



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
CITOTÓXICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
FLORES Y HOJAS DE *Oreocallis grandiflora*”**

AUTORA: MARTHA KARINA YANZA MORENO

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA, M.Sc.

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

Previo a la obtención del Título de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, Martha Karina Yanza Moreno

Se autoriza la reproducción parcial o total, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho 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 CITOTÓXICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLORES Y HOJAS DE *Oreocallis grandiflora*” de responsabilidad de la señorita egresada Martha Karina Yanza Moreno, 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**

BQF. Gisela Pilco, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Martha Karina Yanza Moreno 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 texto que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

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

Martha Karina Yanza Moreno

CI: 060469756-5

DERECHOS DE AUTORÍA

El trabajo de grado que presento, es original y basado en el proceso de investigación y/o adaptación tecnológica establecido en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. En tal virtud, los fundamentos teóricos, científicos y los resultados son de exclusiva responsabilidad de los autores. El patrimonio intelectual le pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Martha Karina Yanza Moreno

CI: 060469756-5

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación va dedicado a Dios, por haberme permitido estudiar y formarme académicamente.

A mis padres por su enorme sacrificio, apoyo económico, emocional, consejo durante el trascurso de mi vida estudiantil.

A mis queridos hermanos por su apoyo moral y emocional, por ser mis guías y ejemplos a seguir, por ayudarme a seguir adelante en el momento en que lo necesitaba.

Kari

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de estudiar y seguir adelante en cada meta u objetivo que me eh planteado.

A mis padres por su compromiso, apoyo económico, apoyo moral en toda mi época estudiantil, por darme día a día todo lo que he necesitado, este logro alcanzado va por ustedes, muchas gracias por estar presente en un objetivo más trazado en mi vida.

A mis hermanos y hermanas que con su profesionalismo inculcaron en mí el amor por lo que hago, el amor por mi carrera y sobre todo el amor por la ciencia de la investigación.

A mis sobrinos por su apoyo emocional en el desarrollo de mi proyecto de titulación.

Mis más sinceros agradecimientos a Diego Vinueza que a más de ser mi tutor me enseñó que con la investigación se puede llegar a hacer cosas grandes e inimaginables, gracias por ayudar a que crezca en mí el interés por la investigación.

A la ESPOCH por permitirme crecer intelectualmente día a día dentro del aula de clase.

CONTENIDO

RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	18
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO	21
1.1. Oreocallis grandiflora	21
1.1.1. Distribución y hábitat	21
1.1.2. Taxonomía	22
1.1.3. Descripción taxonómica	22
1.1.4. Usos terapéuticos	22
1.2. Inflamación	23
1.2.1. Tipos de inflamación	23
1.2.1.1. Por el tiempo de duración	23
1.2.1.2. Por el carácter del exudado	23
1.2.1.3. Por su etiología	23
1.2.1.4. Por sus características morfológicas	24
1.2.1.5. Por su localización	24
1.2.2. Mediadores de la respuesta inflamatoria	24
1.2.2.1. Histamina	25
1.2.2.2. Enzimas proteolíticas	25
1.2.2.3. Factores quimiotácticos	25
1.2.2.4. Heparina	26
1.2.2.5. PGE2	26
1.2.2.6. LTB4	26
1.2.2.7. Factor activador de plaquetas (PAF)	26
1.2.2.8. Bradicininas	26
1.2.2.9. Citocinas	26
1.2.3. Fases evolutivas de los procesos inflamatorios	27
1.2.3.1. Liberación de mediadores	27
1.2.3.2. Llegada de moléculas y células inmunes al foco de inflamación	28

1.2.3.3.	<i>Regulación de la respuesta inflamatoria</i>	29
1.2.3.4.	<i>Reparación</i>	30
1.2.4.	<i>Medicamentos utilizados en la terapia antiinflamatoria</i>	31
1.2.4.1.	<i>Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides</i>	31
1.2.4.2.	<i>Analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)</i>	31
1.2.4.3.	<i>Compuestos antiinflamatorios de origen natural</i>	32
1.3.	<i>Compuestos fenólicos (Polifenoles)</i>	32
1.3.1.	<i>Flavonoides</i>	33
1.3.1.1.	<i>Propiedades</i>	33
1.3.1.2.	<i>Mecanismo antioxidante de los flavonoides</i>	33
1.3.1.3.	<i>Mecanismo antiinflamatorio de los flavonoides</i>	34
1.4.	<i>Ensayos de evaluación in vitro de la actividad antiinflamatoria y citotóxica</i>	35
1.4.1.	<i>Reactivo (WST-1) para la actividad citotóxica y antiinflamatoria</i>	35
1.5.	<i>Antioxidante</i>	36
1.5.1.	<i>Radical libre</i>	36
1.5.2.	<i>Estrés oxidativo</i>	36
1.5.3.	<i>Capacidad captadora de radicales libres método DPPH'</i>	37

CAPITULO II

2.	<i>MARCO METODOLÓGICO</i>	38
2.1.	<i>Lugar de investigación</i>	38
2.2.	<i>Recolección de la materia vegetal</i>	38
2.3.	<i>Equipos y reactivos</i>	38
2.3.1.	<i>Equipos</i>	38
2.3.2.	<i>Reactivos</i>	39
2.4.	<i>Técnicas y métodos</i>	39
2.4.1.	<i>Secado y molienda de la materia vegetal</i>	41
2.4.1.1.	<i>Secado</i>	41
2.4.1.2.	<i>Molienda</i>	41
2.4.2.	<i>Control de calidad</i>	42
2.4.2.1.	<i>Determinación de cenizas totales</i>	42
2.4.2.2.	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	42
2.4.2.3.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	43
2.4.2.4.	<i>Determinación del contenido de humedad (Método gravimétrico)</i>	43

2.4.3.	<i>Análisis cualitativo</i>	44
2.4.4.	<i>Obtención del extracto hidroalcohólico</i>	46
2.4.4.1.	<i>Determinación de los requisitos organoléptico</i>	46
2.4.4.2.	<i>Determinación de densidad relativa</i>	46
2.4.4.3.	<i>Determinación del índice de refracción</i>	47
2.4.4.4.	<i>Determinación del pH</i>	47
2.4.4.5.	<i>Determinación de sólidos totales</i>	47
2.4.5.	<i>Obtención del extracto liofilizado</i>	48
2.4.6.	<i>Cuantificación de fenoles totales</i>	49
2.4.7.	<i>Cuantificación de flavonoides totales</i>	50
2.4.8.	<i>Ensayo citotóxico y antiinflamatorio in vitro</i>	50
2.4.8.1.	<i>Aislamiento de neutrófilos</i>	50
2.4.8.2.	<i>Ensayo citotóxico en neutrófilos aislados</i>	52
2.4.8.3.	<i>Ensayo antiinflamatorio en neutrófilos aislados</i>	54
2.4.9.	<i>Ensayo antioxidante por el método DPPH</i>	55
2.4.10	<i>Análisis estadístico</i>	56

CAPITULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	57
3.1.	Control de calidad de la droga cruda de hojas y flores de <i>Oreocallis grandiflora</i>	57
3.2.	Análisis cualitativo	58
3.3.	Parámetros de calidad del extracto	60
3.4.	Cuantificación de fenoles totales	61
3.5.	Cuantificación de flavonoide totales	62
3.6.	Ensayo citotóxico y antiinflamatorio	63
3.6.1.	<i>Ensayo citotóxico in vitro</i>	63
3.6.2.	<i>Ensayo antiinflamatorio</i>	65
3.7.	Actividad antioxidante	69
	CONCLUSIONES	71
	RECOMENDACIONES	72

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Taxonomía de <i>Oreocallis grandiflora</i>	22
Tabla 2-1. Mediadores de la inflamación.....	27
Tabla 1-2. Equipos utilizados para los ensayos antiinflamatorios y citotóxicos.....	38
Tabla 2-2. Reactivos utilizados para los ensayos antiinflamatorios y citotóxicos.	39
Tabla 3-2. Concentraciones de los diferentes constituyentes para el ensayo de citotoxicidad.....	53
Tabla 4-2. Concentraciones de los diferentes constituyentes para el ensayo antiinflamatorio.	54
Tabla 1-3. Resultados de parámetros de calidad	57
Tabla 2-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	59
Tabla 3-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de flores de <i>Oreocallis grandiflora</i>	59
Tabla 4-3. Parámetros de calidad del extracto de hojas y flores de <i>Oreocallis grandiflora</i>	60
Tabla 5-3. Cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría.	61
Tabla 6-3. Cuantificación de flavonoides por espectrofotometría.	62
Tabla 7-3. Porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de extracto.	63
Tabla 8-3. Porcentaje de inhibición inflamatoria a diferentes concentraciones.	66
Tabla 9-3. Resultados del IC ₅₀	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Fases en que se lleva a cabo el proceso inflamatorio	30
Figura 3-1. Formación del radical flavino.	34
Figura 4-1. Mecanismo de acción antiinflamatoria y citotóxica producida por el WST-1	36
Figura 5-1. Mecanismo de acción del DPPH.....	37
Figura 1-2. Protocolo de investigación	40
Figura 2-2. Secado de la planta.....	41
Figura 3-2. Molienda de la materia vegetal.	41
Figura 4-2. Cenizas totales.....	42
Figura 5-2. Protocolo de tamizaje fitoquímico	44
Figura 6-2. Ensayos a realizarse en los extractos obtenidos en el tamizaje fitoquímico.	45
Figura 7-2 Extractos hidroalcohólicos	46
Figura 8-2 Determinación de pH	47
Figura 9-2 Sólidos totales.	48
Figura 10-2 Extractos liofilizados.....	48
Figura 11-2. <u>Fundamento de la reacción de Folin Ciocalteu</u>	49
Figura 12-2. Adición de ficol a la solución 1 para lisar los eritrocitos.	50
Figura 13-2. Obtención de neutrófilos.	51
Figura 14-2. Recuento de neutrófilos en la cámara Neubauer.	51
Figura 15-2. Neutrófilos.....	52
Figura 16-2. Diluciones preparadas de flores y hojas a diferentes concentraciones.....	52
Figura 17-2. Ensayo de citotoxicidad antes de la incubación.....	53
Figura 18-2. Ensayo de citotoxicidad después de la incubación.....	53
Figura 19-2. Ensayo antiinflamatorio después de la incubación.....	55
Figura 20-2. Final de la reacción con el reactivo DPPH'	56

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3. Porcentaje de viabilidad obtenida de flores y hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	65
Gráfico 2-3. Porcentaje de inhibición de la inflamación obtenida de flores y hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i> a diferentes concentraciones frente a la aspirina a 200ppm	69

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Secado de hojas y flores de *Oreocallis grandiflora*.

ANEXO B. Tamizaje fitoquímico de hojas y flores de *Oreocallis grandiflora*.

ANEXO C. Obtención de los extractos liofilizados de flores y hojas

ANEXO D. Muestras preparadas como estándares para la cuantificación de fenoles (Gráfico 1D) y cuantificación de flavonoides (Gráfico 2D)

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

ANEXO F. Aislamiento de neutrófilos.

ANEXO G. Ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1G) y citotóxico (Gráfico 2G) *in vitro* previo a la incubación.

ANEXO H. Ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1H) y citotóxico (Gráfico 2H) *in vitro* posterior a la incubación.

ANEXO I. Porcentaje de inhibición de los radicales libres de ácido gálico (Tabla 1I), extracto de hojas de *Oreocallis grandiflora* (Tabla 2I), extracto de flores de *Oreocallis grandiflora* (Tabla 3I).

ANEXO J. Valores del R en la regresión logística y probit para el ensayo de citotoxicidad del extracto de hojas (Gráfico 1J), el extracto de flores (Gráfico 2J) y para el ensayo antioxidante del ácido gálico (Gráfico 3J), extracto de hojas (Gráfico 4J) y extracto de flores (Gráfico 5J).

ANEXO K. Valores de IC 50 para el ensayo de citotoxicidad del extracto de hojas (Gráfico 1K), el extracto de flores (Gráfico 2K) y para el ensayo antioxidante del ácido gálico (Gráfico 3K), extracto de hojas (Gráfico 4K) y extracto de flores (Gráfico 5K).

ANEXO L. Prueba de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1l) y citotóxico (Gráfico 2l), y prueba de homogeneidad de varianza del ensayo antiinflamatorio a 200 ppm del extracto de flores, extracto de hojas y aspirina (Gráfico 3l).

ANEXO M. Prueba de normalidad de los datos obtenidos para el ensayo antiinflamatorio a 200 ppm del extracto de flores, extracto de hojas y aspirina.

ANEXO N. Análisis factorial para el ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1N), ensayo citotóxico (2N).

ANEXO Ñ. Análisis anova de un factor para el ensayo antiinflamatorio a concentración de 200 ppm para el extracto de hojas, extracto de flores y aspirina.

ANEXO O. Prueba pos hoc (tukey) para el ensayo antiinflamatorio del tratamiento frente al porcentaje de inhibición de la inflamación (Gráfico 1O), y de las concentraciones utilizadas frente al porcentaje de inhibición de la inflamación (Gráfico 2O). Prueba pos hoc (tukey) para la formación de los niveles que presentan a un mismo grupo de tratamiento (Gráfico 3O), y para la formación de los niveles que presentan a un mismo grupo de concentración (Gráfico 4O).

ANEXO P. Prueba pos hoc (tukey) para el ensayo antiinflamatorio del tratamiento a 200 ppm frente al porcentaje de inhibición de la inflamación (Gráfico 1P),). Prueba pos hoc (tukey) para la formación de los niveles que presentan a un mismo grupo de tratamiento. (Gráfico 2P).

ANEXO Q. Prueba pos hoc (tukey) para el ensayo citotóxico del tratamiento frente a las concentraciones utilizadas (Gráfico 1Q) y prueba pos hoc (tukey) para la formación de los niveles que presentan a un mismo grupo de concentraciones (Gráfico 2Q).

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antiinflamatoria y citotoxicidad *in vitro* de flores y hojas del cucharillo (*Oreocallis grandiflora*). Los extractos hidroalcohólicos fueron obtenidos a partir de las flores y hojas de *Oreocallis grandiflora* por separado, siguiendo una metodología estandarizada. El material vegetal fue extraído con etanol 70 % v/v, las fracciones hidroalcohólicas fueron concentradas bajo condiciones controladas en un evaporador rotatorio, y, finalmente los residuos fueron liofilizados para obtener los extractos hidroalcohólicos correspondientes de hojas y flores. Se comprobó la presencia de compuestos de tipo fenólico, flavonoides, quinonas, saponinas, mucílagos. El contenido de fenoles totales fue de $15\% \pm 0,30$ y $12,01\% \pm 0,21$ para los extractos de hojas y flores, respectivamente. El contenido de flavonoides totales fue de $40,61\% \pm 1,73$ y $15,85\% \pm 1,53$ para hojas y flores, respectivamente. Los extractos presentaron capacidad captadora de radicales libres a una IC_{50} de 290,19 $\mu\text{g/mL}$ para hojas, IC_{50} de 906,92 $\mu\text{g/mL}$ para flores y IC_{50} de 35,20 $\mu\text{g/mL}$ para el ácido gálico utilizado como referencia. Los ensayos de actividad antiinflamatoria y citotoxicidad se llevaron a cabo usando el modelo *in vitro* de neutrófilos aislados, en el cual se determina la reacción de una sal de tetrazolio estable (WST-1). El ensayo antiinflamatorio *in vitro* sobre neutrófilos aislados demostró que los extractos hidroalcohólicos obtenidos tanto de hojas como flores de *Oreocallis grandiflora* exhiben actividad antiinflamatoria pronunciada comparadas con ácido acetilsalicílico, sustancia que fue usada como referencia. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* presentó un valor de porcentaje de inhibición inflamatoria de $97,18\% \pm 1,85$, en tanto que el extracto obtenido a partir de flores de *Oreocallis grandiflora* un valor de $68,27\% \pm 2,88$ y la referencia (ácido acetilsalicílico) $74,11\% \pm 0,11$ resultados obtenidos a partir de tres réplicas del experimento a la concentración de 200 ppm de extracto hidroalcohólico o referencia.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <(CUCHARILLO) *Oreocallis grandiflora*>, <SAL DE TETRAZOLIO (WST-1)>, <ASPIRINA>, <CITOTOXICIDAD>, <INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN>, <ANTIOXIDANTE>

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory activity and *in vitro* cytotoxicity of *Oreocallis* flowers and leaves (*Oreocallis grandiflora*). The hydroalcoholic extracts were obtained from the flowers and leaves of *Oreocallis grandiflora* separately, following a standardized methodology. The plant material was extracted with 70% v/v ethanol, the hydroalcoholic fractions were concentrated under controlled conditions on a rotary evaporator, and finally the residues were lyophilized to obtain the corresponding hydroalcoholic extracts from the leaves and flowers. The presence of phenolic compounds, flavonoids, quinones, saponins, mucilages were verified. The total phenol content was $15\% \pm 0.30$ and $12.01\% \pm 0.21$ for leaf and flower extracts, respectively. The total content of flavonoids was $40.61\% \pm 1.73$ and $15.85\% \pm 1.53$ for leaf and flowers, respectively. The free radical scavenging capacity for the extracts presented a IC_{50} of 290.19 $\mu\text{g/mL}$ for leaves, IC_{50} of 906.92 $\mu\text{g/mL}$ for flowers and IC_{50} of 35.20 $\mu\text{g/mL}$ for the gallic acid used as a reference. Anti-inflammatory activity and cytotoxicity tests were performed using the *in vitro* model of isolated neutrophils, in which the reaction of a stable tetrazolium salt (WST-1) was determined. The *in vitro* anti-inflammatory test on isolated neutrophils demonstrated that the hydroalcoholic extracts obtained from both the leaves and flowers of *Oreocallis grandiflora* exhibit pronounced anti-inflammatory activity compared to aspirin, the substance that was used as reference. The hydroalcoholic extract from *Oreocallis grandiflora* leaves presented a percentage of inflammatory inhibition of $97.18\% \pm 1.85$, while the extract obtained from *Oreocallis grandiflora* flowers had a value of $68.27\% \pm 2.88$ and the reference (aspirin) $74.11\% \pm 0.11$. These results were obtained from three replicates of the experiment at a concentration of 200 ppm of hydroalcoholic extracts or the reference.

Key Words: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACEUTICS>, <(CUCHARILLO) *Oreocallis grandiflora*>, <TETRAZOLIUM SALT (WST-1)>, <ASPIRIN>, <CYTOTOXICITY>, <INFLAMMATORY INHIBITION>, <ANTIOXIDANT>

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista epidemiológico los procesos inflamatorios y dolor muscular se presentan a toda edad e involucran una serie de eventos inespecíficos que pueden ser provocados por numerosos estímulos o agresiones del medio como agentes biológicos, isquemia, traumatismo, lesiones térmicas o fisicoquímicas de diversa índole, etc.(Thomas et al., 2002: p. 97)

Uno de los problemas que afectan el día a día en la sociedad es el uso indiscriminado de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), ya que en esta época son utilizados a nivel mundial como los fármacos de primera elección para paliar el dolor en la inflamación asociada con enfermedades graves como artritis reumatoide y otro tipo de agresiones, sin embargo su uso inadecuado conlleva a la aparición de enfermedades, principalmente gastrointestinales (úlceras peptídicas, hemorragia, lesión de la pared abdominal, etc.).(Zaa et al., 2012a: p. 330)

El Ecuador es un país multidiverso dado que posee una gran cantidad de flora y fauna en sus tres regiones lo que ha conllevado a que el 80% de la población ecuatoriana utiliza medicinas basadas en plantas para mantener un buen estado de salud, esta tendencia crece día a día debido, principalmente, al difícil acceso de la población a una atención médica y medicamentosa general en hospitales públicos, causado por la grave crisis de salud del país así como también por la reducción del gasto público en esta área. (Butrón X, 2004a: p.136), sin embargo existen miles de especies vegetales que carecen de un estudio determinante para poder ser utilizadas como principios activos para una determinada actividad terapéutica. (De Feo, 2003, p.248).

La investigación de productos derivados de la naturaleza ecuatoriana permitirá en el mediano y largo plazo disminuir la importación de medicamentos y promoverá la autosuficiencia del país cuando se los desarrolle como fitofármacos, convirtiéndose en una alternativa que garantizaría el buen vivir de la población.

En la actualidad el estudio de plantas medicinales continúa siendo importante como precursor de nuevos activos para ser utilizados por la industria farmacéutica. Un sinnúmero de plantas originarias de Latinoamérica ha dado origen a compuestos y posteriormente medicamentos para tratar diversas enfermedades, sustancias como la quinina utilizada para tratar el paludismo y

muchas otras plantas que están siendo investigadas actualmente para tratar enfermedades graves como el cáncer o el SIDA. (Butrón X, 2004b: p.136)

El estudio de la actividad antiinflamatoria ha mostrado gran interés científico en el área de la farmacología, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios y reducir o eliminar lesiones a nivel gástrico (Gómez Estrada et al., 2011: pp. 190-197) efecto que ha justificado investigaciones en especies tales como *Euphorbia peplis*, *Bryophyllum pinnatum*, *Clerodendron serratum*, *Cedrus deodara* y *Urera baccifera* (Boeris et al. 2004) con el propósito de hallar compuestos más efectivos y con acciones colaterales mínimas. (Zaa et al., 2012b: pp.330-332)

Algunos metabolitos secundarios de plantas tales como alcaloides, fenoles, taninos, glicósidos, terpenoides, saponinas, flavonoides y esteroides han sido implicados en su capacidad para inhibir la formación de moléculas de señalización pro-inflamatorias tales como prostaglandinas y leucotrienos. (Fawole et al., 2009: pp. 237-238)

Oreocallis grandiflora conocida vulgarmente como cucharillo ha sido utilizada, en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades como la diabetes, desórdenes hormonales, inflamación, gripe y resfriados; además se han realizado estudios que han evaluado la actividad antidiabética *in vitro* mediante la inhibición de α -glucosidasa, sin embargo no existen estudios farmacológicos o *in vitro* que hayan evaluado el potencial antiinflamatorio. (Espinoza et al., 2013a: p.60)

Todo lo mencionado anteriormente conlleva al estudio *in vitro* del potencial antiinflamatorio y citotóxico derivado de las flores y hojas de *Oreocallis grandiflora*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora*.

