



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA Y  
CITOTÓXICA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS  
DE *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.”**

#### **TRABAJO DE TITULACIÓN**

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar el grado académico de:

#### **BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA:** TANNIA BERSABE TOAPANTA IZA

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

RIOBAMBA-ECUADOR

2018

©2018, Tannia Bersabe Toapanta Iza

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 experimental: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.” de responsabilidad de la señorita egresada Tannia Bersabe Toapanta Iza, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Renato Vinueza Tapia, M.Sc. ....

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, M.Sc. ....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, TANNIA BERSABE TOAPANTA IZA, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este presente Trabajo de Titulación y el Patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Tannia Bersabe Toapanta Iza

## **DEDICATORIA**

Al culminar mi carrera profesional, con la exposición de este trabajo de titulación, pienso que es oportuno dedicar mi esfuerzo a Dios por ser mi guía y bendecirme en esta etapa de mi vida.

A mi hija Naidelyn Arianna, tesoro más valioso de mi vida, fuente de mi inspiración y superación.

A mis padres Carmita y Homero quienes sin desmayar me dieron su apoyo absoluto e incondicional.

A mis hermanos Jeaneth, Liliana, Gilson Daniel y Lady quienes siempre han estado a mi lado brindándome su cariño, paciencia y confianza para poder finalizar una nueva meta propuesta.

A mi esposo Jefferson quien me ha brindado su apoyo y ha compartido mis tristezas y alegrías.

Tannia

## **AGRADECIMIENTO**

Al concluir mi trabajo de titulación, me permito agradecer a Dios porque me ha concedido la dicha de estar con vida y poder alcanzar este nuevo logro en mi vida.

A la ESPOCH, Carrera de Bioquímica y Farmacia, autoridades, docentes y técnicos de laboratorios por las instrucciones y conocimientos brindados.

Al BQF. Diego Renato Vinueza Tapia, M.Sc., Director de mi trabajo de titulación por todo el tiempo, paciencia, conocimiento y experiencia compartido para la realización de este trabajo de titulación.

A BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonila, M.Sc. por su paciencia y ayuda durante la ejecución de la investigación.

A mis padres, hermanos, abuelos, tíos, amigos y demás quienes contribuyeron tanto en lo económico como amor entregado para poder vencer cada una de las adversidades encontradas en el transcurso de mi carrera.

Tannia

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	XV
ABSTRACT .....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	1

### CAPÍTULO I

<b>1</b>	<b>MARCO TEÓRIO.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Familia Asteraceae .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Género Baccharis.....</b>	<b>4</b>
1.2.1	Usos del género Baccharis.....	4
<b>1.3</b>	<b>Especie <i>Baccharis genistelloides</i>.....</b>	<b>5</b>
1.3.1	Distribución .....	5
1.3.2	Clasificación taxonómica.....	5
1.3.3	Hábitat .....	5
1.3.4	Características botánicas.....	6
1.3.5	Composición química .....	6
1.3.6	Usos .....	6
1.3.7	Parte utilizable y preparación .....	8
<b>1.4</b>	<b>Inflamación.....</b>	<b>8</b>
1.4.1	Fases de la inflamación.....	9
1.4.1.1	<i>Liberación de mediadores.</i> .....	10
1.4.1.2	<i>Efectos de los mediadores</i> .....	10
1.4.1.3	<i>Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio</i> .....	10
1.4.1.4	<i>Regulación de la respuesta inflamatoria</i> .....	11
1.4.1.5	<i>Reparación</i> .....	11
1.4.2	Rol de las isoenzimas de la ciclooxigenasa (COX) en la inflamación .....	12
<b>1.5</b>	<b>Terapia anti-inflamatoria .....</b>	<b>12</b>
1.5.1	Terapia convencional.....	12
1.5.1.1	<i>Medicamentos Anti-inflamatorios Esteroideos o Glucocorticoides</i> .....	13
1.5.1.2	<i>Analgésicos, Antipiréticos, Anti-inflamatorios no Esteroideos (AINES)</i> .....	13
1.5.2	Fitoterapia.....	14
1.5.3	Compuestos fenólicos.....	15
1.5.3.1	<i>Flavonoides</i> .....	15
<b>1.6</b>	<b>Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> .....</b>	<b>17</b>

<b>1.7</b>	<b>Actividad antioxidante</b> .....	18
1.7.1	Radicales libres.....	18

## **CAPÍTULO II**

<b>2</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	19
<b>2.1</b>	<b>Lugar de la investigación</b> .....	19
<b>2.2</b>	<b>Identificación del material vegetal y recolección de la muestra vegetal</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Tipo de investigación</b> .....	19
<b>2.4</b>	<b>Materiales, reactivos y equipos</b> .....	20
2.4.1	Material vegetal .....	20
2.4.2	Material biológico.....	20
<b>2.5</b>	<b>Técnicas y Métodos</b> .....	22
2.5.1	Preparación de la muestra.....	22
2.5.2	Parámetros de control de la calidad de la droga cruda .....	23
2.5.2.1	<i>Determinación de cenizas totales</i> .....	23
2.5.2.2	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i> .....	23
2.5.2.3	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido</i> .....	24
2.5.2.4	<i>Determinación del contenido de humedad (Método gravimétrico)</i> .....	25
2.5.3	Tamizaje fitoquímico.....	25
2.5.3.1	<i>Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner (alcaloides)</i> .....	27
2.5.3.2	<i>Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner (alcaloides)</i> .....	27
2.5.3.1	<i>Ensayo de Baljet (coumarinas y lactonas)</i> .....	29
2.5.3.1	<i>Ensayo de Borntrager (quinonas)</i> .....	29
2.5.3.2	<i>Ensayo de Liebermann-Burchard (triterpenos y/o esteroides)</i> .....	29
2.5.3.3	<i>Ensayo de la espuma (saponinas)</i> .....	29
2.5.3.4	<i>Ensayo de catequinas</i> .....	30
2.5.3.5	<i>Ensayo de resinas</i> .....	30
2.5.3.6	<i>Ensayo de Fehling (azúcares reductores)</i> .....	30
2.5.3.7	<i>Ensayo del cloruro férrico (compuestos fenólicos y/o taninos)</i> .....	30
2.5.3.8	<i>Ensayo de la ninhidrina (aminoácidos)</i> .....	30
2.5.3.9	<i>Ensayo de Shinoda (flavonoides)</i> .....	31
2.5.3.10	<i>Ensayo de Kedde (glicósidos cardiotónicos)</i> .....	31
2.5.3.11	<i>Ensayo de antocianidinas</i> .....	31
2.5.3.12	<i>Ensayo de mucílagos</i> .....	31
2.5.3.13	<i>Ensayo de principios amargos y astringentes</i> .....	31
2.5.4	Control de calidad del extracto hidroalcohólico .....	32

2.5.4.1	<i>Determinación de los requisitos organolépticos</i> .....	32
2.5.4.2	<i>Determinación de la densidad relativa</i> .....	32
2.5.4.3	<i>Determinación del índice de refracción</i> .....	33
2.5.4.4	<i>Determinación del pH</i> .....	33
2.5.4.5	<i>Determinación de los sólidos totales</i> .....	33
2.5.4.6	<i>Cuantificación de flavonoides totales</i> .....	34
2.5.4.7	<i>Cuantificación de fenoles totales</i> .....	34
2.5.4.8	<i>Determinación de actividad antioxidante</i> .....	34
2.5.4.9	<i>Ensayo anti-inflamatorio in vitro</i> .....	35
2.5.4.10	<i>Ensayo citotóxico in vitro</i> .....	36

### **CAPÍTULO III**

<b>3</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Control de calidad de la droga cruda</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Tamizaje fitoquímico</b> .....	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Control de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>B. genistelloides</i></b> .....	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>Cuantificación de flavonoides por método colorimétrico</b> .....	<b>40</b>
<b>3.5</b>	<b>Cuantificación de fenoles totales</b> .....	<b>41</b>
<b>3.6</b>	<b>Actividad antioxidante</b> .....	<b>42</b>
<b>3.7</b>	<b>Actividad anti-inflamatoria <i>in vitro</i></b> .....	<b>43</b>
<b>3.8</b>	<b>Actividad citotóxica <i>in vitro</i></b> .....	<b>45</b>

<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>47</b>
---------------------------	-----------

<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>48</b>
------------------------------	-----------

### **BIBLIOGRAFÍA**

### **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1</b>	Clasificación taxonómica de <i>Baccharis genistelloides</i> (Lam.) Pers.....	5
<b>Tabla 2-1</b>	Signos y marcadores de la inflamación a corto plazo.....	8
<b>Tabla 3-1</b>	Clasificación de los Tipos de Inflamación.....	11
<b>Tabla 1-2</b>	Materiales empleados en la evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica <i>in vitro</i> .....	20
<b>Tabla 2-2</b>	Reactivos empleados en la evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica <i>in vitro</i> .....	21
<b>Tabla 3-2</b>	Equipos empleados en la evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica <i>in vitro</i> .....	22
<b>Tabla 4 -2</b>	Esquema para el ensayo de actividad anti-inflamatorio <i>in vitro</i> .....	36
<b>Tabla 5-2</b>	Esquema para el ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> .....	37
<b>Tabla 1-3</b>	Resultados del control de calidad de la droga cruda de hojas de <i>Baccharis genistelloides</i> (Lam.) Pers. ....	38
<b>Tabla 2-3</b>	Resultados de Tamizaje fitoquímico de droga cruda de <i>Baccharis genistelloides</i> (Lam.) Pers. ....	39
<b>Tabla 3-3</b>	Resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Baccharis genistelloides</i> Lam. Pers.....	40
<b>Tabla 4-3</b>	Resultados de cuantificación de flavonoides totales, obtenidos por espectrofotometría. ....	41
<b>Tabla 5-3</b>	Resultados de cuantificación de fenoles totales, obtenidos por espectrofotometría. ....	42
<b>Tabla 6-3</b>	Resultados de porcentaje de captación de radicales libres de <i>B. genistelloides</i> . ....	43
<b>Tabla 7-3</b>	Resultado de IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la actividad antioxidante de mediante el método DPPH.....	43
<b>Tabla 8-3</b>	Resultados de actividad anti-inflamatoria <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico <i>B. genistelloides</i> .....	44
<b>Tabla 9-3</b>	Resultados de viabilidad celular <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico <i>B. genistelloides</i> .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1</b> <i>Baccharis genistelloides</i> (Lam.) Pers. ....	6
<b>Figura 2-1</b> Funciones de las enzimas COX-1 y COX-2 en la inflamación .....	12
<b>Figura 3-1</b> Estructura básica de los flavonoides.....	15
<b>Figura 4-1</b> Clasificación y estructura de los flavonoides .....	16
<b>Figura 5-1</b> Descripción de los flavonoides que tienen propiedades antimicrobianas. ....	16
<b>Figura 1-2</b> Obtención del extracto etéreo, alcohólico y acuoso para el Tamizaje fitoquímico ..	26
<b>Figura 2-2</b> Esquema de las reacciones a ejecutar en el extracto de etéreo. ....	26
<b>Figura 3-2</b> Esquema de las reacciones a ejecutar en el extracto alcohólico .....	28
<b>Figura 4-2</b> Esquema de las reacciones a efectuar en el extracto acuoso .....	28

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3</b> Porcentaje de actividad antioxidante del extracto de hojas de hidroalcohólico de <i>B. genistelloides</i> .....	42
<b>Gráfico 2-3</b> Actividad anti-inflamatoria <i>in vitro</i> de <i>B. genistelloides</i> y Ácido acetilsalicílico ..	45
<b>Gráfico 3-3</b> Actividad citotóxica <i>in vitro</i> de <i>B. genistelloides</i> y Ácido acetilsalicílico .....	46

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo A:** Recolección y preparación del material vegetal

**Anexo B:** Control de calidad de las hojas de *Baccharis genistelloides*

**Anexo C:** Tamizaje fitoquímico

**Anexo D:** Control de calidad del extracto hidroalcohólico

**Anexo E:** Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

**Anexo F:** Determinación de actividad antioxidante

**Anexo G:** Determinación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro*

**Anexo H:** Análisis estadístico de la actividad anti-inflamatoria *in vitro*

**Anexo I:** Certificado de identificación botánica de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.

**Anexo J:** Patente no comercial de flora silvestre

**Anexo K:** Guía de movilización interna de especímenes de flora silvestre

**Anexo L:** Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos firmado entre el MAE y la ESPOCH asignado con el número MAE-DNB-CM-2018-0086 y con número de orden de movilización 024-2018-UPN-VS-DPAL-MAE.

## **GLOSARIO**

**°C:** Grado Celsius

**μL:** Microlitros

**μg:** Microgramos

**ACTH:** Hormona adrenocorticotropa

**AINES:** Antiinflamatorios no esteroideos

**COXIB:** Anti-inflamatorios no esteroideos actúan específicamente en COX-2

**Cox-1:** Ciclooxygenasa-1

**Cox-2:** Ciclooxygenasa-2

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DPPH:** 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

**E.H:** Extracto hidroalcohólico

**GA:** Ácido gálico

**IC50:** Concentración inhibitoria media

**mEq:** Miliequivalente

**mL:** Mililitros

**nm:** Nanómetros

**PG:** Prostaglandina

**QE:** Quercetina

**RFE:** Real Farmacopea Española

**RPM:** Revoluciones por minuto

**WST-1:** Cell proliferation reagent

## RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. El material vegetal fue recolectado en la Provincia de Loja. El extracto fue obtenido por maceración usando etanol al 70% como solvente, y posteriormente se concentró y liofilizó, siguiendo un procedimiento estándar. El tamizaje fitoquímico indicó la presencia de flavonoides, alcaloides, triterpenos, saponinas y taninos entre los más representativos. El extracto liofilizado de hojas de *B. genistelloides* presentó 504.82 mgQE/g de flavonoides y 225.76 mgGA/g de fenoles totales. La actividad antioxidante se evaluó mediante el método DPPH, en términos de IC<sub>50</sub> se obtuvo un valor de 303.28 µg/mL. Las actividades anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro* fueron analizadas empleando la sal de tetrazolio (WST-1) sobre neutrófilos aislados. Los resultados obtenidos muestran que *Baccharis genistelloides* a una concentración de 200 µg/mL presenta 69.18% ± 2.99 de inhibición inflamatoria, siendo superior al estándar (ácido acetilsalicílico) que obtuvo un valor de 54.59% ± 1.67. En la evaluación de la citotoxicidad expresada como porcentaje de viabilidad celular se obtuvieron valores superiores en el caso de *Baccharis genistelloides* respecto al estándar (ácido acetilsalicílico) utilizado. Se recomienda realizar estudios *in vivo* para probar la eficacia y seguridad de este interesante producto natural.

**Palabras clave:** <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <MANO DE DIOS (*Baccharis genistelloides*)>, <SAL DE TETRAZOLIO (WST-1)>, <ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA>, <ACTIVIDAD CITOTÓXICA>, <ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE>.

## ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the anti-inflammatory and *in vitro* cytotoxic activity of the hydroalcoholic extract of *Baccharis genistelloides* leaves (Lam.) Pers. The vegetal material was collected in the Loja province. The extract was obtained by maceration using 70% ethanol as solvent and subsequently it was concentrated and lyophilized, following a standard procedure. The phytochemical screening indicated the presence of flavonoids, alkaloids, triterpenes, saponins and tannins among the most representative. The lyophilized extract of *B. genistelloides* leaves showed 504.82mgQE/g of flavonoids and 372.04mgGA/g of total phenols. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH method, in terms of IC<sub>50</sub> a value of 303.28µg/mL was obtained. The anti-inflammatory and *in vitro* cytotoxic activities were analyzed using the tetrazolium salt (WST-1) on isolated neutrophils. The results show that *Baccharis genistelloides* at a concentration of 200 µg/mL presents 69.18%± 2.99 of inflammatory inhibition, being superior to the standard (acetylsalicylic acid) that obtained a value of 54.59%±1.67. In the evaluation of the cytotoxicity expressed as percentage of cellular viability, higher values were obtained in the case *Baccharis genistelloides* with respect to standard (acetylsalicylic acid) used. It is recommended to conduct *in vitro* studies to test the efficacy and safety of this interesting natural product.

**Key Words:** <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <HAND OF GOD (*Baccharis genistelloides*)>, <TETRAZOLIUM SALT>, <ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY>, <ANTIOXIDANT ACTIVITY >.

## INTRODUCCIÓN

El Ecuador es un país diverso que posee miles de especies vegetales con pocos estudios que determinen sus actividades terapéuticas, por lo que se busca generar una nueva alternativa terapéutica para tratar las enfermedades inflamatorias mediante un proyecto de investigación que evalúa la actividad anti-inflamatoria del extracto hidroalcohólico *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers., a la vez que se dará cumplimiento con el del Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017 Objetivo 3 que dice “Mejorar la calidad de vida de la población”(SENPLADES 2013-2017, pp. 135).

En la actualidad, la mayoría de los estudios efectuados sobre la evaluación de la actividad anti-inflamatoria de ciertas plantas medicinales, han constituido un gran aporte para la farmacología lo que permite el desarrollo de distintos fármacos que presenten características anti-inflamatorias, que mejoran la calidad de vida de los pacientes; siendo estos económicos, seguros y con gran potencial terapéutico, a la vez aportan a la matriz productiva de nuestro país ya que se industrializaría nuevos productos naturales permitiendo generar desarrollo, bienestar y progreso de la ciudadanía (Aguilar et al. 2007, pp. 2-7).

Estos nuevos fitofármacos ayudan a controlar, prevenir y tratar este tipo de dolencias sin la presencia de mayores efectos colaterales que ocasionan los medicamentos comercializados actualmente para tratar la inflamación, como por ejemplo el consumo habitual y prolongado de medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) que afecta a una gran cantidad de población (Bannwarth 2006, pp. 1-6).

En conjunto, los AINES ocupan un lugar destacado en las ventas de medicamentos, con más de 40 millones de envases vendidos aproximadamente, según datos de establecimientos sanitarios; siendo los más usados los tradicionales (naproxeno, ibuprofeno o diclofenaco) y los anti-inflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (Cox2); aunque también se encuentran en esta denominación los COXIB y el ácido acetilsalicílico (Martínez & Garridoa 2013, pp. 41-53).

El estudio estima que el gasto directo asociado con complicaciones gastrointestinales relacionadas con el uso de los AINES se encuentra entre 1.800-8.500 dólares por pacientes y hospitalización; mientras que en la población de la tercera edad los costes médicos asociados a los mismos eventos superan los 4.000 millones de dólares anuales (Gassull M. et al. 2007, pp 117-128).

Así, el primer objetivo de esta investigación es probar la actividad anti-inflamatoria que puede presentar la planta, dando un mayor valor terapéutico e integrar nuevas formas de utilización para tratar patologías inflamatorias, en la actualidad se usa para tratar dolencias del hígado (Mendoza, Z. & Yaguana, C. 2014, pp. 27-29).

Además, se ejecutó el estudio de la actividad citotóxica y anti-inflamatoria *in vitro* mediante el empleo de células sanguíneas (neutrófilos) que participan de forma directa en el proceso inflamatorio, método sensible debido a la exposición directa de las células; de igual forma se aprovecha el uso de métodos alternativos que no afecten la vida de biomodelos (Liu, X. et al. 2018, pp. 24-32).

