 9,78±0,01 encontrándose dentro de los parámetros establecidos por la USP # 28, lo cual refleja que la planta fue recolectada, secada y almacenada adecuadamente; la cantidad de humedad en el material vegetal es determinante para mantener la estabilidad de los compuestos que la planta posee, evitando así posibles procesos de hidrólisis o de crecimiento de hongos, bacterias u otros microorganismos que pudiesen afectar su composición (Organización Mundial de la Salud, 1998).

El porcentaje de cenizas totales presentes en el material vegetal representa el contenido de sales inorgánicas y minerales que la muestra posee, entre las cuales puede tener: Fosfatos, carbonatos, nitritos, sulfatos, potasio, calcio; que son los más frecuentes. Igualmente, pueden encontrarse otros ácidos orgánicos, como: málico, oxálico, acético.

A su vez, el porcentaje de cenizas solubles en agua, representa el contenido de sales solubles en la muestra; mientras que, el porcentaje de cenizas insolubles en ácido, indican el contenido de oxalatos o carbonatos que puede poseer el material vegetal.

Un elevado valor de este parámetro puede ser un indicativo del contenido de arena o tierra silíceas con la cual la planta puede estar contaminada y que no fueron eliminadas correctamente en el proceso de acondicionamiento del material vegetal (Organización Mundial de la Salud, 1998a).

Todos los parámetros obtenidos al analizar el porcentaje de cenizas totales ($6,64 \pm 0,05$), cenizas solubles en agua ($3,54 \pm 0,34$), cenizas insolubles en ácido clorhídrico ($0,23 \pm 0,03$); de las partes aéreas de *Bidens andicola* se encontraron dentro del límite de referencia establecido por la USP #28, resultados que se pueden ver en la tabla 1-3, indicando la ausencia de contaminación por arena, tierra o sílices del material vegetal.

3.2. Tamizaje fitoquímico.

El tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos a partir de las partes aéreas de *Bidens andicola* se realizó siguiendo las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006a, pp. 38-64), obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 2-3: Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Ensayo	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
Sudan	+	NA	NA
Dragendorff	-	-	-
Mayer	-	-	-
Wagner	-	-	-
Baljet	-	+	NA
Liebermann-Burchard	-	-	NA
Resinas	NA	-	NA
Espuma	NA	+	+
Cloruro férrico	NA	+++	+++
Shinoda	NA	+++	+++
Catequinas	NA	+	NA
Borntrager	NA	-	NA
Feheling	NA	+++	+++

+ (Escaso), ++ (Moderado), +++ (Abundante); NA (No aplica)

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de *Bidens andicola* se muestran en la tabla 2-3, e indican que en el extracto etéreo se encontró una escasa cantidad de compuestos grasos, debido a un resultado ligeramente positivo para el ensayo de Sudán. En el extracto alcohólico se detectó una escasa presencia de coumarinas, catequinas y saponinas; reflejado por los resultados obtenidos en los ensayos de Baljet, Catequinas y de espuma, respectivamente; en este extracto, se pudo determinar la presencia dominante de compuestos fenólicos, flavonoides, y de azúcares, ya que los resultados para los ensayos de Cloruro férrico, Shinoda y Fehling, respectivamente; fueron positivos.

Por su parte, en el extracto acuoso se encontró una escasa presencia de saponinas; que fueron identificadas gracias al ensayo de la espuma; la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, y de azúcares; es dominante también en este extracto. Se determinó la inexistencia de alcaloides en los extractos, ya que los resultados obtenidos de todos los ensayos realizados para indicar la presencia de alcaloides, fueron negativos.

Los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico se relacionan con el estudio realizado por De Tomassi et al., (1998c, pp. 10-14), en el cual se caracterizan metabolitos secundarios que posee la planta; hallados en su mayoría, compuestos de tipo flavónico, principalmente flavonoles 7-O-glicosidos teniendo como agliconas quercetina o quercetina 3 – metil éter y cadenas de azúcares que incluyen β -D-glucopiranososa, α -L-ranopiranososa y β -D-xilopiranososa; además de chalconas ester glicosido.

No se han encontrado estudios realizados específicamente en *Bidens andicola* que confirmen la existencia de otros metabolitos secundarios como es el caso de coumarinas, catequinas y saponinas halladas en este estudio; pero estudios realizados en otra especie de *Bidens*, como es el caso de *Bidens pilosa* (Kouakou et al. 2008: pp. 29-37); mencionan la existencia de los mismos, por lo que se establece que dichos metabolitos son específicos del género de la planta en estudio.

Las propiedades benéficas que tienen los flavonoides sobre la salud son muchas, identificándolos con múltiples actividades biológicas, entre ellas antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares y cancerígenas (Martínez et al, 2002i, pp. 271-278).

Debido a la abundante cantidad de flavonoides que presenta la planta *Bidens andicola*, se decidió caracterizar los compuestos existentes mediante cromatografía en capa fina y

posteriormente realizar el ensayo antiinflamatorio y citotóxico del extracto etanólico de la planta.

3.3. Control de calidad del extracto hidroalcohólico de *B. andicola*.

Después de haber realizado el tamizaje fitoquímico para detectar compuestos característicos de la planta, se procedió a obtener el extracto etanólico 70% de las partes aéreas de *Bidens andicola* y se realizó el control de los parámetros de calidad del mismo; los resultados obtenidos para dichos parámetros se presentan en la tabla 3-3.

Tabla 3-3: Determinación de los parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Bidens andicola*

Parámetro	Extracto Etanólico 70% de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>
Características Organolépticas	
• Olor	Dulce - Característico
• Color	Amarillo
• Aspecto	Líquido
Características Físico - Químicas	
• pH	6,113 ± 0,040
• Índice de refracción	1,363 ± 0,000
• Densidad relativa	0,985 ± 0,005
• Sólidos totales (%)	4,180 ± 0,060

Realizado por: Estefanía López, 2016

El extracto etanólico de las partes aéreas de *Bidens andicola* presentó un olor dulce, característico de la planta, el cual se debe a la cantidad de flavonoides glicosídicos que posee (De Tomassi et al., 1998d, pp. 10-14). El color del extracto es de un color amarillo correspondiente a la droga utilizada.

El pH del extracto etanólico 70% de las partes aéreas de *Bidens andicola* fue ligeramente ácido (6,113 ± 0,040); valores ácidos para los extractos indican que poseen una gran cantidad de compuestos fenólicos en su composición. (Romero y Navarro, 2009: pp. 4-10).

En el caso de los parámetros de índice de refracción (1,363 ± 0,000), y sólidos totales (4,180 ± 0,060), guardan concordancia entre ellos; estos parámetros indican la buena solubilidad de los metabolitos en el solvente de extracción; además, el extracto cumple con la especificación de la

Farmacopea Francesa de 1989, la misma que establece que el porcentaje de sólidos totales no puede ser menor a 1,20.

El valor de la densidad relativa ($0,985 \pm 0,005$) también concuerda con los parámetros antes mencionados, sugiriendo la presencia de compuestos con capacidad de interrelacionarse a través de puentes de hidrógeno (Murillo et al., 2005).

3.4 . Cromatografía en capa fina.

3.4.1 Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica del extracto hidroalcohólico no hidrolizado.

Previamente a la realización de la cromatografía en capa fina del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bidens andicola* se purificó la fracción flavónica mediante cromatografía en columna, como se describió en el capítulo anterior.

La cromatografía en capa fina fue eluida con la fase móvil acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua (100:11:11:26), ya que esta presenta una buena resolución; se reveló al UV corto 254 nm y con una solución de $AlCl_3$ al 5% en metanol.

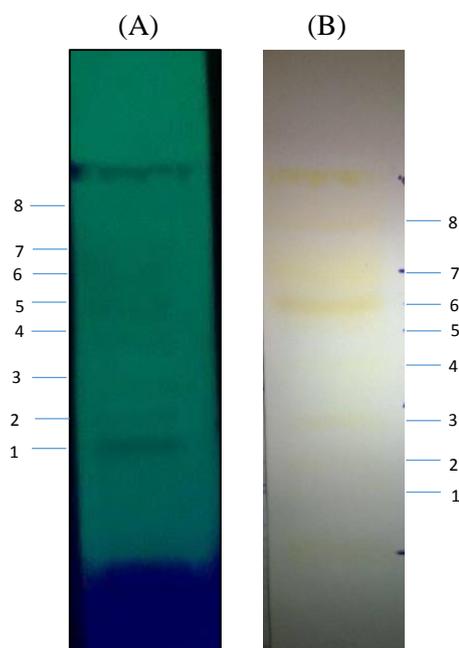


Figura 1- 3. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de *Bidens andicola*, vista a la lámpara UV 254nm (A) y revelados con $AlCl_3$ (B).

Realizado por: Estefanía López, 2016

Tabla 4-3: Resultados de la cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Nº Mancha	Rf	Posible compuesto
1	0,27	Flavonoide-glicósido
2	0,41	Flavonoide-glicósido
3	0,45	Quercetina 3-O-glicósido
4	0,60	Ácido clorogénico
5	0,65	Isoquercitrina
6	0,73	Isoquercetina
7	0,84	Quercetina 3-O-Ramnosido
8	0,87	Flavonoide-glicósido

Realizado por: Estefanía López, 2016

Los resultados presentados en la tabla 4-3 se compararon con los estudios realizados por Wagner y Bladt (2001c, pp. 195-244), y por Cetkovic *et al.*, (2003: pp. 93-102), en los cuales se utilizó la fase móvil acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua (100:11:11:26), con una constante dieléctrica de 22,60; para el análisis de los flavonoides glicosídicos de las drogas vegetales.

Debido a que no se han encontrado trabajos realizados específicamente en la planta *Bidens andicola*, los resultados obtenidos han sido comparados con los estudios efectuados por Cetkovic (2003a: pp. 93-102) y Wagner (2001d, pp. 195-244), en plantas de la familia Asteraceae; a la cual pertenece la planta objeto de este estudio.