Objetivos específicos

1. Identificar los metabolitos secundarios representativos de extracto etéreo, etanólico y acuoso de las flores y hojas de *Oreocallis grandiflora* mediante la aplicación del tamizaje fitoquímico.
2. Cuantificar la cantidad de flavonoides y fenoles totales presentes en el extracto hidroalcohólico de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora* mediante técnicas espectrofotométricas.
3. Determinar la actividad antiinflamatoria de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora* calculando la disminución de la formación de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido) expresado como porcentaje de inhibición inflamatoria.
4. Determinar la actividad citotóxica de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora* mediante la reducción de la sal de tetrazolio expresado como porcentaje de viabilidad celular.
5. Evaluar la capacidad captadora de radicales libres de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora* mediante el ensayo de DPPH´.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Oreocallis grandiflora*

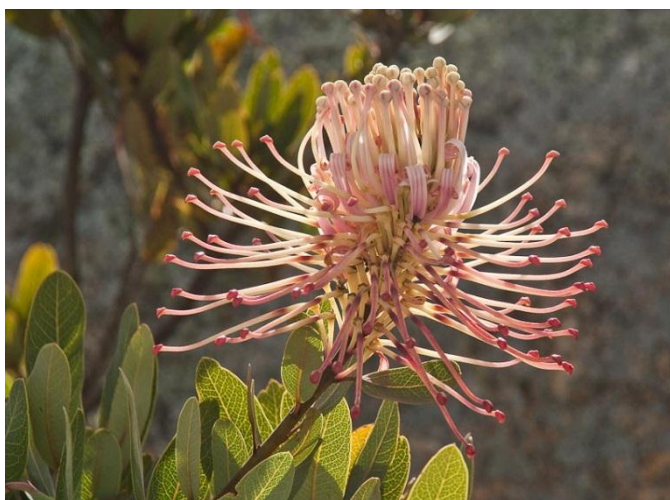


Figura 1-1. Especie *Oreocallis grandiflora*

Fuente: (Balslev et al., 2008: p. 1)

Realizado por: Karina Yanza, 2017

El nombre *Oreocallis* deriva de las palabra griegas or(e)os ="montaña", y kalli= "bella" que significa bella de la montañas inicialmente fue descrita con el nombre de *Embothrium grandiflora* perteneciendo a este género hasta 1954 donde el botánico holandés Herman Otto Sleumer la nombró *Oreocallis grandiflora* (Rios, 2015, p.13)

1.1.1. *Distribución y hábitat*

El género *Oreocallis* está constituido de 5 especies distribuidas en Nueva Guinea, en el este de Australia y desde el norte del Perú hasta el centro del Ecuador. En el Ecuador están representadas 2 especies, ambas andinas: *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. y *Oreocallis mucronata*. En el Ecuador crece entre 1000 a 4000 ms.n.m. (Ulloa y Jorgensen, 1999: p.823), se ha registrado su existencia en las provincias de Azuay, Guayas, Loja y Zamora Chinchipe, (Brako y Zaruchi, 1993: p.634)

1.1.2. Taxonomía

Tabla 1-1. Taxonomía de *Oreocallis grandiflora*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnolipsida
Orden	Proteales
Familia	Proteaceae
Género	<i>Oreocallis</i>
Especie	<i>Grandiflora</i>
Nombres vulgares	Cucharillo, Gañal, galuay, galluay, galguay, galvay

Fuente: (Ulloa y Jorgensen, 1995a: p.230)

Realizado por: Karina Yanza, 2017

1.1.3. Descripción taxonómica

Árbol o arbusto pruinoso entre 3 y 5 m de altura, tiene raíces horizontales; tallos cilíndricos de corteza lisa en plantas jóvenes y en plantas adultas son de corteza rugosa y color café oscuro; las hojas son coriáceas, ovadas, de pecíolo alargado, dispuestas en espiral que forman inflorescencias que miden entre 12 y 14 cm, tiene entre 60 y 80 flores de color blanco rojizas o violáceas y su floración se mantiene durante todo el año; las anteras son ovadas en el ápice y con un pequeño orificio estigmático. El folículo es oblongo-cilíndrico, largamente estipitado, coriáceo, pruinoso, y mide entre 7 y 10 cm, sus semillas son numerosas y aladas. (Ulloa y Jorgensen, 1995b: p.233)

1.1.4. Usos terapéuticos

No existe estudios fitoquímicos preliminares para esta especie, pero se ha reportado en estudios etnobotánicas realizados por la UTPL que empíricamente se utilizan las hojas, los frutos y las flores de la planta en infusiones acuosas para tratar afecciones del tracto intestinal, colesterol, diabetes, dolencias hepáticas, gripe, hernias, inflamaciones, nefritis, problemas de los ojos y úlcera gástrica. (Espinoza et al., 2013b: p.60)

Las flores son utilizadas para tratar afecciones del sistema urinario, sistema hormonal y desórdenes generales. (Tinitana et al., 2016: p.29)

Las cápsulas leñosas en que maduran las semillas son eficaces en la cura de hernias y quebraduras. (CESA, 1989: p 20-21)

1.2. Inflamación

La inflamación es la respuesta inmune inicial que presenta el organismo ante cualquier tipo de agresión, que puede ser de origen externo (infección, traumatismo, lesión) o causada por el propio organismo (enfermedades autoinmunes) controlada humoral y celularmente (complemento, cininas, coagulación y cascada fibrinolítica) y desencadenada por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales. (García de Lorenzo y Mateos et al. 2000a: p.354)

1.2.1. Tipos de inflamación

La clasificación de la inflamación se realiza tomando en cuenta el tiempo de duración, carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización: (Villalba, 2014a: p.2261-2265)

1.2.1.1. Por el tiempo de duración

- a) **Agudas:** Este tipo de inflamación es una respuesta inmediata al agente agresor cuya finalidad es liberar mediadores de defensa del organismo en el área de la lesión cuyo comienzo es rápido y cursa una duración corta. (Villalba, 2014b: p.2261-2265).
- b) **Crónicas:** Es un proceso prolongado, que provoca destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación. (Villalba, 2014c: p.2261-2265).

1.2.1.2. Por el carácter del exudado

- a) **Trasudado:** Se caracteriza por la presencia de líquido extravascular con bajo contenido proteico, producto de un ligero cambio en la permeabilidad vascular. (Villalba, 2014d: p.2261-2265)
- b) **Exudado:** Se caracteriza por presencia de líquido inflamatorio extravascular con alto contenido proteico, provocando aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. (Villalba, 2014e: p.2261-2265)

1.2.1.3. Por su etiología

- a) Infecciosas: Causada por bacterias, virus, parásitos o por toxinas microbianas. (Villalba, 2014f: p.2261-2265)
- b) Traumáticas: causada por golpes intensos con respuesta inmediata o tardía, como ocurre con los esguinces. (Villalba, 2014g: p.2261-2265).
- c) Térmicas resultantes de, quemaduras por calor o congelamiento. (Villalba, 2014h: p.2261-2265)
- d) Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad, a alérgenos comunes o procesos colagenopáticos. (Villalba, 2014i: p.2261-2265)

1.2.1.4. Por sus características morfológicas

- a) Serosa: por acúmulo de líquido tisular de bajo contenido proteico. (Villalba, 2014j: p.2261-2265)
- b) Fibrinosa: Con presencia de exudado con grandes cantidades de fibrinógeno. (Villalba, 2014k: p.2261-2265)
- c) Supurativa o purulenta: se caracteriza por la producción de exudados purulentos que consta de leucocitos y células necróticas. (Villalba, 2014l: p.2261-2265)
- d) Abscesos: presenta tejido inflamatorio purulento acompañado de necrosis licuefactiva. (Villalba, 2014m: p.2261-2265)
- e) Úlceras: Producidas por esfacelamiento de tejido necrótico. (Villalba, 2014n: p.2261-2265)

1.2.1.5. Por su localización

- a) Focales: Producidas en zonas y órganos específicos, en cuyo caso se utiliza el sufijo –itis, por ejemplo, faringitis, otitis, laringitis, conjuntivitis, peritonitis. (Villalba, 2014o: p.2261-2265)
- b) Diseminados: Resultado de la propagación de procesos inflamatorios persistentes ya sea por fistulización o metástasis. (Villalba, 2014p: p.2261-2265)

1.2.2. Mediadores de la respuesta inflamatoria

Las reacciones inmediatas o de fase aguda que siguen a la agresión y cuyo objetivo es la restauración de la homeostasis, constituyen el fenómeno inflamatorio.

Todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, siendo fuente principal de estos los mastocitos y basófilos, estos mediadores son agentes activos farmacológicamente que funcionan como un sistema amplificador del mecanismo efector y ejercen su función en tejidos locales así como también en efectores secundarios (neutrófilos, eosinófilos, células T, plaquetas y monocitos). (García de Lorenzo y Mateos et al. 2000b: p.354)

Estos mediadores pueden ser clasificados en primarios (antes de la degranulación de los mastocitos y basófilos) y secundarios (después de la degranulación). (Bórdes, 2014a: pp.9-12)

Los mediadores primarios más importantes son histamina, enzimas proteolíticas, factor quimiotáctico de eosinófilos y heparina, y, los secundarios son prostaglandinas, leucotrienos factor activador de plaquetas, bradicininas y citocinas. (Bórdes, 2014b: pp.9-12)

1.2.2.1. Histamina

Es un mediador ampliamente distribuido por el organismo, se detecta principalmente en el mastocito y basófilo. Actúa sobre los receptores H1 de los vasos y produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad. La dilatación de los vasos sanguíneos aumenta el flujo sanguíneo localizado, causando enrojecimiento y sensación de calor; la permeabilidad capilar incrementada permite que proteínas y agua fluyan a través de los vasos sanguíneos produciendo edema. (García de Lorenzo y Mateos et al. 2000c: p.354)(Gibon et al., 2017: p.30)

1.2.2.2. Enzimas proteolíticas

Entre las distintas enzimas proteolíticas liberadas por el mastocito, la más importante es la cininogenasa que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre (cininógenos), produciendo su ruptura en péptidos más pequeños (cininas). Las cininas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor. (Bórdes, 2014c: pp.9-12)

1.2.2.3. Factores quimiotácticos

El ECF-A (Factor eosinófilo quimiotáctico de la anafilaxia) incluye dos tetrapéptidos que atraen eosinófilos al foco inflamatorio, induciendo simultáneamente la activación de estas células. El

NCF (Factor de necrosis tumoral) es una proteína de un peso molecular superior a 750.000 Da con capacidad de atraer y activar al neutrófilo. (Bórdes, 2014d: pp.9-12)

1.2.2.4. Heparina

Al inhibir la coagulación, favorece la llegada al foco inflamatorio desde la sangre de moléculas y células. (Bórdes, 2014e: pp.9-12)

1.2.2.5. PGE2

Es la prostaglandina más importante en el proceso inflamatorio. Produce vasodilatación y dolor. En coordinación con el factor C_{5a} y LTB₄ aumenta la permeabilidad vascular. El efecto antiinflamatorio del ácido acetilsalicílico se debe a que al bloquear la vía de la ciclo-oxigenasa impide la formación de esta prostaglandina. (Bórdes, 2014f: pp.9-12) (Gibon et al., 2017b: p.33)

1.2.2.6. LTB4

Es un factor quimiotáctico para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos (Bórdes, 2014g: pp.9-12)

1.2.2.7. Factor activador de plaquetas (PAF)

Este factor tiene varias propiedades. Activa las plaquetas determinando su agregación, con la liberación de mediadores por parte de estos cuerpos e inicio de los procesos de coagulación. Además, produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Por otra parte, es un potente factor quimiotáctico y activador de neutrófilos. (Bórdes, 2014h: pp.9-12).

1.2.2.8. Bradicininas

Se forman en las plaquetas y causan contracción de los músculos lisos, aumento de la permeabilidad capilar, dilatación arterial, etc. (Bórdes, 2014i: pp.9-12).

1.2.2.9. Citocinas

Su acción principal es regular el mecanismo de la inflamación. (Bórdes, 2014j: pp.9-12).

Tabla 2-1. Mediadores de la inflamación

Sustancia	Origen	Efecto
Histamina y serotonina (aminas vasoactivas)	mastocitos, células cebadas y basófilos	Flujo sanguíneo incrementado, edema y picazón
Anafilotoxina C3a	Fijación del complemento	Liberación de histamina, incremento de permeabilidad opsonina
Anafilotoxina C5a	Fijación del complemento	Liberación de histamina, quimiotaxis y activación leucocitaria
Prostaglandinas PGE y PGF (Metabolito del ácido araquidonico)	Plaquetas	Edema y dolor, vasodilatación, fiebre activa a otros mediadores.
Leucotrienos LTC4 y LTD4	Monocitos	Edema, broncoconstricción.
Metabolitos del oxígeno	Glóbulos blancos	Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular.

}Fuente: (García de Lorenzo y Mateos et al. 2000d: p.354)

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

1.2.3. Fases evolutivas de los procesos inflamatorios

Los procesos inflamatorios se llevan a cabo en distintas fases: (Bórdes, 2014k: pp.9-12).

- ✓ Liberación de mediadores
- ✓ Llegada de células inmunes y moléculas al foco de inflamación
- ✓ Regulación del proceso inflamatorio
- ✓ Reparación

1.2.3.1. Liberación de mediadores

Cuando se produce una lesión directa en la célula por el agente agresivo, a nivel local se liberan mediadores de la inflamación que inducen una respuesta inflamatoria. A medida que la inflamación progresa los factores de complemento C_{3a} y C_{5a} actúan sobre receptores de membrana e inducen a la activación del mastocito para la liberación de mediadores de la inflamación. (Bórdes, 2014l: pp.9-12), (García de Lorenzo y Mateos et al., 2000e: p.354)

Sin embargo los mecanismos bioquímicos que subyacen este proceso no son aún bien conocidos. Se piensa que el proceso inicia en la membrana por la activación de adenilato-ciclasa que provoca un incremento inicial de la concentración intracitoplásmica de cAMP, y, por la activación de fosfolipasa A₂ mediante un ataque a los lípidos de membrana produciendo ácido

araquidónico. Se incrementa la permeabilidad de membrana al Ca^{++} provocando un incremento en la concentración de este ion en el citoplasma. (Gibon et al., 2017c: p31)

El incremento de la concentración de iones Ca^{++} y cAMP determina la formación de microtúbulos en el mastocito, así como también el movimiento de gránulos citoplasmáticos hacia la membrana celular para su posterior fusión y liberación de mediadores al espacio extracelular. (Gibon et al., 2017d: p31)

1.2.3.2. Llegada de moléculas y células inmunes al foco de inflamación

Se reclutan macrófagos y plaquetas fundamentales para la osificación intramembranosa. Se inicia una respuesta de fase aguda con alteraciones vasculares que facilitan el transporte de moléculas desde la sangre hacia el foco inflamatorio así como también la formación del edema. En una segunda fase, más tardías las propias alteraciones vasculares, así como la liberación en el foco de inflamación de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes. (Gibon et al., 2017e: p31) (García de Lorenzo y Mateos et al., 2000f: p.354), (Bórdes, 2014m: pp.9-12).

Respuesta en fase aguda: Llegada de moléculas.

Inmunoglobulinas: Los anticuerpos se unen y bloquean el germen y sus toxinas. La IgG, se une a los receptores por la porción Fc (FcR) potenciando la fagocitosis. (Bórdes, 2014n: pp.9-12).

Factores del complemento: Producen la lisis del germen o la célula extraña inductora de la inflamación. Los factores C_{3a} y C_{5a} , actuando sobre receptores de membrana, activan al mastocito y basófilo induciendo la liberación de mediadores y amplificando, de esta forma, el fenómeno inflamatorio. El factor C_{5a} es un potente factor quimiotáctico, mientras que el C_{5b} , uniéndose a receptores de membrana de los fagocitos, potencia la fagocitosis. (Bórdes, 2014ñ: pp.9-12).

Cininógenos: Sobre estas moléculas actúan las cininogenasas liberadas por el mastocito y basófilo dando lugar a las cininas. (Bórdes, 2014o: pp.9-12).

Proteínas de la fase aguda: La más importante es la proteína C Reactiva (PCR) que tiene la capacidad de fijar determinados gérmenes como el neumococo. (Bórdes, 2014p: pp.9-12).

Fase tardía: Llegada de células

Basófilo. Contribuye, junto con el mastocito, a la liberación de mediadores.

Neutrófilos: Son una de las primeras células en llegar al foco inflamatorio. Elimina al agente causante de la inflamación mediante fagocitosis o liberando factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos y produciéndole, así, una muerte extracelular. (Bórdes, 2014q: pp.9-12).

Monocito y Macrófago: Proceden de la sangre y tejidos respectivamente, llegan al foco de inflamación de forma tardía. Actúan fagocitando el agente causal de la inflamación. (Bórdes, 2014r: pp.9-12).

El macrófago sintetiza un péptido inespecífico, la interleucina 1 (IL-1), que es una hormona del sistema inmune que actúa sobre el centro termorregulador que determina la aparición de fiebre, induciendo la síntesis de PGE en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del hipotálamo. (Bórdes, 2014s: pp.9-12).

A nivel local, la IL activa la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, fenómenos incluidos en la fase de reparación de la inflamación.

Los linfocitos T inician una respuesta específica produciendo linfocinas que prolongna la inflamación en una respuesta inmune más elaborada.

Los linfocitos B que proceden de los tejidos linfoideos sintetizan IgE que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación. (Bórdes, 2014t: pp.9-12).

1.2.3.3. Regulación de la respuesta inflamatoria

Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio se encuentra regulado, evitando, así una respuesta inmune perjudicial o exagerada. Algunos de los mediadores que producen activación, al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, logrando de esta manera, una modulación o equilibrio de la respuesta inflamatoria. Los factores que intervienen en esta regulación son: (Bórdes, 2014u: pp.9-12).

- ✓ Histamina: Actúa sobre los receptores H₂, inhibe la actividad del neutrófilo, induce en los mastocitos y basófilos una inhibición de la liberación de mediadores de la inflamación.
- ✓ PGE: Provoca una inhibición de la liberación de mediadores en los mastocitos y basófilos, mientras que en los linfocitos provoca una inhibición de la proliferación y diferenciación.

- ✓ Agonistas autonómicos: La activación de receptores α -adrenérgicos y β colinérgicos induce la estimulación, mientras que la activación del receptor γ -adrenérgico produce una inhibición.
- ✓ Heparina: Inhibe la coagulación y la activación de los factores de complemento.
- ✓ Eosinófilos: Acuden al foco inflamatorio donde liberan una serie de enzimas que degradan algunos mediadores potenciadores de la inflamación (La histaminasa actúa sobre la histamina, la arilsulfatasa sobre los leucotrienos).

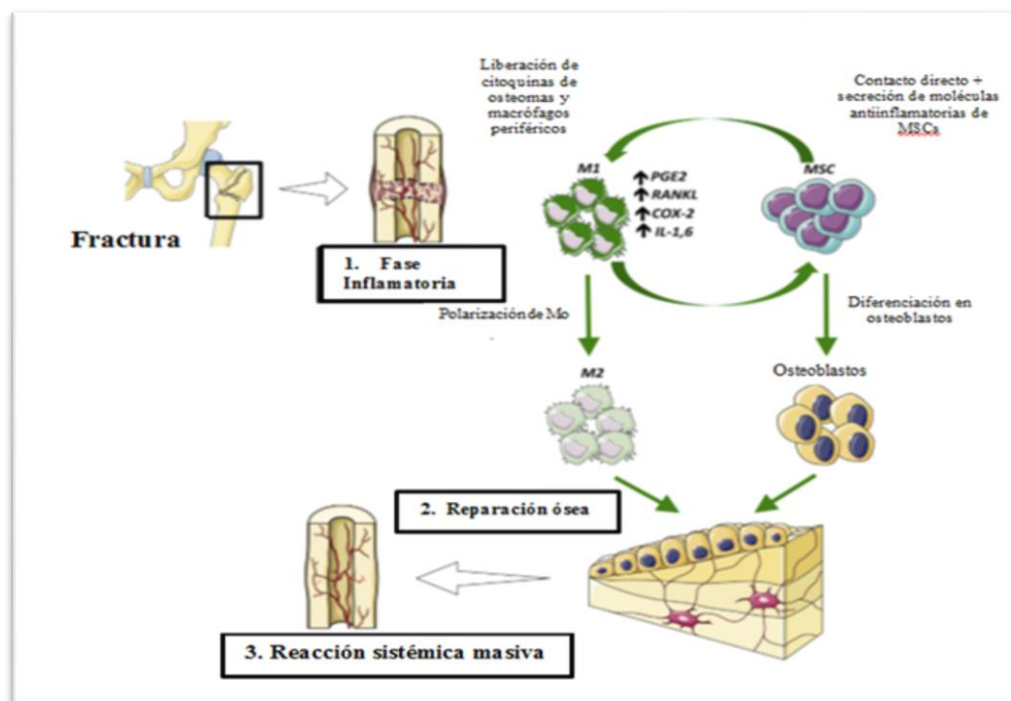


Figura 2-1. Fases en que se lleva a cabo el proceso inflamatorio

Fuente: (Gibon et al., 2017f: p.32)

Realizado por: Karina Yanza, 2017

1.2.3.4. Reparación

Una vez que las causas de la agresión han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria se lleva a cabo los procesos de reparación. (Bórdes, 2014v: pp.9-12).(Gibon et al., 2017e: p.32)

Estos procesos permiten, la llegada a la zona de la agresión de fibroblastos que van a proliferar y sintetizar colágeno, proliferar células epiteliales dentro de la herida manteniéndose hasta resolver la infección, reestablecer la homeostasis y completar la cicatrización. (Bórdes, 2014w: pp.9-12).

Si la homeostasis no se reestablece aparece una reacción sistémica masiva en la que las citocinas activan numerosas cascadas humorales de mediadores inflamatorios que perpetúan la activación del sistema retículo endotelial, provocando pérdida de la integridad microcirculatoria y lesión de diversos órganos. (Bórdes, 2014x: pp.9-12).