El problema que motivo la presente investigación es: ¿Posee el extracto hidroalcohólico de hojas de (*Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.), actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro*?

El presente trabajo de titulación está estructurado de la siguiente:

Capítulo I: abarca información del marco teórico, temas necesarios para comprender acerca de la actividad anti-inflamatoria, antioxidante y citotóxica de *Baccharis genistelloides*, siendo oportuno y necesario recolectar información de libros, revistas y artículos científicos.

Capítulo II: se presenta la metodología necesaria para llevar a cabo esta investigación.

Capítulo III: contiene todos los resultados de los ensayos realizados en la investigación con sus respectivos análisis y teorías aportados por otros investigadores.

Finalmente, se expresan las conclusiones y recomendaciones que responden a los objetivos planteados inicialmente, resultados adquiridos y nuevos paradigmas que se presentaron durante todo el trabajo de titulación.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.

### **Objetivos específicos**

- Identificar la composición química del extracto hidroalcohólico de hojas *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. mediante tamizaje fitoquímico.
- Determinar el contenido de flavonoides totales y fenoles presente en el extracto hidroalcohólico de hojas de *B. genistelloides* (Lam.) Pers. mediante métodos colorimétricos.
- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers mediante el método DPPH´.
- Determinar la actividad anti-inflamatoria *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *B. genistelloides* (Lam.) Pers. sobre neutrófilos aislados.
- Determinar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *B. genistelloides* (Lam.) Pers., en términos de viabilidad celular.

## CAPÍTULO I

### 1 MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Familia Asteraceae

Su nombre proviene del vocablo latino “aster” que significa estrella y se refiere a la apariencia de estrella que presenta las inflorescencias. La familia Asteraceae está formada por hierbas, arbustos, árboles, que pueden ser trepadoras, rastreras o erectas (Freire A., 2004, pp. 95).

Las hojas pueden ser simples, compuestas, alternadas y/o espiraladas; opuestas o incluso pueden estar ausentes. Las inflorescencias están en disposición de capítulo o cabezuela, pueden ser hermafroditas o unisexuales. Muchos agentes como mariposas, colibríes, abejas, o el viento facilitan la polinización de esta familia (Freire A., 2004, pp. 95).

En el Ecuador están distribuidas en toda la región andina, se ha registrado alrededor de 217 géneros y 918 especies. La familia Asteraceae presenta gran valor económico a nivel de: ornamentación girasol (*Helianthus annuus* L.), alimentación la lechuga, (*Lactuca sativa* L.) y medicinal la chilca (*Baccharis latifolia*) (Balslev et al. 2016, pp, 219-234).

#### 1.2 Género Baccharis

El nombre del género *Baccharis* procede del vocablo griego “*Bakkaris*” asignado en honor a “Baco”, dios del vino, este género contiene más especies entre la familia Asteraceae; está constituido por aproximadamente 500 especies, exclusivos de América (Martínez, M. et al. 2018, pp.2-4).

Existe gran interés de investigación sobre éste género por su amplio uso en la medicina popular debido al contenido en metabolitos como flavonoides, di y triterpenos (Aguilar et al. 2007, pp. 14-16)

##### 1.2.1 Usos del género Baccharis

Los estudios de especies del género *Baccharis* de uso tradicional en Latinoamérica señalan que presentan principalmente flavonoides, flavonas, diterpenos labdanos y clerodanos; metabolitos

que les confiere actividad anti-inflamatoria, antioxidante, antifúngica, antileucémica, antiviral, espasmolítica y gastroprotectora (Martínez, S. et al. 2011, pp. 35-40 ).

### 1.3 Especie *Baccharis genistelloides*

#### 1.3.1 Distribución

*Baccharis genistelloides* se encuentra distribuida en Colombia, Bolivia, Perú, Ecuador y Chile. En Ecuador se localizan alrededor de los 1000 msnm a 4500 msnm (De F. Melo et al. 2001, pp. 33-38), en las provincias de Azuay, Zamora Chinchipe, Bolívar, Tungurahua, Cañar, Sucumbíos, Carchi, Chimborazo, El Oro, Cotopaxi, Pichincha, Imbabura, Loja, Napo y Morona Santiago (Mendoza, Z. & Yaguana, C. 2014, pp. 27-29).

#### 1.3.2 Clasificación taxonómica

**Tabla 1-1** Clasificación taxonómica de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.

Reino	<i>Plantae</i>
División	Magnoliophyta
Clase	Magnolipsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Baccharis</i>
Especie	<i>B. genistelloides</i>
Nombres comunes	mano de dios, chilca de cerro.

Fuente: <http://www.tropicos.org/Name/2722899>

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

#### 1.3.3 Hábitat

Habita en bosque montano, matorrales andinos, también pueden crecer en suelos arcillosos, arenosos o pobre en nutrientes con cualquier tipo de pH; sin embargo, prefiere un suelo húmedo y puede tolerar la sequía (Justil, H. & Arroyo, J. 2010, pp. 88-96).

### 1.3.4 Características botánicas

Es una planta terrestre perenne verde, mide de 30 cm hasta 2 metros de altura, cuando hay presencia de sombra puede transformarse en trepadora. Sus hojas son de color verde-amarillento, los tallos son aplanados y con segmentos alados. Flores agrupadas en inflorescencias en forma de capítulos solitarios y/o agrupados color blanco-verdoso, localizadas a lo largo del tallo. Frutos son aquenios de color negro con pequeñas semillas. Es polinizado por insectos y abejas (Mendoza, Z. & Yaguana, C. 2014, pp. 27-29).



**Figura 1-1** *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.

Fuente: ( Mendoza, Z. & Yaguana, C. 2014., pp. 28 )

### 1.3.5 Composición química

La planta contiene hasta 20% de flavonoides, principales componentes activos, incluyendo luteolina, quercetina, nepetin, hispidulina y apigenina (Kuroyanagu et al. 1997, 415-434).

### 1.3.6 Usos

A continuación, se detalla sus diferentes usos:

#### *Alimento de los vertebrados y apícola*

Empleado como forraje del ganado vacuno, equino y otros cuadrúpedos. Apícola: las abejas llegan a las flores de esta especie ( Mendoza, Z. & Yaguana, C. 2014 pp. 29 ).

## *Social*

En el pueblo kichwa de la provincia de Loja, la planta completa es usada para sanar a los niños asustados.

## *Aditivos de los alimentos*

Se aprovecha en la elaboración de quesos (hace más acida la leche) junto con el tercer estómago del becerro, sal y lima (de la Torre et al. 2008 pp. 96).

## *Usos medicinales*

La planta ha adquirido la historia de uso medicinal en las poblaciones nativas de América Latina, donde es apreciada por la efectividad sobre el sistema digestivo (Tapia J. 2004, pp 1-4).

Su actividad medicinal se debe principalmente a los flavonoides, se emplea como antirreumático, colagogo, para curar enfermedades del hígado bebiendo el té dos veces cada día, mientras que para dolores reumáticos se tritura hojas y se realiza frotaciones. Es usado como antihelmíntico y antiulceroso así como para tratar la influenza (Abad et al. 1999, pp. 499-503).

Una investigación ha demostrado que presentan efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos, exclusivamente la quercetina ha mostrado tener efecto antioxidante y anticancerígeno (Justi, H. & Arroyo, J.2010, pp 88-96).

Publicaciones en América del Sur sobre hierbas medicinales, incluyen a *B. genistelloides* ya que es tan efectiva para los trastornos estomacales y es antitérmica. En Brasil se emplea para tratar malaria, trastornos digestivos, diabetes, anemia, diarrea, úlceras, dolor de garganta, angina, indigestión, lombrices intestinales, inflamación urinaria, y lepra (De F. Melo et al. 2001, pp. 33-38).

También se describe un nuevo efecto terapéutico antiartrítico del extracto acuoso de *B. genistelloides* (AEBg) usando el modelo de artritis inducida por colágeno (Coelho et al. 2004, pp. 69-80).

Además, en las zonas andinas se emplea para aliviar la inflamación de riñones y bajar el azúcar de la sangre. La infusión del tallo con aguardiente se emplea como vermífugo y anestésico

(Mendoza, Z. & Yaguana, C. 2014 pp 29). Anti-inflamatorio hepático y renal y en el tratamiento de litiasis biliar ( Galán de Mera, A. & Sánchez I., 2013 pp. 23-27, 31).

### 1.3.7 Parte utilizable y preparación

Se usa toda la planta en cocción (30g/l de agua). Se bebe máximo por nueve días, se puede tomar por tres ocasiones con un intervalo de 30 días ( Mendoza, Z. & Yaguana, C. 2014 pp. 29.).

## 1.4 Inflamación

La reacción inflamatoria es una respuesta defensiva local, puede ser causado por irritantes químicos como compuestos orgánicos o inorgánicos, agentes físicos, toxinas de bacterias, replicación intracelular de virus, reacciones de hipersensibilidad o por infección microbiana. Con este proceso se intenta eliminar los agentes nocivos y tejido dañado con el objetivo de iniciar la curación de heridas. Esto se consigue mediante un proceso de señales químicas que promueven a los leucocitos sanguíneos y los tejidos circundantes inicien el proceso de curación (Attaur et al, 2009, pp. 709).

En ocasiones, la respuesta inflamatoria no es suficiente, los irritantes perduran en los tejidos y la inflamación se vuelve crónica. En estas situaciones la inflamación puede ocasionar más daño que beneficio y los tejidos circundantes sufren un ataque bioquímico y las articulaciones sufren erosión proteolítica llegando a convertirse en enfermedades artríticas. La mayoría de los tratamientos anti-inflamatorios buscan reducir este proceso y otros pocos tratan los síntomas en lugar de erradicar las causas (Attaur et al, 2009, pp. 709-711).

**Tabla 2-1** Signos y marcadores de la inflamación a corto plazo.

<i>CARACTERÍSTICA</i>	<i>MECANISMOS</i>	<i>INICIADORES</i>
Eritema (enrojecimiento)	Vasos sanguíneos dilatados	Histamina
Calor	Incremento del flujo sanguíneo	Vasodilatadores naturales
	Fiebre	pirógenos, PGE <sub>2</sub>
Hinchazón (edema)	Fugas en la microvasculatura	Histamina
	Flujo linfático reducido	Factores de coagulación

Dolor	Muchos	Péptidos de plasma (cininas) Neuropéptidos Amplificación por PGE <sub>2</sub>
Pérdida de función	Dolor agudo, edema Cicatrización por ejemplo formación de granuloma	Proteasas/ leucocitos Factores fibrogénicos (citoquinas)

Fuente: (Attaur et al, 2009, pp. 708)

Elaborado por: Tannia Toapanta, 2018

Cuando se produce una agresión de cualquier tipo, las arteriolas se contraen evitando la pérdida de sangre, por otro lado, los vasos sanguíneos más pequeños se dilatan aumentando el flujo sanguíneo y la permeabilidad del tejido vascular permitiendo la salida de los factores de defensa. Si mencionado proceso no se genera hasta eliminar en su totalidad los agentes nocivos, se produce una inflamación crónica.

#### **1.4.1 Fases de la inflamación**

A continuación se detalla las fases que incluye el proceso de inflamación: (Abbas et al. 2015, pp. 8-9.) (Cuenca A. et al. 2002, 223-235).

1. Liberación de mediadores. Son moléculas liberadas y sintetizadas por el mastocito.
2. Efecto de los mediadores: estas moléculas (liberadas) causan efectos quimiotácticos y modificaciones vasculares que permiten el ingreso al foco inflamatorio las moléculas y células inmunes.
3. Llegada al foco inflamatorio: Actúan células y moléculas de la sangre y de las zonas circundantes al foco.
4. Regulación del proceso inflamatorio: conformada por una cadena de mecanismos que inhiben, finalizan o equilibran el proceso.
5. Reparación. Fenómenos que realizan reparación total o parcial de los tejidos.

#### 1.4.1.1 Liberación de mediadores.

La fuente de liberación de mediadores es el mastocito (célula inmune inespecífica procedente de la médula ósea) contiene gránulos con mediadores de la inflamación en el citoplasma que son liberados una vez que se activa por la agresión provocada por el agente lesivo

El ácido araquidónico tiende a seguir dos rutas 1) de la enzima ciclo oxigenasa (produce prostaglandinas y tromboxanos); 2) de la lipooxigenasa (formación de leucotrienos).

#### 1.4.1.2 Efectos de los mediadores

Mediadores preformados

- Histamina. se encuentra principalmente en el mastocito y basófilo actúa sobre receptores  $H_2$ , produce efectos de inhibición o regulación de la inflamación.
- Enzimas proteolíticas. La kininogenasa actúan en las proteínas llamadas kininógenos, generando péptidos más pequeños (kininas), que provocan vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular
- Heparina. Al impedir la coagulación, beneficia el ingreso de células hacia el foco inflamatorio.

Mediadores sintetizados de *novo*

- $PGE_2$ . (prostaglandina  $E_2$ ) provoca vasodilatación y dolor.
- $LTB_4$ . factor quimiotáctico para leucocitos (eosinófilos, neutrófilos), mastocitos y macrófagos.
- Factor activador de plaquetas. Cumple actividades de activación de plaquetas, aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación y activador de neutrófilos.

#### 1.4.1.3 Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

En la fase inicial se produce alteraciones vasculares que proporcionan el traslado de moléculas al foco inflamatorio y generación de edema. En una segunda fase, las alteraciones vasculares y liberación de factores quimiotácticos establecen el ingreso de células inmunes al foco infeccioso.

#### 1.4.1.4 Regulación de la respuesta inflamatoria

El proceso inflamatorio es regulado para evitar una respuesta perjudicial.

#### 1.4.1.5 Reparación

El proceso de reparación promueve la llegada de fibroblastos (zona afectada) que van sintetizar colágeno y proliferar células epiteliales y vasos sanguíneos.

**Tabla 3-1** Clasificación de los Tipos de Inflamación

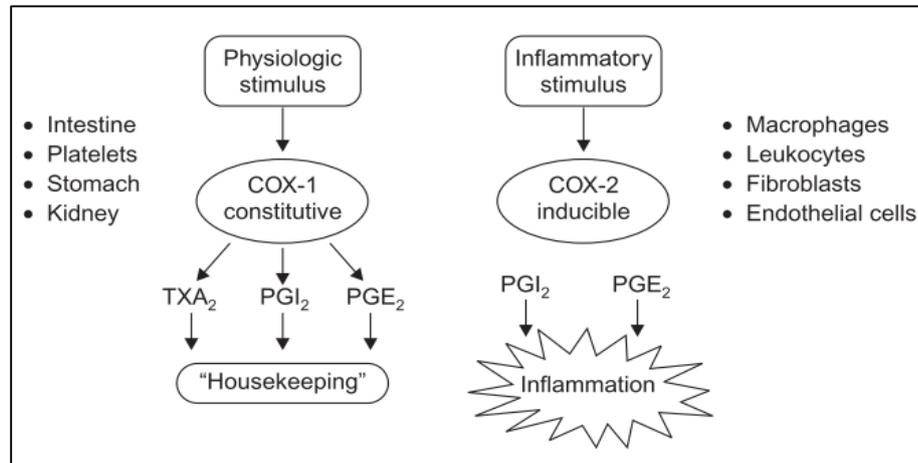
TIPOS DE INFLAMACIÓN		DEFINICIÓN
Por la duración	Inflamación Aguda	Tiene corta duración, da una respuesta inmediata frente al agente perjudicial induciendo el desplazamiento de leucocitos (neutrófilos).
	Inflamación Crónica	Presenta larga permanencia (semanas o meses), implica la presencia de linfocitos y macrófagos y propagación de fibrosis y necrosis.
Por la localización	Focales	Ocasionadas por las infecciones producidas en zonas y órganos específicos.
	Diseminadas	Se da expansión de las inflamaciones persistentes, mediante vía canalicular, fistulización o metástasis.
	Infecciosas	Inducida por microorganismos patógenos como bacterias, parásitos, virus, o por toxinas microbianas.
Por la etiología	Traumática	Producida por golpes agudos, acontece con los esguinces.
	Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad	Producidas por alérgenos comunes.
	Irradiaciones	Dado por exposición a agentes químicos y ambientales que provocan este tipo de energía.
	Necrosis tisular	Puede darse por la presencia de cuerpos extraños.

Fuente:(Villalba, E. 2014, pp. 2261-2664)

Elaborado por: Tannia Toapanta, 2018

### 1.4.2 Rol de las isoenzimas de la ciclooxigenasa (COX) en la inflamación

Se han identificado dos isoenzimas COX: COX-1 y COX-2.



**Figura 2-1** Funciones de las enzimas COX-1 y COX-2 en la inflamación

Fuente: (Nadendla, R. 2005, pp. 232)

## 1.5 Terapia anti-inflamatoria

### 1.5.1 Terapia convencional

Las drogas con acción anti-inflamatorias modifican la respuesta inflamatoria de las enfermedades, sin embargo, no son capaces de curar ni eliminar al agente causal. Por lo que se debe buscar un fármaco que no interfiera con la respuesta normal de la inflamación que forma parte del mecanismo de defensa del organismo (Martínez, E. & Garrido, O. 2013, pp 41-53).

Inicialmente, esteroides como: dexametasona, prednisolona, betametasona y la hidrocortisona eran considerados como fármacos de elección para tratar la inflamación. Sin embargo, han sido reemplazados por otros fármacos con menores efectos adversos y mayormente tolerados, AINEs (Anti-inflamatorio no esteroideo)(Muster, D. 2005, pp. 21-29).

Sobre la base de su estructura química básica de los medicamentos antiinflamatorios se clasifica en: (Attaur et al, 2009, pp. 709-711).

1. Derivados del ácido salicílico.
- 2 Derivados del ácido N-arilntranílico.
3. Derivados del ácido arilacético.

4. Derivados del ácido arilpropiónico.
5. Pirazolonas y pirazolodionas.
6. Varios medicamentos antiinflamatorios (Millikan, L. 2016, pp.103-108)

#### *1.5.1.1 Medicamentos Anti-inflamatorios Esteroideos o Glucocorticoides*

Hormonas anti-inflamatorias: La glándula suprarrenal (A) contiene dos órganos endocrinos, (i) la médula que secreta adrenalina en la sangre (epinefrina) y (ii) la corteza (porción externa) que secreta esteroides C<sub>21</sub> que regulan el metabolismo de los carbohidratos (glucocorticosteroides) y el balance mineral, particularmente excreción de K<sup>+</sup> (mineralcorticoides). La secreción de esteroides está bajo el control de otro órgano endocrino, la pituitaria (P) (situada en la base del cerebro) que libera corticotropina (ACTH). Esto a su vez está regulado por neuropéptidos liberados del hipotálamo (H).

Este llamado HPA a menudo es deficiente en pacientes con artritis reumatoide. Por consiguiente produce menos esteroides suprarrenales. Ensayos en animales de laboratorio, mediante la eliminación de las glándulas suprarrenales proporcionó información de que los esteroides C<sub>21</sub> podrían ser agentes anti-inflamatorios endógenos y su producción podría aumentar al inyectar ACTH (Villalba, E. 2014, pp713-721).