Por otro lado, trabajos realizados con otras plantas del género *Bidens* (Zavala, 2015, pp. 32-35), en los estudios cromatográficos en capa fina, indican la presencia de flavonoides glicosídicos como: 6''O- β -D glucopiranososa α -2 ramnopiranososa-7-O-glucosilflavonol, 4'' metoxi β -D glucopiranososa α -L ramnopiranososa-7-O-glucosilflavonol, 2'' Ramnosol β -D glucopiranososa α -L ramnopiranososa-7-O-glucosilflavonol, 2'' glucosil β -D glucopiranososa α -L ramnopiranososa-7-O-glucosilflavonol, Ester 3' hidroxil-6'' p-cumarol-4''aceto glucósido de chalcona, Ester 3' hidroxil - 6''-3'' aceto glucósido de chalcona, Ester 6'' p-cumaroyl- glucosado de chalcona; y que aunque muestran Rf similares a los obtenidos en el presente estudio, no son comparables, ya que no se utilizó la misma fase móvil.

3.4.2 Cromatografía en capa fina del extracto etanólico hidrolizado.

Después de haber hidrolizado y concentrado el extracto etanólico de las partes aéreas de *Bidens andicola* se procedió a diluir una alícuota en metanol, como se describió en el capítulo anterior.

La cromatografía en capa fina del extracto hidrolizado se eluyó con una fase móvil compuesta por Cloroformo: metanol: agua (40:9:1) (Wagner y Bladt, 2001e: pp. 195-244), se reveló al UV corto 254nm y con una solución de AlCl₃ al 5% en metanol.

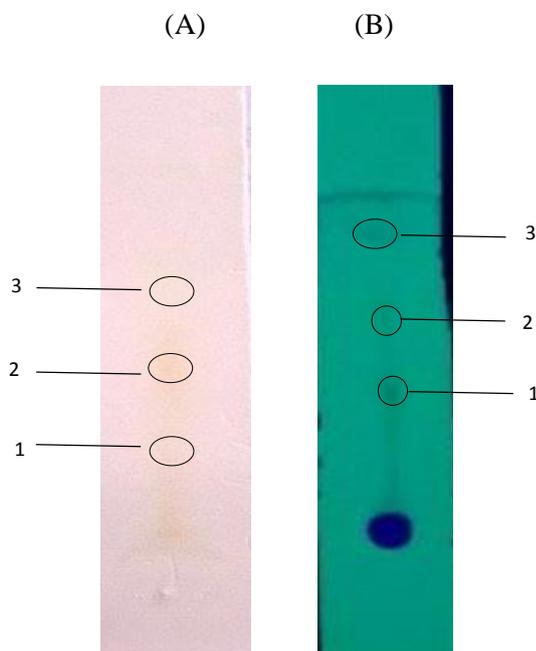


Figura 2-3. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos del extracto hidrolizado de *Bidens andicola*, vista a la lámpara UV 254nm (A) y revelados con AlCl₃ (B).

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Tabla 5-3: Resultados de la cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos de las partes aéreas de *Bidens andicola*, del extracto hidrolizado.

N° Mancha	Rf	Posible compuesto
1	0,27	-
2	0,49	-
3	0,78	Quercetina

Realizado por: Estefanía López.

En la cromatografía en capa fina realizada al extracto hidrolizado de las partes aéreas de *Bidens andicola*, se observó tres compuestos de los cuales se pudo identificar uno de ellos como quercetina, ya que el Rf obtenido fue muy semejante al encontrado en el trabajo de Sánchez (2015, pp. 54-60); en el cual se utilizó la misma fase móvil. La quercetina identificada, coincide con la información presentada en el trabajo realizado por De Tomassi *et al.*, (1998e, pp. 10-14).

Los dos compuestos restantes no pudieron ser identificados, debido a que no se encontraron estudios donde se eluyan estándares de agliconas de flavonoides en la misma fase móvil o con similar constante dieléctrica, la misma que en el caso de la fase móvil utilizada fue de 11,51.

3.5 Aislamiento, purificación e identificación del compuesto flavónico.

El compuesto se aisló siguiendo la metodología planteada en el trabajo realizado por Solís *et al.*, (1991d, pp. 121-123) y se alcanzó un rendimiento de 1,21%, similar al expuesto en ese trabajo. Para la identificación del flavonoide aislado se realizaron ensayos cromatográficos y espectroscópicos; de los cuales se obtuvieron los resultados que se presentan a continuación.

3.5.1 Cromatografía en capa fina del compuesto aislado.

Para la identificación del compuesto aislado mediante cromatografía en capa fina, se utilizó una fase móvil tipo BAW compuesta por n – butanol: ácido acético: agua (3:4:2) y placas de Sílica gel con indicador fluorescente 254nm. La fase móvil de tipo BAW, se utilizó por ser la más adecuada para la identificación de flavonoides del tipo flavonol según trabajos encontrados (Dolphin, 1983a, p.408).



Figura 3-3. Cromatografía en capa fina del compuesto aislado, visto a la lámpara UV 254nm.

Realizado por: Estefanía López, 2016.

El Rf calculado para el flavonoide aislado fue de 0,92, igual al descrito en el trabajo realizado por Solís *et al.*, (1991e, pp. 121-123), en las condiciones similares a las de este estudio; y similar al encontrado en el trabajo realizado por Dolphin, (1983b, p.408).

En el trabajo de Solís *et al.*, (1991f, pp. 121-123), identifica al compuesto aislado como 7, 8, 3', 4' – tetrahidroxiflavanona; el mismo que al ser comparado con el estudio realizado por De Tomassi *et al.*, (1998f, pp. 10-14), no coincide, ya que únicamente identifica la existencia de quercetina, quercetina 3-metil-éter y de okanina, como agliconas para los compuestos fenólicos existentes en *Bidens andicola*.

Es por esto que para identificar el componente aislado se buscó extensamente en la bibliografía, encontrándose en un trabajo, (Dolphin, 1983c, p.408), que un Rf de 0,93 utilizando un sistema tipo BAW como eluyente, indica la existencia de quercetina 3-metil-éter; Rf muy similar al que se obtuvo en la cromatografía realizada en el presente estudio; pudiendo predecirse que el compuesto aislado se trate de quercetina 3-metil-éter.

3.5.2 Espectroscopia UV.

Para tener más certeza de que el compuesto aislado se trate de quercetina 3-metil-éter se realizó un barrido espectrofotométrico en el rango de 200 a 500 nm, utilizando reactivos de desplazamiento; procedimiento que fue detallado en el capítulo anterior; obteniéndose los espectros que se muestran en las figuras a continuación:

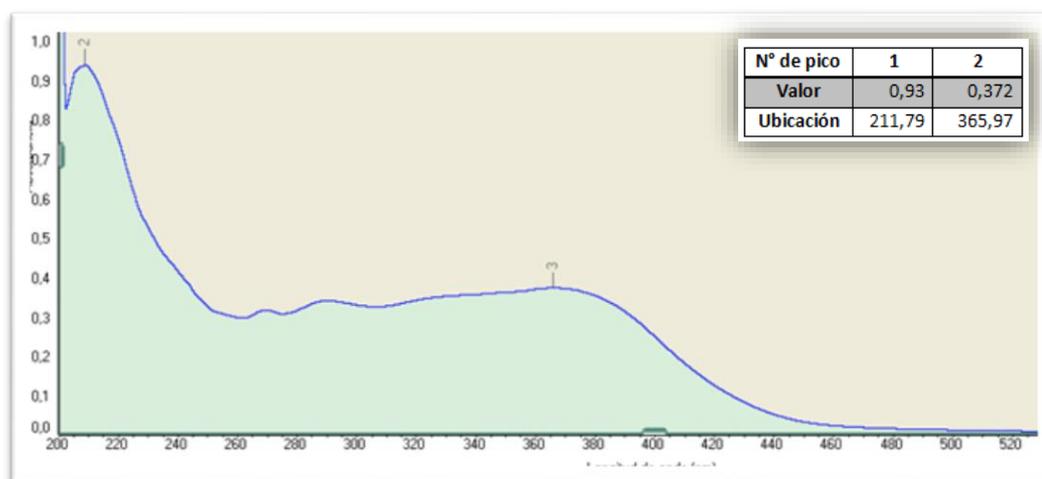


Figura 4-3. Barrido UV de 200-500nm del compuesto aislado en metanol a 100ppm sin reactivos de desplazamiento.

Realizado por: Estefanía López, 2016.

La figura 4-3 es el resultado del barrido inteligente a longitud de onda de entre 200 a 500nm, del flavonoide aislado sin reactivos de desplazamiento, y se obtuvo dos bandas la banda I a una longitud de onda de 365,97nm; una banda a esta longitud de onda es característica de flavonas y

flavonoles que presentan bandas a longitudes de onda de entre 300 a 390nm. (Martinez, 2005a, pp. 21-30).

La banda II presentó una longitud de onda de 211,79 nm, característica del anillo aromático A o funcionalidad del benzoílo, que generalmente suele presentarse entre un rango de 210 a 290nm (Centre y Lane 2001a). En este caso la más importante es la banda I, ya que es la que determina el tipo de flavonoide, en este caso se trataría de un flavonol 3-O sustituido por presentarse a una longitud de onda de no más allá de 365nm, (Martinez, 2005b, pp. 21-30).

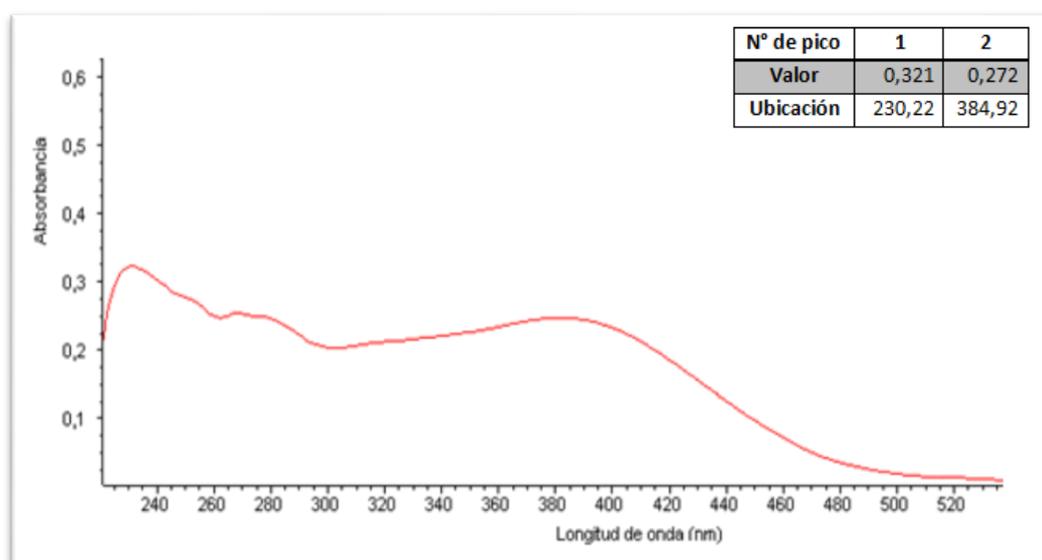


Figura 5-3. Barrido UV de 200-500nm del compuesto aislado en metanol a 100ppm con acetato de sodio.