1.2.4. Medicamentos utilizados en la terapia antiinflamatoria

Existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios:

1.2.4.1. Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides

Actúan sobre el foco de la inflamación previniendo y suprimiendo las manifestaciones tempranas o tardías de los procesos inflamatorios. (Rodríguez Carranza, 2014a: pp 80-81)

Atraviesan la membrana celular y se unen a receptores citosólicos; el complejo fármaco-receptor pasa al núcleo uniéndose a sitios específicos en el DNA lo cual reprime la transcripción o induce transcripción de genes específicos (COX, citocinas y sintasa de óxido nítrico). De esta manera disminuyen la formación de citocinas, factores de adhesión, factor estimulante de la colonia granulocitos-macrófagos, óxido nítrico, liberación de histamina, producción de IgG e inhibe la liberación de ácido araquidónico. (Rodríguez Carranza, 2014b: pp 80-81)

Por estos mecanismos los glucocorticoides inhiben la formación de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, migración de neutrófilos al área de inflamación, la permeabilidad capilar, el edema y la acumulación de mastocitos en el sitio de inflamación. (Rodríguez Carranza, 2014c: pp 80-81)(Gómez Estrada et al., 2011c:pp.185-189)

En este grupo de fármacos destacan los glucocorticoides de acción intermedia (prednisona, triamcinolona, prednisolona), cuyo efecto persiste por 18 a 36 horas, y los de larga duración (betametasona, dexametasona), cuyo efecto persiste de uno a tres días. (Gómez Estrada et al., 2011d: pp.185-189)

1.2.4.2. Analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos mediante la inhibición de la enzima COX, son capaces de suprimir y eliminar los signos y síntomas de la inflamación, algunos ejercen acciones antipiréticas y analgésicas. (Gómez Estrada et al., 2011e: p.189)

Los AINEs son medicamentos muy útiles en el tratamiento de procesos inflamatorios agudos y crónicos, principalmente, en enfermedades reumáticas (artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritromatoso sistémico, vasculitis, etc.) (Rodríguez Carranza, 2014d: pp 80-81)

Estos fármacos se agrupan en varias clases químicas en las cuales se destacara el medicamento representativo de cada grupo: salicilatos (Ácido acetil salicílico), pirazonas y análogos (Fenilbutazona), Paraminofenol (paracetamol), indoles (Indometacina), derivados fenilacéticos (diclofenaco, ketorolaco), derivados arilpropionicos (ibuprofeno, naproxeno), oxicams (piroxicam), inhibidores selectivos de la COX-2 (celecoxib), derivados de la sulfonamida (nimesulida) (Gómez Estrada et al., 2011e: p.189)

Ácido acetil salicílico: Es el único de todos los AINEs que acetila en forma irreversible las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). Al inhibir la COX-1 disminuye la síntesis de TX A y, como consecuencia, la agregación plaquetaria. Por su parte, la inhibición de la COX-2, disminuye la inflamación vascular en el sitio de la placa ateromatosa y eso, a su vez, reduce la infiltración de células mononucleares en la placa ateromatosa. (Palomo et al., 2016: p.135)

1.2.4.3. Compuestos antiinflamatorios de origen natural

Existen muchos estudios que evalúan la actividad antiinflamatoria a partir de compuestos químicos o a su vez metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales (plantas), cabe recalcar que estos estudios se han fundamentado en modelos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*. (Gómez Estrada et al., 2011f: p.187)

Se ha reportado que los terpenos, iridoides glicosilados (aucubina), ginsenósidos, flavonoides (luteolina, quercetina, luteolina 7-glucosido, genistina, gerraniina, corilagina), lignanos (salvinina, calocedrina, pinorecsinol, lariciresinol glicósido), aislados de diferentes especies de plantas presentan una actividad antiinflamatoria significativa. (Gómez Estrada et al., 2011g: p.187)

1.3. Compuestos fenólicos (Polifenoles)

Los compuestos fenólicos se originan principalmente en las plantas que son sintetizados en gran cantidad como producto de su metabolismo secundario, poseen una estructura que consiste en un núcleo aromático, con al menos un grupo hidroxilo libre o sustituido. (Hidalgo, 2012, p. 11), (Quiñones et al., 2012a: p.76)

Existen varias clases y subclases de compuestos fenólicos que se clasifican en función del número de anillos fenólicos presentes y los sustituyentes que presentan estos anillos. Los principales grupos de compuestos fenólicos son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones et al., 2012b: p.76)

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos rutas biosintéticas primarias: (Quiñones et al., 2012c: p.76)

La ruta del ácido shikimico que proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (Fenilalanina, tirosina) y la síntesis de ácido cinámico y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano) (Quiñones et al., 2012d: p.76)

La ruta de los poliacetatos que proporciona las quinonas y las xantonas. (Quiñones et al., 2012e: p.76)

1.3.1. Flavonoides

Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenil pirano ($C_6 - C_3 - C_6$), formados por dos anillos fenilo (A y B), enlazado a través de un anillo C de pirano heterocíclico. El anillo A se biosintetiza por la ruta de los poliacetatos, el anillo B y la unidad C_3 son sintetizados por la ruta del ácido shikimico. (Quiñones et al., 2012f: p.77)

La clasificación de estos compuestos se hace en función de la posición de anillo B y el estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C), siendo los compuestos flavonoides principales: flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianidinas y flavonoles. (Quiñones et al., 2012g: p.77)

1.3.1.1. Propiedades

Los flavonoides son sustancias sólidas cristalizadas de color blanco o amarillento. Sus heterósidos son solubles en agua caliente, alcohol y disolventes orgánicos polares. Sin embargo, cuando están en estado libre, son poco solubles en agua, pero son solubles en disolventes orgánicos más o menos oxigenados, dependiendo de su polaridad. (Lopez, 2017, p.109)

1.3.1.2. Mecanismo antioxidante de los flavonoides

Los flavonoides como la quercetina o la catequina pueden directamente neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS), como el O_2 , H_2O_2 . Los flavonoides que presentan mayor actividad

neutralizadora de radicales libres son la quercetina, miricetina, kenferol, El grupo fenólico que poseen estos compuestos actúa directamente capturando electrones desapareados de las ROS, generando especies menos reactivas. Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones y capturan radicales libres para generar el radical flavínico, mucho menos reactivo. Además, algunos flavonoides como la quercetina pueden quelar iones metálicos de transición (hierro, cobre), evitando la formación de especies reactivas de oxígeno producidas por la reacción de Fenton. (Quiñones et al., 2012e: p.78)

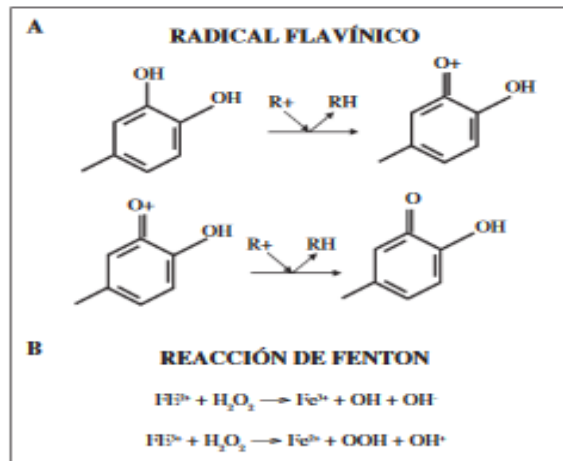


Figura 3-1. Formación del radical Flavino.

Fuente: (Quiñones et al., 2012f: p.78)

Realizado por: Karina Yanza, 2017

1.3.1.3. Mecanismo antiinflamatorio de los flavonoides

Existen estudios que indican que las células y moléculas relacionadas con la respuesta inmunológica están involucradas durante el desarrollo de una lesión vascular.

El estrés oxidativo causado por los radicales libres provoca un incremento de enzimas como la COX y Lipooxigenasa, implicada en la liberación de mediadores inflamatorios (interleucinas y quimiocina). Quiñones et al. (2012g: p.78) expresa que la quercetina inhibe la biosíntesis de la COX y PG, el resveratrol inhibe la biosíntesis de prostaglandinas.

Otros mecanismos implicados en la acción antiinflamatoria son: inhibición de la liberación de histamina, inhibición de la migración celular (en el proceso inflamatorio los leucocitos se dirigen hacia el foco inflamatorio, donde son activados liberando eicosanoides y otros agentes proinflamatorios), acción antirradical (actuando frente a los radicales libres que se originan en la inflamación. (Enciso & Arroyo, 2011, p.234)

1.4. Ensayos de evaluación *in vitro* de la actividad antiinflamatoria y citotóxica

Las células fagocíticas, como los leucocitos y los macrófagos, responden a un sinnúmero de estímulos de membrana causado por la producción y liberación extracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Esta secuencia coordinada de reacciones bioquímicas conocida como estallido oxidativo, es iniciada por un incremento en la recaptación de oxígeno seguida por la reducción de un electrón del oxígeno a superóxido (O_2^-) usando nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) o la ubiquinona oxidoreductasa (NADH) como el donador del electrón, en una reacción catalizada por la oxidasa dependiente de NADPH. Los macrófagos juegan un rol crucial modulando la iniciación y perpetuación de la respuesta inflamatoria. Un medio por el cual los macrófagos modulan la inflamación es por su capacidad para sintetizar mediadores biológicos, como prostaglandinas, los cuales tienen numerosos efectos cardiovasculares e inflamatorios. (Gómez Estrada et al., 2011g: p.187)

La citotoxicidad se debe al óxido nítrico, ya que reacciona con el radical superóxido (O_2^-), produciendo el oxidante altamente tóxico radical peroxinitrito ($ONOO^-$). En condiciones fisiológicas normales, las células producen sólo pequeñas cantidades de NO y trazas de especies reactivas de oxígeno (ROS) están disponibles para recoger el NO.

En contraste cuando ocurre un proceso inflamatorio grandes cantidades de NO son generadas por la isoforma inducible de óxido nítrico sintasa (NOS) (iNOS) acompañados de una gran producción de ROS, lo que podría cambiar la química del NO, hacia la formación de $ONOO^-$, anhídrido nitroso (N_2O_3), que son potentes oxidantes, nitrantes y nitrosantes. (Gómez Estrada et al., 2011h: p.187).

1.4.1. Reactivo de proliferación celular (WST-1) para la actividad citotóxica y antiinflamatoria

Es una herramienta utilizada para determinar el grado de inhibición o inducción de la proliferación celular en cualquier modelo *in vitro*. El ensayo se fundamenta en la escisión enzimática de la sal de tetrazolio (WST-1) a formazan por deshidrogenasas mitocondriales presentes en células viables (neutrófilos). Una expansión en el número de células viables provoca un aumento de la actividad global de la deshidrogenasa mitocondrial en la muestra que conduce a un incremento en la cantidad de colorante de formazan formado (correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el ensayo) que se cuantifica mediante un espectrofotómetro de barrido múltiple (lector de ELISA). (Roche, 2007a: p.2)(Tan y Berridge, 2000, p.62).

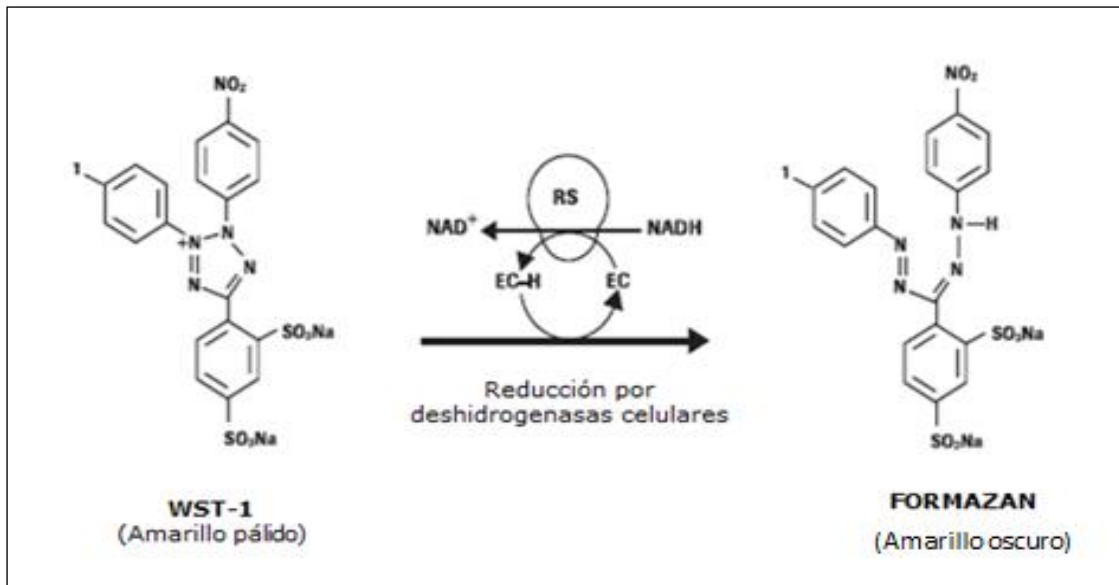


Figura 4-1. Mecanismo de acción antiinflamatoria y citotóxica producida por el WST-1

Fuente: (Roche, 2007b: p.2)

Realizado por: Karina Yanza, 2017

1.5. Antioxidante

Un antioxidante es una molécula suficientemente estable capaz de retardar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable actuando como donador de electrones (agente reductor) a un radical libre, formando un radical menos tóxico, disminuyendo e inhibiendo la capacidad de daño celular. (Alhakmani et al., 2013, p. 626). Niveles bajos de antioxidantes causan estrés oxidativo siendo posible la aparición de daño o muerte de las células.

1.5.1. Radical libre

Es un átomo, molécula o ion que contiene un electrón desapareado o de forma libre que actúa como potente agente oxidante. Los radicales libres más perjudiciales para el organismo son los radicales de oxígeno (denominados especies de oxígeno reactivas), en especial el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y oxígeno singulete (O_2) (Shettar et al., 2015a: p.920)

1.5.2. Estrés oxidativo

Es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de destoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante (alteración prooxidante/antioxidante). (Shettar et al., 2015b: p.920)

1.5.3. Capacidad captadora de radicales libres. Método DPPH'

El ensayo DPPH evalúa la capacidad antioxidante de una molécula al captar radicales libres, se considera como uno de los métodos colorimétricos estándar y fáciles para la evaluación de las propiedades antioxidantes de compuestos puros. DPPH' es un radical estable en solución y de color púrpura. (Mishra et al., 2012a: p.1038).

Este ensayo se basa en una reacción redox donde el DPPH' al aceptar un átomo de hidrógeno (H) a partir de la molécula captadora, es decir, antioxidante, da como resultado la reducción de DPPH' a DPPH₂, el color púrpura cambia a amarillo con disminución concomitante en la absorbancia a 515 nm. (Mishra et al., 2012b: p.1038).

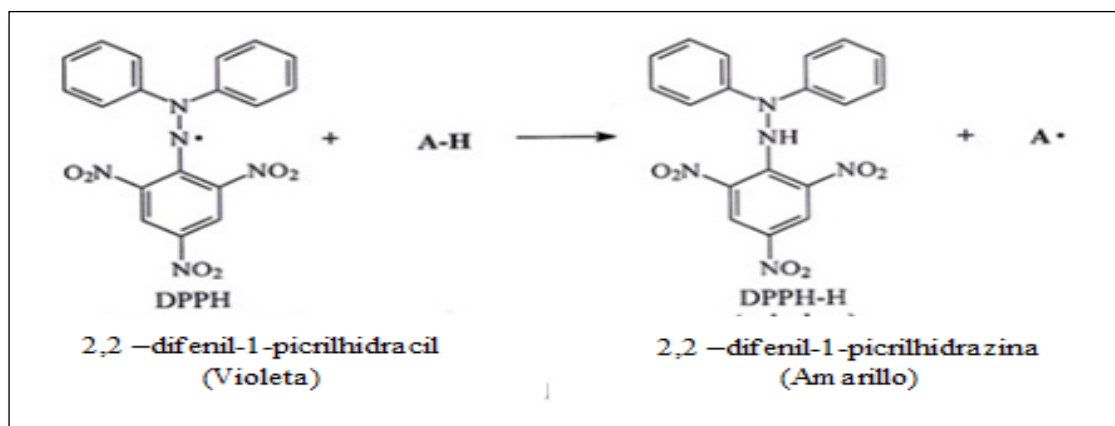


Figura 5-1. Mecanismo de acción del DPPH'

Fuente: (Mishra et al., 2012c: p.1038).

Realizado por: Karina Yanza

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de investigación

La presente investigación se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Laboratorio de Productos Naturales.

2.2. Recolección de la materia vegetal

La materia vegetal fue recolectada en el mes de Febrero de 2016 en el cantón Olmedo, provincia de Loja, a 1451 m.s.n.m. La ubicación corresponde a las siguientes coordenadas geográficas:

- ✓ Latitud: 3°56'24.67" S
- ✓ Longitud: 79°35'54.803" O

2.3. Equipos y reactivos

2.3.1. Equipos

Tabla 1-2. Equipos utilizados para los ensayos antiinflamatorios y citotóxicos

Equipos para la molienda y secado de la planta			
Estufa		Molino	
Equipos para el tamizaje fitoquímico			
Sonicador	Balanza		
Equipos para el control de calidad			
Desecador	Estufa	Mufla	Balanza
Sonicador	PHmetro	Picnómetro	Refractómetro
Equipos para la obtención del extracto liofilizado			
Rotavapor	Liofilizador	Congelador	
Equipos para el ensayo citotóxico, antiinflamatorio y antioxidante			
Microscopio	Cámara Neubauer	Centrifuga	Espectrofotómetro

Realizado por: Karina Yanza, 2017

2.3.2. Reactivos

Tabla 2-2. Reactivos utilizados para los ensayos antiinflamatorios y citotóxicos.

Reactivos para el tamizaje fitoquímico			
Agua destilada	Ácido clorhídrico	Cloruro de sodio	Reactivo de Drangendorff
Reactivo de Mayer	Reactivo de Wagner	Alcohol	Reactivo de Baljet
Cloroformo	Hidróxido de sodio 5%	Anhídrido acético	Ácido sulfúrico
Fehling A	Fehling B	Tricloruro férrico 5%	Cloruro de sodio 0.9 %
Magnesio metálico	Alcohol amílico	Éter	Etanol
Reactivos para el control de calidad			
Ácido clorhídrico 10%	Ácido nítrico	Peróxido de hidrogeno	Nitrato de amonio 10%
Reactivos para el ensayo antiinflamatorio, citotóxico y antioxidante			
Sangre	Heparina	Solución modificada de Hanks	Reactivo de Turk
Dimetilsulfoxido 5%	Tritón X 100 0.1%	Ficol	Cloruro de amonio 0.85%
Zymosan A opsonizado	WST-1	DPPH	

Realizado por: Karina Yanza, 2017

2.4. Técnicas y métodos

La metodología que se llevó a cabo para el control de calidad, tamizaje fitoquímico, cuantificación de fenoles, cuantificación de flavonoides, ensayo antiinflamatorio, citotóxico y antioxidante se menciona en la figura 1-2.

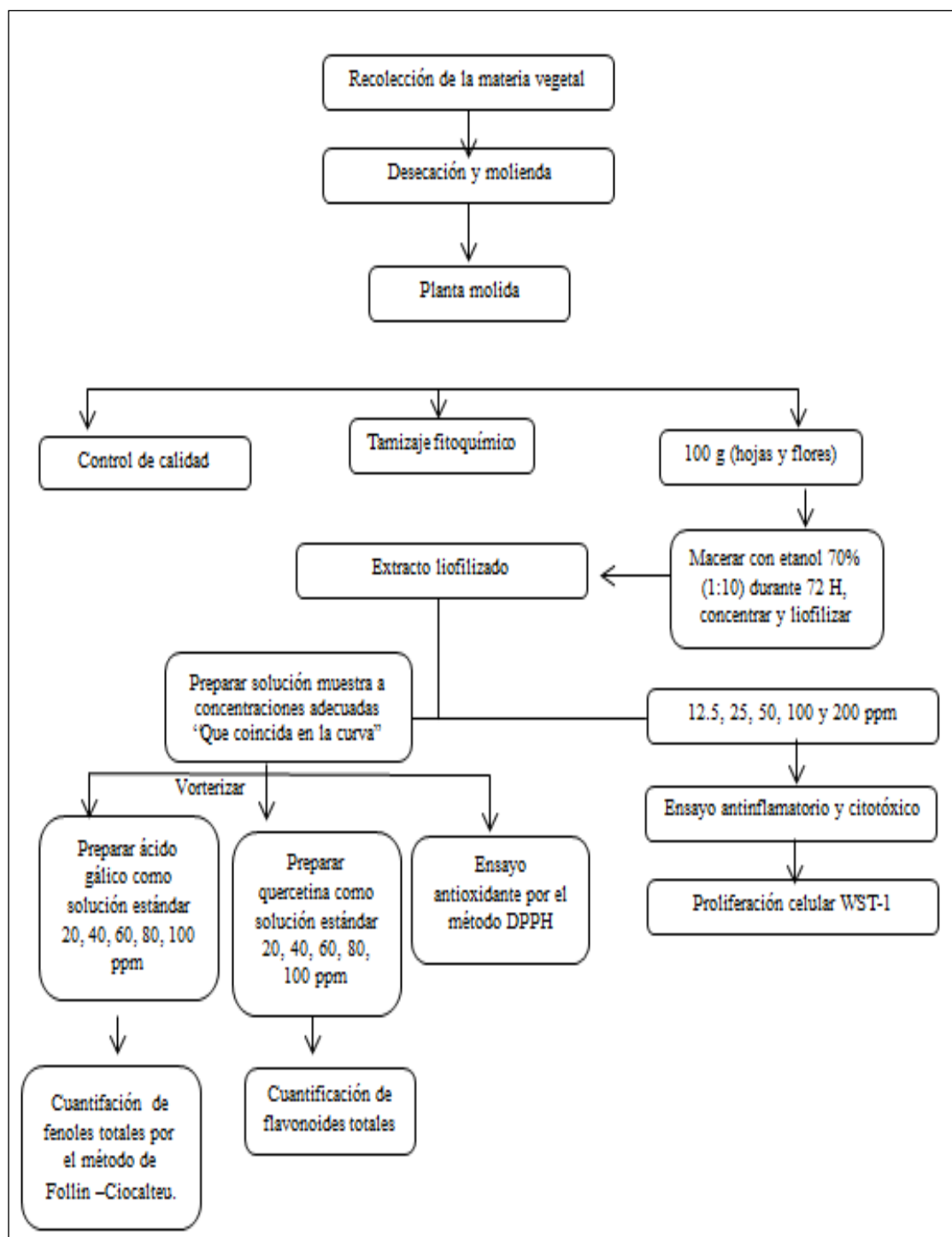


Figura 1-2. Protocolo de investigación

Realizado por: Karina Yanza, 2017

2.4.1. Secado y molienda de la materia vegetal

2.4.1.1. Secado

Hojas y flores de *Oreocallis grandiflora* fueron separadas, lavadas y secadas a una temperatura de 50 °C en una estufa de convección forzada marca BINDER modelo RE-115.



Figura 2-2. Secado de la planta

Realizado por: Karina Yanza, 2017

2.4.1.2. Molienda

La molienda se realizó en un molino de cuchilla giratoria Thomas Co con la finalidad de obtener pequeñas trazas de planta (hojas y flores por separado) de 2 a 3 mm de espesor, adecuado para los ensayos a realizarse.



Figura 3-2. Molienda de la materia vegetal.