Los glucocorticoides se administran por vía tópica, oral o parenteral para tratar afecciones inflamatorias, pero se sabe que ejercen muchos efectos secundarios indeseables. Son considerados como los más potentes entre los anti-inflamatorios, debido a que actúan contra la inflamación por diversas vías (Chatwal, 2009, pp.225-230).

#### *1.5.1.2 Analgésicos, Antipiréticos, Anti-inflamatorios no Esteroideos (AINES)*

Los agentes anti-inflamatorios no esteroideos carecen de los efectos indeseables de los anti-inflamatorios esteroides debido a su diferente mecanismo de acción. Los AINES actúan mediante la inhibición de la ciclo-oxigenasa isoenzima 2, impidiendo la síntesis de prostaglandinas implicadas en el dolor y la inflamación; mientras que la isoenzima ciclo-oxigenasa 1 participa en síntesis de los prostanoides implicados en funciones constitucionales, como la gastroprotección (Dawson, J. & Hennell, S. 2007, pp.39-43).

En medicina, esta clase de drogas se emplean en el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos como: artritis, espondilitis anquilosante reumatoide y osteoartritis. Estas drogas son capaces de

aliviar los síntomas del dolor e inflamación que está asociada con la enfermedad. Los agentes anti-inflamatorios no esteroideos también poseen propiedades analgésicas y antipiréticas (reducen la temperatura en estados febriles) (Watson, R. 2013 pp. 2-15). Por lo tanto, estos agentes también se usan como analgésicos contra el dolor de intensidad baja a moderada. Además, estos agentes no provocan dependencia y carecen de los efectos no deseados como los opioides en el sistema nervioso central (Chatwal, 2009, pp.225-230).

## CLASIFICACIÓN DE ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)

Se pueden clasificar en función de la estructura química de la siguiente manera:

1. Salicilatos
2. Ácidos propiónicos (Profens)
3. Ácido arilo y heteroarilacético
4. Antranilatos (Fenamatos)
5. Oxicams ("Enol Acids")
6. Fenilpirazolonas (Nadendla, R. 2005, pp. 232-234).

- AINES no selectivos

Ibuprofeno, naproxeno (para el dolor agudo), diclofenaco.

- AINES selectivos de Cox-2

Celecoxib: (para osteoartritis), etoricoxib

### ***1.5.2 Fitoterapia***

Es parte de la terapéutica que permite disponer de medicamentos de origen natural para prevenir o curar una patología, habitualmente de leve o moderada severidad. De esta forma las plantas tienen un papel esencial en el ámbito sanitario en países en vías de desarrollo e inclusive en países industrializados desde los últimos años donde la población está interesada en optar por una terapia natural cuya materia prima son drogas vegetales o extractos (Martínez et al. 2011, pp. 35-36).

De esta forma el empleo de plantas medicinales ayuda a tratar la inflamación sin la presencia de mayores efectos secundarios, lo que constituye la principal ventaja ante la terapia convencional. Entre los compuestos responsables de la actividad anti-inflamatoria son compuestos fenólicos,

flavonoides, alcaloides, terpenos, saponinas y compuestos relacionados, lignanos, entre otros (Gómez, H. ; et al. 2011, pp. 182-2011).

### 1.5.3 Compuestos fenólicos

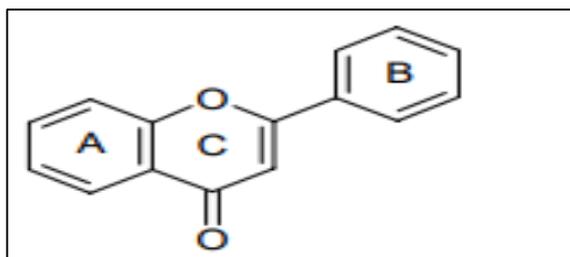
Los compuestos fenólicos constituyen una parte integral de la dieta humana, son considerados compuestos biológicamente activos (Fraga & Perez 2018, pp. 107-112). El conocimiento acerca de los radicales libres y su papel en el envejecimiento han despertado interés por conocer la actividad de los compuestos fenólicos. Una extensa gama de estudios demostraron que las propiedades antioxidantes podrían contrarrestar la aterosclerosis, enfermedad cardíaca y mostrar citotoxicidad selectiva hacia las células cancerígenas en la mama (Mulero, J. et al. 2015, pp. 25-31).

#### 1.5.3.1 Flavonoides

También son conocidos como bioflavonoides, se encuentran de forma natural en las plantas (metabolitos secundarios). Los flavonoides constituyen un importante grupo de polifenoles, existen aproximadamente 4.000 flavonoides (Singh, A. 2016 pp. 1-13).

Son nutrientes vegetales que, al consumir en forma de fruta o verdura, carecen de toxicidad. Los flavonoides son los responsables de los vibrantes colores, sabor y astringencia de flores y frutos de muchas plantas. También cumplen el rol de protección de las plantas contra los ataques de microbios e insectos (Nogueira-librelotto et al. 2016, pp. 326-335).

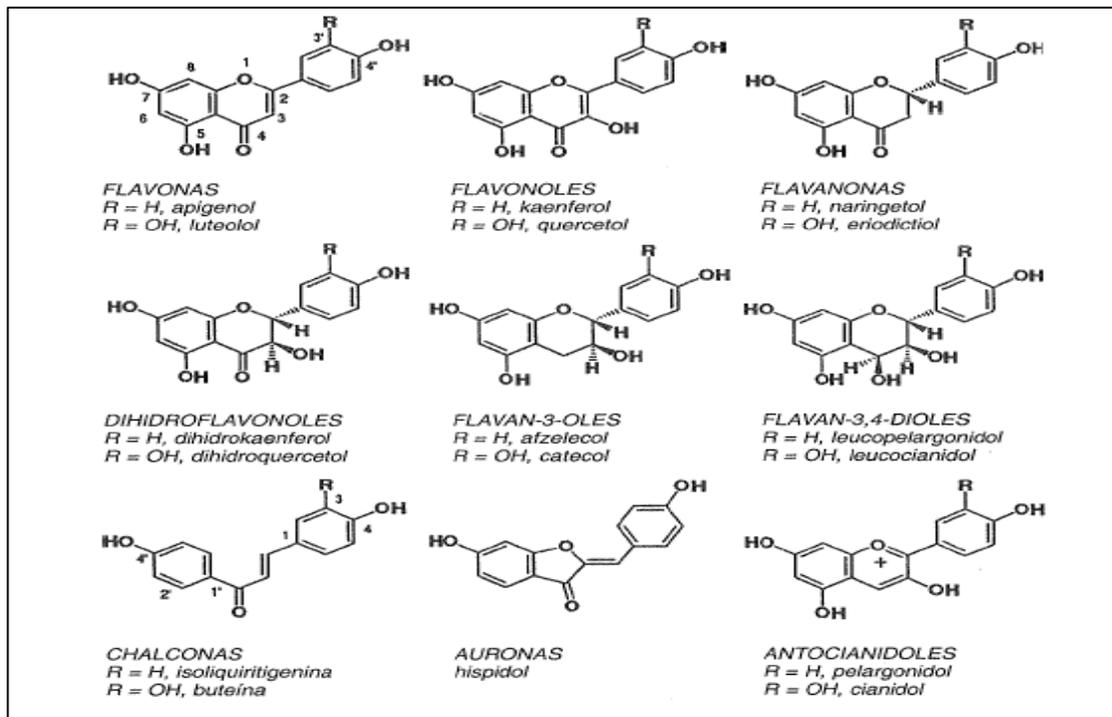
Los flavonoides son un gran grupo de compuestos derivados del benzo- $\gamma$ -pirano, presentan diversos grupos hidroxilos enlazados a C6-C3-C6, nominadas como A, B y C (Figura 3.1). Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución en el anillo B se subdividen en flavonas, flavononas, flavonoles, , flavanos, isoflavonas, auronas, chalconas y antocianinas (Figura 4.1) (Bruneton , J. 2001 pp. 306-324).



**Figura 3-1** Estructura básica de los flavonoides

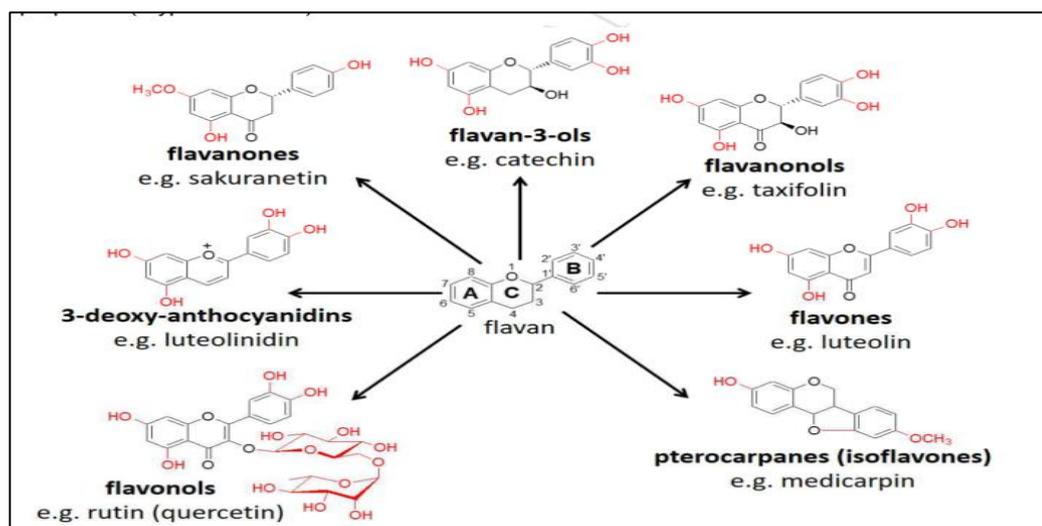
**Fuente:** (Bruneton , J. 2001 pp. 307)

Más importante aún, el consumo de alimentos que contienen flavonoides se ha relacionado con numerosos beneficios para la salud. Los flavonoides presentan actividad antioxidante, antimicrobiana (Figura 5.1 ), antiviral, anti-inflamatoria y muchas otras (Wei, M.; et al. 2018, pp. 2-10). Al ser compuestos polifenólicos, los flavonoides pueden actuar como antioxidantes mediante el mecanismo de eliminación de los radicales libres y quelación de iones metálicos (Saraswat, J. & Bhattacharya, P. 2013, pp. 125-140).



**Figura 4-1** Clasificación y estructura de los flavonoides

Fuente: (Bruneton , J. 2001 pp. 307)



**Figura 5-1** Descripción de los flavonoides que tienen propiedades antimicrobianas.

Fuente: (Schenke, D. et al. 2018, pp. 6)

Algunos flavonoides poseen notables efectos terapéuticos en las lesiones hepáticas causadas por diversos factores como el alcohol, drogas y productos químicos (captando radicales libres y especies reactivas de oxígeno); la acción hepatoprotectora de los flavonoides puede estar relacionada con su acción antioxidante y anti-inflamatorias (Wan, L. & Jiang, J. 2018, pp. 283-291).

Estudios observacionales describen que una dieta rica en flavonoides previene trastornos neurodegenerativos, protegen el cerebro del envejecimiento (bebiendo té verde y negro, rico en flavonoides), retarda la edad (espinaca o fresa) (Keller, RB 2016, pp. 2-23). El consumo de jugo de arándano silvestre mejora aspectos de la memoria y aprendizaje (en adultos mayores) además, reduce los síntomas depresivos y niveles de glucosa (Jaeger, B. et al. 2017pp.50-62).

Algunas investigaciones también indican que los flavonoides pueden ayudar a prevenir la caries dental y reducen la aparición de dolencias comunes como la gripe (Wei, M.; et al. 2018 pp. 2-10).

### **1.6 Ensayo de citotoxicidad *in vitro***

Se define citotoxicidad celular a la alteración de la función celular básica que conlleva a producir un daño que puede ser detectado. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* presentan alta sensibilidad en comparación con los estudios en animales, esto se da por la exposición directa de las células con el material que se prueba y la ausencia de los mecanismos biológicos que protegen a los órganos y tejidos *in vivo* (Liu, X. et al. 2018, pp. 24-32).

WST-1 (sal de tetrazolio soluble en agua) es un ensayo colorimétrico que permite la cuantificación no radioactiva de la viabilidad celular, proliferación celular y citotoxicidad de una solución que depende de las deshidrogenasas mitocondriales en células intactas (Braun et al. 2018, pp 28-34).

**Principio:** Las sales de tetrazolio débilmente coloreadas o incoloras, se reducen por medio de un mecanismo celular (producido en el exterior de la célula) a formazan de color amarillo oscuro, una sal soluble (Tan, A. & Berridge, M. 2018, pp.59-68). En este ensayo se deduce que la reducción del colorante es proporcional al número de células viables en la fase de crecimiento exponencial (proliferación celular) (Berridge, M. & Patries, H.2015, pp. 3-27).

Las células cultivadas en la microplaca de 96 pocillos se incuban con el reactivo WST-1, después del periodo de incubación se cuantifica el formazan formado con un espectrofotómetro de barrido múltiple. La absorbancia medida es directamente proporcional con la cantidad de células viables (Roche 2007, pp.1-4).

## **1.7 Actividad antioxidante**

### **1.7.1 Radicales libres**

Los radicales libres actúan en la regulación de la transducción de señales, expresión genética y activación de receptores. En los sistemas biológicos se encuentra especies de oxígeno reactivo (ROS) (superóxido, hidroxilo, hidroperóxido, peroxi, etc.) y especies de nitrógeno reactivo (RNS) (óxido nítrico (NO), peroxinitrito, etc) (Adaramoye & Olajuyin 2014, pp. 408-415).

Sin embargo, se conoce que el exceso de radicales produce toxicidad en el organismo, produciendo daño oxidativo a macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos. El exceso de generación de radicales libres puede inducir a cáncer, enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis e inflamación (Fidrianny, I. & Nurfitri, H. 2015, pp. 1525-1531).

El papel que desempeña los antioxidantes de las plantas medicinales es minimizar la generación de radicales libres y apaciguar padecimientos causados por el estrés oxidativo. Entre los compuestos que presentan actividad antioxidante tenemos a los polifenoles (flavonoides), su actividad se debe esencialmente a sus propiedades redox, pues actúan en la neutralización de radicales libres, extinción del oxígeno singulete y triplete y descomposición de peróxidos (Adaramoye & Olajuyin 2014, pp. 2-8).

El método para determinar la actividad antioxidante, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) se empleó para investigar la capacidad antioxidante de frutas frescas, bebidas y alimentos. Además, estudios revelaron que el método DPPH puede usarse para determinar la actividad antioxidante de extractos de plantas (Fidrianny et al. 2014, pp. 209-303).

## CAPÍTULO II

### 2 MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Lugar de la investigación

Ésta presente investigación se ejecutó en la en el laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.2 Identificación del material vegetal y recolección de la muestra vegetal

La muestra vegetal fue recogida en la Provincia de Loja, Cantón Loja, Tiro límite con el Parque Nacional Podocarpus.

En las siguientes coordenadas:

- Latitud: 9558068 Y
- Longitud: 704427W
- Altitud: 2487m s.n.m.

*Baccharis gensitelloides* (Lam.) Pers. fue identificada en el Herbario de la Universidad Nacional de Loja ubicado en la Provincia de Loja por el Ing. Zhofre Aguirre Mendoza.

Esta investigación se realizó dentro del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos firmado entre el MAE y la ESPOCH asignado con el número MAE-DNB-CM-2018-0086 y con número de orden de movilización 024-2018-UPN-VS-DPAL-MAE.

#### 2.3 Tipo de investigación

En este trabajo de titulación se realizó un estudio experimental que permitió evaluar la actividad anti-inflamatoria y citotóxica en neutrófilos aislados.

## 2.4 Materiales, reactivos y equipos

### 2.4.1 Material vegetal

2 muestras frescas de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. recolectas en la Provincia de Loja.

### 2.4.2 Material biológico

Neutrófilos aislados de pacientes sanos.

Para la ejecución de cada ensayo de la presente investigación se empleó los siguientes materiales, reactivos y equipos detallados a continuación:

**Tabla 1-2** Materiales empleados en la evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro*

ENSAYO	MATERIALES	
<b>Control de calidad de la droga cruda</b>	Crisoles de Porcelana	Reverbero
	Trípode	Cápsula de porcelana
	Triangulo de porcelana	Pipetas graduadas
	Papel filtro	
<b>Tamizaje fitoquímico</b>	Gradillas	Pinzas para tubos de ensayos
	Tubos de ensayo	Trípodes
	Frascos ámbar	Embudos
	Papel filtro	Pipetas graduadas
<b>Control de calidad del extracto hidroalcohólico</b>	Picnómetro	Cronómetro
	Varilla de vidrio	Piseta
<b>Cuantificación de flavonoides y fenoles totales</b>	Micropipeta de 100 y 1000 $\mu$ L	Papel Aluminio
	Balones de aforo de 25 y 100 mL	Tubos de ensayo
	Pipetas graduadas	Vasos de precipitación
<b>Actividad antioxidante</b>	Micropipeta de 100 y 1000 $\mu$ L	Tubos de ensayo
	Balones de aforo de 25 y 100 mL	Papel Aluminio
		Piseta
	Pipetas graduadas	Vasos de precipitación
	Cronómetro	

<b>Actividad anti-inflamatoria y citotóxica <i>in vitro</i></b>	Micropipeta de 10 y 1000µL	Vasos de precipitación
	Balones de aforo de 25, 200 y 1000 mL	Placa de micropocillos
	Pipetas graduadas	Cámara de Neubauer
	Tubos de ensayo y gradilla	Algodón
	Papel Aluminio	Espátula
	Jeringuillas de 3 mL, 5 mL, 10 mL y 20 mL	Piseta

Elaborado por: Tannia Toapanta, 2018

**Tabla 2-2** Reactivos empleados en la evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro*

ENSAYO	REACTIVOS	
<b>Control de calidad de la droga cruda</b>	Solución de nitrato de amonio 10g/100mL.	Agua destilada
	Peróxido de hidrógeno concentrado	Ácido nítrico
	Ácido clorhídrico al 10%	
<b>Tamizaje fitoquímico</b>	Cloroformo	Cloruro de sodio al 0.9 %
	Hidróxido de sodio al 5%	Solución al 2 % de ninhidrina
	Anhídrido acético	Reactivo de Baljet
	Ácido sulfúrico concentrado	Etanol.
	Reactivo de Fehling	Éter etílico
	Tricloruro férrico al 5 %	Agua destilada
	Reactivo de Dragendorff	Sudan III o Sudan IV
	Cloruro de sodio	Ácido clorhídrico
	Reactivo de Mayer	Reactivo de Wagner
<b>Control de calidad del extracto hidroalcohólico</b>	Alcohol etílico-éter dietílico (1:1)	Agua destilada
	Peróxido de hidrógeno concentrado	Solución reguladora de pH
	Solución de nitrato de amonio 10g/100mL	
<b>Cuantificación de flavonoides y fenoles totales</b>	Nitrito de sodio al 5%	Cloruro de aluminio al 10%
	Agua destilada	Hidróxido de sodio 1M
	Reactivo de Folin Ciocalgteu	Carbonato de sodio 7.5%
<b>Actividad antioxidante</b>	Reactivo de DPPH	Metanol
	Agua destilada	Etanol al 70%
<b>Actividad anti-inflamatoria y citotóxica <i>in vitro</i></b>	Heparina sódica	Solución modificada de Hanks
	Agua destilada	Tritón X-100
	Ficoll Paque	Cloruro de Amonio
	Zimozan A	Dimetilsulfóxido

Elaborado por: Tannia Toapanta, 2018

**Tabla 3-2** Equipos empleados en la evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro*

<b>ENSAYO</b>	<b>EQUIPOS</b>	
<b>Control de calidad de la droga cruda</b>	Mufla	Balanza analítica
	Desecador	Sonicador
	Estufa	Molino
<b>Tamizaje fitoquímico</b>	Sorbona	
<b>Control de calidad del extracto hidroalcohólico</b>	pH-metro	Balanza analítica
	Refractómetro de Abbé	Desecador
	Baño de agua	Estufa
<b>Cuantificación de flavonoides y fenoles totales</b>	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220	Balanza analítica
		Baño de agua
	Vórtex mixer MRCS1-100	Desecador
<b>Actividad antioxidante</b>	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220	Balanza analítica
		Baño de agua
	Vórtex mixer MRC S1 - 100	Desecador
<b>Actividad anti-inflamatoria y citotóxica <i>in vitro</i></b>	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220	Balanza analítica
		Baño de agua
	Vórtex mixer MRC S1 - 100	Desecador
	Centrifuga	

Elaborado por: Tannia Toapanta, 2018

## 2.5 Técnicas y Métodos

### 2.5.1 Preparación de la muestra

Las hojas de *B. genistelloides* (Lam.) Pers. fueron recolectadas, seleccionadas, lavadas y desecadas en la estufa a 40 °C por un determinado tiempo para posteriormente pulverizarlas en un molino y almacenarlas.