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Al añadir acetato de sodio, se pudo apreciar un desplazamiento batocrómico de 19 nm para la banda II y para la banda I. La ionización del hidroxilo en la posición 7 afecta a la banda II, por lo cual se puede decir que se trata de un flavonol 7-hidroxilado (Martinez, 2005c, pp. 21-30).

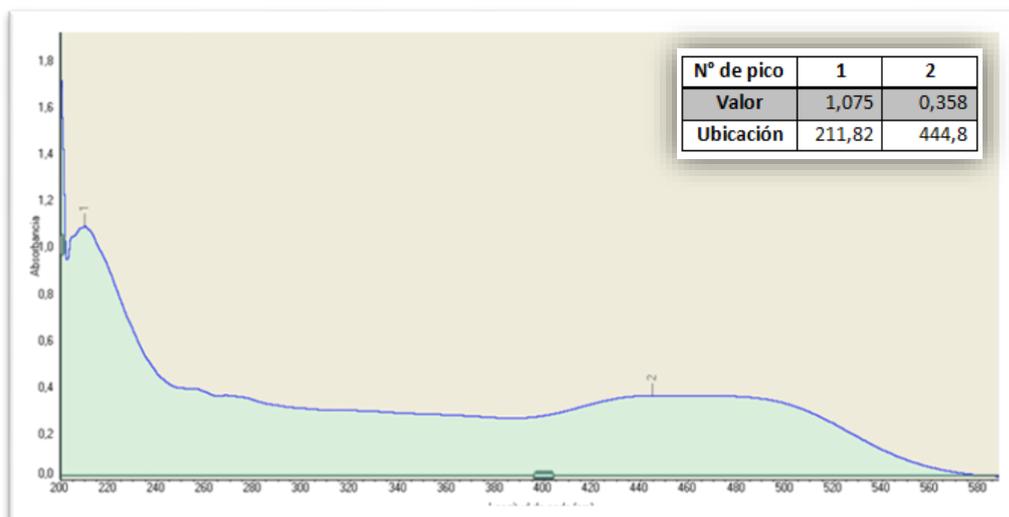


Figura 6-3. Barrido UV de 200-500nm del compuesto aislado en metanol a 100ppm con tricloruro de aluminio.

Realizado por: Estefanía López, 2016.

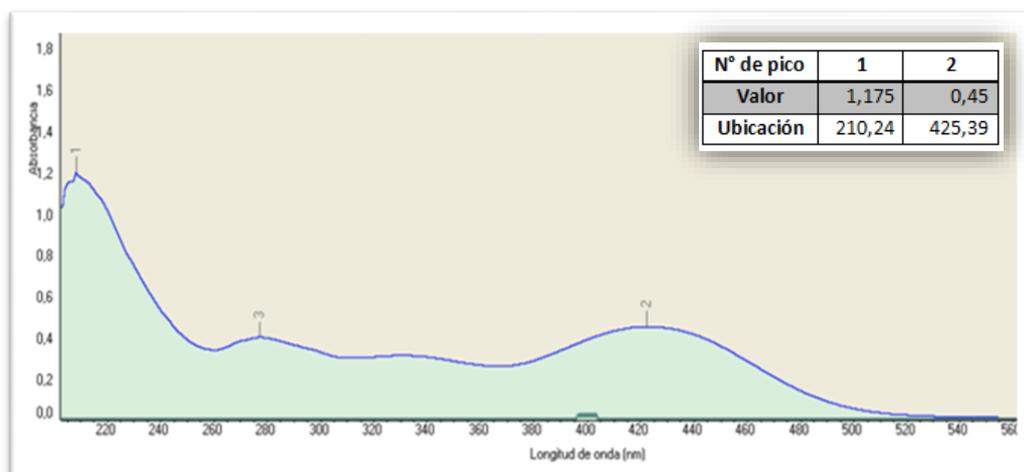


Figura 7-3. Barrido UV de 200-500nm del compuesto aislado en metanol a 100ppm con tricloruro de aluminio y ácido clorhídrico.

Realizado por: Estefanía López.

En las figuras 6-3 y 7-3, se pueden observar desplazamientos batocrómicos para la banda I; ya que el AlCl_3 forma quelatos con los flavonoides orto – dihidroxilados, también indica la existencia de grupos hidroxilo libres en las posiciones 3 o 5.

Con la adición del HCl el desplazamiento vario un poco, pero se mantuvo entre los 35 y 70 nm, ratificando la existencia de un grupo OH libre en la posición 5 (Centre y Lane 2001b).

En el caso de los desplazamientos hiperocrómicos e hipocrómicos que se han presentado, no se ha podido encontrar información bibliográfica, que los puedan explicar en este caso, ya que

únicamente menciona a los desplazamientos batocrómicos como responsables para la identificación de flavonoides.

Con los ensayos cromatográficos en capa fina y espectroscópicos UV realizados al compuesto aislado se puede confirmar presuntivamente que se trata de un flavonoide derivado de la quercetina como es la quercetina 3-metil-éter, flavonoide descrito en el trabajo realizado por De Tomassi *et al.*, (1998g, pp. 10-14).

3.5.3 Análisis infrarrojo.

Para obtener el espectro del flavonoide aislado se realizó una espectroscopía infrarroja.

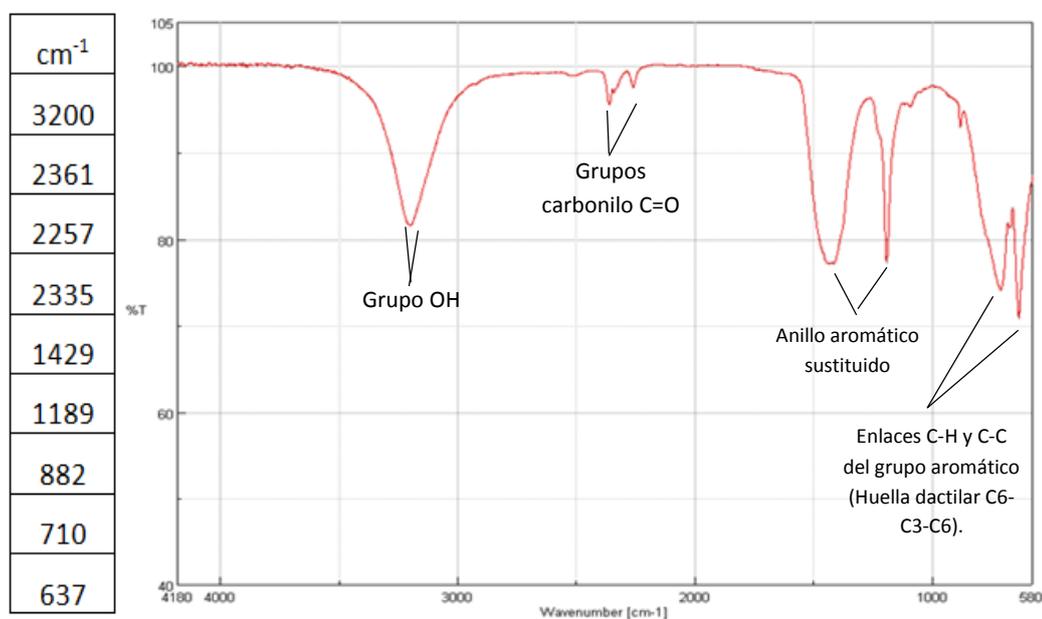


Figura 8-3. Espectro IR del compuesto aislado de *Bidens andicola*.

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Debido a que no se encontró en la bibliografía análisis espectroscópicos infrarrojos de la Quercetina 3-metil éter se realizó un análisis según la posición de los picos.

En la figura 8-3 del espectro infrarrojo del compuesto aislado se puede observar una banda a 3200cm⁻¹ característica de la tensión del grupo O-H, estas bandas pueden presentarse entre los 3200 a 3400 cm⁻¹ y son típicas del grupo hidroxilo fenólico; además, existen bandas de vibración entre los 2000 y 2300cm⁻¹ características de grupos C=O, la banda a 1429cm⁻¹ es característica de vibraciones presentes para grupos aromáticos sustituidos, mientras que la vibración a 1189cm⁻¹, corresponde a vibraciones de compuestos aromáticos O-sustituidos.

Las bandas presentes entre la región de 600 y 800cm⁻¹, son propias de las vibraciones correspondientes a los enlace de tipo C-H y C-C en compuestos aromáticos (Martinez, 2005d, pp. 21-30).

3.6 Cuantificación de fenoles por el método de Folin - Ciocalteau

Los fenoles del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bidens andicola* fueron cuantificados utilizando el método de Folin - Ciocalteau, para lo cual fue necesario elaborar una curva de calibración de ácido gálico, la misma que presentó una ecuación de la recta de: $y=0.00062x+0.061$ y con un $R^2 = 0,9992$ (Gráfico 1H).

Para obtener el resultado de la cuantificación de fenoles se interpoló el valor obtenido de la absorbancia de la muestra en la curva de calibración (Gráfico 1H). En la tabla 6-3, se muestran los resultados obtenidos expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de planta y en porcentaje.

Tabla 6–3: Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Extracto	Flavonoides totales expresados como mg de Ácido gálico/100 g de planta.	Porcentaje
Etanólico 70%	12058,065 ± 274,705	12,058 ± 0,274

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de fenoles del extracto, muestran que tiene un elevado contenido de compuestos fenólicos. Es importante mencionar que no existen datos bibliográficos para *Bidens andicola*, con los cuales se puedan comparar los resultados obtenidos y a su vez los estudios encontrados en otras especies del mismo género no son comparables; ya que no se han realizado en las mismas condiciones de este ensayo.

Sin embargo, la elevada concentración de compuestos fenólicos que posee la planta estaría relacionada con la actividad antiinflamatoria de la misma, lo cual justifica su uso medicinal y farmacológico (Nava, 2010, pp. 2-4).