Realizado por: Karina Yanza, 2017

2.4.2. Control de calidad

2.4.2.1. Determinación de cenizas totales

Se pesó 2g de muestra molida (hojas y flores), en un crisol previamente tarado, se calentó en un reverbero hasta carbonización, posteriormente se incineró en una mufla a 700 °C, durante 2 horas, se enfrió el crisol en un desecador y se pesó (Se repitió este procedimiento hasta obtener un masa constante).(Miranda, 2006a: p.27)

Cálculo:

$$\% C = \{(m_1 - m / m_2 - m)\} \times 100$$

En donde:

%C = contenido de cenizas en porcentaje de masa

m = masa del crisol vacío en g

m₁ = masa del crisol con la muestra después de la incineración en g

m₂ = masa del crisol con la muestra antes de la incineración en g



Figura 4-2. Cenizas totales

Realizado por: Karina Yanza, 2017

2.4.2.2. Determinación de cenizas solubles en agua

A las cenizas obtenidas en cenizas totales, se añadió 15 mL de agua destilada y se hirvió suavemente durante 5 min. A la muestra hervida se filtró y se carbonizó en un reverbero para posterior incineración en la mufla a una temperatura de 700°C durante 2h. (Se repitió el procedimiento hasta obtener una masa constante). (Miranda, 2006b: p.27)

Cálculo:

$$\% Ca = \{(m_2 - m_a / m_1 - m)\} \times 100$$

En donde:

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

m = masa del crisol vacío en g

m_a = masa del crisol con la ceniza insoluble en agua en g

m₁ = masa del crisol con la muestra en g

m₂ = masa del crisol con la ceniza total en g

2.4.2.3. *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

A las cenizas obtenidas de cenizas totales se añadió 2 mL de ácido clorhídrico al 10%, se tapó el crisol con un vidrio reloj y se procedió a hervir durante 10 min en un reverbero. Se lavó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y se unió al contenido del crisol. Se filtra el contenido del crisol, se lavó el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico (se añadió 2 gotas de nitrato de plata 0.1 mol/L) no presente cloruros. El filtrado con el residuo se desecó a 105°C y se transfirió al crisol inicial en el cual se procede a incinerar en una mufla a 700 ° C durante 2 h. Finalmente se transfirió a un desecador hasta que se enfrió (Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante). (Miranda, 2006c: p.28)

Cálculo:

$$B = \{(m_2 - m_1 / m)\} \times 100$$

En donde:

B = Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

m = muestra utilizada en g

m₁ = masa del crisol con la muestra en g

m₂ = masa del crisol con la ceniza insoluble en ácido clorhídrico en g

2.4.2.4. *Determinación del contenido de humedad (Método gravimétrico)*

Se pesó 2 g de muestra molida (hojas y flores) y se transfirió a una cápsula de porcelana previamente tarada a 105 °C (desecada hasta masa constante). Posteriormente se deseco durante 3 h, se enfrió la capsula con la muestra en el desecador y se pesó. Se colocó nuevamente el crisol en la estufa durante 1h (Se repitió el procedimiento hasta mantener una masa constante). (Miranda, 2006d: p.28)

Cálculo

$$SS (\%) = \{(m_2 - m_1) / (m_2 - m)\} \times 100$$

En donde:

SS= sustancia seca en porcentaje en masa.

m = masa de la cápsula vacía en g

m₁= masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada en g

m₂= masa de la cápsula con la muestra en g

2.4.3. Análisis cualitativo

Para llevar a cabo las pruebas de tamizaje fitoquímico se empleó el esquema general de la figura 5-2., en el que se utilizó solventes de polaridad creciente (éter, etanol y agua) respectivamente.

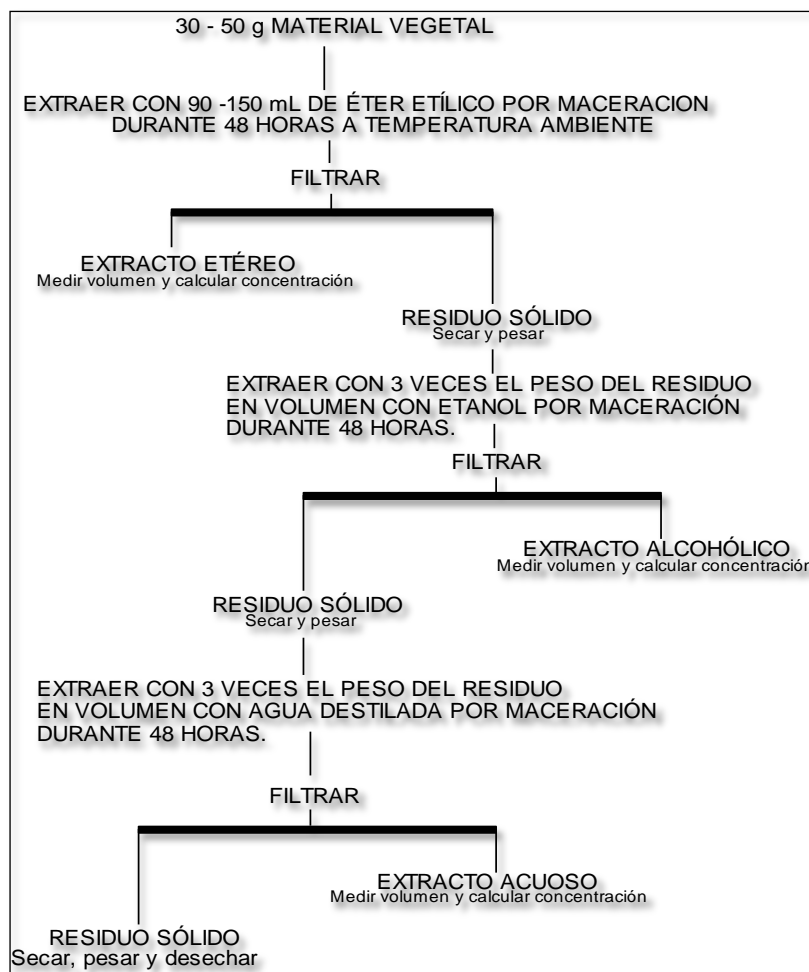


Figura 5-2. Protocolo de tamizaje fitoquímico

Fuente: (Miranda, 2006e: p.32)

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Los ensayos y pruebas que se realizaron en el tamizaje fitoquímico, son métodos cualitativos y específicos para la determinación de diferentes tipos de metabolitos secundarios. Se fundamentan principalmente en el cambio de coloración o formación de precipitados. Las reacciones llevadas a cabo en cada uno de los extractos se observan en la figura 6-2.

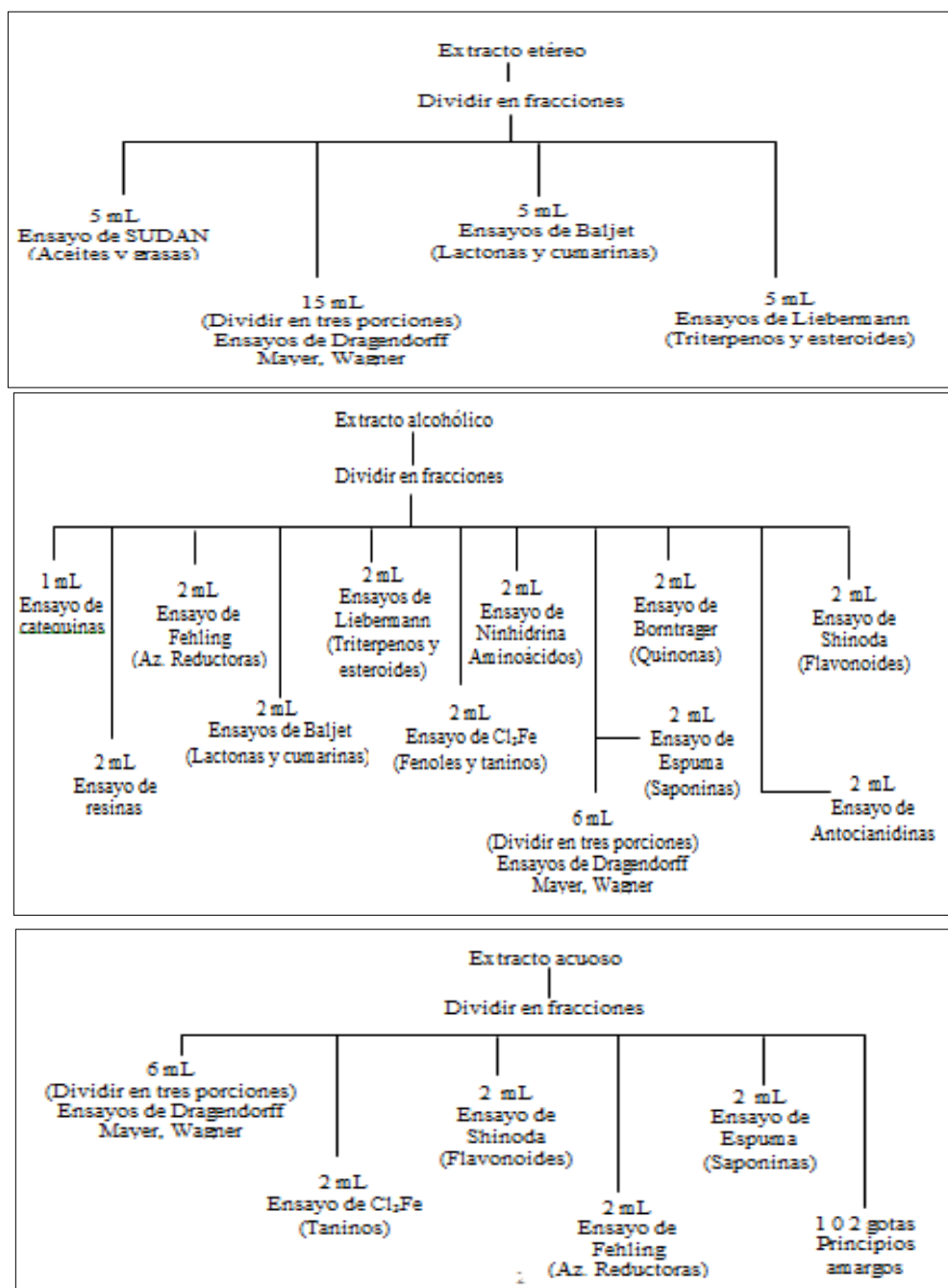


Figura 6-2. Ensayos a realizarse en los extractos obtenidos en el tamizaje fitoquímico.

Fuente: (Miranda, 2006f: pp.34-37)

Realizado por: Karina Yanza, 2017

2.4.4. Obtención del extracto hidroalcohólico

Para la obtención del extracto hidroalcohólico se procedió a pesar 100 g de planta, se introdujo en un frasco ámbar, se añadió 1000 mL de etanol al 70% (1:10), Se dejó macerar durante 72 h, Posteriormente se sónico durante 1 y se filtró el contenido al vacío.



Figura 7-2 Extracto hidroalcohólico

Realizado por: Karina Yanza, 2017

El filtrado fue utilizado para la determinación de los parámetros de calidad como se detallan a continuación:

2.4.4.1. Determinación de los requisitos organolépticos

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

Determinación de olor: Se tomó una tira de papel y se introdujo en los extractos, Se procedió a oler para determinar si pertenece a las características propias del extracto obtenido. (Miranda, 2006g: p.27)

Determinación de color: En un tubo de ensayo completamente seco y limpio se trasvasó las muestras de ensayo (extracto de hojas y flores), hasta las $\frac{3}{4}$ y se observó el color, la transparencia y si era el caso separación de capas. (Miranda, 2006h: p.27)

2.4.4.2. Determinación de densidad relativa

Se pesó un picnómetro vacío y seco, posteriormente se llenó el picnómetro con el extracto y se introdujo en una estufa a 25°C durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se enfrió y se pesó cuidadosamente el picnómetro con la muestra. (Miranda, 2006i: p.37)

Se repitió el mismo procedimiento usando agua destilada.

Cálculo:

$$D_{25} = \{(m_1 - m) / (m_2 - m)\} \times 100$$

En donde:

D_{25} = Densidad relativa

m = masa del picnómetro vacío en g

m_1 = masa del picnómetro con la muestra en g

m_2 = masa del picnómetro con el agua en g

2.4.4.3. Determinación del índice de refracción

Se colocó una gota de la muestra de análisis sobre el prisma de medición, se enfocó la luz moviendo el compensador cromático hasta lograr obtener la intersección entre los campos claro y oscuro. (Miranda, 2006j: p.37)

2.4.4.4. Determinación del pH

Se ajustó el pHmetro con las soluciones buffer reguladoras y se procedió a medir el pH. Sobre la muestra a analizar se introdujo el pHmetro

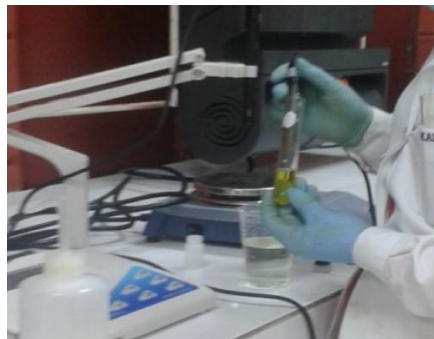


Figura 8-2 Determinación de pH

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

2.4.4.5. Determinación de sólidos totales

En una cápsula de porcelana previamente tarada, se añadió 5 mL del extracto alcohólico, se evaporó el contenido de la capsula en baño de agua hasta que el residuo este aparentemente seco. Se pasa a una estufa hasta que alcance un peso constante. (Miranda, 2006k: p.38)



Figura 9-2. Sólidos totales.

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Cálculo:

$$St = \{(Pr-P) / V\}$$

En donde:

Pr = masa de la cápsula más el residuo en g

P = masa de la cápsula vacía en g

V = volumen de la porción de ensayo en mL.

2.4.5. Obtención del extracto liofilizado

Del extracto hidroalcohólico obtenido anteriormente, este se procedió a concentrar en el rotavapor a una temperatura de 50 °C, el concentrado se filtró, se congeló con nitrógeno líquido en el vaso de liofilización (el congelado se lo hizo de tal manera que el extracto quede por las paredes del vaso para obtener un buen liofilizado) y se colocó en el Liofilizador.

Nota: Se debía mantener la muestra congelada hasta que el extracto este completamente seco.



Figura 10-2 Extractos liofilizados.

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

2.4.6. Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales es una técnica basada en el método de Folin-Ciocalteu, se fundamenta en una reacción redox, donde los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu de color amarillo que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es medida a 765 nm. (Alhakmani et al., 2013a: p.625)

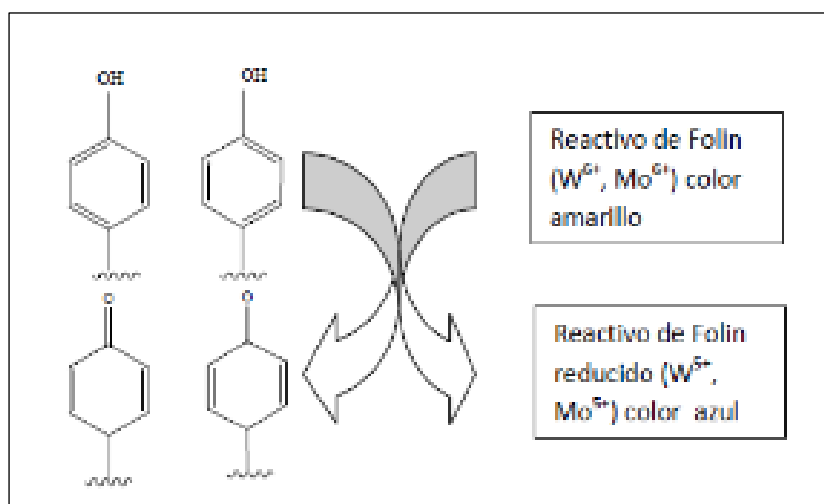


Figura 11-2. Fundamento de la reacción de Folin Ciocalteu

Fuente: (Alhakmani et al., 2013b: p.625)

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Se preparó como solución estándar el ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, para la realización de la curva de calibración. Posteriormente se preparó las soluciones problema a concentraciones adecuadas (300 a 600 ppm)

Procedimiento

Se tomaron 250 μ L de cada disolución estándar de ácido gálico o de la solución problema y se colocó en un balón aforado de 25 mL, al cual se añadió 15 mL de agua destilada y 1.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se vortizó y se dejó en reposo (oscuridad) durante 8 minutos. Transcurrido ese tiempo se añadió 3.75 mL de carbonato sódico al 7.5% y se aforo al volumen final con agua destilada. Se dejó en oscuridad durante 2 horas y se midió la absorbancia a 765 nm. (Slimestad et al., 2009, p.11374)

Los resultados fueron expresados en g de ácido gálico por cada 100 g de extracto.

2.4.7. Cuantificación de flavonoides totales

Se preparó como solución estándar quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm en metanol, para la realización de la curva de calibración. Posteriormente se preparó las soluciones problema (extracto liofilizado de Hojas y Flores) a concentraciones adecuadas (100 a 600 ppm) en metanol.

Procedimiento

A una alícuota (1ml) de cada disolución estándar o solución problema se añadió 4 mL de agua destilada y 300 μ L de NaNO_2 . Después de 5 min en oscuridad se añadió 300 μ L AlCl_3 al 10% y se dejó en oscuridad durante 6 min, finalmente transcurrido ese tiempo se añadió 2 mL de NaOH 1M, se dejó en reposo durante 15 min en oscuridad y se mido la absorbancia de cada muestra caracterizada por un color rosado a 510 nm. (Pérez-Pérez et al., 2014, p.68)(Boukhris et al., 2012, p. 643)

Nota: Al añadir cada reactivo se vortizó durante 1 min.

2.4.8. Ensayo citotóxico y antiinflamatorio in vitro

2.4.8.1. Aislamiento de neutrófilos

A un tubo se añadió en proporciones (1:10:10) heparina, sangre venosa, solución modificada de Hanks, respectivamente y se homogenizó lentamente (solución 1).

Posteriormente, en otros tubos de centrifuga se añadió en proporciones (3:4) ficol y solución 1 respectivamente (La solución 1 se suspendió por la pared del tubo con el debido cuidado).

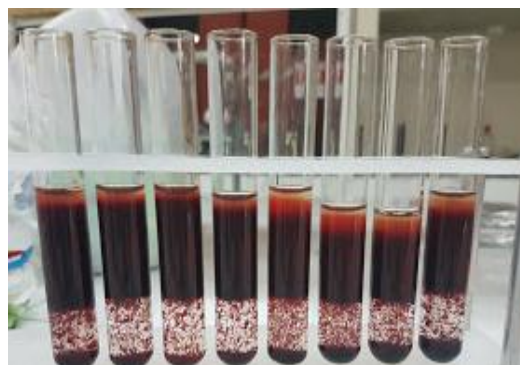


Figura 12-2. Adición de ficol a la solución 1 para lisar los eritrocitos.

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Se centrifugaron los tubos a 1500 RPM durante 30 min con la finalidad de que los eritrocitos precipiten fácilmente para ser eliminados.

Después de los 30 min en la centrifuga se tomó la fracción de neutrófilos de cada tubo y se añadió a otro tubo el cual fue lavado con solución modificada de Hanks en proporciones (1:3) y se centrifugó nuevamente. Transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante del tubo y el precipitado (neutrófilos) fue lavado con solución hipotónica de cloruro de amonio al 0.83%, solución modificada de Hanks para lisar células rojas y se centrifugó.

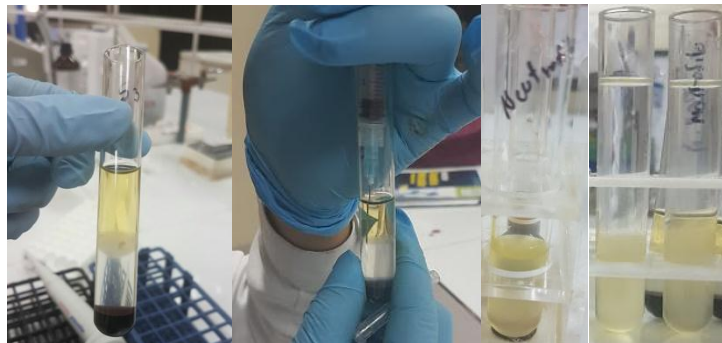


Figura 13-2. Obtención de neutrófilos.

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se reconstituyó con 1 mL de solución modificada de Hanks, una alícuota de esta muestra se añadió en la cámara Neubauer (hemocitómetro) donde se realizó el conteo de neutrófilos.



Figura 14-2. Recuento de neutrófilos en la cámara Neubauer.

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Finalmente, los neutrófilos fueron resuspendidos a una concentración de 10^7 células/mL (6.8 mL de solución modificada de Hanks). (Choudhary y Jalil, 2005a: p.2348)

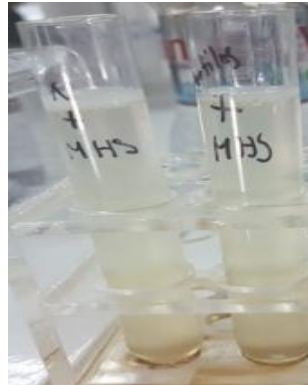


Figura 15-2. Neutrófilos

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

2.4.8.2. Ensayo citotóxico en neutrófilos aislados

Se preparó una solución madre (200 ppm) de las muestras (extractos de hojas y flores liofilizados) en una solución de DMSO al 5%, disuelta en solución modificada de Hanks, la cual fue utilizada para realizar diluciones y obtener concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 ppm (Figura 16-2)



Figura 16-2. Diluciones preparadas de flores y hojas a diferentes concentraciones.

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Posteriormente, se realizó el ensayo de citotoxicidad en el que se utilizó micropocillos para añadir las cantidades adecuadas de neutrófilos, concentración de los extractos y WST-1 (Tabla 3-2)

Tabla 3-2. Concentraciones de los diferentes constituyentes para el ensayo de citotoxicidad.