En este presente trabajo se realizaron los ensayos por triplicado con el fin de garantizar la seguridad y eficacia de la droga que será analizada posteriormente.

Para lo cual se realizan las siguientes actividades:

## 2.5.2 *Parámetros de control de la calidad de la droga cruda*

### 2.5.2.1 *Determinación de cenizas totales*

Las cenizas totales corresponden al residuo inorgánico (minerales) que se obtiene después de incinerar una droga.

**Procedimiento** Se pesan  $2g \pm 0.5$  mg de la droga pulverizada en un crisol de porcelana anteriormente tarado.

Se procede a carbonizar la muestra en un reverbero, seguidamente se incinera en la mufla por un lapso de dos horas en una temperatura de  $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Se coloca el crisol en el desecador por 15 minutos y se pesa, el proceso se repite hasta que en dos pesadas consecutivas la masa sea constante.

El residuo final presenta un color blanco, para obtener el resultado se aplica la siguiente fórmula:

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

Dónde:

%C = porcentaje de cenizas totales.

M = masa del crisol vacío (g)

M<sub>1</sub> = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M<sub>2</sub> = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

### 2.5.2.2 *Determinación de cenizas solubles en agua*

Las cenizas solubles en agua corresponden a la parte de las cenizas totales con capacidad de disolverse en agua.

**Procedimiento** En el crisol con cenizas totales obtenidas anteriormente se colocan de 15 mL de agua, se tapa y se hierve ligeramente en un mechero por 5 minutos. Empleando papel filtro libre de cenizas, se filtra y se transfiere al crisol inicial, se carboniza en el mechero y se procede a incinerar en la mufla a  $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por un lapso de 2 horas.

Se traslada a un desecador hasta alcance la temperatura ambiente y pesar. Repetir el proceso hasta conseguir peso constante.

Para obtener el resultado se aplica la presente fórmula:

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

Dónde:

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

M<sub>2</sub> = masa del crisol con las cenizas totales (g).

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

M<sub>1</sub> = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

### 2.5.2.3 *Determinación de cenizas insolubles en ácido*

Las cenizas ácido insolubles son las que se obtiene posterior a la disolución de las cenizas totales en ácido clorhídrico al 10%. Este parámetro permite medir la cantidad de sílice contenida en la planta, principalmente tierra silíceo y arena.

**Procedimiento** A las cenizas totales se agrega 2 mL de ácido clorhídrico al 10% se tapa con un vidrio reloj y se calienta en un baño de agua por 10 minutos. Luego, se lava el vidrio reloj con 5mL de agua caliente uniendo al contenido del crisol.

Se filtra la solución; se lava el residuo con agua caliente hasta que la solución obtenida de la filtración añadiendo dos gotas de AgNO<sub>3</sub> (nitrato de plata) 0.1 Molar no indique presencia de cloruros.

Posteriormente, el filtrado se deseca a 100°C y se transfiere al crisol inicial y se incinera en la mufla durante 2 horas a una temperatura de 700 °C. Finalmente, se ubica en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa hasta conseguir masa constante.

Se debe aplicar la siguiente fórmula para obtener el resultado.

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

Dónde:

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

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

$M_2$  = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático.

#### 2.5.2.4 *Determinación del contenido de humedad (Método gravimétrico)*

Mediante este análisis podemos controlar la calidad de la droga cruda, evitando el desarrollo de microorganismos y/o deterioro de los metabolitos presentes en ella.

El método empleado es el gravimétrico debido a su facilidad, pero no es aplicable en drogas que contengan sustancias volátiles.

**Procedimiento** Se pesan  $2g \pm 0.5mg$  de droga en una cápsula de porcelana (tarada) y colocar en la estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  y por tiempo de 3 horas. Posteriormente la cápsula se ubica en el desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y pesar. Se coloca reiteradamente en la estufa durante 1 hora, y repetir el proceso de pesar hasta adquirir una masa constante.

Para obtener el resultado se aplica la ecuación siguiente:

$$\text{Hg} = \frac{M_2 - M_1}{M_1 - M} \times 100$$

Dónde:

Hg = pérdida en peso por desecación (%).

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

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

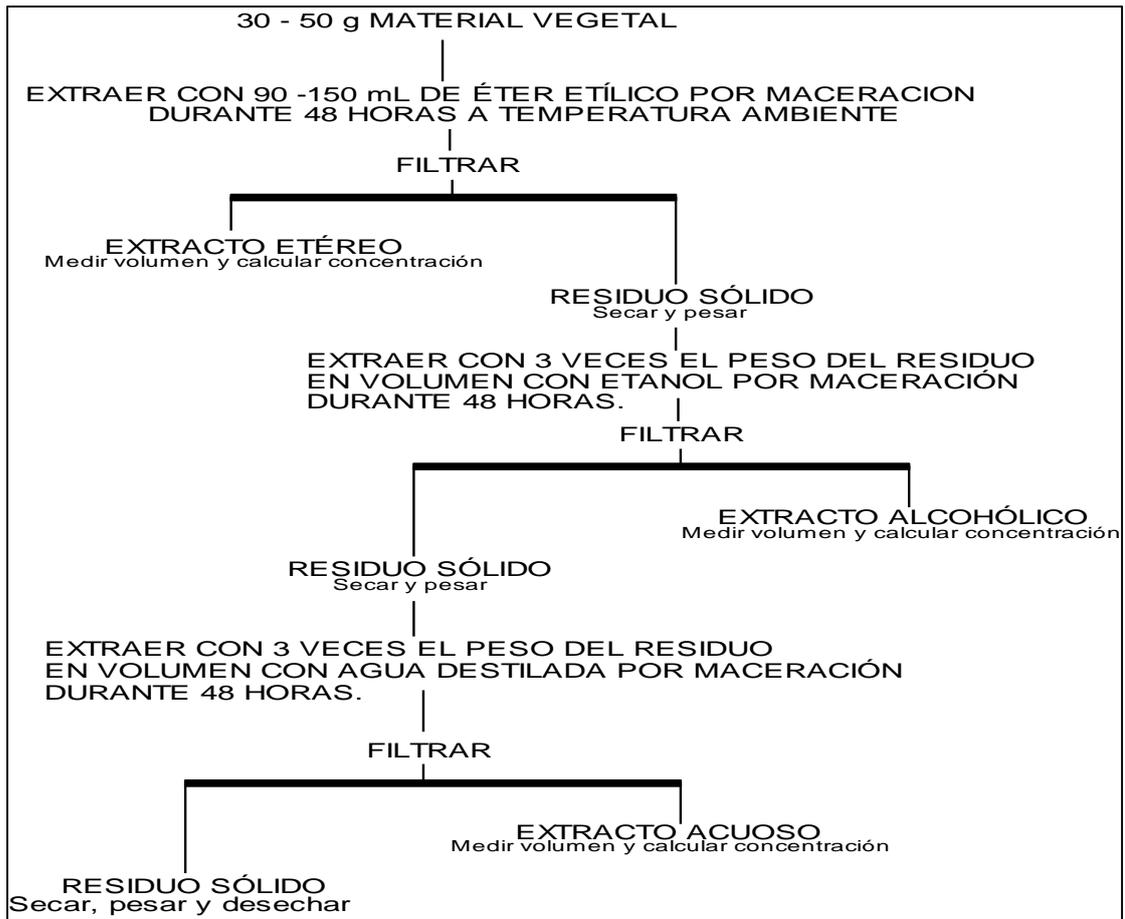
M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

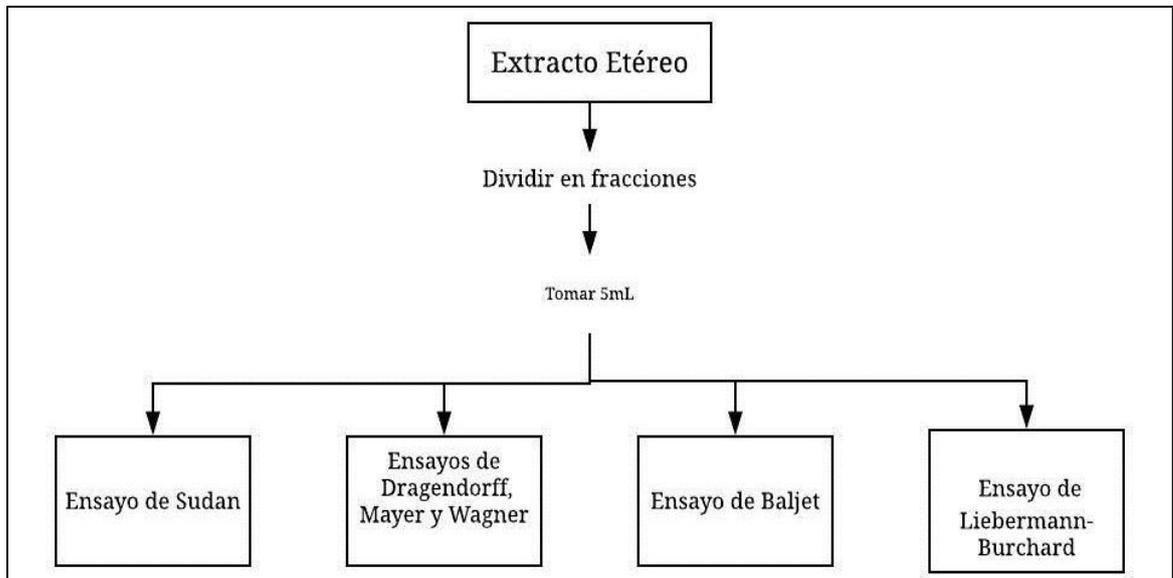
#### 2.5.3 *Tamizaje fitoquímico*

Para realizar el análisis cualitativo de la droga se sigue el esquema de la figura N° 1-2 para la obtención de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso.

Consecutivamente en cada extracto obtenido se realiza los ensayos según indica los esquemas de las (Figuras 2-2, 2-3 y 2-4). A continuación se indica el proceso a seguir para la ejecución de los ensayos:



**Figura 1-2** Obtención del extracto etéreo, alcohólico y acuoso para el Tamizaje fitoquímico  
 Fuente: (Miranda, 2006, pp. 40)



**Figura 2-2** Esquema de las reacciones a ejecutar en el extracto de etéreo.  
 Fuente: (Miranda, 2006, pp. 40)

Elaborado por: Tannia Toapanta, 2018

### 2.5.3.1 *Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner (alcaloides)*

Ensayo de Dragendorff : Si la alícuota está diluida en solvente orgánico se evapora en baño de agua y se coloca 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua, en cambio si es acuoso se agrega 1 gota de ácido clorhídrico concentrado y calentar ligeramente.

A la solución acuosa ácida se añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff.

Ensayo de Mayer: con la solución ácida obtenida siguiendo el proceso anterior se continúa añadiendo una pizca de NaCl (cloruro de sodio) en polvo, agitar y filtrar. Colocar 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer y observar el resultado.

Nota: En el extracto acuoso se puede encontrar alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, y para un resultado positivo se debe expresar como (++) ó (+++) en todos los casos.

### 2.5.3.2 *Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner (alcaloides)*

Ensayo de Dragendorff : Si la alícuota está diluida en solvente orgánico se evapora en baño de agua y se coloca 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua, en cambio si es acuoso se agrega 1 gota de ácido clorhídrico concentrado y calentar ligeramente.

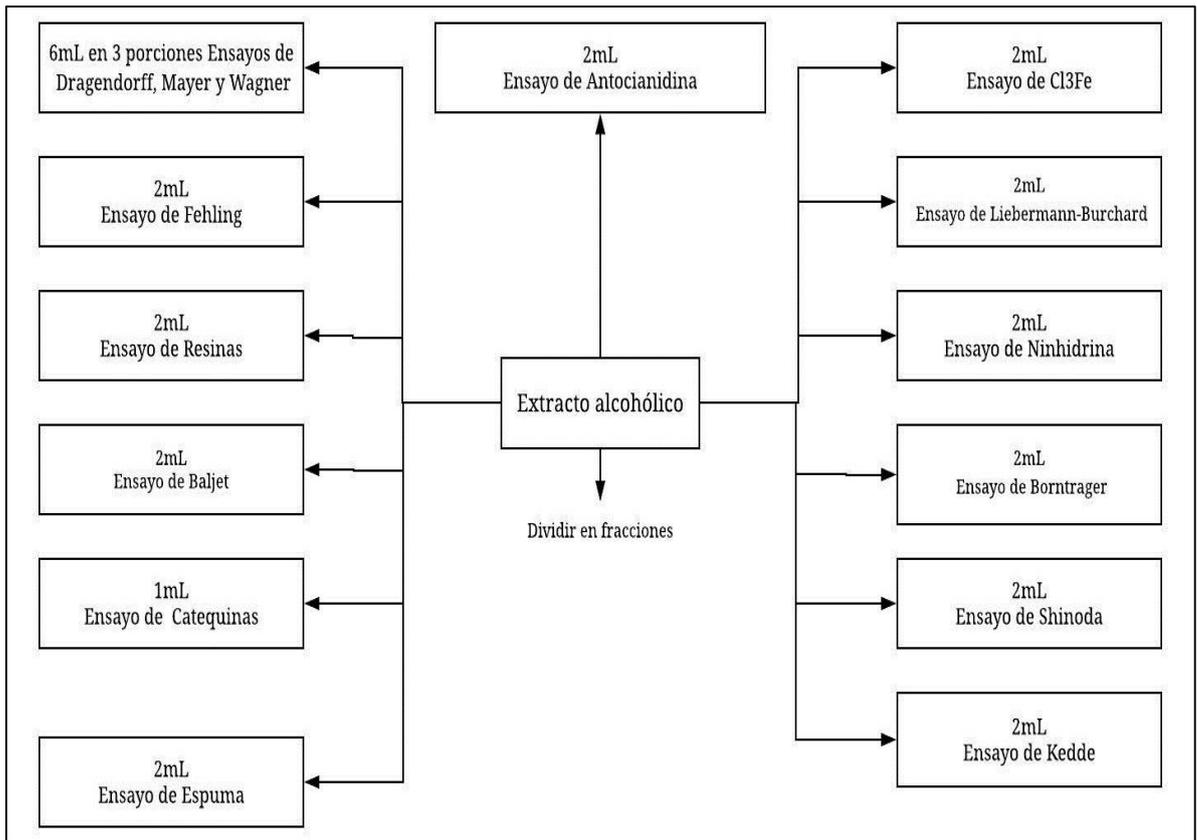
A la solución acuosa ácida se añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff.

Ensayo de Mayer: con la solución ácida obtenida siguiendo el proceso anterior se continúa añadiendo una pizca de NaCl (cloruro de sodio) en polvo, agitar y filtrar. Colocar 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer y observar el resultado.

Nota: En el extracto acuoso se puede encontrar alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, y para un resultado positivo se debe expresar como (++) ó (+++) en todos los casos.

Ensayo de Wagner: se trabaja con la solución ácida de la misma manera y se procede añadir 2 ó 3 gotas del reactivo.

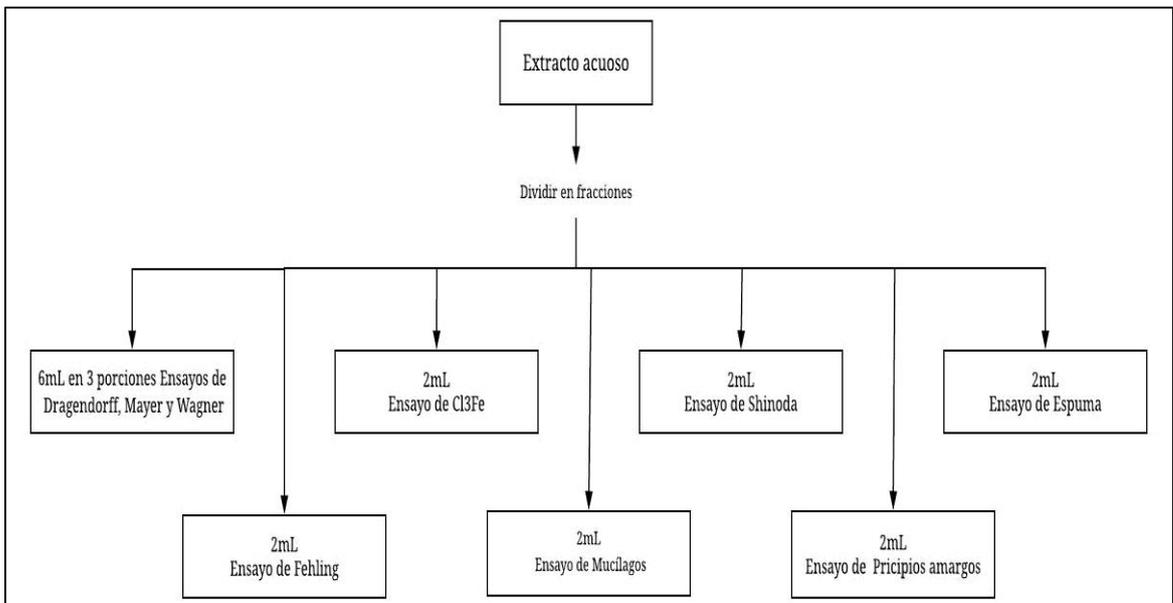
El resultado en los ensayos de alcaloides se expresa como: opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).