3.7 Cuantificación de flavonoides totales.

Los flavonoides totales del extracto etanólico de las partes aéreas de *Bidens andicola* fueron cuantificados utilizando un método colorimétrico con tricloruro de aluminio, para lo cual fue

necesario elaborar una curva de calibración de quercetina, la misma que presento una ecuación de la recta de: $y = 0,0012x + 0,0218$ y con un $R^2 = 0,9991$ (Gráfico 2H).

Para obtener el resultado de la cuantificación de flavonoides totales se interpolo el valor obtenido de la absorbancia de la muestra en la curva de calibración (Gráfico 2H). En la tabla 7-3, se muestran los resultados obtenidos expresados en mg equivalentes de quercetina por gramo de planta y en porcentaje.

Tabla 7-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Extracto	Flavonoides totales expresados como mg de Quercetina/100 g de planta.	Porcentaje
Etanólico 70%	9986,667 ± 123,47	9,987 ± 0,123

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de flavonoides totales del extracto, muestran que tiene un elevado contenido de flavonoides. El resultado de este ensayo fue un tanto menor al obtenido para la cuantificación de fenoles; este resultado es de esperarse, ya que se debe tener en cuenta que los flavonoides al ser un subgrupo de los compuestos fenólicos van a encontrarse en menor cantidad (Nava, 2010a, pp. 2-4).

Es importante mencionar que no existen datos bibliográficos para *Bidens andicola*, con los cuales se puedan comparar los resultados obtenidos. El elevado contenido de flavonoides en *Bidens andicola*, estaría relacionado con actividades antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares y cancerígenas (Martínez et al, 2002j: pp. 271-278), justificando su uso medicinal.

3.8 Ensayo antiinflamatorio y citotóxico *in vitro*.

Estos ensayos fueron realizados con el extracto liofilizado de las partes aéreas de *Bidens andicola*, el mismo que presentó un rendimiento de 9,65% y con el compuesto aislado.

3.8.1 Ensayo antiinflamatorio *in vitro*.

El ensayo para determinar la actividad antiinflamatoria se basó en un método colorimétrico modificado (Tan y Berridge, 2000c: pp. 59-68); que mide la reducción de las sales de tetrazolio (WST-1), en presencia de neutrófilos aislados activados. Después de haber realizado las mediciones espectrofotométricas y calculado el porcentaje de inhibición inflamatoria, se obtuvieron los resultados, que se indican en la tabla 8-3.

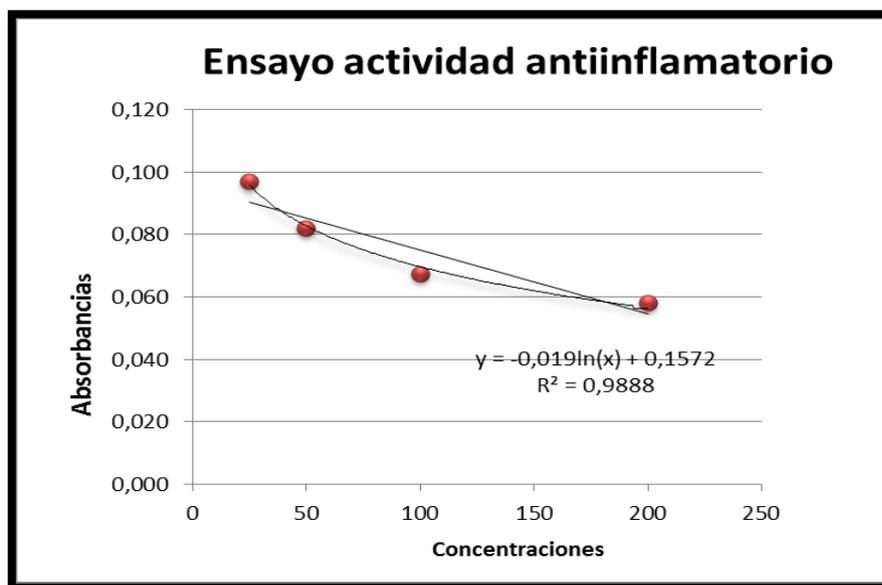


Figura 9-3. Curva obtenida del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto hidroalcohólico.

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Tabla 8-3: Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto.

	Porcentaje de Inhibición Inflamatoria
Ácido acetil salicílico 200ppm	82,117 ± 0,762
Extracto 200ppm	80,138 ± 0,729
Extracto 100ppm	76,999 ± 0,695
Extracto 50ppm	71,947 ± 0,538
Extracto 25ppm	66,827 ± 1,225

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente aplicando el test ANOVA de un factor, para verificar si existen diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición inflamatoria y las concentraciones de extracto utilizadas.

Antes de aplicar el test ANOVA de un factor se verificó que los datos cumplían con los supuestos de distribución normal y de homogeneidad; para lo cual se aplicaron los test de Kolmogorov Smirnov y el test de Homogeneidad de varianzas; respectivamente, utilizando el software SPSS, las tablas de estos test se presentan en los gráficos 1K y 1L, en los anexos.

Después de realizarse el test ANOVA de un factor, se pudo determinar que si existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición inflamatoria y las concentraciones utilizadas del extracto, ya que a ser el valor p de 0,000 menor al 0,05 (nivel de significancia) se rechaza la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$); es decir, existe una diferencia significativa del porcentaje de inhibición inflamatoria en relación a la concentración.

La tabla del análisis ANOVA de un factor, para este caso, se presenta en el gráfico 1M.

Al rechazar la hipótesis nula para el test de ANOVA de un factor, existe la necesidad de verificar si al menos uno de los tratamientos es diferente a los demás, para lo cual se realizó el test de TukeyB (Gráfico 1N), estableciéndose que todos los tratamientos son diferentes; es decir que el porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida a una concentración determinada, no es igual al porcentaje de inhibición inflamatoria de las demás.

Por lo cual podemos concluir que la concentración que posee el máximo porcentaje de inhibición inflamatoria es a 200ppm y que estadísticamente esta siempre será significativamente diferente que la inhibición inflamatoria presentada a 100, 50 y 25 ppm.

El test ANOVA de un factor, se utilizó también para determinar la existencia de la diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida por El ácido acetilsalicílico y el extracto, ambos a 200 ppm, y se pudo establecer que si existe una diferencia significativa entre ambas, siendo algo más elevado el porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida por el ácido acetilsalicílico. La tabla del test ANOVA, utilizado en este caso se muestra en el gráfico 3M, en los anexos.

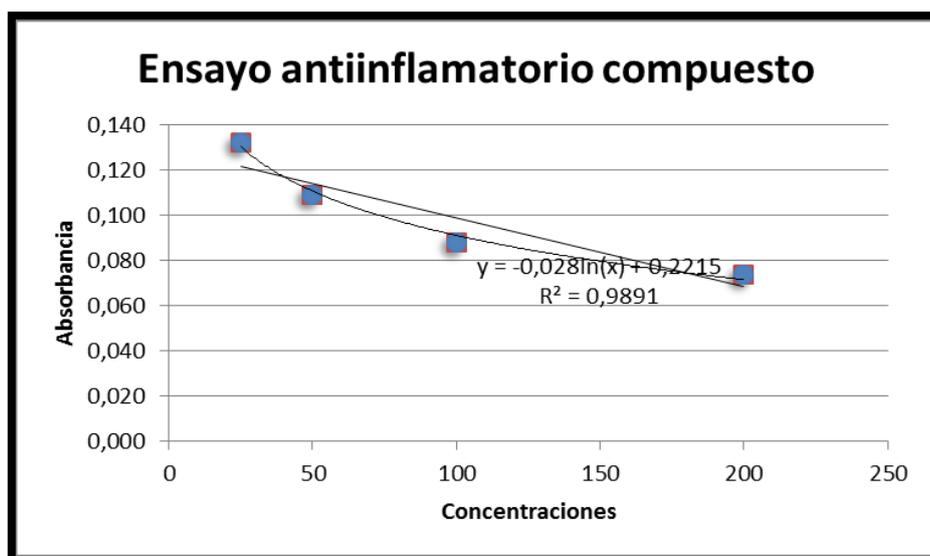


Figura 10-3. Curva obtenida del porcentaje de inhibición inflamatoria del compuesto aislado.

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Tabla 9-3: Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*, expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del compuesto aislado.

	Porcentaje de Inhibición Inflamatoria
Ácido Acetilsalicílico 200ppm	81,648 ± 0,999
Compuesto aislado 200ppm	74,759 ± 1,462
Compuesto aislado 100ppm	69,917 ± 1,386
Compuesto aislado 50ppm	62,755 ± 1,351
Compuesto aislado 25ppm	54,843 ± 1,898

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Al igual que el análisis en el caso anterior se aplicó inicialmente los test de Kolmogorov Smirnov (Gráfico 2K) y el test de Homogeneidad de varianzas (Gráfico 2L), para verificar que los datos cumplieran con los supuestos de distribución normal y de homogeneidad; esto se realizó con la finalidad de aplicar el test de ANOVA de un factor para verificar la existencia de diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición inflamatoria y las concentraciones de compuesto utilizadas, determinándose que si existe diferencia significativa como se puede observar en la tabla del test ANOVA en el gráfico 2M.

Para verificar si al menos uno de los tratamientos es diferente a los demás se realizó el test TukeyB (Gráfico 2N) y se pudo determinar que todos los tratamientos son significativamente diferentes entre sí y que no existen grupos homogéneos; es decir, el porcentaje de inhibición

inflamatoria obtenida a una concentración determinada, no es igual al porcentaje de inhibición inflamatoria de las demás; de lo cual, se concluyó que el porcentaje de inhibición inflamatoria máxima es a una concentración de 200ppm.

Para determinar si existe diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida por el ácido acetilsalicílico y el obtenido por el compuesto, ambos a 200ppm, se realizó el test ANOVA de un factor, concluyéndose que de hecho, realmente existe una diferencia significativa entre ambas, siendo el porcentaje de inhibición inflamatoria obtenido por el ácido acetilsalicílico el más elevado. La tabla del test ANOVA, utilizado en este caso se muestra en el gráfico 4M.

Finalmente, para determinar la existencia de diferencias entre los resultados de inhibición inflamatoria, obtenidos por el extracto y por el compuesto a las concentraciones establecidas, se realizó el test ANOVA de un factor (Gráfico 1P) y se pudo concluir que si existe una diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto y del compuesto aislado; aunque la diferencia no es tan elevada, en la tabla 9-3, podemos observar que el extracto presenta un mayor porcentaje de inhibición inflamatoria que el compuesto.