Tratamiento	Neutrófilos (μL)	Concentración de los extractos/ controles (μL)	WST-1 (μL)
Control (+) DMSO 5%	140	100	10
Control (-) X 100 0.1%	140	100	10
Concentración 200 ppm	140	100	10
Concentración 100 ppm	140	100	10
Concentración 50 ppm	140	100	10
Concentración 25 ppm	140	200	10
Concentración 12.5 ppm	140	100	10

Fuente: (Choudhary & Jalil 2005)

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

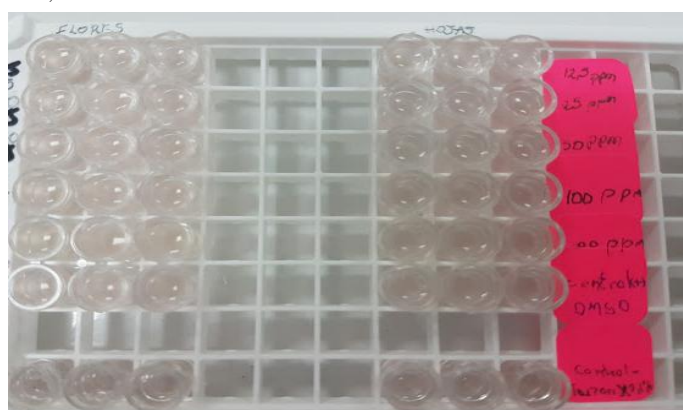


Figura 17-2. Ensayo de citotoxicidad antes de la incubación.

Realizado por: Karina Yanza, 2017

Cuando se añadió cada uno de estos constituyentes se homogenizó y se llevó a incubación a 37°C durante 3 h (Homogenización cada 30 min). (Figura 18-3)

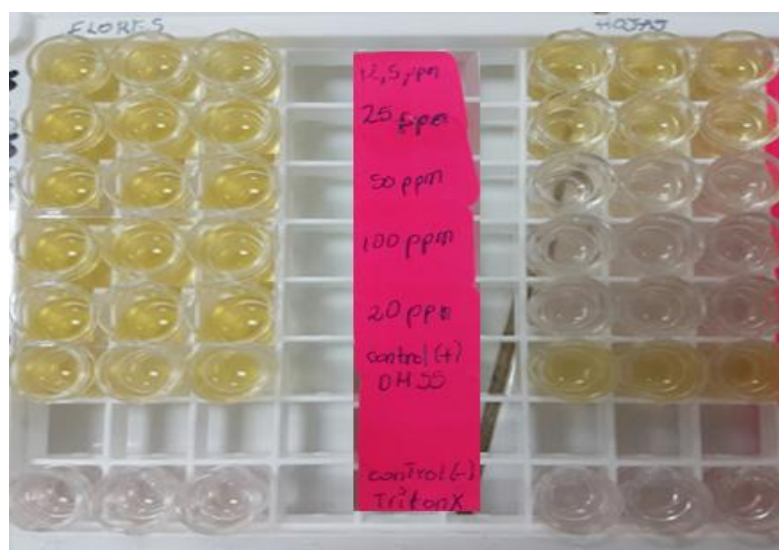


Figura 18-2. Ensayo de citotoxicidad después de la incubación.

Realizado por: Karina Yanza, 2017

Finalmente, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm. (Tan & Berridge, 2000, pp.62-64), (Choudhary y Jalil, 2005b: p.2348)

La cantidad de neutrófilos viables celularmente fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular que fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilida celular} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo (DMSO)}} \times 100$$

2.4.8.3. Ensayo antiinflamatorio en neutrófilos aislados

Se prepararon las soluciones a analizar a concentraciones de 12.5, 25, 50,100 y 200 ppm para los extractos de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora*; ácido acetil salicílico 200 ppm control (+) y Triton X 100 al 0,1% control (-), que se disolvieron en una solución de DMSO al 5% diluido en solución modificada de Hanks.

Posteriormente, a cada micropocillo en los que se realizó el ensayo antiinflamatorio se añade los siguientes componentes como se muestra en la tabla 4-2.

Tabla 4-2. Concentraciones de los diferentes constituyentes para el ensayo antiinflamatorio.

Tratamiento	Neutrófilos (µL)	Concentración de los extractos/ controles (µL)	WST-1 (µL)
Control (-)Triton X 100 0,1%	140	100	10
Control (+) DMSO 5%	140	100	10
Aspirina 200 ppm	140	100	10
Concentración 200ppm	140	100	10
Concentración 100ppm	140	100	10
Concentración 50ppm	140	100	10
Concentración 25 ppm	140	200	10
Concentración 12,5 ppm	140	100	10

Fuete: (Choudhary & Jalil 2005)

Realizado por: Karina Yanza, 2017

Se homogenizó cada micropocillo con su contenido y se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron 50 µL de Zymosan A opsonizado.

Inmediatamente se incubo a 37 °C durante 1 h.



Figura 19-2. Ensayo antiinflamatorio después de la incubación.

Realizado por: Karina Yanza, 2017

Finalmente, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.

Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición inflamatoria y se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(100 - \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo (DMSO)}} \right) \times 100$$

2.4.9. Ensayo antioxidante por el método DPPH'

Se prepararon soluciones estándar de ácido gálico a concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm y soluciones de muestra a concentraciones de 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm para hojas y flores 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm, (el diluyente fue metanol); 5.9 mg de DPPH' se diluyeron en un volumen de 250 mL con metanol. (La absorbancia de esta solución debía oscilar entre 0.6 a 0.8 por lo que se esperó hasta que se estabilice y alcance la absorbancia adecuada para la realización de ensayo). (Cuvelier & Berset, 1995a: p.28)

Procedimiento

3,9 mg de la solución de DPPH' se añadió en distintos tubos, posteriormente a estas soluciones se añadieron 100 µL de las soluciones estándares y soluciones muestras a distintas concentraciones que fueron preparadas previamente.

Se homogenizó, se dejó en reposo en oscuridad durante 1 hora exactamente. Finalmente, la absorbancia fue medida a 515 nm.

Los datos obtenidos fueron expresados como porcentaje de inhibición de radicales libres DPPH' calculado mediante la siguiente fórmula: (Cuvelier & Berset, 1995b: p.28)

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia del control positivo (DPPH')} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo (DPPH')}} \times 100$$



Figura 20-2. Final de la reacción con el reactivo DPPH'

Realizado por: Karina Yanza, 2017

2.4.10. Análisis estadístico

Los resultados de esta investigación fueron tabulados en el sistema estadístico SPSS y Excel. Se realizó un análisis factorial, el test Anova y una prueba pos hoc para el ensayo antiinflamatorio y citotóxico.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Control de calidad de la droga cruda de hojas y flores de *Oreocallis grandiflora*

Para el control de calidad de la droga cruda (hojas y flores) de *Oreocallis grandiflora* se obtuvo los siguientes resultados expresados en la tabla 1-3.

Tabla 1-3. Resultados de parámetros de calidad

Parámetro	Hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i> (%)	Flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> (%)	Límites aceptados (Real Farmacopea Española, 2003)
Humedad	12.44 ± 0.06	12.48 ± 0.15	14%
Cenizas totales	2.23 ± 0.07	2.37 ± 0.08	5%
Cenizas solubles en agua	0.60 ± 0.02	0.58 ± 0.06	2%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	0.44 ± 0.03	0.31 ± 0.05	1%

Realizado por: Karina Yanza, 2017

Los parámetros de calidad de una droga cruda determinan si es adecuada y está en óptimas condiciones para ser utilizada, el contenido elevado de agua en una droga vegetal puede ocasionar el crecimiento de bacterias, hongos, insectos e hidrólisis de algunos constituyentes que puede promover el deterioro de la droga además determina la eficacia del proceso de desecación y almacenamiento; la determinación de cenizas totales determina la cantidad de cenizas fisiológicas derivados del propio vegetal y cenizas no fisiológicas que es el residuo de la materia extraña (arena, tierra), es muy importante e indica el cuidado que se tiene al preparar la droga; las cenizas solubles en agua representan el contenido de sales solubles; las cenizas insolubles en ácido clorhídrico representan la calidad de la droga cruda al determinar la presencia de arena y tierra sílice en la muestra causada por una mala recolección del material vegetal. (Organización Mundial de la Salud, 1998, pp.331-334)

Como se puede observar en la Tabla 1-3, la determinación del contenido de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico de hojas y flores de *Oreocallis grandiflora* se encuentran dentro de los límites de calidad expuestos por la Real Farmacopea española 2003, lo que indica que el material vegetal estuvo en óptimas condiciones para ser utilizado garantizando la calidad de los ensayos *in vitro*.

3.2. Análisis cualitativo

En las tablas 2-3 y 2-4 se presentan los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico con solventes de diferentes polaridades (éter, etanol, agua), en los que se obtiene resultados positivos para los ensayos de Baljet, Fehling, Liebermand-Buchard, Resinas, espumas, FeCl₃, Borntrager, Shinoda, Antocianidinas y ensayo de mucilagos. Lamentablemente no existen investigaciones previas respecto a esta planta que corroboren estos resultados sin embargo en estudios anteriores realizados en la familia Proteacea se reporta para *Helicia excelsa Roxb*, *Hakea salicifolia* y *Hakea sericeae* la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, terpenos, taninos, resultados que coinciden con este estudio. (Chandra, 2015a: p.8) (Madureira et al. 2012 p: 41)

Debido a la presencia de derivados fenólicos, como flavonoides y cumarinas, que en conjunto son responsables de la coloración, protección entre otras actividades de las plantas, presentan capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo de la planta, (Zhu et al. 2012 p:8) se ha reportado su potencial antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes modelos de ensayo, observándose que la actividad antioxidante *in vitro* puede llegar a superar a la vitamina C y E dependiendo de las concentraciones de la muestra de ensayo (Agati et al. 2012 p: 70). Se ha reportado que estos compuestos poseen actividad antibacteriana, antialérgica, cardioprotectora, antiinflamatorio y antiviral. (Chandra, 2015b: p.6)

Los terpenoides son compuestos de gran interés farmacológico debido a que presenta una relación estrecha con las hormonas, incluyendo las hormonas sexuales, siendo utilizados en procesos inflamatorios y como analgésicos en situaciones clínicas moderadas (esteroides), además muestran una diversidad de actividades medicinales, incluyendo antivirales, antipalúdicos antibacterianos, antiinflamatorios, anticancerosos y quimiopreventivos. Se ha encontrado que inhiben la síntesis de colesterol, (Chandra, 2015c: p.6)

Los taninos son metabolitos encargados de proteger a la planta contra el ataque de herbívoros e insectos al inducir la toxicidad, es capaz de formar complejos con proteínas que actúan como una barrera para los microorganismos impidiendo su propagación. Se ha reportado que los taninos actúan como astringentes, antibacterianos, antiulcerogénicos, antivirales, antitumorales, antitrombogénicos y antiinflamatorios. (Chandra, 2015d: p.6)

Las saponinas representan un amplio grupo de glicósidos caracterizados por sus propiedades tensioactivas, son alelopáticos y se ha comprobado que actúan como antimicrobianas, antimaláricas, antiplasmodiales, antiproliferativas, antipsoriaicas, antialérgicas,

antiaterosclerosis, antidiabéticas, insecticidas, moluscicidas, antiinflamatorias y anticancerosas. También se ha informado que son activos contra la obesidad. (Chandra, 2015e: p.6)

Al poder observar mediante estas pruebas cualitativas la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos, taninos y saponinas como los metabolitos secundarios más representativos de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora*, se supondría que la actividad antiinflamatoria, citotóxica y antioxidante puede deberse a uno de estos metabolitos secundarios.

Tabla 2-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de *Oreocallis grandiflora*

Ensayo a realizar	Compuesto a identificar	Extracto etéreo	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Dragendorff	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Mayer	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Wagner	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Sudan	Compuestos grasos	(-)	N/A	N/A
Baljet	Lactonas (Cumarinas)	(-)	(+++) Precipitado color rojo	N/A
Liebermand – Buchard	Triterpenos y/o esteroides	(-)	(+++) verde intenso	N/A
Catequinas	Catequinas	N/A	(+)	N/A
Resinas	Resinas	N/A	(+)	N/A
Fehling	Azúcares reductoras	N/A	(+++) Precipitado rojo	(+++)
Espumas	Saponinas	N/A	(++)	(+++)
Tricloruro férrico	Fenoles y taninos	N/A	(+++)color verde intenso	(+++)
Borntrager	Quinonas	N/A	(+++) color rojo	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	(++) color rojo	(+++)color rojo
Antocianidinas	Flavonoides	N/A	(+++) color rojo	N/A
Mucilagos	Polisacáridos	N/A	N/A	(++) Gelatinoso
Principios amargos	Principios amargos y astringentes	N/A	N/A	(++) Ligeramente astringente

(N/A) No aplica, (-) Ausencia, (+) Escaso, (++) Mediamente abundante, (+++) Abundante

Realizado por: Karina Yanza, 2017

Tabla 3-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de flores de *Oreocallis grandiflora*.

Ensayo a realizar	Compuesto a identificar	Extracto etéreo	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Dragendorff	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Mayer	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Wagner	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Sudan	Compuestos grasos	(+++) color rojo	N/A	N/A
Baljet	Lactonas (Cumarinas)	(+++) precipitado color rojo	(+++) Precipitado color rojo.	N/A
Liebermand – Buchard	Triterpenos y/o esteroides	(+)	(++) verde intenso	N/A
Catequinas	Catequinas	N/A	(+)	N/A
Resinas	Resinas	N/A	(-)	N/A
Fehling	Azúcares reductoras	N/A	(+++) Precipitado rojo ladrillo	(++) Precipitado rojo ladrillo
Espumas	Saponinas	N/A	(++)	(++)

Tricloruro férrico	Fenoles y taninos	N/A	(+++) color verde intenso	(+++) color verde intenso
Borntrager	Quinonas	N/A	(+++) color rojo	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	(++) color rojo	(++)
Antocianidinas	Flavonoides	N/A	(++) color rojo	N/A
Mucilagos	Polisacáridos	N/A	N/A	(++) Gelatinoso
Principios amargos	Principios amargos y astringentes	N/A	N/A	(+) amargo

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

Realizado por: Karina Yanza, 2017

3.3. Parámetros de calidad del extracto

Tabla 4-3. Parámetros de calidad del extracto de hojas y flores de *Oreocallis grandiflora*.

Parámetro		Resultado de hojas	Resultado de flores
Requisitos organolépticos	Aspecto	Opalescente	Transparente
	Color	Verde oscuro	Amarillo
	Olor	Alcohólico	Alcohólico
	Sabor	Amargo, ligeramente astringente	Amargo, ligeramente astringente
Densidad relativa		0.83 ± 0.02	0.82 ± 0.005
Índice de refracción		1.368	1.367
pH		5.67	5.62
Sólidos totales		3.02 ± 0.06	1.82 ± 0.05

Realizado por: Karina Yanza, 2017

Como se puede observar en la tabla 4-3 los requisitos organolépticos son características propias de las hojas y flores, y del solvente usado.

La densidad relativa es de 0.83 ± 0.02 para hojas y 0.82 ± 0.005 para flores que al comparar con el solvente utilizado (etanol al 70%) que tiene una densidad de 0.68 se observa un incremento significativo lo cual se asume que se debe a la presencia de sustancias solubles (metabolitos secundarios) capaces de interrelacionarse mediante la formación de puentes de hidrógeno. (Ochoa, et. al. 2006a: p.78)

El índice de refracción fue de 1.368 y 1.367 para hojas y flores, respectivamente, al comparar con el índice de refracción del agua que es 1, es superior, esto puede atribuirse a la posible existencia de sustancias (metabolitos secundarios) o sólidos solubles totales (azúcares) capaces de ser disueltos en el solvente de extracción (etanol 70%), (Ochoa, et. al. 2006b: p.78) además, el extracto cumple con la especificación de la Real Farmacopea Española, la misma que establece que el porcentaje de sólidos totales no puede ser menor a 1.20%.

La cantidad de sólidos totales de hojas fue de 3.02 ± 0.06 y de flores de 1.82 ± 0.05 , lo que significa que puede existir mayor cantidad de sustancias (Posiblemente metabolitos secundarios, sales minerales) en hojas que en flores capaces de ser solubilizados en el solvente de extracción etanol al 70 %. (Ochoa,et. al 2006c: p.79)

El pH de ambas muestras analizadas fue de 5.67 y 5.62 respectivamente, al comparar con el etanol 70% que tuvo un pH de 7.08 se puede observar claramente que los extractos tienden a disminuir su pH, lo que indica que el extracto tiende a ser ligeramente ácido. Además, el carácter ácido corrobora las características ácidas débiles de los compuestos que tienden a ser extraídos en estos extractos como flavonoides, fenoles, taninos, entre otros. (Ochoa,et. al 2006d: p.79) (Dehesa, 2011 p: 142-143).

3.4. Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles se lo realizó espectrofotométricamente mediante el método de Folin – Ciocalteu, para lo cual se elaboró una curva de calibración de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm obteniéndose la siguiente ecuación de la recta $A = 0.0026 C + 0.0286$ ($R^2 = 0,9991$).

Para obtener la concentración de fenoles totales en el extracto liofilizado se sustituyó el valor de la absorbancia obtenida espectrofotométricamente a 600ppm (extracto liofilizado de hojas) y 600 ppm (extracto liofilizado de flores), los cuales fueron expresados en g Eq GAE/100 g de extracto liofilizado.

Tabla 5-3. Cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría.

Muestra analizada	Fenoles Totales	
	g Eq GAE/100g de Extracto liofilizado	Porcentaje (%)
Hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	16.004 ± 0.296	16.004 ± 0.296
Flores de <i>Oreocallis grandiflora</i>	12.013 ± 0.210	12.013 ± 0.210

Realizado por: Karina Yanza, 2017

Como se puede observar en la tabla 5-3 la concentración de fenoles totales es de 16.004 ± 0.296 y 12.013 ± 0.210 g Eq GAE/100g de extracto liofilizado para hojas y flores respectivamente, en

estudios realizados por (Espinoza et al., 2013c: p.65-66) se observa un resultado similar para hojas de esta misma especie.

Sin embargo, no existe investigaciones previas que corrobore el resultado para flores, haciendo elucidar, en esta investigación, que posiblemente las hojas comparadas con las flores presenten una mayor concentración de fenoles totales, lo que podría revelar un mayor efecto antiinflamatorio, citotóxico y antioxidante en hojas de *Oreocallis grandiflora*.

Al comparar los resultados obtenidos de *O. grandiflora* en relación al contenido de fenoles totales con otras especies de la familia Proteaceae como *Protea hybrid* “Susara” que exhibe 0.058 ± 8 g Eq GAE/100g de planta (León et al. 2014p: 234) y *Protea cynaroides L.* que presenta 4.209 g Eq GAE/100g de planta, (Wu et al. 2011 p: 12544) se puede evidenciar que hojas y flores de *Oreocallis grandiflora* superan estas concentraciones.

3.5. Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se lo realizó espectrofotométricamente mediante el método de tricloruro de aluminio, para lo cual se elaboró una curva de calibración con estándar de Quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm con la que se obtuvo la siguiente ecuación de la recta $A = 0.0012 + 0.0256$ ($R^2 = 0.9990$).

Para obtener la concentración de flavonoides totales en el extracto liofilizado se sustituyó el valor de la absorbancia obtenida espectrofotométricamente a 100ppm (extracto liofilizado de hojas) y 300 ppm (extracto liofilizado de flores), los cuales fueron expresados en g Eq Q/100g de extracto liofilizado y en porcentaje.

Tabla 6-3. Cuantificación de flavonoides por espectrofotometría.

Muestra a analizar	Flavonoides Totales	
	g Eq Q/100 g Extracto liofilizado	Porcentaje (%)
Hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	40.612 ± 1.735	40.61 ± 1.735
Flores de <i>Oreocallis grandiflora</i>	15.842 ± 1.530	15.842 ± 1.530

Realizado por: Karina Yanza, 2017

La cantidad de flavonoides totales expresados como g Eq Q/ 100 g de extracto liofilizado, como se observa en la tabla 6-3 es mayor en hojas de *Oreocallis grandiflora*, actualmente hay un gran interés en estos compuestos debido a su capacidad antioxidante. Estas propiedades antioxidantes son el motivo de sus posibles implicaciones en la salud humana, como son la prevención del cáncer, trastornos metabólicos, artritis reumatoide, VIH/ SIDA, enfermedades cardiovasculares (Reducen las tasas de colesterol y de LDL oxidada al actuar como donador de iones hidrógeno por medio de sus grupos hidroxilo). Por otro lado, son capaces de inhibir las enzimas ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, lo que se traduce en una reducción en la formación de tromboxanos y leucotrienos. Por ello, los fenoles pueden controlar, en parte, la reacción inflamatoria. (Creus, 2004, pp.83-84)(Samatha et al., 2012, pp. 2011-2012)

Debido al alto contenido de flavonoides en hojas y flores se puede decir que estas concentraciones podrían estar relacionadas con la actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica. En un estudio similar realizado en una Proteaceae como *Embotrium coccineim* se observó que presentó 0.500 ± 9 g QE/100 g extracto seco (Leyton et al. 2015 p:264) que es una concentración mucho menor a la que se obtuvo en los extractos de hojas y flores de *Oreocallis grandiflora*.

3.6. Ensayo citotóxico y antiinflamatorio

Los ensayos antiinflamatorios y citotóxicos fueron realizados con el extracto liofilizado obtenido del extracto hidroalcohólico de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora*.

3.6.1. Ensayo citotóxico in vitro

El ensayo citotóxico se lo realizó aplicando la metodología expuesta por (Choudhary & Jalil, 2005c: p.2348). Este ensayo se fundamenta en la reducción de sales de tetrazolio en las células vivas o metabólicamente activas a formazán, donde la absorbancia obtenida en cada ensayo representa la cantidad de células viables, que fue expresado como porcentaje de viabilidad celular, como se observa en la tabla 7-3.

Tabla 7-3. Porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de extracto.

Concentraciones utilizadas	Viabilidad celular de hojas (%)	Viabilidad celular flores (%)
Concentración 12,5 ppm	67.43 ± 1.31	86.30 ± 2.26
Concentración 25 ppm	61.50 ± 2.97	$62. \pm 2.03$

Concentración 50 ppm	26.74 ± 2.35	54.29 ± 1.89
Concentración 100 ppm	22.35 ± 1.05	46.51 ± 1.79
Concentración 200 ppm	21.30 ± 0.50	40.76 ± 0.84

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Los resultados obtenidos en este estudio se examinaron estadísticamente aplicando un análisis factorial para validar que existe diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular al usar los distintos tratamientos y concentraciones de extracto.

Después de realizar el análisis factorial, se determinó que existe diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular al aplicar los tratamiento y concentraciones de extracto utilizado, obteniéndose un $p < 0.05$ (nivel de significancia), se rechazó la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$) que dice que no existe diferencia significativa entre los grupos ($p \geq 0,05$) y se aceptó la hipótesis alternativa ($H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$), que expone que si existe diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$). (Anexo 2N)

Al rechazar la hipótesis nula para el análisis factorial realizado fue necesario verificar si al menos uno de los grupos de tratamiento es diferente a los demás, se efectuó el test de Tukey y se estableció que existe diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular al variar las concentraciones utilizadas (12.5, 25, 50, 100 y 200 ppm), ($p < 0.05$); es decir, el porcentaje de viabilidad celular obtenida al aplicar concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 ppm no serán iguales, (Anexo 1Q), (Anexo 2Q) en hojas y en flores.