**Figura 3-2** Esquema de las reacciones a ejecutar en el extracto alcohólico

**Fuente:** (Miranda, 2006, pp. 40)

**Elaborado por:** Tannia Toapanta, 2018



**Figura 4-2** Esquema de las reacciones a efectuar en el extracto acuoso

**Fuente:** (Miranda, 2006, pp. 40)

**Elaborado por:** Tannia Toapanta, 2018\_

#### 2.5.3.1 *Ensayo de Baljet (coumarinas y lactonas)*

Si el extracto es acuoso se debe evaporar y concentrar en 1 mL de alcohol y se añade 1mL del reactivo.

Se considera un resultado positivo a la presencia de coloración (++) o precipitado rojo (+++).

#### 2.5.3.1 *Ensayo de Borntrager (quinonas)*

La alícuota de ensayo se de concentrar en 1 mL de cloroformo y se agrega 1 mL de hidróxido de sodio, potasio ó amonio al 5 %. Se agita para homogenizar las fases y dejar en reposo hasta obtener una separación.

El resultado es positivo si la fase alcalina (superior) se colorea de rosada (++) o roja (+++).

#### 2.5.3.2 *Ensayo de Liebermann-Burchard (triterpenos y/o esteroides)*

Si la alícuota no se encuentra en cloroformo se debe actuar como en el ensayo anterior y se continúa adicionando 1 mL de anhídrido acético y mezclar bien. Colocar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes, no agitar.

Se considera el ensayo positivo cuando hay un cambio rápido de coloración:

- Rosado-azul muy rápido.
- Verde intenso-visible, aunque rápido.
- Verde oscuro-negro-final de la reacción. Presenta cantidades importantes de compuestos.

#### 2.5.3.3 *Ensayo de la espuma (saponinas)*

Si la alícuota se halla en alcohol, se diluye en agua 1:5 y se agita fuertemente la mezcla por un lapso de 5-10 minutos.

Se considera positivo si aparece espuma con una altura de más de 2 mm de altura y es constante por más de 2 minutos.

#### 2.5.3.4 *Ensayo de catequinas*

A la solución alcohólica añadir con un capilar 1 gota sobre papel de filtro y sobre la mancha colocar solución de carbonato de sodio.

Es positivo cuando hay la presencia de una mancha verde carmelita a la luz UV.

#### 2.5.3.5 *Ensayo de resinas*

A 2 mL de la solución alcohólica se adiciona 10 mL de agua destilada. Si aparece un precipitado el ensayo es positivo.

#### 2.5.3.6 *Ensayo de Fehling (azúcares reductores)*

Si la alícuota no es acuosa se debe evaporar y redisolverse en 1-2 mL de agua y se continúa añadiendo 2 mL del reactivo, se calienta en baño de agua por 5-10 minutos.

El ensayo es positivo si hay aparición de coloración o precipitado rojo.

#### 2.5.3.7 *Ensayo del cloruro férrico (compuestos fenólicos y/o taninos)*

Se adiciona 3 gotas de solución de tricloruro férrico al 5 % (en solución salina fisiológica) a una alícuota del extracto alcohólico, en cambio, si el extracto es acuoso (determinación de taninos) se agrega acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de solución de tricloruro férrico al 5 %.

A continuación, se explica cuando se considera positivo el ensayo:

- Compuestos fenólicos en general: coloración rojo-vino.
- Taninos del tipo pirocatecólicos: coloración verde intensa.
- Taninos del tipo pirogalotánicos: coloración azul.

#### 2.5.3.8 *Ensayo de la ninhidrina (aminoácidos)*

A una alícuota de extracto en alcohólico (si el extracto no se encuentra en alcohol se mezcla con alcohol) y se añade 2 mL de solución de ninhidrina al 2 % en agua y se calienta durante 5-10 minutos en baño de agua.

Se considera positivo este ensayo si se presenta un color azul violáceo.

#### 2.5.3.9 *Ensayo de Shinoda (flavonoides)*

Si el extracto es alcohólico se debe añadir 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico se espera 5 minutos, se continúa añadiendo 1 mL de alcohol amílico, se homogeniza y dejar reposar hasta que se separen las fases.

Se considera positivo el ensayo, cuando el alcohol amílico se colorea de: amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

#### 2.5.3.10 *Ensayo de Kedde (glicósidos cardiotónicos)*

A una alícuota del extracto etanólico se añade 1 mL del reactivo se mezcla y se deja reposar por 5-10 minutos.

Es positivo cuando hay aparición de coloración violácea, constante por 1-2 horas.

#### 2.5.3.11 *Ensayo de antocianidinas*

Se calienta 2 mL de extracto etanólico durante 10 minutos con 1 mL de HCL concentrado. Se deja enfriar y se coloca 1 mL de agua, 2 mL de alcohol amílico. Se procede agitar dejando que separe las dos fases.

Se considera positivo cuando hay aparición de color rojo a marrón en la fase amílica.

#### 2.5.3.12 *Ensayo de mucílagos*

A una alícuota de extracto acuoso se enfría a 0-5 °C. El ensayo es positivo si la solución presenta consistencia gelatinosa.

#### 2.5.3.13 *Ensayo de principios amargos y astringentes*

Se ejecuta el ensayo saboreando 1o 2 gotas del extracto en agua y se reconoce el sabor de cada uno de estos principios.

#### 2.5.4 Control de calidad del extracto hidroalcohólico

##### Preparación del extracto hidroalcohólico

Se procede a pesar 100g de droga cruda previamente preparada, se trasvasa a un recipiente y se añade etanol al 70 % (en una proporción 1:10), se macera por un lapso de 72 horas.

Luego se filtra y concentra en el rotavapor. También si es necesario se debe liofilizar.

##### 2.5.4.1 Determinación de los requisitos organolépticos

- Determinación de olor: coger una tira de papel secante (1 cm x10 cm) e introduce en la muestra de ensayo y oler y determinar si el olor es característico del producto.
- Determinación del color: en un tubo se llena un 75% con muestra y se observa el color, transparencia, presencia de partículas y la separación en capas.

##### 2.5.4.2 Determinación de la densidad relativa

Pesar el picnómetro (vacío y seco) y llenar con la muestra de ensayo, mantener a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C durante 15 minutos, si es necesario secar el líquido con una tira de papel.

En el exterior del picnómetro para proceder a pesar; repetir el proceso agua destilada finalmente con un picnómetro limpio.

El resultado se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Dónde:

M<sub>1</sub>: peso del picnómetro con la muestra (g)

M<sub>2</sub>: peso del picnómetro con el agua (g)

M: peso el picnómetro vacío (g).

#### 2.5.4.3 *Determinación del índice de refracción*

Se procede a ajustar el equipo seleccionando la zona del espectro visible para ello se utiliza agua destilada. Seguidamente, se coloca una gota de muestra sobre el prisma de medición. Se debe realizar tres lecturas (no deben diferir en más de 0.002) y se saca la media

Para obtener los resultados se aplica la fórmula siguiente:

$$N_d^{25} = N_d^t + 0.00044 (t-25)$$

Dónde:

$N_d^{25}$  = Índice de refracción a 25 °C

$N_d^t$  = valor leído en la escala del aparato a la temperatura t.

t = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044 = factor de corrección por grado Celsius.

#### 2.5.4.4 *Determinación del pH*

Se debe ajustar el pH del equipo y posteriormente se debe determinar el pH de la muestra. Para los resultados toman en cuenta todos los decimales.

#### 2.5.4.5 *Determinación de los sólidos totales*

Colocar 5,0 mL de la muestra y evaporar en el baño de agua hasta que quede seco. Luego se coloca en la estufa por aproximadamente 3 horas hasta conseguir un peso constante, para pesar previamente se coloca en el desecador.

El resultado se expresa aplicando la siguiente fórmula:

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

Dónde:

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

P = masa de la cápsula vacía (g)

V = volumen de la porción de ensayo.

100 = factor matemático.

#### 2.5.4.6 *Cuantificación de flavonoides totales*

Se toma 1ml de las soluciones (1000 µg/mL) a analizar y de la solución estándar (ácido gálico) y añadir 4 mL de agua destilada junto con 0,3 mL de nitrito de sodio al 5%, se espera 5 minutos y se agrega 0,3 mL de cloruro de aluminio al 10% se vortaliza por 1 minuto y se deja en completa oscuridad.

Finalmente, se añade 2 mL de hidróxido de sodio 1 Molar y se procede a leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados se expresan en porcentaje.

#### 2.5.4.7 *Cuantificación de fenoles totales*

Se toma 1mL de la muestra y la solución estándar, se agrega 15 mL de agua destilada, 1.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu se espera 8 minutos y se agrega 3,5 mL de carbonato de sodio al 7,5% y se afora a 25 mL con agua destilada se vortaliza por 1 minuto y se deja por 2 horas en completa oscuridad. Las lecturas se ejecutan a una longitud de 765nm.

Se elabora una curva de calibración usando quercetina de concentraciones entre 20 y 100mg/L como estándar. Los resultados se expresan como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra seca.

#### 2.5.4.8 *Determinación de actividad antioxidante*

Se toma una alícuota de 100µL de la muestra y se añade 3,9 del reactivo DPPH se homogeniza y se incuba a 37°C. se coloca en la cubeta de cuarzo y se lee la absorbancia a 520nm. Se emplea ácido gálico como control positivo.

El porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\%I = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}}$$

Dónde:

A control: absorbancia de la reacción control

A muestra: absorbancia de la muestra de ensayo.

Los resultados se expresan como IC50, es decir la concentración que se requiere para disminuir la concentración de DPPH a la mitad (50%) y se calcula a partir de la interpolación de una regresión lineal, valores más bajos de IC50 indican una mayor actividad antioxidante.

#### 2.5.4.9 *Ensayo anti-inflamatorio in vitro*

Primeramente, se realiza el conteo de neutrófilos del paciente luego se procede a aislar los neutrófilos y realizar el ensayo de actividad anti-inflamatoria *in vitro* de las soluciones (12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL).

#### **Aislamiento de neutrófilos**

Se debe colocar 1mL de heparina en tubos de tapa roja y extraer 10mL sangre venosa del voluntario sano y homogenizar para impedir que se coagule, luego se añade 5 mL de solución modificada de Hanks.

En otros 4 tubos se debe colocar 3 mL de Ficoll Paque, 4 mL de la sangre anteriormente preparada lentamente y centrifugar los tubos por 30 minutos a 1500 rpm; una vez centrifugada se debe separar la porción blanca con una jeringuilla de 3mL.

Inmediatamente, se mezcla con solución modificada de Hanks en proporción 2:1 y centrifugar por 30 minutos a 1500 rpm; se desecha el sobrenadante y se añade 2 mL de solución modificada de Hanks y 2 o 3 gotas de cloruro de amonio al 0.9% para nuevamente centrifugar

Finalmente, se elimina el sobrenadante y se añade 1 mL de solución modificada de Hanks se vortexiza y se junta en un solo tubo.

#### **Preparación de Zymozan A opsonizado**

Se pesa 5,1mg de Zymozan A y disolver en 2 mL de suero sanguíneo, incubar a 37°C por 20 a 30 minutos agitando cada 5 minutos y se centrifuga por 10 minutos a 1500rpm. Se elimina el sobrenadante y se reconstituye con 2mL de solución modificada de Hanks.

Ejecución de la actividad anti-inflamatoria *in vitro*: para su ejecución se emplea el siguiente esquema que se indica en la Tabla N° 4-2

**Tabla 4 -2** Esquema para el ensayo de actividad anti-inflamatorio *in vitro*

Tratamiento		Neutrófilos, μL	Extracto y grupos control, μL	WST-1, μL	Zymozan A opsonizado, μL
DMSO 5%:	control	140	100	10	50
positivo					
Tritón X 0.1%:	control	140	100	10	50
negativo					
Ácido	200	140	100	50	50
acetilsalicílico:	100	140	100	10	50
control	50	140	100	10	50
comparativo	25	140	100	10	50
	12.5	140	100	10	50
Soluciones de	200	140	100	10	50
<i>Baccharis</i>	100	140	100	10	50
<i>genistelloides</i>	50	140	100	10	50
Lam. Pers.	25	140	100	10	50
	12.5	140	100	10	50

Elaborado por: Tannia Toapanta, 2018

Se deja incubar por 30 minutos a 37°C, seguidamente se añade 50 μL de Zymozan A opsonizado. Finalmente se incuba a 37°C durante 1 hora y se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.

Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición inflamatoria y se obtiene aplicando la ecuación siguiente:

$$\% \text{Inhibición} = 100 - \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del DMSO 5\%}} \right) * 100$$

#### 2.5.4.10 Ensayo citotóxico *in vitro*

Para realizar el análisis citotóxico *in vitro* de las muestras se debe seguir el mismo proceso de:

- Conteo de neutrófilos
- Aislamiento de neutrófilos de la sangre de un paciente sano.
- El esquema que se debe aplicar en el ensayo citotóxico *in vitro* se detalla en la tabla N°

**Tabla 5-2** Esquema para el ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Tratamiento		Neutrófilos, $\mu\text{L}$	Extracto y grupos control, $\mu\text{L}$	WST-1, $\mu\text{L}$
DMSO 5%: control positivo		140	100	10
Tritón X 0.1%: control negativo		140	100	10
Ácido acetilsalicílico:	200	140	100	10
control	100	140	100	10
comparativo	50	140	100	10
	25	140	100	10
	12.5	140	100	10
Soluciones de <i>Baccharis genistelloides</i>	200	140	100	10
	100	140	100	10
	50	140	100	10
Lam. Pers.	25	140	100	10
	12.5	140	100	10

Elaborado por: Tannia Toapanta, 2018

Luego de poner cada solución en la placa de micro pocillos se incuba durante 3 horas y se procede a leer las absorbancias. El resultado se expresa en porcentaje de viabilidad celular mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\% \text{viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del DMSO 5\%}} \times 100$$

### CAPÍTULO III

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

### 3.1 Control de calidad de la droga cruda

Los ensayos de control de calidad permiten determinar la calidad e identificación de una droga. La tabla 1-3 indica los resultados de contenido de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico de las hojas de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers., todos los valores obtenidos se encuentran dentro de las especificaciones establecidas en la Farmacopea Española.

**Tabla 1-3** Resultados del control de calidad de la droga cruda de hojas de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.

PARÁMETRO	RESULTADO	REFERENCIA:RFE, 2002
Contenido de humedad	5.49±0.03	≤14%
Cenizas totales	3.16±0.03	≤5%
Cenizas solubles en agua	1.85±0.04	≤2%
Cenizas insolubles en ácido	0.96±0.04	≤1%

Elaborado por: Tannia Toapanta, 2018

El porcentaje de humedad mediante obtenido mediante el método gravimétrico fue de 5.49%, valor inferior a la especificación 14%, lo que indica que el método de secado y almacenamiento empleado fue el adecuado, además su vida útil no se verá afectada por crecimiento de bacterias, hongos o la hidrólisis de los metabolitos presentes en las hojas.

En la determinación de cenizas totales se obtuvo un valor de 3.16%; cenizas solubles en agua 1.85% y cenizas insolubles en ácido clorhídrico 0.96%; encontrándose dentro de los parámetros establecidos en la Farmacopea Española (2003), que son 5%, 2% y 1% respectivamente. La determinación de cenizas totales permite identificar el contenido de sales minerales responsables de alguna acción terapéutica y su valor elevado indica que el procedimiento de recolección fue el inadecuado y existe materia extraña adherida a la superficie de esta. Las cenizas solubles en agua indican el contenido de sales hidrosolubles en la planta, mientras que las cenizas insolubles en ácido clorhídrico e indican contaminación con arena o tierra.

No existen datos de control de calidad de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. para comparar sin embargo, cada valor obtenido al realizar los ensayos por triplicado indica que la droga cruda es óptima para ejecutar posteriores ensayos de la investigación.

### 3.2 Tamizaje fitoquímico

**Tabla 2-3** Resultados de Tamizaje fitoquímico de droga cruda de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.

ENSAYADO	METABOLITO	TIPO DE EXTRACTO		
		ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
Sudan	Aceites y grasas	(-)	(N/A)	(N/A)
	Drangedorff	(+)	(-)	(+)
Alcaloides	Mayer	(+)	(-)	(-)
	Wagner	(-)	(-)	(-)
Baljet	Lactonas y cumarinas	(+)	(+)	(N/A)
Liebermann-Buchard	triterpenos-esteroides	(+)	(+)	(N/A)
Catequinas	Catequinas	(N/A)	(+)	(N/A)
Resinas	Resinas	(N/A)	(+)	(N/A)
Fehling	Azúcares reductores	(N/A)	(+)	(-)
Espuma	Saponinas	(N/A)	(-)	(+)
Cloruro férrico	Taninos	(N/A)	(+)	(+)
Ninhidrina	Aminoácidos	(N/A)	(-)	(N/A)
Borntrager	Quininas	(N/A)	(-)	(N/A)
Shinoda	Flavonoides	(N/A)	(+)	(+)
Kedde	Cardenolidos	(N/A)	(-)	(N/A)
Antocianidina	Flavonoides	(N/A)	(+)	(N/A)
mucílagos	Polisacáridos	(N/A)	(N/A)	(-)
principios amargos	Principios amargos y astringentes	(N/A)	(N/A)	(-)

**Interpretación:** Presencia (+), Ausencia (-) y No aplica (N/A)

**Realizado por:** Tannia Toapanta, 2018

Existe un estudio que presenta el análisis fitoquímico de *B. genistelloides* (Lam.) Pers., indican la presencia de compuestos como flavonoides, alcaloides, saponinas, compuestos fenólicos y taninos (Justil, H. & Arroyo, J. 2010, pp. 88-96). Datos que correlacionan con la marcha fitoquímica realizada en esta investigación, destacando la presencia principal de compuestos fenólicos (flavonoides).

La presencia de los compuestos fenólicos, quercetina como indica bibliografía serían los responsables de la actividad antioxidante mediante mecanismo de reducción y anticancerígeno que presenta *Baccharis genistelloides*.

Los compuestos fenólicos (flavonoides) y terpenoides presentan actividad terapéutica ante procesos inflamatorios. Los terpenoides al relacionarse con las hormonas actúan interfiriendo en la vía de señalización inflamatoria de las PG (Chatwal, 2009, pp.225-230).

### 3.3 Control de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *B. genistelloides*

**Tabla 3-3** Resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Baccharis genistelloides* Lam. Pers.

PARÁMETRO	RESULTADOS	
<b>Requisitos organolépticos</b>	Olor	Característico aromático
	Color	Café oscuro
	Sabor	Amargo, ligeramente astringente
	Aspecto	Transparente
<b>Índice de refracción</b>	1.368	
<b>pH</b>	5.85	
<b>Sólidos totales</b>	2.87%	
<b>Densidad relativa</b>	0.89 ±0.11	

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

La tabla 3-3 indican los resultados de las características organolépticas y físicas del extracto hidroalcohólico de hojas de *B. genistelloides*. Las características organolépticas demuestran que el extracto presenta un aspecto transparente, color café oscuro, olor característico (aromático) y sabor amargo, ligeramente astringente.

El índice de refracción es de 1.368, superior al índice de refracción del agua (1), esto se debe a la presencia de metabolitos secundarios presentes en el extracto.