Según los resultados presentados en la tabla 8-3 y 9-3, podemos apreciar que el efecto antiinflamatorio, reportado como porcentaje de inhibición inflamatoria, es mayor para el extracto; esto se debe a que la actividad antiinflamatoria no se relaciona únicamente con los flavonoides presentes en el extracto, sino también, interviene el hecho de que puedan ocurrir interacciones entre los componentes del extracto, como sinergismo entre flavonoides o entre flavonoides y tocoferoles o palmitato ascorbil o con ácido cítrico (Nava, 2010, pp. 2-4).

3.8.2 *Ensayo citotóxico in vitro.*

El ensayo para determinar la actividad antiinflamatoria se basó en un método colorimétrico modificado (Berridge et al., 1996: pp. 4-9). Este ensayo se basa en medir la reducción de las sales de tetrazolio de las células vivas y metabólicamente activas, a compuestos coloreados del tipo formazán; es por esto, que el fundamento de este ensayo colorimétrico es la detección de las células que son viables exclusivamente; expresándose los resultados como porcentaje de viabilidad celular.

Después de haber realizado las mediciones espectrofotométricas y calculado el porcentaje de viabilidad celular, los resultados se indican en la tabla 10-3.

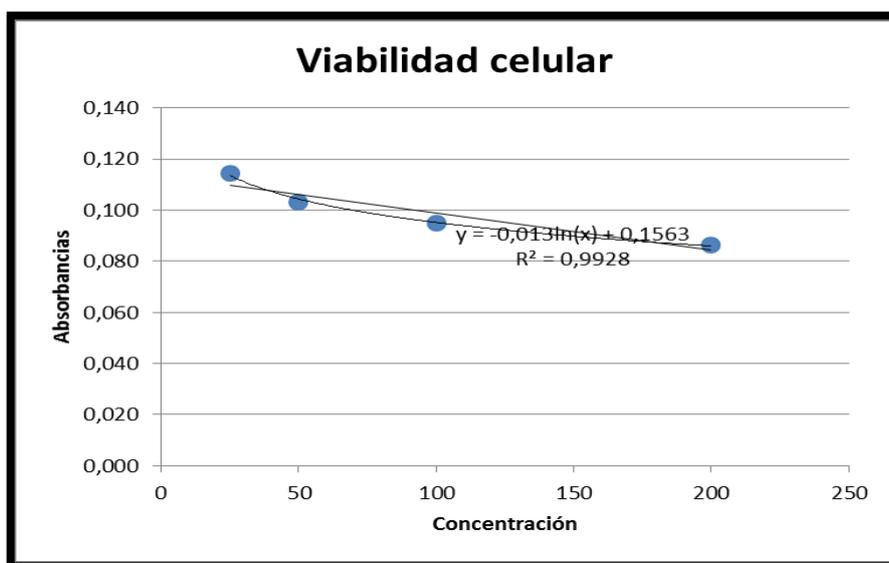


Figura 11-3. Curva obtenida del porcentaje de viabilidad celular del extracto hidroalcohólico.

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Tabla 10-3: Resultados de la evaluación de la citotoxicidad *in vitro* expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del extracto.

	Porcentaje de Viabilidad Celular
Ácido acetilsalicílico 200ppm	23,359 ± 0,504
Extracto 200ppm	27,679 ± 0,329
Extracto 100ppm	30,399 ± 0,372
Extracto 50ppm	32,959 ± 0,474
Extracto 25ppm	36,639 ± 0,262

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Después de haber obtenido los resultados de este ensayo se aplicó para todos los datos el análisis de los supuestos de distribución normal de datos y de homogeneidad, para lo cual se realizaron los test de Kolmogorov Smirnov y el test de Homogeneidad de varianzas, respectivamente; aceptándose las hipótesis tanto para el test distribución normal como para el test de homogeneidad de varianzas; las tablas de estos test se presentan en los gráficos 3K y 3L, respectivamente.

Los test anteriores fueron un pre-requisito para realizar el test de ANOVA de un factor y verificar si existen diferencia entre los resultados obtenidos del porcentaje de viabilidad celular y las concentraciones del extracto utilizadas, determinándose que si existe diferencia significativa como se puede observar en la tabla del test ANOVA en el gráfico 1Ñ.

Al existir una diferencia significativa establecido por el test de ANOVA, existe la necesidad de verificar si al menos uno de los tratamientos es diferente a los demás, para lo cual se realizó el test de TukeyB (Gráfico 10), de lo cual se pudo concluir que todos los tratamientos son significativamente diferentes y que no existen grupos homogéneos; es decir, el porcentaje de viabilidad celular obtenido a una concentración determinada, no es igual al porcentaje de viabilidad celular de las demás; siendo, la concentración que posee el máximo porcentaje de viabilidad celular es a 25ppm.

Se realizó también el test ANOVA de un factor, para determinar la diferencia de los resultados obtenidos, entre el porcentaje de viabilidad celular del ácido acetilsalicílico y del extracto, los dos a 200 ppm, estableciéndose que si existe una diferencia significativa; siendo el porcentaje de viabilidad celular más elevado para el extracto. La tabla del test ANOVA, se muestra en el gráfico 3Ñ.

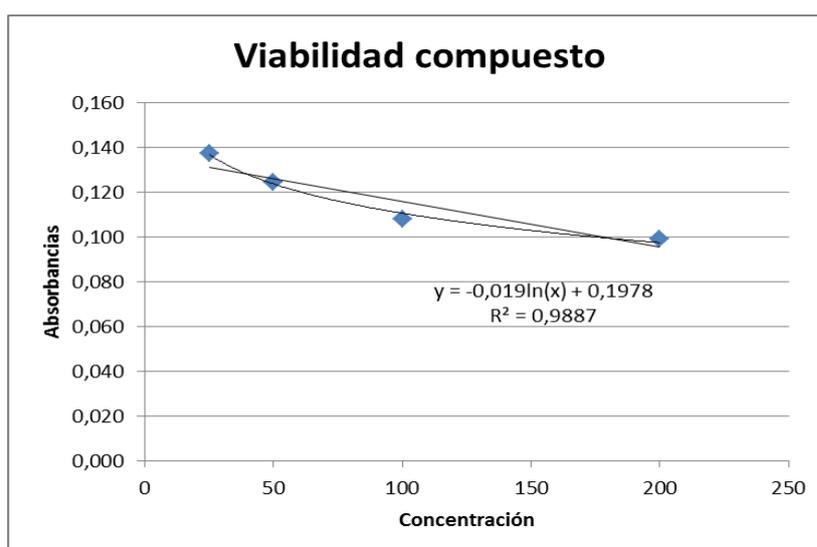


Figura 12-3. Curva obtenida del porcentaje de viabilidad celular del compuesto aislado.

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Tabla 11-3: Resultados de la evaluación de la citotoxicidad *in vitro* expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del compuesto aislado.

	Porcentaje de Viabilidad Celular
Ácido acetilsalicílico 200ppm	23,767 ± 0,406
Compuesto aislado 200ppm	31,480 ± 0,645
Compuesto aislado 100ppm	34,341 ± 0,652
Compuesto aislado 50ppm	39,588 ± 0,549
Compuesto aislado 25ppm	43,640 ± 0,441

Realizado por: Estefanía López, 2016.

Se aplicó los test de Kolmogorov Smirnov (Gráfico 4K) y el test de Homogeneidad de varianzas (Gráfico 4L), para verificar que los datos cumplieran con los supuestos de distribución normal y de homogeneidad; para poder realizar el test de ANOVA de un factor y verificar la diferencia entre el porcentaje de viabilidad celular y las concentraciones de compuesto utilizadas, determinándose que si existe diferencia significativa como se puede observar en la tabla del test ANOVA en el gráfico 2Ñ.

Para verificar si al menos uno de los tratamientos es diferente a los demás, se realizó el test TukeyB (Gráfico 2O) y se determinó que los tratamientos son significativamente diferentes entre sí y que no existen grupos homogéneos; es decir, el porcentaje de viabilidad celular obtenida a una concentración determinada, no es igual al porcentaje de viabilidad celular obtenida por las demás; de lo cual se concluyó, que el porcentaje de viabilidad celular máximo se presentó a una concentración de 25ppm.

Se realizó también el test de ANOVA de un factor para determinar si hay diferencia significativa entre el porcentaje de viabilidad celular obtenidos, tanto por el ácido acetilsalicílico como por el compuesto, ambos a 200ppm; concluyéndose, que existe una diferencia significativa entre los dos resultados; siendo el porcentaje de viabilidad celular obtenido por el compuesto el más elevado. La tabla del test ANOVA, utilizado se muestra en el gráfico 4Ñ.

Finalmente, se realizó el test ANOVA de un factor para determinar la diferencia existente entre los resultados obtenidos del porcentaje de viabilidad celular, por el extracto y por el compuesto a las concentraciones establecidas; concluyéndose, que si existe una diferencia significativa entre el porcentaje de viabilidad celular del extracto y del compuesto aislado (Gráfico 2P); aunque la diferencia no es tan elevada, en la tabla 11-3, podemos apreciar que el compuesto aislado presenta un mayor porcentaje de viabilidad celular que el extracto.

Los resultados obtenidos del porcentaje de viabilidad celular son algo bajos en nivel general tanto para el compuesto como para el extracto, presentando un porcentaje de viabilidad celular máximo de 36,64 y 43,64% respectivamente, a una concentración de 25 ppm.

En este caso la citotoxicidad tanto del compuesto como del extracto, fue evaluada en términos de viabilidad celular; la misma que mide la proporción de células vivas o metabólicamente activas luego de un procedimiento (Vendrell y Serra, 2008, pp. 41-43).

En este caso se mide la actividad metabólica específicamente mitocondrial; ya que el reactivo WST-1 es transformado por un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa; activo solo en células viables, en formazán.

Por lo tanto, la cantidad de formazán producido durante el ensayo, es evaluado a través de medidas de absorbancia en un espectrofotómetro y que está relacionada con el número de células metabólicamente activas; es así, como un mayor número de células provoca una mayor actividad de deshidrogenasas y como consecuencia una mayor concentración de formazán; entonces, la muestra de las células implicaría una menor absorbancia de la muestra (Vendrell y Serra, 2008a, pp. 41-43).

Basados en este preámbulo podemos ver que la viabilidad celular tanto del extracto como del compuesto es aceptable a concentraciones de 25 ppm; pero, al comparar el porcentaje de viabilidad celular de las sustancias de prueba es mucho mayor en relación con el ácido acetilsalicílico.