Estos resultados reflejan que la concentración que presenta el máximo porcentaje de viabilidad celular es la de 12.5 ppm tanto en hojas y flores, estableciendo que estadísticamente esta concentración presentará un porcentaje de viabilidad celular significativamente diferente al porcentaje de viabilidad celular de las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 ppm.

Como se puede observar en la Tabla 7-3 las flores presentan mayor viabilidad celular frente a las hojas y el porcentaje va incrementado a medida que la concentración del extracto disminuye, es decir es inversamente proporcional.

Al determinar la concentración LC_{50} se obtuvo $LC_{50} = 28,37$ para hojas ($R = 0.856$) y $LC_{50} = 86.388$ para flores ($R = 0.848689$) (Anexo 1K), (Anexo 2K); (Nemudzivhadi & Masoko, 2014, p.2000) expresan que existe una relación inversamente proporcional entre la citotoxicidad y el LC_{50} , es decir mientras la concentración LC_{50} es mayor el efecto citotóxico es menor. De esta

manera el extracto de flores exhibió un LC₅₀ mayor que las hojas de *Oreocallis grandiflora* lo que podría reflejar el menor efecto citotóxico y mayor viabilidad celular obtenido en este estudio para flores.

Sin embargo, las hojas al poseer mayor citotoxicidad que las flores a diferentes concentraciones, estas pueden ser utilizadas para experimentos en líneas celulares para enfermedades como el cáncer, HIV y evaluar también su potencial antibacteriano. (Tiwary et al., 2015, p.7).

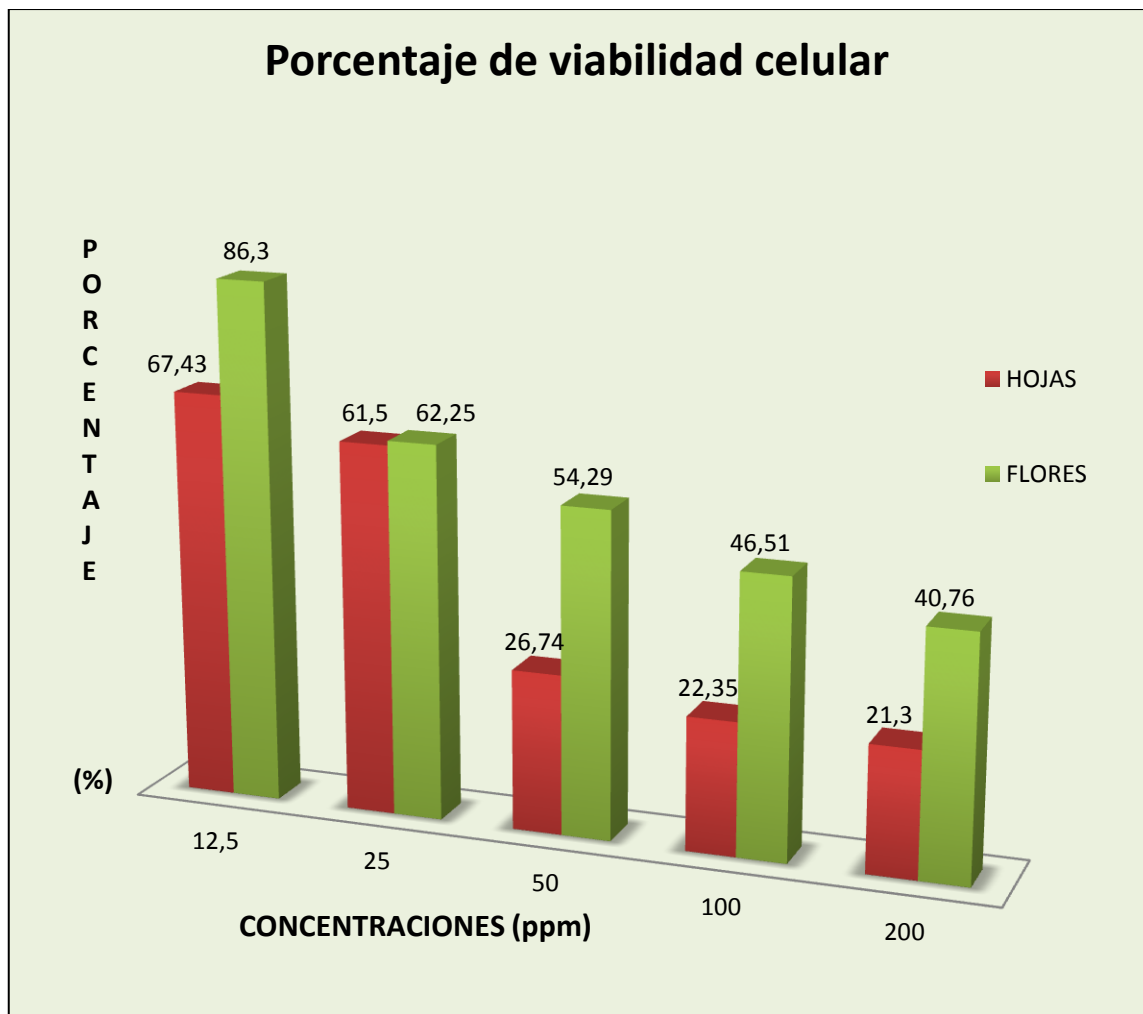


Gráfico 1-3. Porcentaje de viabilidad obtenida de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora*

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

3.6.2. Ensayo antiinflamatorio

El ensayo antiinflamatorio se lo realizo siguiendo la metodología expuesta por (Choudhary & Jalil 2005d: p.2348), la cual se fundamenta en la reducción de la sal de tetrazolio (WST-1), altamente soluble en agua en presencia de neutrófilos aislados (1×10^7 neutrófilos /mL), cuyo resultado fue expresado como porcentaje de inhibición inflamatoria.(Tabla 8-3).

Tabla 8-3. Porcentaje de inhibición de la inflamación a diferentes concentraciones.

Concentraciones utilizadas	Inhibición inflamatoria de hojas (%)	Inhibición inflamatoria de flores (%)
Concentración 12,5 ppm	62.17 ± 0.45	54.04 ± 1.40
Concentración 25 ppm	74.41 ± 0.71	57.75 ± 0.47
Concentración 50 ppm	87.83 ± 1.11	60.19 ± 0.65
Concentración 100 ppm	88.80 ± 10.61	61.38 ± 0.80
Concentración 200 ppm	97.18 ± 1.85	68.27 ± 2.88
Aspirina 200 ppm	74.11 ± 0.11	74.11 ± 0.11

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Los resultados obtenidos en este ensayo se evaluaron estadísticamente aplicando un análisis factorial para validar que existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición inflamatoria al usar distintos tratamientos (extracto de hojas, extracto de flores, aspirina) y concentraciones de extracto.

Después de realizar el análisis factorial, se determinó que existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición inflamatoria al aplicar los distintos tratamientos y concentraciones de extracto, obteniéndose un $p < 0.05$ (nivel de confianza), se rechazó la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$) que dice que no existe diferencia significativa entre los grupos y se aceptó la hipótesis alternativa ($H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$), que expone que si existe diferencia significativa entre los grupos. (Anexo 1N)

Al rechazar la hipótesis nula para el análisis factorial realizado fue necesario verificar si al menos uno de los grupos de tratamiento es diferente a los demás, se realizó el test de Tukey, en el cual se estableció que existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición inflamatoria al utilizar los diferentes tratamientos (extracto de hojas, extracto de flores, Aspirina), ($p = 0.00$); (Anexo 1O), es decir el porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida al aplicar un tratamiento no será igual al porcentaje de inhibición inflamatoria de los demás tratamientos. (Anexo 3O).

De la misma manera se estableció que existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición inflamatoria al aplicar distintas concentraciones de extracto (12.5, 25, 200 ppm), ($p = 0,00$) (Anexo 2O); es decir, el porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida al aplicar concentraciones de 12.5; 25 y 200 ppm), no serán iguales. Sin embargo no existe diferencia significativa entre las concentraciones de 50 y 100 ppm ($p = 0.627$), es decir, el porcentaje de

inhibición de inflamación obtenido al aplicar las concentraciones de 50 y 100 ppm serán iguales. (Anexo 4O)

Estos resultados reflejan que la concentración que presenta el máximo porcentaje de inhibición inflamatoria es la de 200 ppm tanto en hojas y flores, es decir estadísticamente esta concentración presentará un porcentaje de inhibición inflamatoria significativamente diferente al porcentaje de inhibición de inflamación de las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 200ppm.

Posteriormente, para determinar si existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición inflamatoria del ácido acetil salicílico, extracto de hojas y extracto de flores, a concentración de 200 ppm, se realizó el test estadístico ANOVA de un factor, previamente se verificó que se cumpla con los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad aplicando el estadístico de Levene y el test de Shapiro-Wilk.

El análisis de homogeneidad de varianzas presentó un $p=0.092$ en el que se estableció que las distribuciones de los datos de cada grupo son homogéneas ($p>0.05$), y la prueba de normalidad presento un $p>0.05$ estadísticos entre 0.469 y 0.961; lo que indica que se cumple con el supuesto de normalidad para cada grupo. (Anexo L y M) ya verificado la homogeneidad y normalidad de los datos se aplicó el test estadístico ANOVA de un factor.

Mediante la aplicación del test ANOVA de un factor se estableció que existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición inflamatoria si se utiliza extracto de hojas, extracto de flores y aspirina a 200ppm ya que se obtuvo $p=0.000$ que es menor a 0.05 (nivel de confianza), por tanto, se rechazó la hipótesis nula ($H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3= \mu_4$) que dice que no existe diferencia significativa entre los grupos y se aceptó la hipótesis alternativa ($H_a= \mu_1\neq\mu_2\neq\mu_3\neq \mu_4$), que expone que si existe diferencia significativa entre los grupos (extracto de hojas, extracto de flores y aspirina).(Anexo Ñ)

Al rechazar la hipótesis nula para el test estadístico ANOVA, fue necesario verificar si al menos uno de los grupos de tratamiento es diferente a los demás, efectuándose el test de Tukey en el que se estableció que existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición inflamatoria al aplicar los diferentes tratamientos (extracto de hojas, extracto de flores y Aspirina a 200 ppm), en el que se obtuvo un $p<0.05$. Por tanto el porcentaje de inhibición inflamatoria que se obtiene al aplicar un tratamiento no sera igual al porcentaje de inhibición inflamatoria de los demás tratamientos a 200 ppm. (Anexo P)

La tabla 8-3 expresa los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición inflamatoria de flores, hojas (*Oreocallis grandiflora*) y control positivo (ácido acetilsalicílico a 200 ppm), se puede observar claramente que el porcentaje de inhibición inflamatoria de hojas a concentraciones de 50, 100 y 200 ppm superan al control positivo. En estudios previos sobre el potencial antiinflamatorio realizados en extractos de diferentes especies se ha demostrado la presencia de compuestos fenólicos, terpenoides, taninos, flavonoides, (Abdulmalik et al., 2017b: pp.134-135)(Onoja et al., 2017, p.210), resultados que son similares a los obtenidos mediante el análisis cualitativo expresando que el porcentaje elevado de inhibición inflamatoria puede deberse a estos constituyentes fitoquímicos.

Por el contrario en las flores a las distintas concentraciones de ensayo se observó un porcentaje de inhibición inflamatoria menor que el control positivo (ácido acetilsalicílico), que podría deberse a la existencia de diferentes tipos de metabolitos secundarios. (Abdulmalik et al., 2017c: pp.134-135).(Samatha et al., 2012b: p.2013)

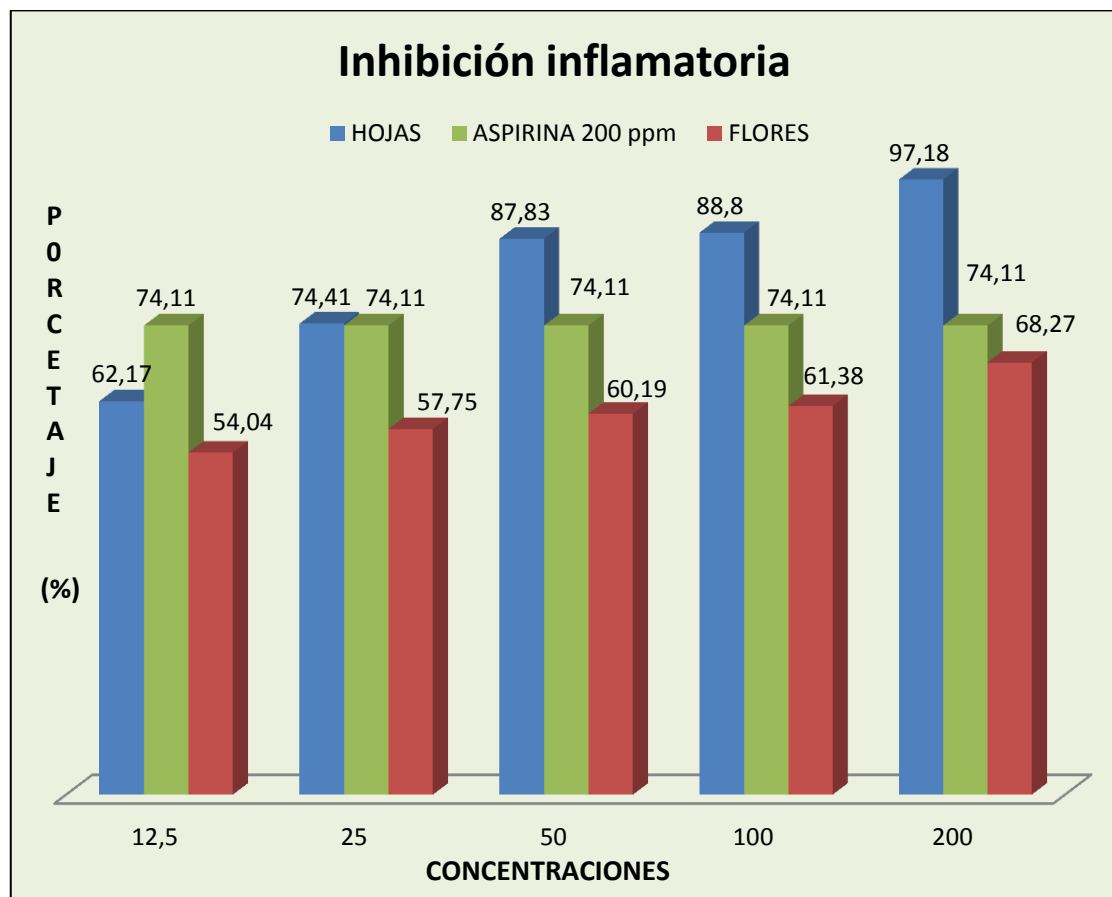


Gráfico 2-3. Porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora* a diferentes concentraciones frente a la aspirina a 200ppm

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

3.7. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó aplicando el método DPPH' que se fundamenta en una reacción redox donde el DPPH' al aceptar un átomo de hidrógeno (H) a partir de la molécula captadora (antioxidante), da como resultado la reducción de DPPH' a DPPH₂, el color púrpura cambia a amarillo, con disminución concomitante en la absorbancia a 515 nm. (Mishra et al., 2012c: p. 1041). Se utilizó como estándar ácido gálico, se calculó las concentraciones IC₅₀ utilizando el programa BLeSq.

Tabla 9-3. Resultados del IC₅₀.

Extracto	Resultado de IC₅₀
HOJAS	290.19 µg/ml
FLORES	906.92 µg/ml
ÁCIDO GÁLICO	35.33 µg/ml

Realizado por: Karina Yanza, 2017.

Como se puede observar en la tabla 9-3 el ácido gálico presenta un IC₅₀ mejor (IC₅₀ de 35.33 µg/ml) comparado con los extractos de hojas (IC₅₀ de 290.19 µg/ml) y flores (IC₅₀ de 906.92 µg/ml). (Cuvelier & Berset 1995)(Anthony & Saleh 2013) enuncian que mientras menor sea el IC₅₀ de una muestra, mayor será su capacidad antioxidante. En consecuencia, de lo anteriormente mencionado las hojas podrían tener mayor actividad antioxidante que las flores, esto puede deberse a la presencia de diferentes tipos de fitoconstituyentes en flores y hojas. (Anthony & Saleh, 2013, p.402).

Shem-Tov et al. (2012, p.303) explica que el potencial antioxidante de los compuestos se debe principalmente a la capacidad de eliminar la formación de radicales libres y donar átomos de hidrógeno. Bajalan et al. (2016, p.258) expresa que la presencia de sustituyentes donadores de electrones en la estructura de los anillos de los compuestos de tipo fenólico, así como la cantidad y la disposición de los grupos hidroxilo determinan su potencial antioxidante. En este caso las hojas presentaron mayor concentración de compuestos de tipo fenólico que las flores, por lo que se asume que podría estar relacionado con la capacidad antioxidante. (Tabla 5-3 y 6-3)

En estudios realizados en plantas de la familia Proteacea se reporta para *Embothrium coccineum* un IC₅₀ de 5.27 µg/mL, *Helicia nilagirica* un IC₅₀ de 3.92 µg/ml. Además se reporta IC₅₀ de 15 µg/mL, IC₅₀ de 69 µg/mL, IC₅₀ de 134 µg/mL para los extractos: metanólico, hexánico y de acetato de etilo, respectivamente, para hojas de *Oreocallis grandiflora* (Espinoza et al. 2013d: pp.66-68), siendo resultados menores que los obtenidos ya que el ensayo antioxidante se lo realizó con extracto hidroalcohólico, pudiendo influenciar la polaridad de los solventes en la extracción de algunos compuestos que presenten actividad antioxidante.

A pesar de que el ensayo fue realizado sobre el extracto bruto, la planta exhibe una capacidad antioxidante moderada para hojas; por lo que, sería importante realizar ensayos que apoyen a la homeostasis redox en modelos *in vivo* o *in vitro*, debido a su alta capacidad antioxidante usando compuestos aislados a partir del extracto bruto.

CONCLUSIONES

Los metabolitos secundarios representativos en flores y hojas de *O. grandiflora* fueron compuestos fenólicos, taninos, terpenos y flavonoides. Además, en los extractos etanólico y acuoso se determinó la presencia de saponinas, quinonas y mucílagos en ambas partes de la especie vegetal, mientras que en el extracto etéreo estos constituyentes estuvieron ausentes.

Flavonoides totales y fenoles totales fueron cuantificados mediante espectrofotometría en ambos extractos, obteniendo 40.612 g Eq Q/100g de extracto hojas y 15.842 g Eq Q/100g de extracto flores; y, 16.004 g Eq GAE/100g de extracto hojas y 12.018 g Eq GAE/100g de extracto flores.

Se determinó la capacidad antiinflamatoria de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora* expresada como porcentaje de inhibición inflamatoria, en la cual el extracto de hojas presenta mayor actividad antiinflamatoria en las distintas concentraciones ensayadas con un porcentaje de inhibición que oscila entre 62–97% al comparar con las flores que oscila entre 54-68%.

Se determinó la actividad citotóxica en términos de viabilidad celular porcentual de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora*, verificando que el extracto de flores presenta mayor viabilidad celular y por ende menor citotoxicidad con un porcentaje que oscila entre 40-86% frente al de las hojas que oscila entre 21-67%, a las diferentes concentraciones de ensayo.

Se evaluó la capacidad captadora de radicales libres mediante el ensayo DPPH' estableciendo que las hojas presentan mayor actividad antioxidante que las flores con valores de $IC_{50}=290.19 \mu\text{g/mL}$ y $IC_{50}=906.92 \mu\text{g/mL}$ para hojas y flores respectivamente.

RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuros trabajos de investigación aislar los compuestos de esta especie vegetal mediante técnicas cromatográficas y elucidar sus estructuras a través de NMR, MS para determinar los compuestos que pueden ser responsables de la actividad antiinflamatoria potencial obtenida en hojas.

Debido al alto potencial citotóxico de hojas se recomienda realizar ensayos sobre actividad antibacteriana y antitumoral.

Realizar ensayos *in vivo* sobre la actividad antiinflamatoria y toxicidad de flores y hojas para poder trasladar los valores de dosis a otras especies y usar este producto natural con un grado de seguridad aceptable.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDULMALIK, A.A., et.al.**, In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of Extracts from *Calendula arvensis* (CA) Flowers. *INTECH*, 2017, pp. 124-135.
- AGATI, G. ET AL.**, Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 2012, pp.67-76. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>.
- ALHAKMANI, F., KUMAR, S. y KHAN, S.A.**, Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 3, no. 8, 2013, pp. 623-627. ISSN 22211691. DOI 10.1016/S2221-1691(13)60126-4.
- ANTHONY, K.P. y SALEH, M.A.**, Free Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Silymarin Components. , 2013, pp. 398-407. DOI 10.3390/antiox2040398.
- BAJALAN, I, , et.al.**, Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of extracts from different populations of lavender. *Industrial Crops & Products* [en línea], vol. 87, 2016, pp. 255-260. ISSN 0926-6690. DOI 10.1016/j.indcrop.2016.04.059. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.059>.
- BALSLEV, H., , et.al.**, Enciclopedia De Plantas Utiles Del Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU*, vol. 1, 2008, pp. 1-3.
- BOERIS, M.A., TOSO, R.E. y SKLIAR, M.I.**, Actividad antiinflamatoria de *Salpichroa organifolia*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, vol. 23, no. 2, 2004, pp. 138-141. ISSN 03262383.
- BÓRDES, R.**, El proceso inflamatorio. *Revista de Enfermería* [en línea], vol. 4, 2014, pp. 9-12. Disponible en: [http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero 4/pinflamatorio4.htm](http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm).
- BOUKHRIS, M, et.al.**, Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium , *Pelargonium graveolens*. *Phytochemistry*, 2012, pp. 130-138.