El pH es de 5.8 ligeramente ácido debido a la presencia de flavonoides, taninos, saponinas, etc. El valor de la densidad es de 0.89 ±0.11; superior a etanol (densidad=0.68), esto se debe a la presencia de los metabolitos secundarios.

Finalmente, el valor de sólidos totales es de 2.87% e indica la cantidad de compuestos extraídos.

### 3.4 Cuantificación de flavonoides por método colorimétrico

En la cuantificación de flavonoides totales se empleó la quercetina como estándar, dando una ecuación  $y = 0.001x + 0.0014$  con un coeficiente de correlación de 0.999. Los resultados se expresan en mgQE/g de extracto liofilizado.

Al realizar la interpolación de la absorbancia en la curva de calibración se encontró la concentración de flavonoides totales es de  $504.82 \pm 3.91$  mgQE/g de extracto liofilizado de *B. genistelloides* (Tabla 4-3).

No existen investigaciones sobre cuantificación de flavonoides de esta planta para corroborar estos resultados, pero se puede relacionar directamente el valor obtenido con la actividad antioxidante y la identificación cualitativa previamente realizada.

Los flavonoides presentan utilidad terapéutica en la inflamación al inhibir a la enzima ciclooxigenasa impidiendo la síntesis de prostaglandinas (Meijide, G.; et al. 2000, 33-55)

**Tabla 4-3** Resultados de cuantificación de flavonoides totales, obtenidos por espectrofotometría.

<b>EXTRACTO LIOFILIZADO DE <i>B. genistelloides</i> (µg/mL)</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES (mgQE/g de extracto liofilizado)</b>
1000	$504.82 \pm 3.91$

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

### 3.5 Cuantificación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales se realizó mediante espectrofotometría (método de Folin–Ciocalteu), para la curva de calibración se empleó el ácido gálico como estándar, obteniendo la siguiente ecuación  $y = 0.0024x - 0.054$ , con un coeficiente de correlación de 0,8617. El resultado se expresa en mgGA/g de extracto liofilizado.

La concentración de fenoles totales fue  $372.04 \pm 1.15$  mg GA/g de extracto liofilizado *B. genistelloides* (tabla 5-3), la presencia de fenoles totales son los responsables de la actividad antioxidante de la planta.

No existen estudios que comprueben los resultados obtenidos, sin embargo, se encontró estudios de *Baccharis latifolia* (Asterácea) que muestra un contenido de  $283.4 \pm 22.4$  mg GA/g extracto liofilizado (Prada 2015. p 95). Por lo tanto, se puede decir que el contenido de compuestos fenólicos podría ser similar en el género *Baccharis* de la familia Asteraceae.

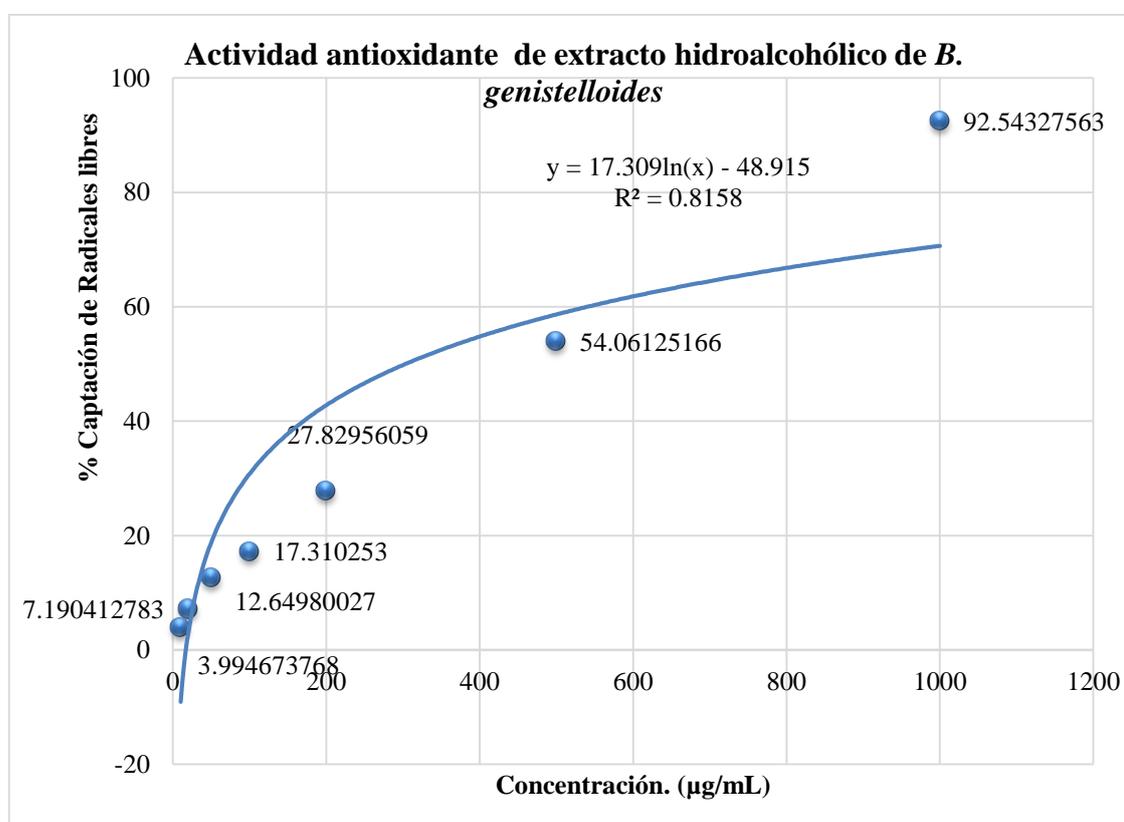
**Tabla 5-3** Resultados de cuantificación de fenoles totales, obtenidos por espectrofotometría.

EXTRACTO LIOFILIZADO DE <i>B. genistelloides</i> , (µg/mL)	CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES (mgGA/g de extracto liofilizado)
1000	225.76±0.48

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

### 3.6 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada por el método DPPH. Para encontrar IC<sub>50</sub> se midió el porcentaje de captación de radicales libres (Gráfico 1-3).



**Gráfico 1-3** Porcentaje de actividad antioxidante del extracto de hojas de hidroalcohólico de *B. genistelloides*

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

Se obtuvo un valor de 92.54% de Captación de radicales libres de DPPH a concentración de 1000 µg/mL (Tabla 6-3). Según Bianchina, G.; et al (2018), indica un valor de 97.37% de Captación de radicales libres de DPPH, hay una variación debido a las diferentes condiciones de ejecución, material vegetal entre otros.

Al reemplazar la ecuación logarítmica (Gráfico 1-3) se obtiene IC<sub>50</sub> 303.28µg/ mL (Tabla 3-7), indicando la concentración del antioxidante que se requiere para inhibir el 50% de los radicales libres, un mayor valor de IC<sub>50</sub> presenta menor actividad antioxidante, es decir son inversamente proporcional.

El efecto antioxidante se debe a los flavonoides y taninos que actúan inhibiendo la síntesis de radicales libres mediante una reducción de DPPH a DPPH-H.

**Tabla 6-3** Resultados de porcentaje de captación de radicales libres de *B. genistelloides*.

CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE <i>B. genistelloides</i> , (µg/mL)	% CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE DPPH
10	3.99
20	7.19
50	12.65
100	17.31
200	27.83
500	54.06
1000	92.54

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

**Tabla 7-3** Resultado de IC<sub>50</sub> (µg/ml) de la actividad antioxidante de mediante el método DPPH.

EXTRACTO LIOFILIZADO DE <i>B. genistelloides</i> , µg/mL	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IC <sub>50</sub> (µg/mL)
1000	303.28

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

### 3.7 Actividad anti-inflamatoria *in vitro*

El ensayo anti-inflamatorio *in vitro* se ejecutó con una sal de tetrazolio (WST-1), mediante espectrofotometría sobre neutrófilos aislados. Los resultados se presentaron en porcentaje (%) de inhibición inflamatoria (Tabla 8-3).

Los datos se analizaron mediante ANOVA con el programa estadístico SPSS 23, para determinar si existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición inflamatoria en los diferentes tratamientos aplicados.

Al ejecutar el análisis factorial (Anexo 1H), se encontró que si existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición inflamatoria entre el extracto hidroalcohólico de *B. genistelloides*, el estándar (ácido acetilsalicílico) y las distintas concentraciones, siendo  $p < 0.05$ , por lo tanto se rechaza la hipótesis nula que dice que no hay diferencias significativas y se acepta la  $H_a$ , confirmando que existen diferencias significativas entre los grupos de estudio, por lo tanto se aplicó el Test de Tukey (Anexo 2H) comprobando así que los tratamientos difieren entre sí.

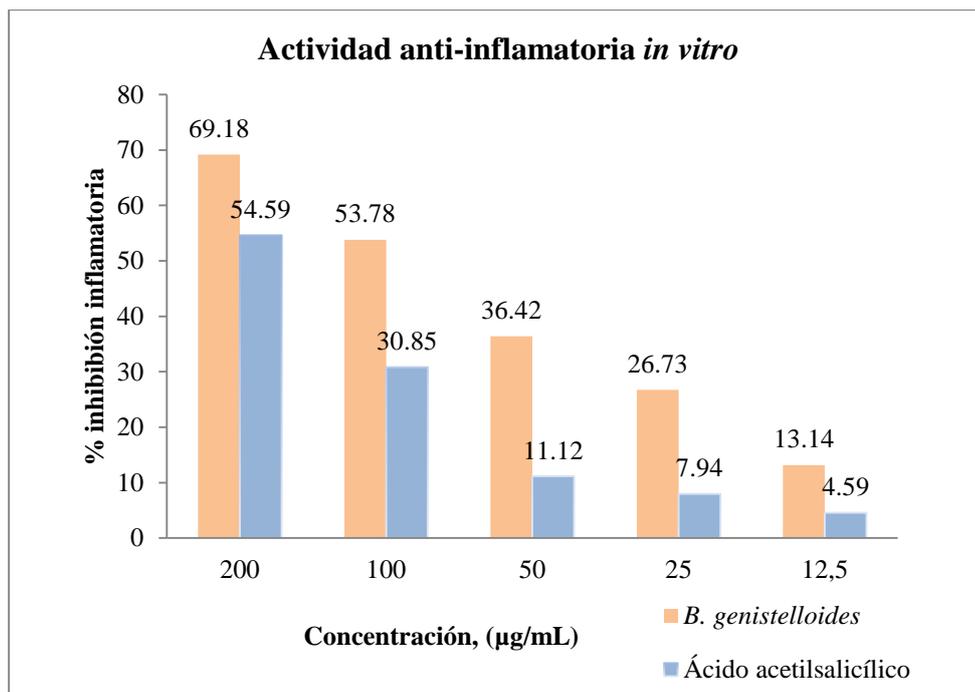
**Tabla 8-3** Resultados de actividad anti-inflamatoria in vitro del extracto hidroalcohólico *B. genistelloides*

CONCENTRACIÓN,	%INHIBICIÓN	INFLAMATORIA
$\mu\text{g/mL}$	E.H DE <i>B. genistelloides</i>	Acido acetilsalicílico
200	69.18±2.99	54.59±1.67
100	53.78±6.34	30.85±2.15
50	36.42±6.13	11.12±3.93
25	26.73±2.26	7.94±0.54
12.5	13.14±2.36	4.59±3.12

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

Finalmente, se comprueba que *B. genistelloides* presenta 69.18±2.99% de inhibición inflamatoria a una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$  siendo superior al estándar (ácido acetilsalicílico) que presenta un valor 54.59± 1.67 % de inhibición inflamatoria (Gráfico 2-3).

Aunque no existen investigaciones que demuestren la actividad anti-inflamatoria de *Baccharis genistelloides*, se encontró una investigación que evaluó la actividad anti-inflamatoria *in vivo* de otras especies del género *Baccharis* empleando una dosis de 3g/kg de planta (3000  $\mu\text{g/mL}$ ) encontrando valores en *B. subalata* 58.1%, *B. obtusifolia* 57.1%, *B. salicifolia* 50%, chilca (*B. latifolia*) 42.8%, *B. dracunculifolia* 36.4%, y *B. pentlandii* 33.3% de inhibición inflamatoria datos inferiores al valor obtenido en la investigación que dio 69.18±2.99% de inhibición inflamatoria a concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$  (Dávalos,E et al. 2007 pp 41-44).



**Gráfico 2-3** Actividad anti-inflamatoria *in vitro* de *B. genistelloides* y Ácido acetilsalicílico

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

### 3.8 Actividad citotóxica *in vitro*

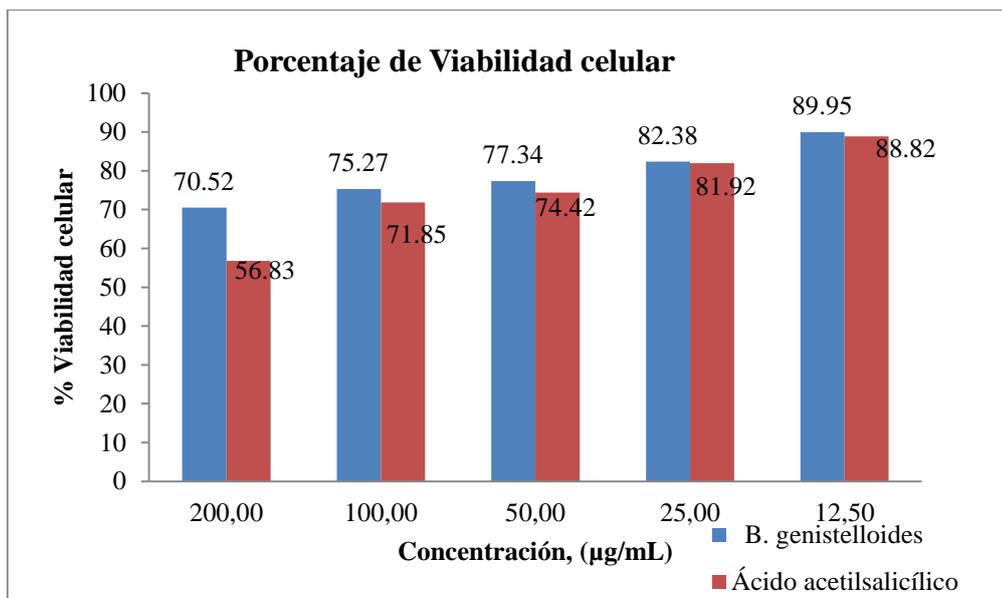
En los resultados obtenidos de la actividad citotóxica va expresado como porcentaje de viabilidad celular, como se puede observar en la tabla 9-3.

**Tabla 9-3** Resultados de viabilidad celular *in vitro* del extracto hidroalcohólico *B. genistelloides*

CONCENTRACIÓN, (µg/mL)	% VIABILIDAD CELULAR	
	E.H DE <i>B. genistelloides</i>	Ácido acetilsalicílico
200	70.52±4.86	56.83±3.05
100	75.27±1.34	71.85±1.88
50	77.34±3.33	74.42±3.03
25	82.38±2.81	81.92±3.08
12.5	89.95±5.52	88.82±4.02

Los valores son medias ± SD, n = 3.

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018



**Gráfico 3-3** Actividad citotóxica *in vitro* de *B. genistelloides* y Ácido acetilsalicílico

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

Los datos obtenidos demuestran que la viabilidad celular es inversamente proporcional a la concentración es decir, que a menor concentración del extracto de *B. genistelloides* y ácido acetilsalicílico presenta mayor porcentaje de viabilidad celular (Gráfico 3-3). A concentración de 12.5 µg/mL el extracto de *Baccharis genistelloides* presenta menor citotoxicidad que el estándar (ácido acetilsalicílico)

Según Justil, H. & Arroyo, J. en el 2010 comprobaron que el extracto etanólico de hojas de *Baccharis genistelloides* presenta actividad quimioprotectora sobre cáncer inducido por 1.2 – dimetilhidracina en ratas machos, así mismo, existen estudios *in vitro* de otras especies de *Baccharis* que señala una inhibición de lipoperoxidación produciendo una disminución del estrés oxidativo. Esto puede deberse a los compuestos flavonoides que presenta *Baccharis genistelloides* y sus propiedades antitumoral, antiviral, y antioxidante según reportan varios estudios (Abad et al. 1999, pp. 499-503) (Justi, H. & Arroyo, J.2010, pp 88-96).

Además, en el análisis cualitativo se encontraron alcaloides, que podrían ser del tipo pirrolizidínicos (común en la Familia Asteraceae) que son capaces de producir hepatotoxicidad.

## CONCLUSIONES

Mediante tamizaje fitoquímico se identificó la presencia de metabolitos secundarios en las hojas de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. flavonoides, alcaloides, triterpeno, saponinas y taninos entre los más representativos, los cuales serían los responsables de la actividad anti-inflamatoria y antioxidante *in vitro*.

Se realizó la cuantificación de flavonoides y fenoles totales presente en las hojas de *B. genistelloides*, encontrándose un valor de 504.82 mgQE/g de extracto liofilizado de flavonoides; mientras que la cantidad de fenoles fue de 225.76 mgGA/g de extracto liofilizado.

Se evaluó la capacidad antioxidante de las hojas *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers mediante el método DPPH, obteniendo un valor IC<sub>50</sub> de 303.28 µg/mL

Se determinó la actividad anti-inflamatoria *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *B. genistelloides* (Lam.) Pers. sobre neutrófilos aislados, expresados como porcentaje de inhibición inflamatoria obteniendo valores que varían desde 70-13% de inhibición inflamatoria dosis dependiente.

Se determinó la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas de *B. genistelloides* (Lam.) Pers. expresados en porcentaje de viabilidad celular, obteniendo un valor que oscila entre 70-90% dependiendo de la concentración.

## RECOMENDACIONES

Debido a la capacidad anti-inflamatorio y antioxidante que presenta se recomienda realizar estudios que determinen el grado de citotoxicidad y eficacia de *Baccharis genistelloides*.

Se recomienda ejecutar investigaciones que demuestren la potencialidad citotóxica del extracto de *B. genistelloides* frente a células tumorales y comprobar la información que se ha encontrado en bibliografía.

Se recomienda ejecutar estudios *in vivo* y verificar si el porcentaje de inhibición inflamatoria sigue siendo superior al de otras especies.

## BIBLIOGRAFÍA

**Abad, María; et al.** " Antiviral activity of Bolivian plant extracts". *General Pharmacology* [online], 1999, (Madrid-España) **32**(4), pp 499–503. [Consulta: 20 junio 2018]. ISSN 03063623. Available at: doi:10.1016/S0306-3623(98)00214-6

**Abbas, Abul; et al.**,. *Inmunología celular y molecular*. Octava Edición. Madrid-España: Copyright , 2015, pp. 8-9.

**Adaramoye, OA.; & Olajuyin, A.** " A Comparative In Vitro Study on the Antioxidant and Anti-acetylcholinesterase Properties of Aerial Parts of *Strophanthus preusii* Engl & Pax ". *Department of Biochemistry* [online], 2014.(Nigeria- India) **63**(5), pp.408–415. [Consulta: 11 junio 2018] Available at: doi:10.7727/wimj.2013.287

**Aguilar, Enrique.; et al.**, . "Etnobotánica, fitoquímica y farmacología de especies del género *Baccharis* (Asteraceas) utilizadas como plantas medicinales en el Departamneto de Ayacucho". *Ciencia e Investigación*, 10 (1), 2007, (Universidad Nacional Mayor de San arcos-Perú). pp. 14-16.