El bajo porcentaje de viabilidad celular tanto del extracto como del compuesto aislado, pero sobretodo del ácido acetilsalicílico; se debe a que este ensayo mide específicamente la actividad metabólica mitocondrial de la célula y que según estudios realizados todos los fármacos y sustancias con actividad farmacológica, causan disfunción mitocondrial en las células, esto provoca a largo o corto plazo lo que se conoce como efectos adversos.

En estos estudios también se menciona una lista de medicamentos que pueden inducir un daño mitocondrial y entre ellos se encuentra el ácido acetilsalicílico, lo cual explica la viabilidad celular tan baja de este compuesto (Neustadt y Pieczenik, 2015).

De esto se puede concluir que tanto el extracto como el compuesto aislado de *Bidens andicola*, presentan porcentajes de viabilidad celular aceptables en comparación con el control y que al relacionarse el daño mitocondrial con los efectos adversos que un fármaco produce, serían

menores los ocasionados por las sustancias estudiadas en este trabajo, en comparación con el ácido acetilsalicílico, un fármaco considerado seguro.

Es importante mencionar que en este caso no se pudo calcular la CL_{50} , debido a que para poder hacerlo es necesario tener como mínimo el valor de al menos dos concentraciones, tanto a niveles superiores como inferiores, que se aproximen al 50% de viabilidad celular.

CONCLUSIONES.

- Se determinó que la droga cruda, seca obtenida a partir de las partes aéreas de *Bidens andicola* cumplen con los parámetros establecidos por la USP # 28, haciéndola apta para ser estudiada. Mediante el tamizaje fitoquímico realizado en los diferentes extractos de las partes aéreas de *Bidens andicola*, se pudo evidenciar la presencia principalmente de compuesto fenólicos, flavonoides y azúcares reductores; además de otros compuestos como saponinas, catequinas, coumarinas y compuestos grasos.
- Se identificó mediante cromatografía en capa fina de la fracción flavónica obtenida a partir del extracto etanólico 70% de las partes aéreas de *Bidens andicola* la existencia de compuestos como son flavonoides del tipo glicósido, quercetina 3-O-glicósidos, quercetina 3-O-Ramnosidos, isoquercetina, isoquercitrina y ácido clorogénico. En el extracto hidrolizado se identificó principalmente la presencia de quercetina.
- Se aisló el flavonoide a partir de extracto hidrolizado de las partes aéreas de *Bidens andicola* con un rendimiento del 1,21% y se lo identificó realizando pruebas cromatograficas y espectrofotométricas, determinando que presumiblemente se trate de quercetina 3 metil éter.
- Se cuantificó espectrofotométricamente la cantidad de fenoles totales presentes en el extracto etanólico 70% de las partes aéreas de *B. andicola* y fue de $12193,548 \pm 274,705$ mg Eq de ácido gálico/100 g de planta; mientras que la cantidad de flavonoides que se determinó fue de $9986,667 \pm 123,47$ mg Eq de quercetina/100 g de planta.
- Se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto hidroalcohólico y del compuesto aislado de *Bidens andicola*, mediante el porcentaje de inhibición antiinflamatoria, de lo cual se pudo establecer que aunque ambos poseen una buena inhibición inflamatoria, el extracto posee mayor porcentaje encontrándose entre un rango de 80 a 67%, en comparación al intervalo de 75 a 55% del compuesto aislado, porcentajes determinados a diferentes concentraciones.
- Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico y del compuesto aislado de *Bidens andicola*, mediante el porcentaje de viabilidad celular, determinándose que el compuesto aislado tiene un mayor porcentaje de viabilidad celular que el extracto, es decir tiene menor citotoxicidad.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda para futuros trabajos realizar estudios antiinflamatorios y de toxicidad *in vivo*, tanto del extracto etanólico 70% como del compuesto aislado de *Bidens andicola*.
- Realizar ensayos antiinflamatorios y citotóxicos comparativos de hojas y flores de *Bidens andicola*.
- Realizar ensayos confirmatorios de la estructura y denominación del compuesto aislado, específicamente mediante HPLC-MS/MS triple cuadrupolar Q-TOF y Espectroscopía de NMR.

BIBLIOGRAFÍA.

AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS, Ficha Técnica: Aspirina. [en línea]. 2015, [Consulta: 22 julio 2016]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/57838/57838_ft.pdf

ANDERSEN, Oyvind; & MARKHAM, Kenneth. Chemistry, Biochemistry and Applications. New Zealand. Taylor & Francis, 2006 pp. 1-10.

BERRIDGE, Michael; & TAN, An. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. nº 4 (2000), (New Zealand) pp. 4-9. [Consulta: 21 Julio 2016]. 0022-1759. Disponible en: http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/BIOCHEMICA_96_4_p14-19.pdf

BORDÉS, R. et al. *El proceso inflamatorio*. [en línea]. España: 2005. [Consulta: 21 Julio 2016]. Disponible en: <https://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%2>.

BOUKHRIS, M. et al., Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, pelargonium graveolens. *Phytotherapy Research*, vol. 27, nº 8, (2013), (Tunisie) pp. 1206-1213.

CATELLI, P., *Inflamación* [en línea]. Argentina: 2009. Inflamación. [Consulta: 16 de Julio de 2016]. Disponible en: http://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Clase_1-09-09_Inflamacion.pdf.

CENTRE, G; & LANE, T. Flavonoids and Other Polyphenols, Vol 335. California-Estados Unidos: Academic Press, 2001, pp. 37-40.

CETKOVIC, G. et al. Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of Marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts. *Apteff*, vol. 34, (2003), (Serbia y Montenegro) pp. 93-102.

- CHUAQUI, B. & GONZÁLEZ, S.** *Manual de Patología General* [en línea]. Chile: 2007. Pontificia Universidad Católica de Chile. [Consulta: 20 de Julio de 2016]. Disponible en: http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/PatologiaGeneral/Patol_055.html.
- DE TOMASSI, N. et al.** Flavonol and Chalcone Ester Glycosides from *Bidens andicola*. *Journal of Natural Products*, vol. 61, No. 12 (Italia) pp. 10-14.
- DOLPHIN, D.** Chromatography Fundamentals and Applications of Chromatographic and Electrophoretic Methods Part B: Applications. *Journal of Chromatography Library* [en línea]. 1983, (Holanda), pp 403-408. [Consulta: 16 de Julio de 2016]. 9780444420442. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301477008613500>.
- ENCISO, E; & ARROYO, J.** Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *Artículos originales*, vol. 2, no. 4, (2011), (Perú) pp. 231-237.
- GALVÁN, F; & NERI, E.** *Efectos gastrointestinales graves por antiinflamatorios no esteroideos* [en línea]. 2006. [Consulta: 17 Julio 2016]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2138516>.
- GALVIS, J. et al.** Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 16, No. 4, (2011), (Colombia) pp. 313-323.
- GÓMEZ, H., et al.** Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 10, No. 3, (2011), (Cuba) pp. 182-217.
- GUTIERREZ, G.** Evaluación Farmacognóstica y fitoquímica preliminar de *Phyllanthus orbicularis* HBK. *Rev Cubana Farm*, vol. 34, No. 1, (2000), (Cuba). pp. 56-62.
- HALL, V., et al.** Antiinflamatorios No Esteroidales. *Centro Nacional de información de medicamentos*. (2001), (Costa Rica) pp. 25 - 40.
- HUANG, S; & LEAN, T.** Quantification of tocopherols, tocotrienols, and ??-oryzanol contents and their distribution in some commercial rice varieties in Taiwan. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, vol. 59, No. 20, (2011), (Taiwan). pp. 11150-11159.

JIMÉNEZ, M., et al. Vías de activación y funciones biológicas del sistema complemento. *Mediciego* [en línea], 2013. Vol. 19, No. 1, p. 7. [Consulta: 21 julio 2016] Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/mediciego/mdc-2013/mdc131p.pdf>.

KOUAKOU, L. et al. Effet antihypertensif de BpF 2 , une fraction d ' extrait aqueux de feuilles de *Bidens pilosa L .* (Asteraceae). *Science and Nature*, Vol. 5, (2008), (Abidjan) pp. 29-37.

LASTRA, H; & PONCE, H. *Bidens pilosa linné. Revista Cubana de plantas medicinales.* Vol 1, (2001), (Cuba) pp. 28-33.

MARÍN, C; & PARRA, S., *Bidens andicola.* Colombia: Humboldt, 2015. p. 170

MARTINEZ, A. Flavonoides. *Universidad de Antioquia,* .2005. Medellín-Colombia. pp. 21-26.

MARTÍNEZ, S., et al. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, Vol. 17, No. 6, (2002), España. pp. 271-278.

MIRANDA, M. Farmacognosia y productos naturales: Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas. 6ª ed. La Habana - Cuba: F. Varela, 2006, pp. 32-62.

MURILLO, E. et al. *Efecto alelopático de la fracción clorofórmica de Lagascea mollis. (Asteraceae) sobre la germinación y el crecimiento radicular de Oryza sativa L.* [en línea]. Colombia: 2005. [Consulta: 20 de Julio de 2016]. Disponible en: [http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042005000100008&lng=es&nrm=.](http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042005000100008&lng=es&nrm=)

NAVA, G. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. (Querétaro-México). 2010. pp. 2-4.

NEUSTADT, J; & PIECZENIK, S. Los medicamentos inducen daños en las mitocondrias, los orgánulos que suministran la energía necesaria para la actividad celular. *Montana Integrative Medicine* [en línea], 2015, (Estados Unidos), [Consulta:21 de Julio 2016].

Disponible en: <https://noticiasdeabajo.wordpress.com/2015/04/05/los-medicamentos-inducen-danos-en-las-mitocondrias-los-organulos-que-suministran-la-energia-necesaria-para-la-actividad-celular/>.

ROMERO, X; & NAVARRO, P. Acidez y pH. Escuela venezolana para la enseñanza de la química. (Venezuela). 2009. pp. 49.

SÁNCHEZ, A. Evaluación de la actividad cicatrizante in vitro del geranio (*Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. (Riobamba-Ecuador). 2015. pp. 54-60.

SOLIS, A., et al. Contribución al Estudio Fitoquímico de *Bidens andicola*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 53, no. 9, (1991), (Perú) pp. 122 - 123.