- BRAKO, L. Y ZARUCHI, J.**, Catalogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. *USA*, vol. 45, no. Missouri Botanical Garden. St. Louis, Missouri, 1993, pp. 634.
- BUTRÓN, X.**, *Ecuador: Uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su comercialización*. 2004. S.l.: s.n.
- Central Ecuatoriana de Servicios agrícolas (CESA)**, Especies forestales nativas en los Andes de Ecuador. *Central ecuatoriana de servicios agrícolas (CESA)*. Primera. Quito, Ec.: s.n., 1989, pp. 20, 21, 28.
- CHANDRA, G.C.**, Ethnomedicinal Use and Phytochemical Analysis of Selected Medicinal Plants of Mizoram , India Vabeiryureilai M and Trends in Green Chemistry. *iMedPub Journals*, 2015, pp. 1-9.
- CHOUDHARY, M.I. y JALIL, S.**, Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen , *Usnea longissima*. *Phytochemistry*, vol. 66, 2005, pp. 2346-2350. DOI 10.1016/j.phytochem.2005.06.023.
- CREUS, E.V.A.G.**, Compuestos fenólicos un análisis de sus beneficios para la salud. *Nutrición*, vol. 23, 2004, pp. 80-84.
- CUVELIER, M.E. y BERSET, C.**, Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. , vol. 30, 1995, pp. 25-30.
- DE FEO, V.**, Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 85, no. 2-3, 2003, pp. 243-256. ISSN 03788741. DOI 10.1016/S0378-8741(03)00017-5.
- DEHESA, M.**,. *Control De Calidad De Los Fitofármacos*, 2011, Quito, Ec. pp:139-152.
- ENCISO, E. y 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. *An Fac med*, vol. 72, no. 4, 2011, pp. 231-237.

- ESPINOZA, A., JARAMILLO, M. y SANTIAGO, O.,** Actividad antioxidante y antihyperglucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam .) R . Br ., al sur del Ecuador [Antioxidant and antihyperglycemic activity of the medicinal specie. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, vol. 12, no. 1, 2013, pp. 59-68.
- FAWOLE, O.A, et.al.,** Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in South Africa. , vol. 123, 2009, pp. 237-243. DOI 10.1016/j.jep.2009.03.012.
- GARCÍA DE LORENZO, LÓPEZ MARTÍNEZ, J. y SÁNCHEZ CASTILLA, M.,** Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva* [en línea], vol. 24, no. 8, 2013, pp. 353-360. ISSN 02105691. DOI 10.1016/S0210-5691(00)79622-7. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210569100796227>.
- GIBON, E., LU, L.Y., NATHAN, K. y GOODMAN, S.B.,** Inflammation, ageing, and bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Translation* [en línea], vol. 10, 2017, pp. 28-35. ISSN 2214031X. DOI 10.1016/j.jot.2017.04.002. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214031X17300128>.
- GÓMEZ ESTRADA, H.A., GONZÁLEZ RUIZ, K.N. y MEDINA, J.D.,** Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, vol. 10, no. 3, 2011, pp. 182-217. ISSN 07177917.
- HIDALGO, M.,** Antocianos: metabolismo y actividad biológica. , 2012, pp. 9-13.
- LEYTON, M. ET AL.,** Free radical-scavenging activity of sequential leaf extracts of *Embothrium coccineum*. *Open Life Sciences*, 10(1) 2015, pp.260-268.
- LEÓN, F. ET AL.,** Phenolic compounds, antioxidant activity and ultrastructural study from *Protea* hybrid «Susara». *Industrial Crops and Products*, 55, 2014, pp.230-237. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.024>.

LOPEZ, T., Flavonoides. , vol. 21, 2017, pp. 108-114.

MADUREIRA, A.M., DUARTE, A. & TEIXEIRA, G., Antimicrobial activity of selected extracts from *Hakea salicifolia* and *H. sericeae* (Proteaceae) against *Staphylococcus aureus* multiresistant strains. *South African Journal of Botany*, 81, 2012, pp.40-43. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2012.05.002>.

MIRANDA, M., *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana Cuba, 2006.

MISHRA, K., OJHA, H. y CHAUDHURY, N.K., Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH Å assay : A critical review and results. *Food Chemistry* [en línea], vol. 130, no. 4, 2012, pp. 1036-1043. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.07.127. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>.

NEMUDZIVHADI, V. y MASOKO, P., In Vitro Assessment of Cytotoxicity , Antioxidant , and Anti-Inflammatory Activities of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) Leaf Extracts. , 2014.

OCHOA, A, et. al., Estandarización preliminar de parámetros de calidad del extracto blando de las hojas de *Petiveria alliacea* L. Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe [en línea], vol 13, no.3, 2006, pp. 78-83. ISSN 0258-5995. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/4435/443543705010.pdf>.

ONOJA, S.O, et.al., Alexandria University Faculty of Medicine Antioxidant , anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract of *Justicia secunda* Vahl leaf. *Alexandria Journal of Medicine* [en línea], vol. 53, no. 3, 2017, pp. 207-213. ISSN 2090-5068. DOI 10.1016/j.ajme.2016.06.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2016.06.001>.

PALOMO, I, et.al., Antiagregantes plaquetarios: mecanismos de acción y riesgos asociados al uso. *Vitae*, vol. 16, 2016, pp. 133-143.

PÉREZ, E., et.al., Determination of total phenols and flavonoids in guava leaves (*Psidium guajava* L.) E. *Rev.peru.biol*, vol. 31, no. 1, 2014, pp. 60-77. ISSN 16909763.

- QUIÑONES, M., MIGUEL, M. y ALEIXANDRE, A.**, Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*, vol. 27, no. 1, 2012, pp. 76-89. ISSN 16995198. DOI 10.3305/nh.2012.27.1.5418.
- REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA**, Método de farmacognosia. Madrid-España, S/N, 2003. p. 95.
- RIOS, L.**, Ecología, utilización e impactos producidos en el aprovechamiento de cucharillo *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. en las parroquias de Taquil, Chantaco, Chuquiribamba y Gualal de la provincia de Loja. , 2015.
- ROCHE**, Cell Proliferation Reagent WST-1. *Cell Proliferation*, vol. 1, no. 11, 2007, pp. 1-4. ISSN 0006291X. DOI 10.1016/j.bbrc.2008.07.050.
- RODRÍGUEZ CARRANZA, R.**, Farmacología de la inflamación y de las alergias. *Guía de farmacología y terapéutica*, 2014, pp.77-83.
- SAMATHA, T., et.al.**, Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts. , vol. 5, no. 3, 2012, pp. 2011-2013.
- SHEM-TOV, Y., et.al.**, Determination Of Total Polyphenol, Flavonoid And Anthocyanin Contents And Antioxidant Capacities Of Skins From Peanut (*Arachis Hypogaea*) Lines With Different Skin Colors. *Journal of Food Biochemistry*, vol. 36, no. 3, 2012, pp. 301-308. ISSN 01458884. DOI 10.1111/j.1745-4514.2011.00539.x.
- SHETTAR, A.K., et.al.**, Evaluation of in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ximenia americana* extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* [en línea], vol. 5, no. 11, 2015, pp. 918-923. ISSN 22221808. DOI 10.1016/S2222-1808(15)60957-4. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60957-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60957-4).
- SLIMESTAD, R., VANGDAL, E. y BREDE, C.**, Analysis of phenolic compounds in six norwegian plum cultivars (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 23, 2009, pp. 11370-11375. ISSN 00218561. DOI

10.1021/jf902054x.

TAN, A.S. y BERRIDGE, M. V., 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. , vol. 238, 2000, pp. 59-68.

THOMAS, J., PH, D., et.al., Over-the-Counter Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Risk of Gastrointestinal Symptoms. , vol. 97, no. 9. 2002

TINITANA, F., et.al. Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, vol. 12, no. 1, 2016, pp. 29. ISSN 1746-4269. DOI 10.1186/s13002-016-0100-4.

TIWARY, B.K., et.al., The in vitro cytotoxic activity of ethno-pharmacological important plants of Darjeeling district of West Bengal against different human cancer cell lines. , 2015, pp. 1-10. DOI 10.1186/s12906-015-0543-5.

ULLOA, C. Y JORGENSEN, P., *Árboles y arbustos del Ecuador*. QUITO-ECUADOR: 1995

ULLOA, C. y JORGENSEN, P., Catalogue of the plants of Ecuador. , no. Missouri Botanical Garden Press. St, 1999, pp. 823.

VILLALBA, E., Inflamación I. *Revista de Actualización Clínica*, vol. 43, 2014, pp. 2261-2265.

Organización mundial de la salud (OMS), *Quality control methods for herbal materials*. 1998.

WU ET AL.,. Role and significance of total phenols during rooting of *Protea cynaroides* L. cuttings. *African Journal of Biotechnology*, 10(59), 2011, pp.12542-12546. Available at: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/5696C8D32925>.

ZAA, C., VALDIVIA, M. y MARCELO, Á., Efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea*. *Rev.peru.biol*, vol. 19, no. 3, 2012, pp. 329-334.

ZHU, M. ET AL., Relationship between the composition of flavonoids and flower colors variation in tropical water lily (nymphaea) cultivars. *PLoS ONE*, 7(4), 2012, pp.1-11.












ANEXOS

ANEXO A. Secado de hojas y flores de *Oreocallis grandiflora*.



ANEXO B. Tamizaje fitoquímico de hojas y flores de *Oreocallis grandiflora*.

Tabla 1B. Tamizaje fitoquímico de hojas

	Extracto etéreo	Extracto Etanólico	Extracto acuoso
Ensayo	Imagen	Imagen	Imagen
Dragendorff			
Mayer			
Wagner			
Sudan			





































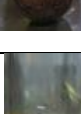






Baljet			
Liebermand – Buchard			
Catequinas			
Resinas			
Fehling			
Espumas			
Tricloruro férrico			
Borotrager			
Shinoda			
Antocianidinas			

Tabla 2B. Tamizaje fitoquímico de flores

	Extracto etéreo	Extracto Etanólico	Extracto acuoso
Ensayo	Imagen	Imagen	Imagen
Dragendorff			
Mayer			
Wagner			
Sudan			
Baljet			
Liebermand – Buchard			
Catequinas			
Resinas			
Fehling			
Espumas			
Bomtrager			

Tricloruro férico			
Shinoda			
Antocianidinas			

Anexo C. Obtención de los extractos liofilizados de flores y hojas



Anexo D. Muestras preparadas como estándares para la cuantificación de fenoles (Gráfico 1D) y cuantificación de flavonoides (Gráfico 2D)

Gráfico 1D

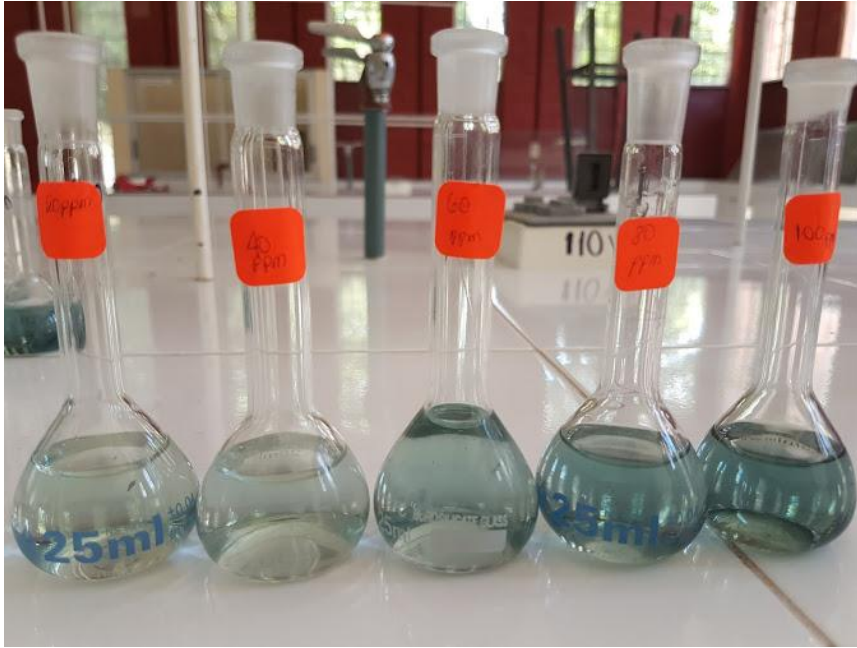
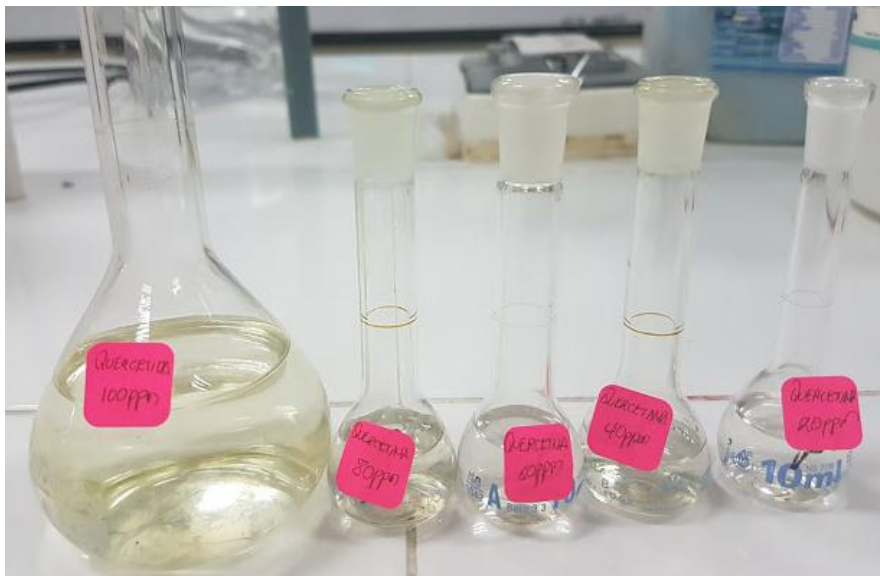


Gráfico 2D



Anexo E. Curva de calibración de ácido gálico utilizada para la cuantificación de fenoles totales (Gráfico 1E), y curva de calibración de quercetina utilizada para cuantificación de flavonoides totales (Gráfico 2E)

Gráfico 1E

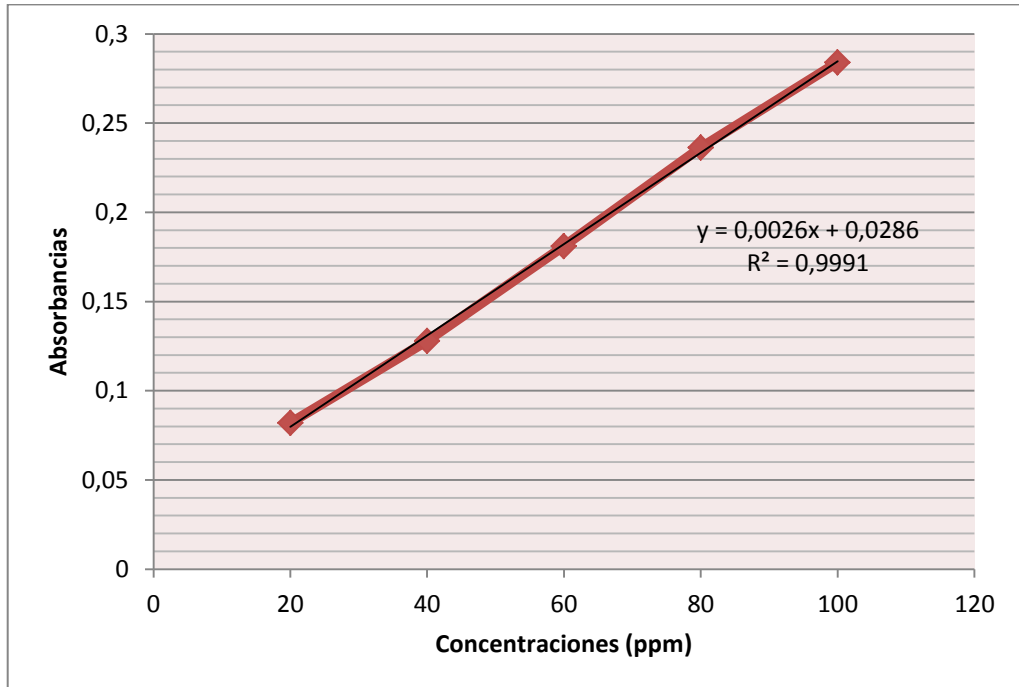
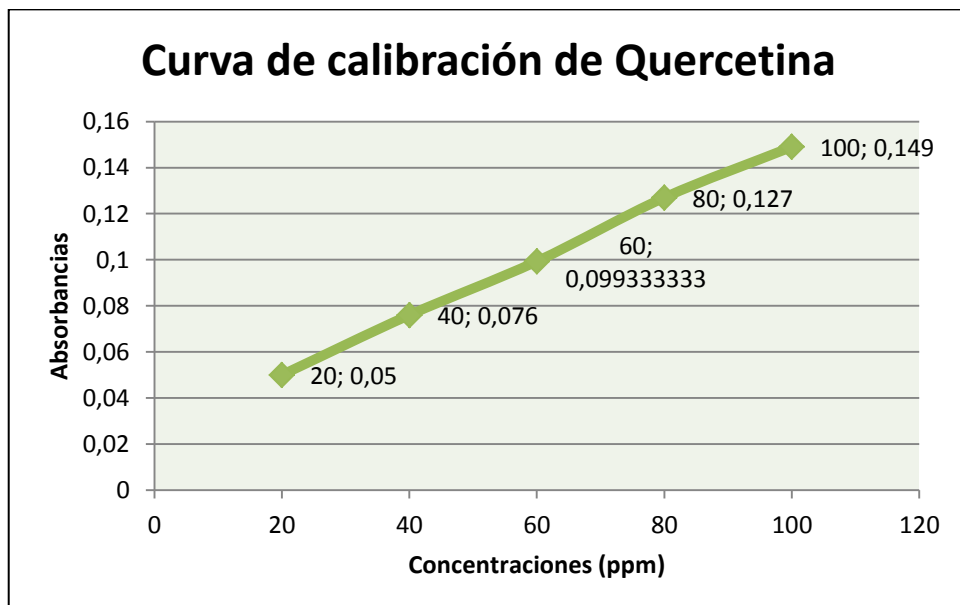


Gráfico 2E



Anexo G. Ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1G) y citotóxico (Gráfico 2G) *IN VITRO* previo a la incubación

Gráfico 1G

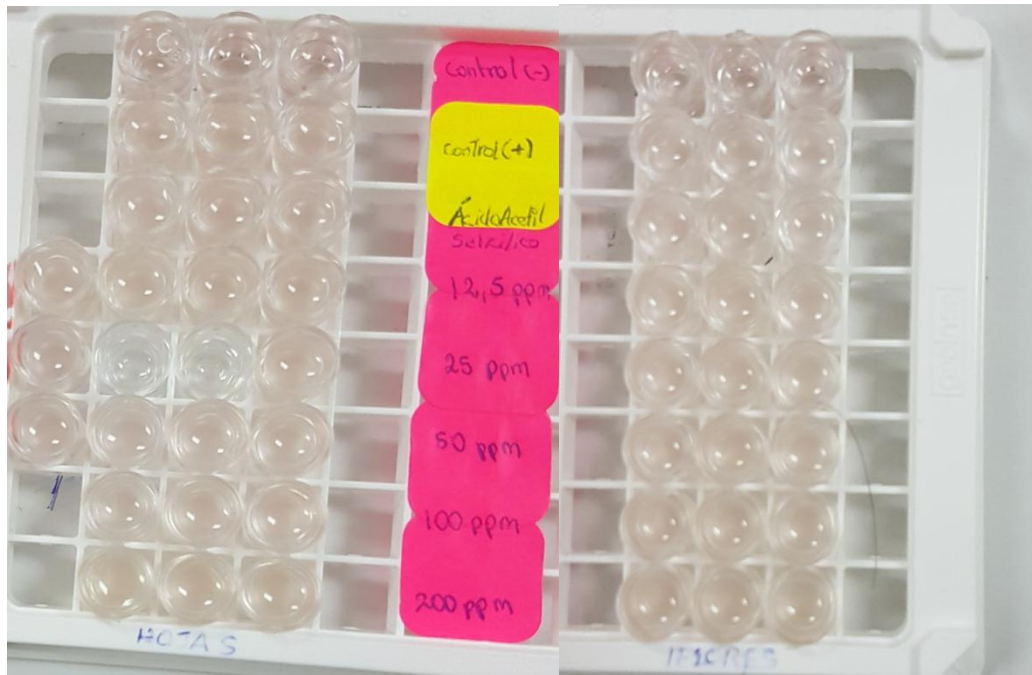
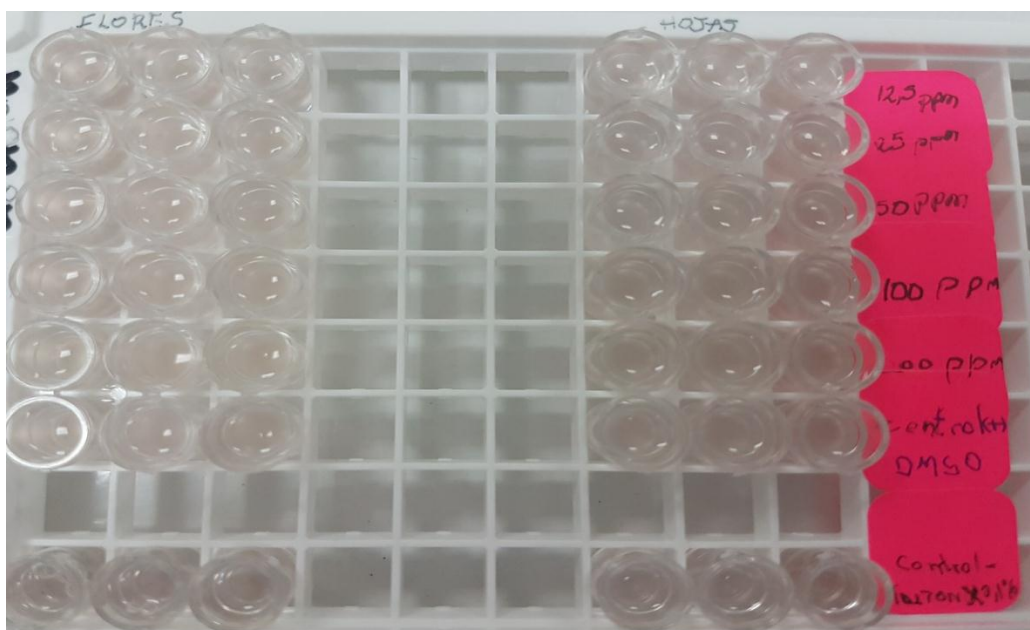


Gráfico 2G

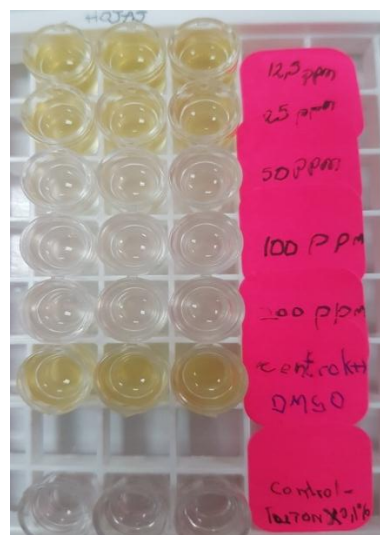


Anexo H. Ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1H) y citotóxico (Gráfico 2H) *IN VITRO* posterior a la incubación

Gráfico 1H



Gráfico 2H



Anexo I. Porcentaje de inhibición de los radicales libres de ácido gálico (Tabla 1I), extracto de hojas de *Oreocallis grandiflora* (Tabla 2I), extracto de flores de *Oreocallis grandiflora* (Tabla 3I).