**Attaur; et al.** *Frontiers in Medicinal Chemistry*. Volumen 4, España. 2009, pp. 708-711

**Balslev, Henrik; et al.**,. *Etnobotánica de plantas nativas de una comunidad rural de la Sierra, Ecuador: un análisis cuantitativo*. 23 (1). Ambato-Tungurahua-Ecuador: Arnaldoa, 2016, pp. 219-234.

**Bannwarth, B.** "Tratamientos antiinflamatorios. Situación actual de los AINE clásicos y de los coxibs". *EMC - Tratado de Medicina B.m.: Elsevier* [online], 2006. (Paris-España). **10**(1), pp. 1–6. [Consulta: 11 junio 2018]. ISSN 1636-5410. Available at: doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1636-5410(06)70376-2

**Bianchina, Giorffino1; et al.** "Capacidad antioxidante *in vitro* de los flavonoides totales obtenidos del extracto fluido de hojas y tallos de *Baccharis genistelloides*". *Sciendo: ciencia para el desarrollo.* , 21(2), 2018, (Trujillo-Perú).pp.249–257.

**Berridge, Michael & Patries, Herst,** "Tetrazolium dyes as tools in cell biology : New insights into their cellular reduction" *Biotechnology Annual and Medical* [online], 2015,(Nueva Zelanda).pp. 3-27 [Consulta: 18 junio 2018].Available at: doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7

**Braun, Katharina.; et al.** "Comparison of different cytotoxicity for in vitro evaluation of mesoporous silica nanoparticles". *Toxicology in Vitro Elsevier* [online], 2018, (Alemania). pp. 28-34. [Consulta: 12 junio 2018]. ISSN 0887-2333. Available at: doi:10.1016/j.tiv.2018.06.019

**Bruneton, Jean.** *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales.* Segunda edición. Editorial: Acribia S.A, 2001, pp. 303-324.

**Chatwal, G.** *Medicinal Chemistry (Organic Pharmaceutical Chemistry).* Nueva Delhi: Himalaya Publishing House, 2009, pp. 225-230.

**Coelho, M.; et al.** "Anti-arthritis effect and subacute toxicological evaluation of Baccharis genistelloides aqueous extract". *Toxicology Letters* [online], 2004, (Rio de Janeiro-Brazil) **154**(1–2), pp. 69–80. [Consulta: 12 junio 2018] ISSN 03784274. Available at: doi:10.1016/j.toxlet.2004.07.004

**Cuenca, Adriana; et al. ,** "Automatic Modeling of Knee-Joint Motion For The Virtual Reality Dynamic Anatomy (VRDA) Tool". *Anatomical Sciences Education* [online], 2002, (Estados Unidos) **1**(4), pp. 223–235. ISSN 19359780. Available at: doi:10.1007/978-3-642-10470-1\_18

**Dávalos, E. ; et al.** "Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género Baccharis: B. articulata, B. dracunculifolia, B. salicifolia, B. ulicina, B. latifolia, B. pentlandii, B. obtusifolia, B. subalata". *Revista Boliviana de Química*,24(1), 2007, (La Paz-Bolivia). pp.41–44.

**Dawson, Julie, & Hennell, Sheena.** *Practical Prescribing for Musculoskeletal Practitioners.* Segunda Edición. Reino Unido: M&K Publishing, 2007. pp. 39-43

**De F. Melo, Suzana.; et al.** "Effect of the Cymbopogon citratus, Maytenus ilicifolia and Baccharis genistelloides extracts against the stannous chloride oxidative damage in Escherichia coli". *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online], 2001 (Río de Janeiro) **496**(1–2), pp. 33–38. [Consulta: 15 junio 2018] ISSN 13835718. Available at: doi:10.1016/S1383-5718(01)00216-9

**De La Torre, L. ; et al.**, 2008. *Enciclopedia De Plantas Utiles Del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontífica Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departameto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus. **1**. Quito-Ecuador: Copyright, 2008, pp. 96.

**Fidrianny, Irda; et al.**, "In vitro antioxidant activities from various extracts of banana peels using abts, Dpph assays and correlation with phenolic, Flavonoid, Carotenoid content". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **6**(8), 2014, ( Indonesia). pp. 299–303..

**Fidrianny, Irda. & Nurfitri, H.** "Research Article In vitro antioxidant activities , phenolic , flavonoid and carotenoid content from different polarity extracts of five citrus peels using DPPH and Cuprac method " *Journal of Chmical and Pharmaceutical Research*, **7**(4), 2015, ( Indonesia). pp. 1525–1531.

**Freire, Alina.** *Botánica Sistemática Ecuatoriana*. Segunda Edición. Quito-Ecuador: MSSBotSistemática, 2004, pp. 2004

**Galán de Mera, Antonio & Sánchez Isidoro.** *Principios de Botánica Farmacéutica* [online]. Cajamarca-Perú: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo - Fondo Editorial, 2013.[Consulta: 14 junio 2018]. Available at: doi:10.13140/RG.2.1.3523.0806

**Gassull, Miguel; et al.** *Una visión integrada de la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal*. Tercera Edición. España: Copyright, 2007, pp 117-128.

**Gómez, H. ; et al.**, "Actividad antiinflamatoria de productos naturales". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* [online], 2011, (Perú), **10**(3), pp. 182–217. [Consulta: 14 junio 2018].ISSN 07177917. Available at: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85618379003>

**Jaeger, Baptiste. ; et al.** "Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation". *Molecular Aspects of Medicine Elsevier* [online], 2017, (Estados Unidos) **61**, pp. 50–62. [Consulta: 20 junio 2018]. ISSN 18729452. Available at: doi:10.1016/j.mam.2017.11.003

**Justil, Hugo & Arroyo, Jorge.** "Extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* (carqueja) sobre el cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas". *Laboratorio de Farmacología*,

*Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú*, **71**(2), (2010), (Perú). pp. 88–96.

**Keller, RB.** *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*. New York: Nova Science Publishers, 2009, pp. 2-23

**Kuroyanagu, M.; et al.** "Studies on the constituents of *Baccharis genistelloides*". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* [online], 1997, (Japón) **117**(11), pp. 415–434. [Consulta: 18 junio 2018]. ISSN 09168451. Available at: doi:10.1248/cpb.37.3229

**Liu, Xuemei; et al.** "A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies" [online], 2018, (USA) **97**(June), pp. 24–32. [Consulta: 18 junio 2018]. Available at: doi:10.1016/j.yrtph.2018.06.003

**Martínez, Euclides & Garrido, Osvaldo.** "Farmacocinética : antiulcerosos y antiinflamatorios". *Rev Hosp Jua Mex* . **80**(1), (2013), (México) pp. 41–53.

**Martínez, María; et al.** "Multivariate statistical analysis of morpho-anatomical data of nine sect. Caulopterae species (*Baccharis* – Asteraceae) used in folk medicine". *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [online], 2018, (Argentina), pp.2-4. [Consulta: 14 junio 2018] ISSN 0102695X. Available at: doi:10.1016/j.bjp.2018.05.002

**Martínez, Silvia; et al.** "Estudio in Vitro De La Actividad Antifúngica De Extractos Vegetales Del Género *Baccharis* Sobre *Candida Albicans*". *Revista Boliviana De Química*. **28**(1),( 2011), (La Paz-Bolivia) pp. 35–40.

**Meijide, G.; et al.** "Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2 Texto completo". *Publicado en Rev Esp Reumatol*.(2000) pp.33–55.

**Mendoza, Zhofre & Yaguana, Celso.** *Plantas medicinales de la zona andina de la provincia de Loja* . Primera Edición. Loja-Ecuador: ,2014 pp. 27-29.

**Miranda, M.** *Farmacognosia y productos naturales: Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas*. Sexta edición. La Habana-Cuba, 2006. pp. 40-41.

**Mulero, J. et al.** "Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides". *Food Chemistry Elsevier* [online], 2015, (Murcia-España) pp. 25-31. [Consulta: 18 junio 2018]. ISSN 18737072. Available at: doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.141

**Muster, D.** "Anti-inflammatory drugs". *EMC-Stomatologie* [online], 2005, (Mumbai-India) **1**(1), pp. 21–29. [Consulta: 11 junio 2018]. Available at: doi:10.1016/j.emcsto.2005.01.005

**Nogueira-Librelo, D. et al.** "There have been many epidemiological studies linking flavonoid intake to health benefits and many *in vitro* studies demonstrating various biological effects of flavonoids that should be reflected by health benefits". *Nova Science Publishers*, **147**(June), (2016), (Nueva York- Estados Unidos) pp. 326–335.

**Millikan, L.** Drug Therapy in Dermatology. [online]. New York:Copyright, 2016. [Consulta: 19 junio 2018]. Available at: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/esepoch/reader.action?docID=1648225&query=Drug+Therapy+in+Dermatology%2C>

**Nadendla, Rama Rao.** *Principles of Organic Medicinal Chemistry*, Chalapathi Nagar -India: Copyright, New Age International Limite, Publishers, 2005. pp. 232-234.

**Prada, Jessica.** Análisis metabólico de la especie *Baccharis latifolia* (Asteraceae) en la Sabana de Bogotá. [online]. (Tesis).Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Departamento de Biología Biorgánica. (Bogotá-Colombia), 2015 p.95. [Consulta: 19 junio 2018]. Available at: <https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/10654/6623/1/ANALISIS%20METABOLOMICO%20DE%20Baccharis%20latifolia%20.pdf>

**Perez, Francisco & Fraga, Cesar.** "Research trends in flavonoids and health". *Archives of Biochemistry and Biophysics B.m.: Elsevier* [online], 2018, (Madrid-España), **646**(March), pp. 107–112. [Consulta: 18 junio 2018] ISSN 10960384. Available at: doi:10.1016/j.abb.2018.03.022

**Real Farmacopea Española. Madrid.** Madrid-España, 2003. p. 95.

**Roche,** Cell Proliferation Reagent WST-1. *Cell Proliferation* [online]. 2007. **1**(11), pp. 1–4. [Consulta: 18 junio 2018] ISSN 0006291X. Available at: doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.050

**Saraswat, Jyoti & Bhattacharya Partha.** 2013. "Effect of duty cycle on energy". *International Journal of Computer Networks & Communications (IJCNC)* [online]. 2013. (Barcelona-España) **5**(1), pp.125–140. [Consulta: 18 junio 2018]. Available at: doi:10.5121/ijcnc.2013.5109

**Schenke, Dirk, et al.** "Suppression of UV-B stress induced flavonoids by biotic stress: Is there reciprocal crosstalk" *Plant Physiology and Biochemistry B.m.: Elsevier* [online], , 2018, (Alemania), pp. 6. [Consulta: 18 junio 2018]. ISSN 09819428. Available at: doi:10.1016/j.plaphy.2018.06.026 6

**SENPLADES,** 2013. *Plan Nacional Buen Vivir.pdf* [online]. 2013, (Quito-Ecuador) pp. 59–68. [Consulta: 20 junio 2018]. ISBN 978-9942-07-448-5. Available at: [www.planificacion.gob.ec/Cnseemplades@seemplades.gob.ec/Cnwww.buenvivir.gob.ec/Cnwww.buenvivir.gob.ec](http://www.planificacion.gob.ec/Cnseemplades@seemplades.gob.ec/Cnwww.buenvivir.gob.ec/Cnwww.buenvivir.gob.ec) 135

**Singh, A.** *Compendia of World's Medicinal Flora.* United States of America: Chapman and Hall/CRC, 2016 pp. 1-13.

**Tan, An & Berridge, Michael 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 Tamizajeanti-inflammatory agents". *Journal of Immunological Methods* [online], 2018 (Granada-España) **238**(1–2), pp. 59–68. [Consulta: 18 junio 2018]ISSN 00221759. Available at: doi:10.1016/S0022-1759(00)00156-3

**Tapia, José.** "Asteráceas". *Biodiversidad y desarrollo hermano en Yucatan* [online], 2004. (Yucatán-México). pp. 1-4. [Consulta: 18 junio 2018] Available at: <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/18 Asteraceas.pdf>

**Tropicos.** *Baccharis genistelloides (Lam.) Pers.* [Consulta: 18 junio 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/2722899>

**Villalba, Ericka.** "Inflamación I" . *Revista de Actualización Clínica,* **43,** (2014), (La Paz-Bolivia). pp. 2261–2265.

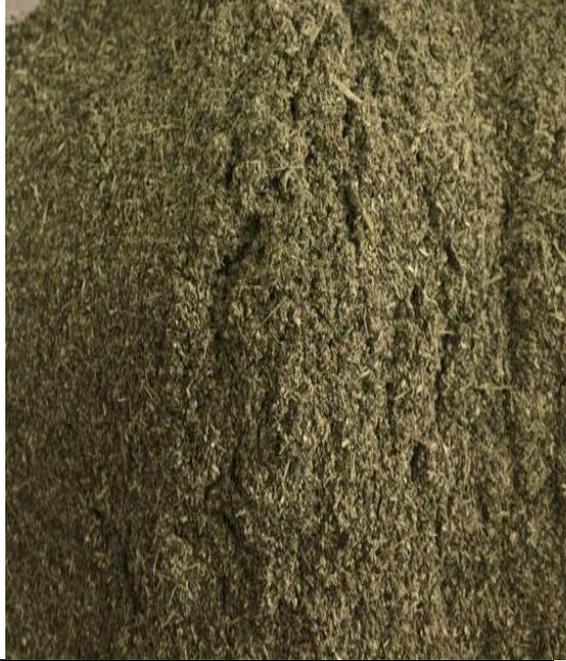
**Watson, Ronald Ross.** *Pyphenols in Human Health and Disease.* Volumen 1. London: Elsevier Science & Technology, 2013 pp. 2-15.

**Wan, Lin & Jiang, Jian.** "Protective effects of plant-derived flavonoids on hepatic injury". *Journal of Functional Foods* B.m.: Elsevier [online]. 2018, (China), **44**(March), pp. 283–291. [Consulta: 18 junio 2018] ISSN 17564646. Available at: doi:10.1016/j.jff.2018.03.015

**Wei, Mengying; et al.** "Urinary metabolomics study on the anti-inflammation effects of flavonoids obtained from Glycyrrhiza". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online] 2018. (China), **1086**(March), pp, 2–10. [Consulta: 18 junio 2018]. ISSN 1873376X. Available at: doi:10.1016/j.jchromb.2018.04.

## ANEXOS

### Anexo A: Recolección y preparación del material vegetal

	
Recolección de las hojas de <i>Baccharis genistelloides</i>	Material vegetal seco
	
Tamizado de la droga molida	Droga cruda seca y molida

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

**Anexo B: Control de calidad de las hojas de *Baccharis genistelloides***



Determinación del contenido de humedad

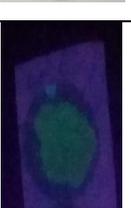
Determinación de cenizas Totales



Determinación de cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

**Anexo C: Tamizaje fitoquímico**

ENSAYO	TIPO DE EXTRACTO		
	ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
Sudan			
Drangedorff			
Mayer			
Wagner			
Baljet			
Liebermann-buchard			
Catequinas			

<b>Fehling</b>			
<b>Espuma</b>			
<b>Cloruro férrico</b>			
<b>Ninhidrina</b>			
<b>Boritrager</b>			
<b>Shinoda</b>			
<b>Antocianidina</b>			