TAN, A; & BERRIDGE, M. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: A simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *Journal of Immunological Methods*, vol. 238, no. 1-2. (2000), (New Zealand) pp. 59-68.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ. Citotoxicidad celular. [en línea]. 2008. [Consulta: 22 julio 2016]. Disponible en: http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_ambiental/guion-citotoxicidad.pdf.

VENDRELL, C; & SERRA, J. Evaluación de la citotoxicidad del implante dental. Comité científico de AVINENT Implant system. (2008), pp. 41-43.

WAGNER, H; & BLADT, S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2ª ed. Munich-Alemania: Springer, 2001 pp. 195-244.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Quality control methods for medicinal plant materials*. (1998), (Geneva-Suiza). pp. 34-122.

ZAVALA, C. Elaboración de un fitocosmético, lápiz labial con propiedad hidratante y antiherpéticas con extractos de amor seco (*Bidens pilosa*) y aroma de café (*Coffea*

arabica). [en línea] (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2015. pp. 32-35. [Consulta: 22 julio 2016]. Disponible en: [http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4019/1/56T00541%20UDCT FC.pdf](http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4019/1/56T00541%20UDCT%20FC.pdf)

ANEXOS.

ANEXO A. Recolección del material vegetal.



ANEXO B. Determinación del contenido de humedad de la droga cruda



ANEXO C. Determinación de Cenizas totales de la droga cruda (Gráfico 1C) y determinación de cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico (Gráfico 2C).

Gráfico 1C.



Gráfico 2C



ANEXO D. Tamizaje fitoquímico.

EXTRACTO ETÉREO		EXTRACTO ACUOSO		EXTRACTO ETANÓLICO	
PRUEBA	IMAGEN	PRUEBA	IMAGEN	PRUEBA	IMAGEN
SUDAN		DRAGENDORF		BALJET	
DRAGENDORF		MAYER		RESINAS	
MAYER		WAGNER		ESPUMAS	
WAGNER		FECL3		WAGNER	
BALJET		SHINODA		CLORURO FÉRRICO	

LIEBERMANN-BURCHARD		FEHLING		SHINODA	
		ESPUMA		DRAGENDORF	
				MAYER	
				CATEQUINAS	
				BORNTRANGER	

ANEXO E. Preparación del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *B. andicola* (Gráfico 1E), cromatografía en columna (Gráfico 2E) y obtención del extracto hidrolizado (Gráfico 3E).

Gráfico 1E



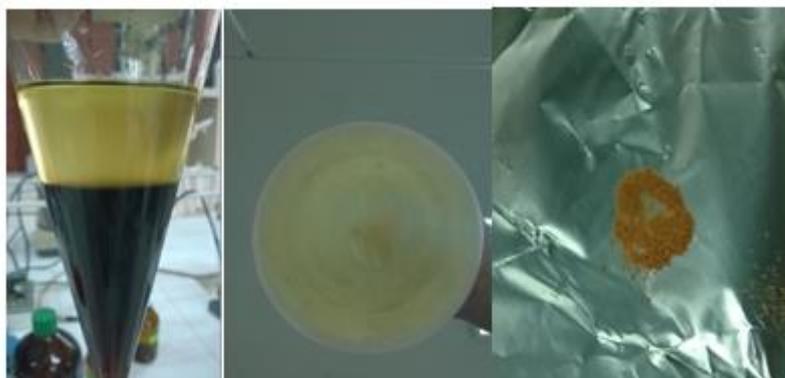
Gráfico 2E.



Gráfico 3E.



ANEXO F. Aislamiento y Purificación del compuesto aislado.



ANEXO G. Espectrofotómetro con el que se realizó los análisis para la identificación del compuesto aislado (Gráfico 1G) e infrarrojo (Gráfico 2G).

Gráfico 1G



Gráfico 2G



ANEXO H. Curva de calibración de ácido gálico usada para la cuantificación de fenoles (Gráfico 1H) y curva de calibración de quercetina usada para la cuantificación de flavonoides totales (Gráfico 2H).

Gráfico 1H

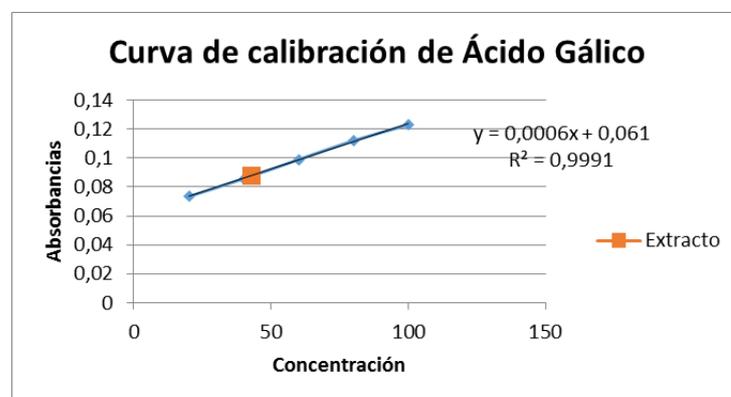
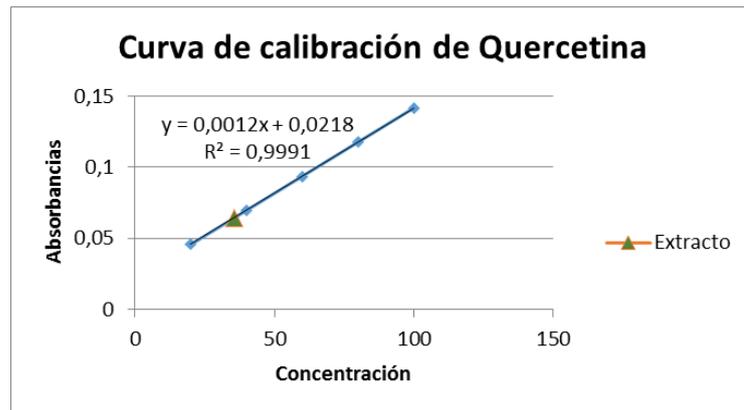
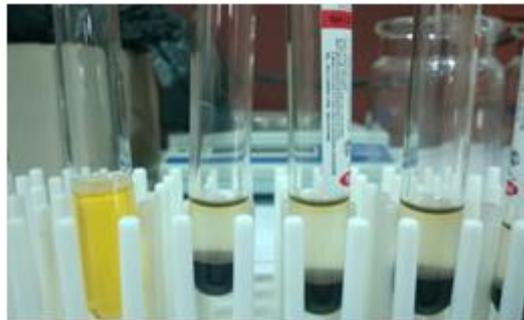


Gráfico 2H.



ANEXO I. Aislamiento de los neutrófilos.



ANEXO J. Ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1J) y citotoxicidad (Gráfico 2J) *in vitro*.

Gráfico 1J



Gráfico 2J



ANEXO K. Prueba de normalidad de los datos obtenidos en el ensayo antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1K) y del compuesto (Gráfico 2K) y prueba de normalidad de los datos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad del extracto hidroalcohólico (Gráfico 3K) y del compuesto aislado (Gráfico 4K).

Gráfico 1K

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Inhibición
N		20
Parámetros normales ^{a,b}	Media	73,9777
	Desviación estándar	5,24571
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,154
	Positivo	,112
	Negativo	-,154
Estadístico de prueba		,154
Sig. Asintótica (bilateral)		,200 ^{c,d}

a. La distribución de prueba es normal.

Gráfico 2K

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		inhibinf
N		25
Parámetros normales ^{a,b}	Media	68,7845
	Desviación estándar	9,59119
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,113
	Positivo	,103
	Negativo	-,113
Estadístico de prueba		,113
Sig. asintótica (bilateral)		,200 ^{c,d}

a. La distribución de prueba es normal.

Gráfico 3K

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		viabilidad
N		16
Parámetros normales ^{a,b}	Media	31,9191
	Desviación estándar	3,42731
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,151
	Positivo	,131
	Negativo	-,151
Estadístico de prueba		,151
Sig. asintótica (bilateral)		,200 ^{c,d}

a. La distribución de prueba es normal.

Gráfico 4K

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		viabilidad
N		16
Parámetros normales ^{a,b}	Media	37,2623
	Desviación estándar	4,87330
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,185
	Positivo	,185
	Negativo	-,133
Estadístico de prueba		,185
Sig. asintótica (bilateral)		,148 ^c

a. La distribución de prueba es normal.

ANEXO L. Prueba de Homogeneidad de varianzas, de los datos obtenidos en el ensayo antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1L) y del compuesto aislado (Gráfico 2L) y prueba de Homogeneidad de varianzas, de los datos obtenidos en el de citotoxicidad del extracto hidroalcohólico (Gráfico 3L) y del compuesto aislado (Gráfico 4L).

Gráfico 1L

Prueba de homogeneidad de varianzas

Inhibición

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,122	3	16	,370

Gráfico 2L

Prueba de homogeneidad de varianzas

Inhibición

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
,177	3	16	,910

Gráfico 3L

Prueba de homogeneidad de varianzas

viabilidad

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
,812	3	12	,511

Gráfico 4L

Prueba de homogeneidad de varianzas

viabilidad

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
,679	3	12	,582

ANEXO M. Análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo antiinflamatorio del extracto (Gráfico 1M) y del compuesto (Gráfico 2M) frente a la concentración y análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo antiinflamatorio del extracto (Gráfico 3M) y del compuesto (Gráfico 4M) frente al ácido acetilsalicílico a 200ppm

Gráfico 1M

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	511,619	3,000	170,540	243,319	0,000	3,239
Dentro de los grupos	11,214	16,000	0,701			
Total	522,833	19,000				

Gráfico 2M

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1131,630	3,000	377,210	159,043	0,000	3,239
Dentro de los grupos	37,948	16,000	2,372			
Total	1169,578	19,000				

Gráfico 3M

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	9,790	1,000	9,790	17,628	0,003	5,318
Dentro de los grupos	4,443	8,000	0,555			
Total	14,233	9,000				

Gráfico 4M

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	118,645	1,000	118,645	75,669	0,000	5,318
Dentro de los grupos	12,544	8,000	1,568			
Total	131,189	9,000				

ANEXO N. Análisis Tukey para los datos del ensayo antiinflamatorio del extracto (Gráfico 1N) y del compuesto (Gráfico 2N) frente a la concentración.