Tabla 1 I

Concentraciones utilizadas (ppm)	Porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH
10	19,71
20	27,96
40	36,94
60	70,91
80	77,96
100	84,70

Tabla 2 I

Concentraciones utilizadas (ppm)	Porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH (hojas)
10	3,04
50	10,90
100	18,27
200	29,01
500	59,29
1000	89,10

Tabla 3 I

Concentraciones utilizadas (ppm)	Porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH (Flores)
10	3,52
50	5,28
100	9,62
200	15,38
500	24,68
1000	51,28
1500	68,36
2000	78,36

Anexo J. Valores del R en la regresión logística y probit para el ensayo de citotoxicidad del extracto de hojas (Gráfico 1J) , el extracto de Flores (Gráfico 2J) y para el ensayo antioxidante del ácido gálico (Gráfico 3J), extracto de hojas (Gráfico 4J) y extracto de Flores (Gráfico 5 J)

Gráfico 1J

```
Ready...

Probit Regression
Y = CumNorm(-0.512 * Log(X) + 1.716)
R = 0.853046
EC50 = 28.5657 (10.558+66.2431)

Logit Regression
Exp((-0.834 * Log(X) + 2.791)) / (1 + Exp((-0.834 * Log(X) + 2.791)))
R = 0.856217
EC50 = 28.3693 (10.6326+65.0436)
```

Gráfico 2J

```
FLORES DE O. grandiflora

Logit Regression
Exp((-0.731 * Log(X) + 3.26)) / (1 + Exp((-0.731 * Log(X) + 3.26)))
R = 0.848689
EC50 = 86.3777 (36.6637+238.0007)

Probit Regression
Y = CumNorm(-0.441 * Log(X) + 1.963)
R = 0.861282
EC50 = 85.8943 (38.0988+222.3288)
```

Gráfico 3J

```
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
ESTANDÁR ÁCIDO GÁLICO

Logit Regression
Exp((1.394 * Log(X) -4.965)) / (1 + Exp((1.394 * Log(X) -4.965)))
R = 0.908908
EC50 = 35.1966 (21.4797+56.9706)

Probit Regression
Y = CumNorm(0.846 * Log(X) -3.016)
R = 0.906523
EC50 = 35.327 (21.4023+57.6026)
```


Gráfico 4J

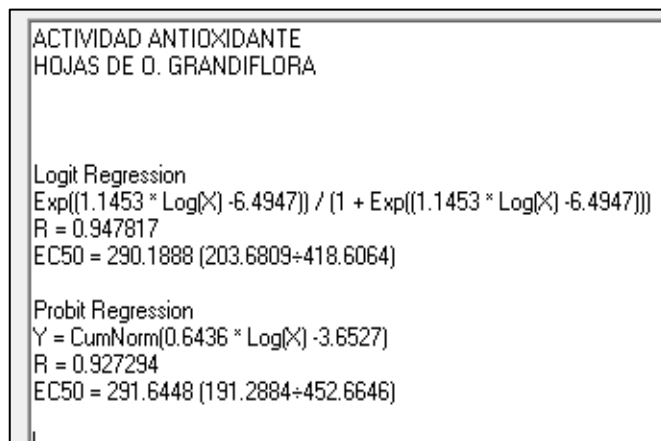
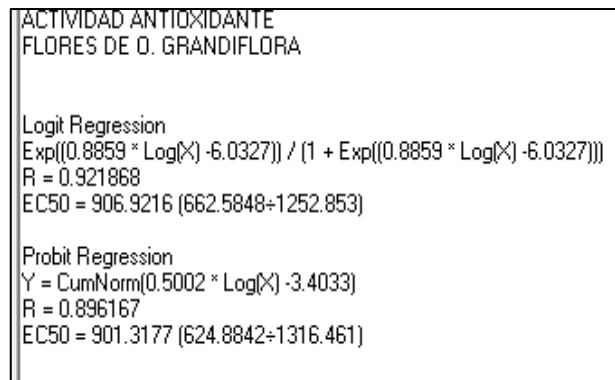


Gráfico 5J



Anexo K. Valores de IC₅₀ para el ensayo de citotoxicidad del extracto de hojas (Gráfico 1K), el extracto de Flores (Gráfico 2K) y para el ensayo antioxidante del ácido gálico (Gráfico 3K), extracto de hojas (Gráfico 4K) y extracto de Flores (Gráfico 5K).

Gráfico 1K

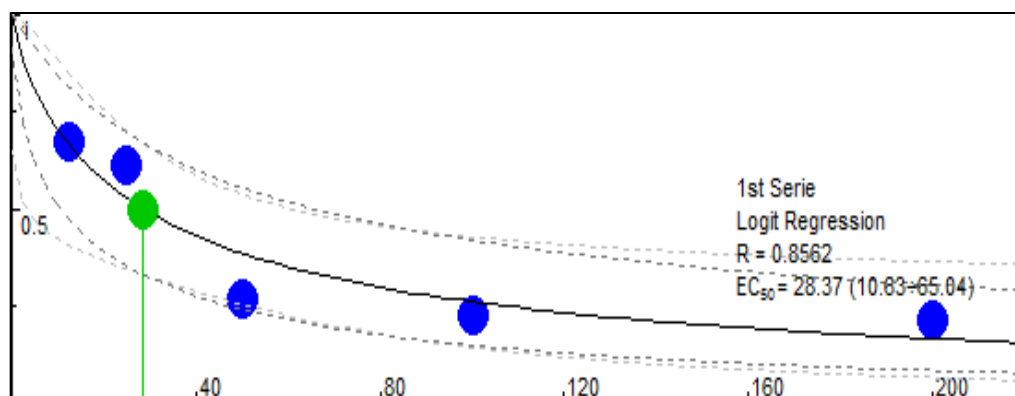


Gráfico 2K

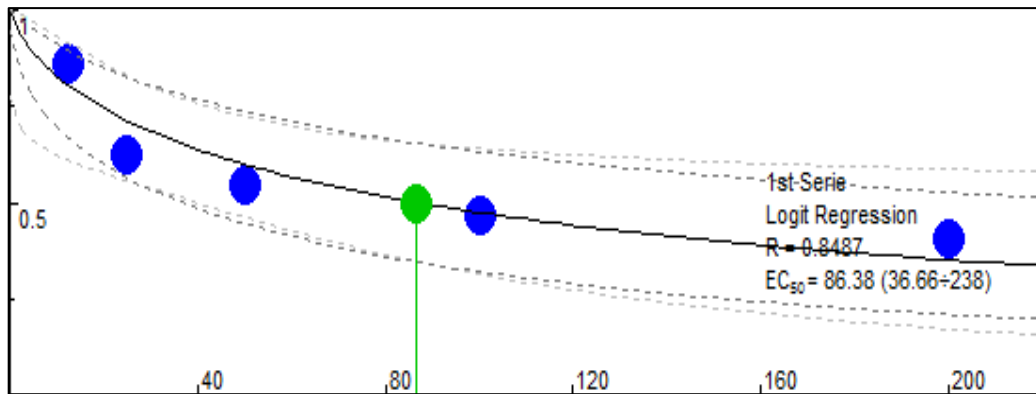


Gráfico 3K

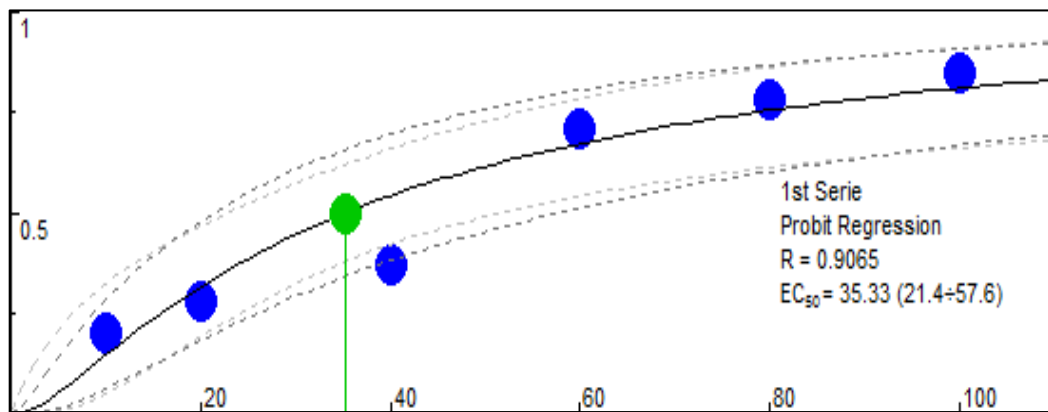


Gráfico 4K

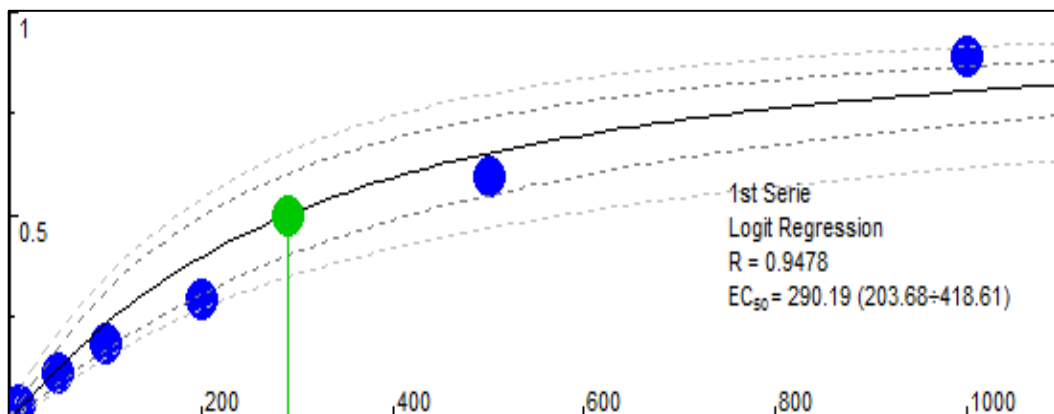
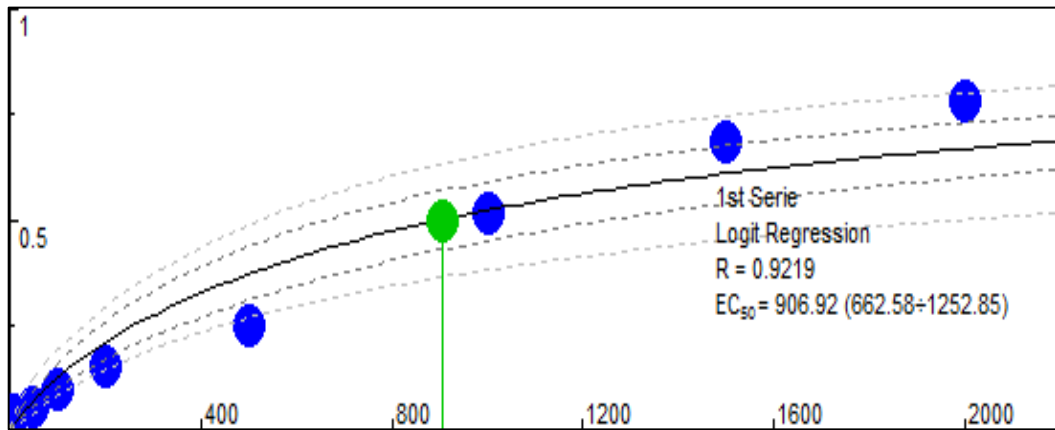


Gráfico 5K



Anexo L. Prueba de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1L) y citotóxico (Gráfico 2L), y prueba de homogeneidad de varianza del ensayo antiinflamatorio a 200 ppm del extracto de flores, extracto de hojas y aspirina (Gráfico 3L).

Gráfico 1L.

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error ^a			
Variable dependiente: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN			
F	df1	df2	Sig.
2,767	9	20	0,128
Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.			
a. Diseño : Interceptación + TIPO DE EXTRACTO + CONCENTRACIONES UTILIZADAS + TIPO DE EXTRACTO * CONCENTRACIONES UTILIZADAS			

Gráfico 2L

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error ^a			
Variable dependiente: Porcentaje de viabilidad celular			
F	df1	df2	Sig.
1,689	9	20	,158
Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.			
a. Diseño : Interceptación + Concentración utilizada + Tipo de extracto + Concentración utilizada * Tipo de extracto			

Gráfico 3L.

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Porcentaje de inhibición inflamatoria			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
3,638	2	6	,092

Anexo M. Prueba de normalidad de los datos obtenidos para el ensayo antiinflamatorio a 200 ppm del extracto de flores, extracto de hojas y aspirina.

Pruebas de normalidad							
	TRATAMIENTO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% Inhibición Inflamatoria	HOJAS	,291	3	.	,925	3	,469
	FLORES	,231	3	.	,980	3	,731
	ASPIRINA	,177	3	.	1,000	3	,961

Anexo N. Análisis factorial para el ensayo antiinflamatorio (Gráfico 1N), ensayo citotóxico (2N)

Gráfico 1N

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN INFLAMATORIA					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	6208,102 ^a	10	620,810	447,692	,000
Interceptación	160347,071	1	160347,071	115632,975	,000
Tratamiento	3771,198	2	1885,599	1359,784	,000
Concentraciones utilizadas	2122,018	4	530,504	382,569	,000
Tratamiento * Concentraciones utilizadas	494,477	4	123,619	89,147	,000
Error	34,667	25	1,387		
Total	191251,803	36			
Total corregido	6242,769	35			

a. R al cuadrado = ,994 (R al cuadrado ajustada = ,992)

Gráfico 2N

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: Porcentaje de viabilidad celular					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	12423,125 ^a	9	1380,347	404,058	,000
Interceptación	71893,915	1	71893,915	21044,917	,000
Concentración utilizada	9299,206	4	2324,802	680,520	,000
Tipo extracto	2479,915	1	2479,915	725,925	,000
Concentración utilizada * Tipo extracto	644,004	4	161,001	47,129	,000
Error	68,324	20	3,416		
Total	84385,364	30			
Total corregido	12491,449	29			
a. R al cuadrado = ,995 (R al cuadrado ajustada = ,992)					

Anexo Ñ. Análisis ANOVA de un factor para el ensayo antiinflamatorio a concentración de 200 ppm para el extracto de hojas, extracto de flores y Aspirina.

ANOVA					
INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1402,469	2	701,235	179,088	,000
Dentro de grupos	23,494	6	3,916		
Total	1425,963	8			

Anexo O. Prueba pos hoc (Tukey) para el ensayo antiinflamatorio del tratamiento frente al porcentaje de inhibición de la Inflamación (Gráfico 1O), y de las concentraciones utilizadas frente al porcentaje de inhibición de la Inflamación (Gráfico 2O). Prueba pos hoc (Tukey) para la formación de los niveles que presentan a un mismo grupo de tratamiento (Gráfico 3O), y para la formación de los niveles que presentan a un mismo grupo de concentración (Gráfico 4O).

Gráfico 10

Prueba pos hoc para tipo TRATAMIENTO (Tukey)

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN INFLAMATORIA						
HSD Tukey						
(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
EXTRACTO DE HOJAS	EXTRACTO DE FLORES	21,7533*	,42999	,000	20,6822	22,8243
	ASPIRINA	7,9587*	,56882	,000	6,5419	9,3756
EXTRACTO DE FLORES	EXTRACTO DE HOJAS	-21,7533*	,42999	,000	-22,8243	-20,6822
	ASPIRINA	-13,7946*	,56882	,000	-15,2114	-12,3777
ASPIRINA	EXTRACTO DE HOJAS	-7,9587*	,56882	,000	-9,3756	-6,5419
	EXTRACTO DE FLORES	13,7946*	,56882	,000	12,3777	15,2114
Se basa en las medias observadas.						
El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,387.						
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.						

Gráfico 20

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN						
HSD Tukey						
(I) CONCENTRACIONES UTILIZADAS	(J) CONCENTRACION ESUTILIZADAS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
12,50	25,00	-7,9758*	,75969	,000	-10,2491	-5,7025
	50,00	-15,9131*	,75969	,000	-18,1864	-13,6398
	100,00	-16,9866*	,75969	,000	-19,2599	-14,7133
	200,00	-24,6231*	,75969	,000	-26,8964	-22,3499
25,00	12,50	7,9758*	,75969	,000	5,7025	10,2491
	50,00	-7,9373*	,75969	,000	-10,2106	-5,6641

	100,00	-9,0108*	,75969	,000	-11,2841	-6,7376
	200,00	-16,6473*	,75969	,000	-18,9206	-14,3741
50,00	12,50	15,9131*	,75969	,000	13,6398	18,1864
	25,00	7,9373*	,75969	,000	5,6641	10,2106
	100,00	-1,0735	,75969	,627	-3,3468	1,1998
	200,00	-8,7100*	,75969	,000	-10,9833	-6,4367
100,00	12,50	16,9866*	,75969	,000	14,7133	19,2599
	25,00	9,0108*	,75969	,000	6,7376	11,2841
	50,00	1,0735	,75969	,627	-1,1998	3,3468
	200,00	-7,6365*	,75969	,000	-9,9098	-5,3632
200,00	12,50	24,6231*	,75969	,000	22,3499	26,8964
	25,00	16,6473*	,75969	,000	14,3741	18,9206
	50,00	8,7100*	,75969	,000	6,4367	10,9833
	100,00	7,6365*	,75969	,000	5,3632	9,9098
* . La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.						

Gráfico 30

Tukey prueba pos hoc para TRATAMIENTO

PORCENTAJ EDEINHIBICIÓN INFLAMATORIA				
HSD Tukey ^{a,b,c}				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto		
		1	2	3
EXTRACTO DE FLORES	15	60,3248		
ASPIRINA	6		74,1194	
EXTRACTO DE HOJAS	15			82,0781
Sig.		1,000	1,000	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
Se basa en las medias observadas.				

Gráfico 40

Prueba pos hoc para concentraciones utilizadas

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN INFLAMATORIA					
HSD Tukey ^{a,b}					
CONCENTRACIONESUTILIZADAS	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
12,50	6	58,1017			
25,00	6		66,0775		
50,00	6			74,0149	
100,00	6			75,0884	

200,00	6				82,7249
Sig.		1,000	1,000	,627	1,000

Anexo P. Prueba pos hoc (Tukey) para el ensayo antiinflamatorio del tratamiento a 200 ppm frente al porcentaje de inhibición de la Inflamación (Gráfico 1P). Prueba pos hoc (Tukey) para la formación de los niveles que presentan a un mismo grupo de tratamiento. (Gráfico 2P).

Gráfico 1P

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: IINHIBICIÓN NFLAMATORIA						
HSD Tukey						
(I) TRATAMIENTO 200ppm	(J) TRATAMIENTO 200ppm	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
EXTRACTO DE HOJAS	EXTRACTO DE FLORES	28,91401*	1,61567	,000	23,9567	33,8713
	ASPIRINA	23,07209*	1,61567	,000	18,1148	28,0294
EXTRACTO DE FLORES	EXTRACTO DE HOJAS	-28,91401*	1,61567	,000	-33,8713	-23,9567
	ASPIRINA	-5,84192*	1,61567	,026	-10,7992	-,8846
ASPIRINA	EXTRACTO DE HOJAS	-23,07209*	1,61567	,000	-28,0294	-18,1148
	EXTRACTO DE FLORES	5,84192*	1,61567	,026	,8846	10,7992

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

Gráfico 2P

IINHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN				
HSD Tukey ^a				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
EXTRACTO DE FLORES	3	68,2679		
ASPIRINA	3		74,1098	
EXTRACTO DE HOJAS	3			97,1819
Sig.		1,000	1,000	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.				

Anexo Q. Prueba pos hoc (Tukey) para el ensayo citotóxico del tratamiento frente a las concentraciones utilizadas (Gráfico 1Q) y prueba pos hoc (Tukey) para la formación de los niveles que presentan a un mismo grupo de concentraciones (Gráfico 2Q).

Gráfico 1Q

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Porcentaje de viabilidad celular						
HSD Tukey						
(I) Concentración utilizada	(J) Concentración utilizada	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
12,50	25,00	14,9878*	1,06712	,000	11,7946	18,1810
	50,00	36,3480*	1,06712	,000	33,1547	39,5412
	100,00	42,4421*	1,06712	,000	39,2489	45,6353
	200,00	45,8414*	1,06712	,000	42,6482	49,0346
25,00	12,50	-14,9878*	1,06712	,000	-18,1810	-11,7946
	50,00	21,3602*	1,06712	,000	18,1670	24,5534
	100,00	27,4543*	1,06712	,000	24,2611	30,6475
	200,00	30,8536*	1,06712	,000	27,6604	34,0469
50,00	12,50	-36,3480*	1,06712	,000	-39,5412	-33,1547
	25,00	-21,3602*	1,06712	,000	-24,5534	-18,1670
	100,00	6,0941*	1,06712	,000	2,9009	9,2874
	200,00	9,4935*	1,06712	,000	6,3002	12,6867
100,00	12,50	-42,4421*	1,06712	,000	-45,6353	-39,2489
	25,00	-27,4543*	1,06712	,000	-30,6475	-24,2611
	50,00	-6,0941*	1,06712	,000	-9,2874	-2,9009
	200,00	3,3993*	1,06712	,033	,2061	6,5925
200,00	12,50	-45,8414*	1,06712	,000	-49,0346	-42,6482
	25,00	-30,8536*	1,06712	,000	-34,0469	-27,6604
	50,00	-9,4935*	1,06712	,000	-12,6867	-6,3002
	100,00	-3,3993*	1,06712	,033	-6,5925	-,2061
El término de error es la media cuadrática (Error) = 3,416.						
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.						

Gráfico 2Q

Porcentaje de viabilidad celular						
HSD Tukey ^{a,b}						
Concentraciones utilizadas	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
200,00	6	31,0361				
100,00	6		34,4354			
50,00	6			40,5296		
25,00	6				61,8898	
12,50	6					76,8775
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.						
Se basa en las medias observadas.						
El término de error es la media cuadrática (Error) = 3,416.						
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.						
b. Alfa = ,05.						