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

**Anexo D: Control de calidad del extracto hidroalcohólico** Realizado por: Tannia Toapanta, 2018



Determinación de color



Determinación de olor



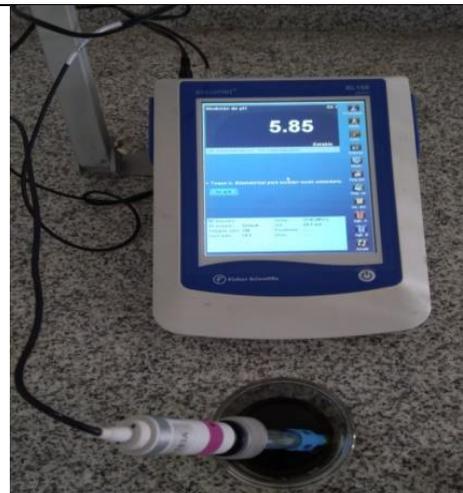
Determinación de índice de refracción



Determinación de sólidos totales

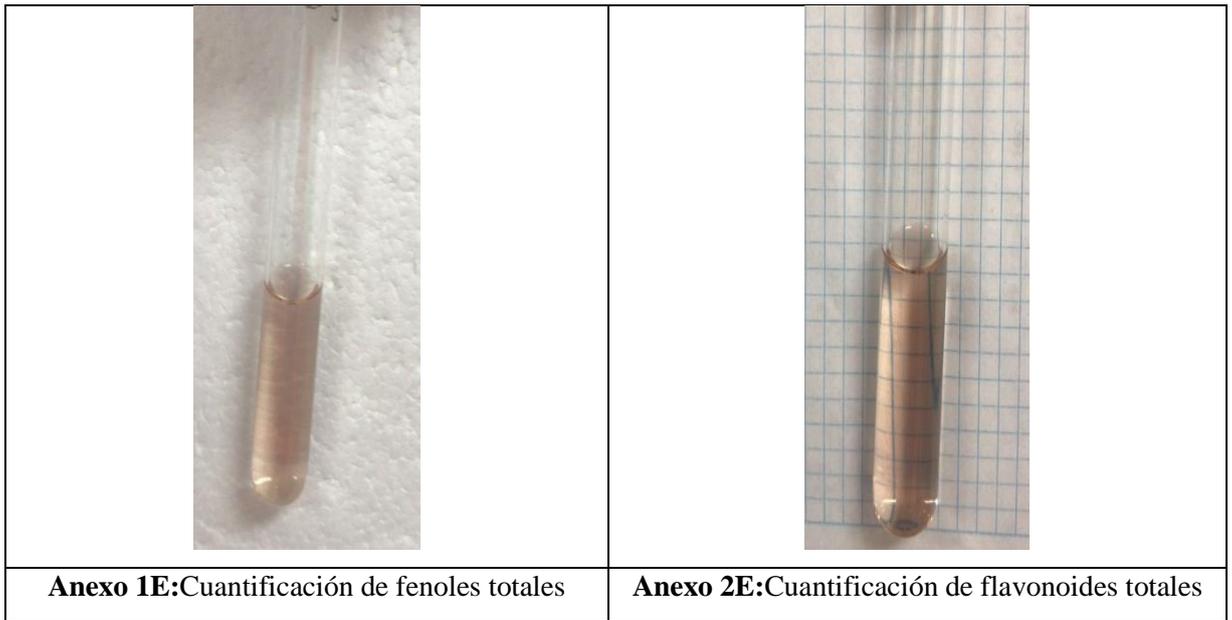


Determinación de densidad



Determinación de pH

**Anexo E:** Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

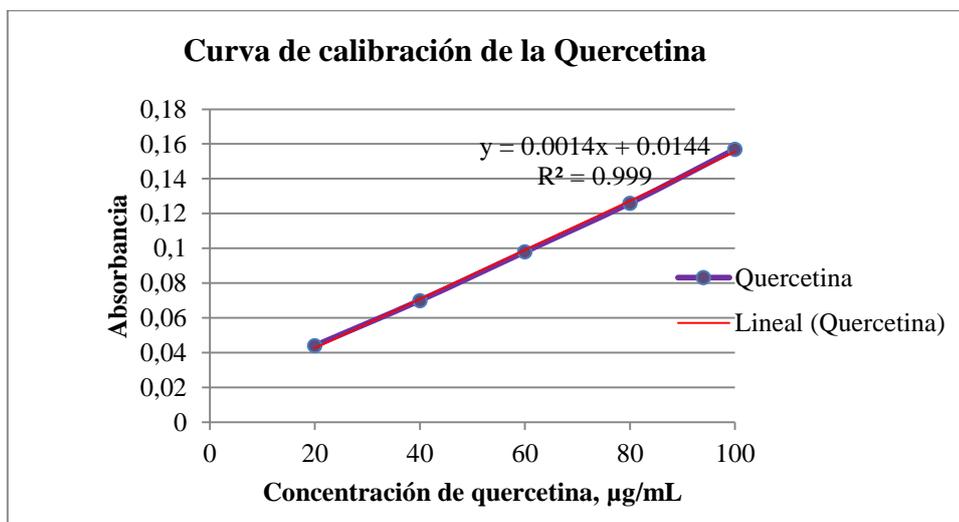


Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

**Anexo 3E:** Curva de calibración del estándar, Quercetina para cuantificación de flavonoides

CONCENTRACIÓN, $\mu\text{g/mL}$	ABSORBANCIA DE QUERCETINA
20	0.044
40	0.07
60	0.098
80	0.126
100	0.157

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

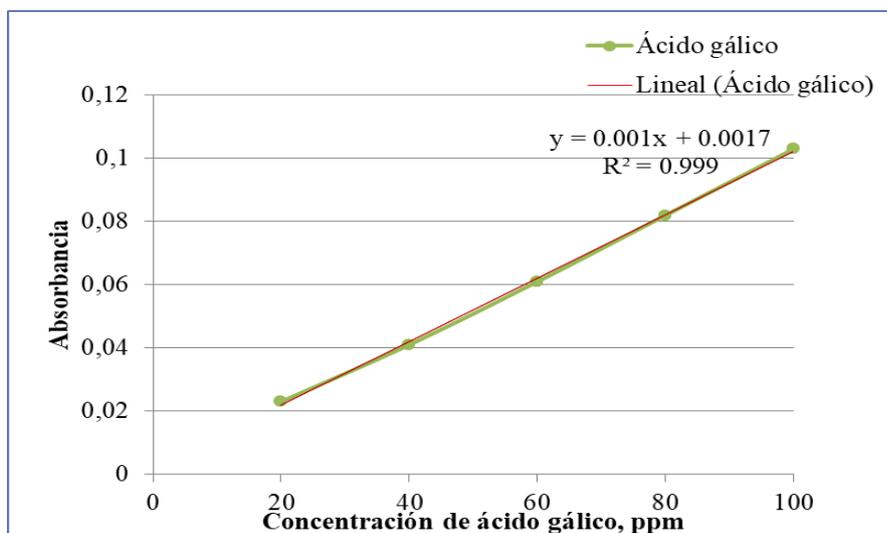


Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

**Anexo 4E:** Curva de calibración del estándar, Ácido Gálico, para cuantificación de fenoles

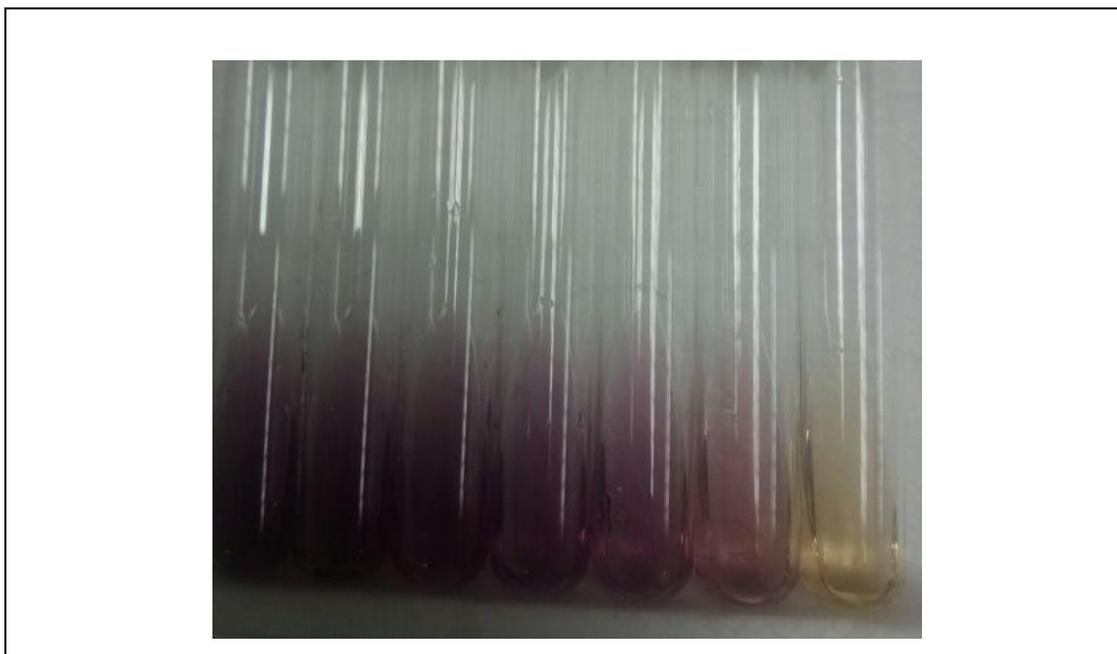
CONCENTRACIÓN, µg/mL	ABSORBANCIA DE ÁCIDO GÁLICO
20	0.023
40	0.041
60	0.061
80	0.082
100	0.242

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018



Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

**Anexo F:** Determinación de actividad antioxidante



Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

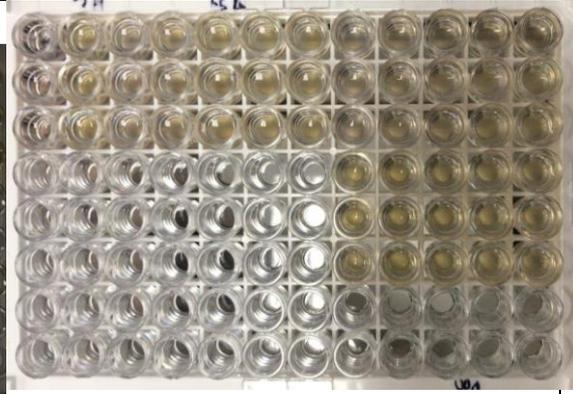
**Anexo G:** Determinación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro*



**Anexo 1G:** Procedimiento de aislamiento de neutrófilos



**Anexo 2G:** Ensayo anti-inflamatorio *in vitro* posterior a la incubación



**Anexo 3G:** Ensayo citotóxico *in vitro* posterior a la incubación

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

## Anexo H: Análisis estadístico de la actividad anti-inflamatoria *in vitro*

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: PORCENTAJE.INHIBICION.INFLAMATORIA					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	13571,799 <sup>a</sup>	9	1507,978	115,711	,000
Intersección	28525,109	1	28525,109	2188,809	,000
concentración.ppm	10864,366	4	2716,091	208,413	,000
FACTOR	2438,840	1	2438,840	187,139	,000
concentración.ppm *	268,593	4	67,148	5,152	,005
Error	260,645	20			
Total	42357,553	30			
Total corregido	13832,444	29			

a. R al cuadrado = ,981 (R al cuadrado ajustada = ,973)

### Anexo 1H: Test de ANOVA

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

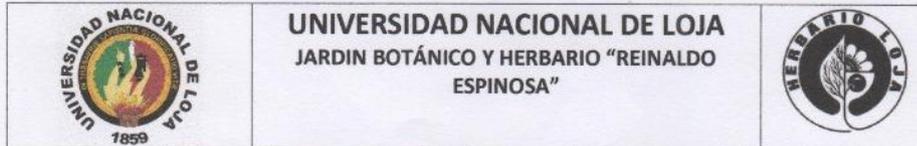
Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: PORCENTAJE.INHIBICION.INFLAMATORIA						
HSD Tukey						
(I) concentración.ppm	(J) concentración.ppm	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
12,5	25	-8,4763*	2,08425	,005	-14,7131	-2,2395
	50	-14,9112*	2,08425	,000	-21,1480	-8,6743
	100	-33,4545*	2,08425	,000	-39,6913	-27,2176
	200	-53,0223*	2,08425	,000	-59,2592	-46,7855
25	12,5	8,4763*	2,08425	,005	2,2395	14,7131
	50	-6,4349*	2,08425	,041	-12,6717	-,1980
	100	-24,9782*	2,08425	,000	-31,2150	-18,7413
	200	-44,5460*	2,08425	,000	-50,7829	-38,3092
50	12,5	14,9112*	2,08425	,000	8,6743	21,1480
	25	6,4349*	2,08425	,041	,1980	12,6717
	100	-18,5433*	2,08425	,000	-24,7802	-12,3065
	200	-38,1111*	2,08425	,000	-44,3480	-31,8743
100	12,5	33,4545*	2,08425	,000	27,2176	39,6913
	25	24,9782*	2,08425	,000	18,7413	31,2150
	50	18,5433*	2,08425	,000	12,3065	24,7802
	200	-19,5678*	2,08425	,000	-25,8047	-13,3310
200	12,5	53,0223*	2,08425	,000	46,7855	59,2592
	25	44,5460*	2,08425	,000	38,3092	50,7829
	50	38,1111*	2,08425	,000	31,8743	44,3480
	100	19,5678*	2,08425	,000	13,3310	25,8047

Se basa en las medias observadas.  
El término de error es la media cuadrática(Error) = 13,032.  
\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

### Anexo 2H: Test de Tukey: Prueba Post Hoc

Realizado por: Tannia Toapanta, 2018

**Anexo I:** Certificado de identificación botánica de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.

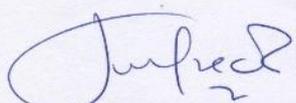


**A QUIEN INTERESE/CORRESPONDA:**

Certifico que en el herbario "Reinaldo Espinosa" –LOJA- de la Universidad Nacional de Loja, se ha realizado la identificación taxonómica de la planta denominada chilca de cerro, mano de dios, que corresponde a la especie *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. de la familia Asteraceae, que consta en el catálogo de plantas vasculares del Ecuador y en las bases Tropicos y The Plant List. Planta colectada por Tannia Bersabe Toapanta Iza

Lo certifico para los fines pertinentes.

Loja, 16 de marzo del 2018



Ing. Zhofre Aguirre Mendoza Ph.D.

**DIRECTOR DEL HERBARIO LOJA**



Anexo J: Patente no comercial de flora silvestre

  EL GOBIERNO DE ECUADOR

**MINISTERIO DEL AMBIENTE**

**PATENTE NO COMERCIAL DE MANEJO DE FLORA SILVESTRE**

**HERBARIO: 005-2018-VS-DPL-MAE**  
**Loja, 12 de julio de 2018**

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere: El Código Orgánico del Ambiente, autoriza al Ing. Zhofre Aguirre Mendoza con Ci. 110247006-7, Director del Herbario y Jardín Botánico "Reinaldo Espinosa" de la Universidad Nacional de Loja, para que realice en el país manejo y conservación "HERBARIO" con fines de préstamo, donación e intercambio con otros herbarios (exportación-importación) colección, investigación y educación; ubicado en la Argelia predios de la Ciudadela Universitaria, parroquia Punzara, cantón y provincia de Loja, de acuerdo a las siguientes especificaciones:

**Datos Generales**

- 1.- Nombre de la empresa: Herbario de la Universidad Nacional de Loja
- 2.- Representante Legal: Ing. Zhofre Aguirre Mendoza
- 3.- Nacionalidad: ecuatoriana
- 4.- Domicilio legal: Ciudadela Universitaria La Argelia.
- 5.- Teléfono: 072547275
- 6.- Domicilio: Federico Chopin y Juan José Castillo (ciudadela Juan José Castillo-Loja)

**Especificaciones**

- 1.- Solicitud de Patente dirigida a la Dirección Provincial: Ing. Zhofre Aguirre Mendoza Director del Herbario y Jardín Botánico "Reinaldo Espinosa".
- 2.- Complementos autorizados de manejo: préstamo, donación e intercambio (exportación-importación), investigación, colección exhibición y educación.
- 3.- Contraparte institucional del Ministerio del Ambiente: Dirección Provincial Ambiental Loja
- 4.- Responsabilidad técnica delegada por el Ministerio del Ambiente: Elga. Guadalupe Calle Cueva.
- 5.- Duración: 1 año – del 12 de julio del 2018 al 11 de julio del 2019

**6.- Obligaciones del beneficiario:**

- 6.1.- Llevar un registro completo de actividades realizadas.
- 6.2.- Presentar un informe anual para la renovación de la patente y aquella que fuera requerida por la autoridad en el transcurso del año, incluyendo la planificación de trabajo para el próximo año.
- 6.3.- Regirse a las disposiciones citadas al reverso del presente documento.
- 6.4.- Facilitar información y permitir el acceso de los funcionarios del Ministerio del Ambiente a sus instalaciones para el respectivo control.

  
Ing. Victor Hugo Dominguez Esparza  
**COORDINADOR GENERAL ZONAL- ZONA 7 (LOJA, EL ORO Y ZAMORA CHINCHIPE)**  
**DIRECTOR PROVINCIAL DE LOJA (SUBROGANTE)**

  
Ministerio del Ambiente  
COORDINADOR GENERAL ZONAL- ZONA 7  
DIRECCIÓN PROVINCIAL DE LOJA

VHDEI@ec.gob.ec



Dirección: Calle Heróica 71 y Alameda • Ciudad Nueva, 17002 • Loja - Ecuador • Teléfono: 593-7 350-7900

**Anexo K:** Guía de movilización interna de especímenes de flora silvestre

MINISTERIO DEL AMBIENTE



**GUIA DE MOVILIZACIÓN INTERNA DE ESPECIMENES DE FLORA SILVESTRE**

**Nro: 024-2018-UPN-VS-DPAL-MAE**

**Fecha de emisión:** 05 de octubre de 2018  
**Fecha de movilización:** 09 de octubre de 2018 **Válido hasta:** 10 de octubre de 2018

La Dirección Provincial del Ambiente de Loja, autoriza a: Jenny Susana Lazo con CI. Nro. 1723231294; Tannia Bersabe Toapanta con CI. Nro. 1805365085; y a María José Rivera con CI. Nro. 0604057976, para que movilice desde el sitio La Argelia, parroquia Punzara, cantón y provincia de Loja, muestras de flora silvestre, hasta el Herbario de la ESPDCH ubicado en la avenida 11 de noviembre y Canónigo Ramos perteneciente a la parroquia Lizarzaburu cantón Riobamba provincia de Chimborazo. Basaco en el contrato Marco MAE-DNB-CM-2018-0086.

La movilización se realizará en transporte terrestre: Público: como equipaje  
 El día 9 de octubre de 2018

ORDEN	FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	NATIVA ENDÉMICA INTRODUCCIÓN	APENDECE CITES	LISTA ROJA UICN	LISTA ROJA ECUADOR	ELEMENTO CONSTITUTIVO	NÚMERO	ESTADO	OBSERVACIONES S/PROCEDENCIA
Asterales	Asteraceae	Gnaphalium americanum	Lechugilla	Nativa	X	X	X		2	Planta fresca	Funda plástica
Asterales	Asteraceae	Baccharis genitivaloides	Mano de alca	Nativa	X	X	X		2	Planta fresca	Funda plástica
Asterales	Asteraceae	Sigesbeckia serrata	Sacha Jicams	Nativa	X	X	X		2	Planta fresca	Funda plástica
<b>TOTAL</b>									<b>6</b>		

**Observaciones:**

Las muestras permanecerán bajo la responsabilidad del BQF. Diego Vinuela Tapia Docente Investigador de la Escuela Politécnica de Chimborazo, quien consta como responsable del Proyecto en el Contrato Marco, hasta que la Autoridad Ambiental disponga lo pertinente.

  
 Lcda. Rocío Betancourt Lazo  
**COORDINADOR GENERAL ZONAL  
 ZONA 7 LOJA -EL ORO- ZAMORA  
 CHINCHIPE (Subrogante)**



  
 Srta. Jenny Susana Lazo  
**BENEFICIARIO  
 CI. 1723231294**

09-10-2018

16:01

Elaborado por: Blg. Guadalupe Calle



**Anexo L:** Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos firmado entre el MAE y la ESPOCH asignado con el número MAE-DNB-CM-2018-0086 y con número de orden de movilización 024-2018-UPN-VS-DPAL-MAE.

 SECRETARIA GENERAL  
FONM REG 14 SEP 2018  
REGISTRO 6367  
FOLIO 402  
MINISTERIO DEL AMBIENTE 

**CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO: "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" CELEBRADO ENTRE EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, A TRAVÉS DE LA SUBSECRETARÍA DE PATRIMONIO NATURAL Y LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.**

MAE-DNB-CM-2018-0086

**COMPARECIENTES:**

A la suscripción del presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica Denominado: "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" comparecen, por una parte el MINISTERIO DEL AMBIENTE, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural, legalmente representado por el LCDO. LÓPEZ MORA ALFREDO DANILO, en su calidad de Subsecretario de Patrimonio Natural, ocoforme se desprende de la Acción de Personal Nro. 0945 de 02 de mayo de 2018, delegado de la máxima autoridad mediante Acuerdo Ministerial Nro. 024 de 09 de marzo de 2016, publicado en el Registro Oficial Nro. 725 de 04 de abril de 2016, a quien en adelante se le denominará "MAE"; y, por otra parte, la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, debidamente representada por el Ing. BYRON ERNESTO VACA BARAHONA PhD., en su calidad de Rector, conforme consta del certificado emitido por el Ab. Carlos de la Cadena, Secretario General, documento que se agrega como habilitante y a quien en adelante se denomina "ESPOCH".

Las partes convienen en celebrar, el presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos respecto de la solicitud del programa de investigación científica denominado "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

**PRIMERA. ANTECEDENTES.-**

1. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 3 numeral 7 establece que son deberes primordiales del Estado "(...)7. Proteger el patrimonio natural y cultural del país. (...) " y 83 numerales 6 y 13 establece como deberes y responsabilidades de los ecuatorianos y los ecuatorianos "(...) 6. Respetar los derechos de la naturaleza, preservar un ambiente sano y utilizar los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible (...) 13. Conservar el patrimonio cultural y natural del país, y cuidar y mantener los bienes públicos (...)";
2. El artículo 14 de la Norma Suprema determina que: "...Se reconoce el derecho de la

Calle Madrid 1155 y Andalucía Código Postal: 170117 / Quito - Ecuador. Teléfono: 593-2-398-7600

1