Gráfico 1N

Tukey simultaneous comparison t-values (d.f. = 16)					
		25ppm	50ppm	100ppm	200ppm
		66,82725	71,94707	76,99861	80,13768
25ppm	66,827				
50ppm	71,947	9,67			
100ppm	76,999	19,21	9,54		
200ppm	80,138	25,14	15,47	5,93	
critical values for experimentwise error rate:					
		0,05	2,86		
		0,01	3,67		

Gráfico 2N

Tukey simultaneous comparison t-values (d.f. = 16)					
		25ppm	50ppm	100ppm	200ppm
		54,8430	62,7555	69,9166	74,7593
25ppm	54,8430				
50ppm	62,7555	8,12			
100ppm	69,9166	15,48	7,35		
200ppm	74,7593	20,45	12,32	4,97	
critical values for experimentwise error rate:					
		0,05	2,86		
		0,01	3,67		

ANEXO Ñ. Análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo de citotoxicidad del extracto (Gráfico 1Ñ) y del compuesto (Gráfico 2Ñ) frente a la concentración y análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo de citotoxicidad del extracto (Gráfico 3Ñ) y del compuesto (Gráfico 4Ñ) frente al ácido acetilsalicílico a 200ppm

Gráfico 1Ñ

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	174,583	3,000	58,194	431,403	0,000	3,490
Dentro de los grupos	1,619	12,000	0,135			
Total	176,201	15,000				

Gráfico 2Ñ

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	352,225	3,000	117,408	351,282	0,000	3,490
Dentro de los grupos	4,011	12,000	0,334			
Total	356,236	15,000				

Gráfico 3Ñ

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	37,335	1,000	37,335	205,880	0,000	5,987
Dentro de los grupos	1,088	6,000	0,181			
Total	38,423	7,000				

Gráfico 4Ñ

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	118,970	1,000	118,970	409,768	0,000	5,987
Dentro de los grupos	1,742	6,000	0,290			
Total	120,712	7,000				

ANEXO O. Análisis Tukey para los datos del ensayo de citotoxicidad del extracto (Gráfico 1O) y del compuesto (Gráfico 2O) frente a la concentración.

Gráfico 1O

Tukey simultaneous comparison t-values (d.f. = 12)		200ppm	100ppm	50ppm	25ppm
		27,6793	30,3994	32,9589	36,6392
200ppm	27,6793				
100ppm	30,3994	10,47			
50ppm	32,9589	20,33	9,86		
25ppm	36,6392	34,50	24,03	14,17	
critical values for experimentwise error rate:					
		0,05	2,97		
		0,01	3,89		

Gráfico 2O

Tukey simultaneous comparison t-values (d.f. = 12)		200ppm	100ppm	50ppm	25ppm
		31,47969	34,34141	39,58816	43,64012
200ppm	31,47969				
100ppm	34,34141	7,00			
50ppm	39,58816	19,84	12,83		
25ppm	43,64012	29,75	22,75	9,91	
critical values for experimentwise error rate:					
		0,05	2,97		
		0,01	3,89		

ANEXO P. Análisis ANOVA de un factor para los datos del ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1P) y para el ensayo de citotoxicidad (Gráfico 2P) del extracto frente al compuesto aislado.

Gráfico 1P

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2350,369	7,000	335,767	218,553	0,000	2,313
Dentro de los grupos	49,162	32,000	1,536			
Total	2399,531	39,000				

Gráfico 2P

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	755,202	7,000	107,886	459,947	0,000	2,423
Dentro de los grupos	5,629	24,000	0,235			
Total	760,831	31,000				

ANEXO Q. Gráficas que muestran la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1Q) y del compuesto aislado (Gráfico 2Q)

Gráfico 1Q

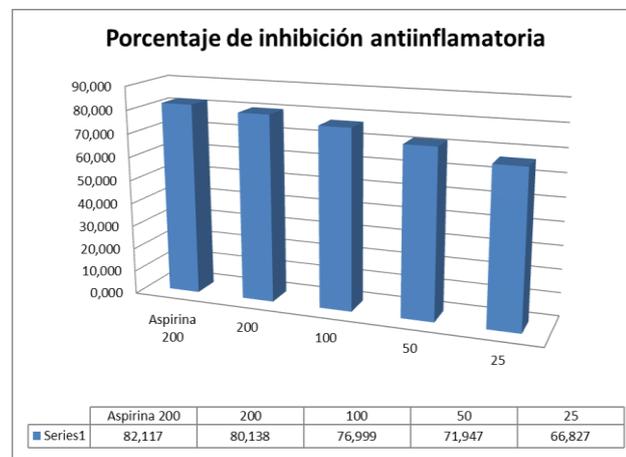
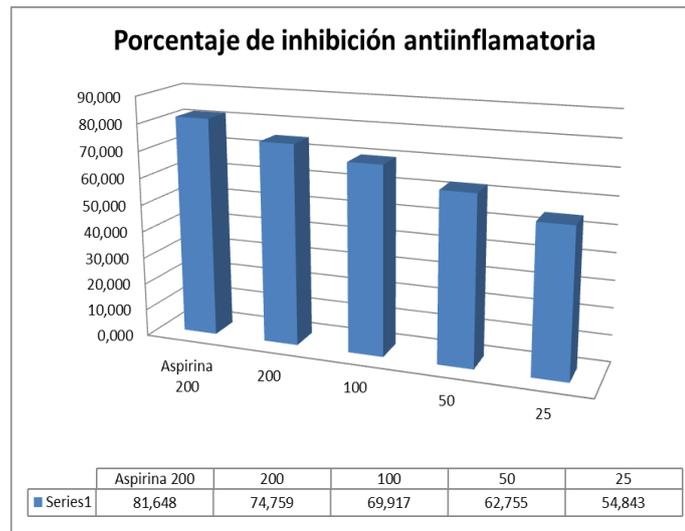


Gráfico 2Q



ANEXO R. Gráfica del porcentaje de viabilidad celular y de citotoxicidad del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1R) y del compuesto aislado (Gráfico 2R).

Gráfico 1R

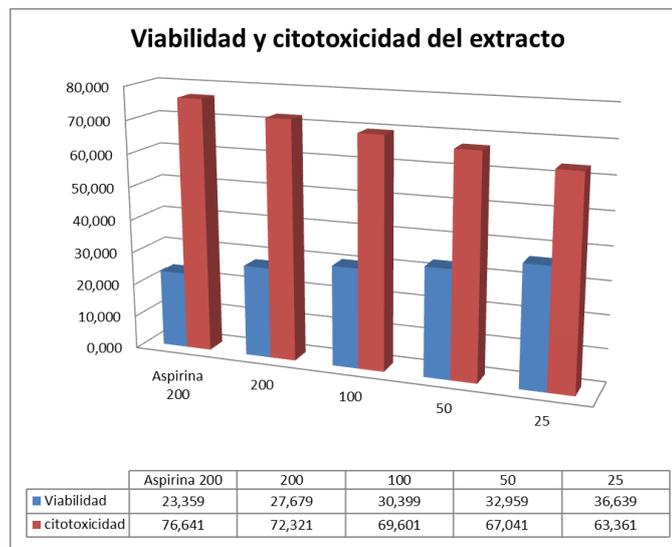
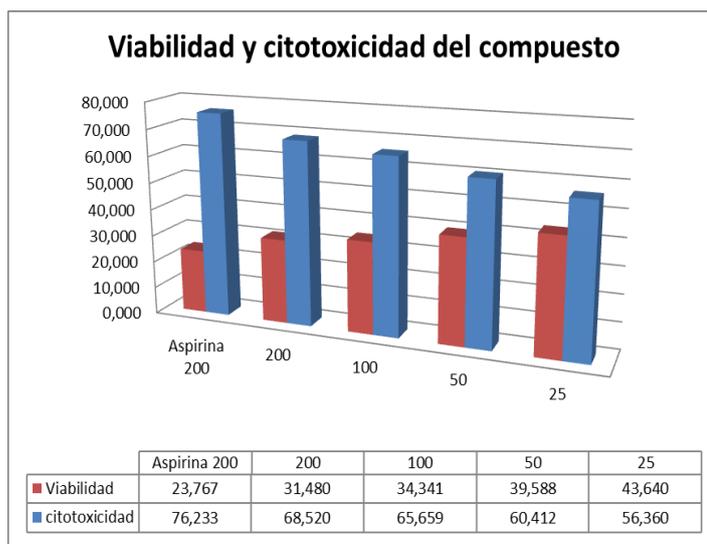


Gráfico 2R



ANEXO S. Cuadro de las absorbancias obtenidas del ensayo de actividad antiinflamatoria *in vitro*, tanto del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1S) como del compuesto aislado (Gráfico 2S).

Gráfico 1S

DMSO 5%	0,295	0,291	0,292	0,294	0,293
Tritón 0,1%	0,001	0	0	0,001	0
Aspirina 200ppm	0,056	0,053	0,052	0,05	0,051
200 ppm	0,062	0,058	0,057	0,056	0,058
100 ppm	0,071	0,065	0,067	0,066	0,068
50 ppm	0,085	0,081	0,08	0,082	0,083
25 ppm	0,103	0,097	0,098	0,095	0,093

Gráfico 2S

DMSO 5%	0,293	0,295	0,293	0,291	0,294
Tritón 0,1%	0,001	0	0,001	0	0
Aspirina 200ppm	0,058	0,052	0,053	0,055	0,051
200 ppm	0,081	0,073	0,072	0,074	0,070
100 ppm	0,095	0,085	0,086	0,087	0,088
50 ppm	0,116	0,107	0,108	0,106	0,109
25 ppm	0,142	0,131	0,128	0,129	0,132

ANEXO T. Cuadro de las absorbancias obtenidas del ensayo de citotoxicidad *in vitro*, tanto del extracto hidroalcohólico (Gráfico 1T) como del compuesto aislado (Gráfico 2T).

Gráfico 1T

DMSO 5%	0,312	0,313	0,311	0,314
Tritón 0,1%	0,001	0	0,001	0
Ácido acetilsalicílico	0,071	0,074	0,072	0,075
200 ppm	0,087	0,086	0,085	0,088
100 ppm	0,096	0,095	0,093	0,096
50 ppm	0,101	0,104	0,102	0,105
25 ppm	0,114	0,115	0,113	0,116

Gráfico 2T

DMSO 5%	0,316	0,313	0,314	0,315
Tritón 0,1%	0	0	0	0,001
Ácido acetilsalicílico	0,076	0,074	0,073	0,076
200 ppm	0,097	0,100	0,098	0,101
100 ppm	0,106	0,109	0,107	0,110
50 ppm	0,123	0,126	0,124	0,125
25 ppm	0,139	0,137	0,135	0,138