



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
Ageratum conyzoides L.”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: ALVAREZ LEMA DENNIS JAVIER

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

Riobamba-Ecuador

2018

© 2018, Dennis Javier Alvarez Lema

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo experimental: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Ageratum conyzoides* L.” de responsabilidad del señor Dennis Javier Alvarez Lema, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Renato Vinueza Tapia

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Gissela Alexandra Pilco Bonilla

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Dennis Javier Alvarez Lema soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación y el patrimonio intelectual de la misma pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 25 de octubre de 2018

Dennis Javier Alvarez Lema

060469367-1

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación se lo dedico a Dios padre celestial, quien me guía cada instante de mi vida, quien me otorga la fuerza y el coraje necesario para luchar en contra de las dificultades y permitirme avanzar con paso firme en mi camino profesional.

A mis padres quienes con su comprensión, paciencia y dedicación se han convertido en el eje primordial de mi desarrollo personal y profesional. Además de contar con su apoyo emocional y económico que me han permitido cumplir cada uno de mis objetivos planteados.

A mi abuelita Rosario, mi hermanita Johana y mi gran amiga Jennifer; tres angelitos que me cuidan desde el cielo y que siempre creyeron en mí.

A mis hermanos (Darwin, Alexis y Joel), a todos mis familiares y amigos, quienes siempre me apoyaron y alentaron a cumplir una importante meta en mi vida.

Dennis Javier

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento sincero a Dios, por darme salud y sabiduría para culminar con éxito una etapa más de mi vida, por la fortaleza brindada para continuar por el buen camino.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias, a la Escuela de Bioquímica y Farmacia y a sus docentes por compartir sus conocimientos y experiencias en mi formación profesional y humanístico.

Al BQF. Diego Vinueza por su valioso apoyo, asesoramiento, dedicación y paciencia en el desarrollo de este trabajo de titulación, resolviendo mis inquietudes y mejorando mis destrezas.

A la BQF. Gissela Pilco Miembro del tribunal de tesis por el gran aporte brindado, tiempo y paciencia en la escritura del trabajo de titulación y la finalización de la misma.

A la Ing. Carla Haro Técnico docente del laboratorio de productos naturales, por facilitarme los equipos y materiales necesarios para la realización práctica de este trabajo experimental

Dennis Javier

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	XIV
SUMMARY	XV
CAPITULO I	
1 MARCO REFERENCIAL	6
<i>1.1 Biodiversidad del Ecuador.....</i>	<i>6</i>
1.1.1 Plantas medicinales.....	6
1.1.2 Estudios etnobotánicos	7
<i>1.2 Familia Asteraceae</i>	<i>7</i>
1.2.1 Genero Ageratum	8
1.2.2 Ageratum conyzoides L.....	8
<i>1.2.2.1 Características y sinónimos.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2.2 Hábitat.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2.3 Taxonomía.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2.4 Composición química</i>	<i>10</i>
<i>1.2.2.5 Usos farmacológicos</i>	<i>10</i>
<i>1.3 Inflamación.....</i>	<i>11</i>
1.3.1 Definición.....	11
1.3.2 Etapas de la inflamación	11
<i>1.3.2.1 Liberación de mediadores</i>	<i>11</i>
<i>1.3.2.2 Efecto de los mediadores</i>	<i>12</i>
<i>1.3.2.3 Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio</i>	<i>14</i>
<i>1.3.2.4 Regulación del proceso inflamatorio.....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.2.5 Reparación.....</i>	<i>15</i>
1.3.3 Tipos de inflamación	16
<i>1.3.3.1 Por su duración</i>	<i>16</i>
<i>1.3.3.2 Por su localización</i>	<i>16</i>
<i>1.3.3.3 Por su etiología</i>	<i>16</i>
<i>1.4 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's)</i>	<i>17</i>
1.4.1 Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos	17
1.4.2 Mecanismo de acción.....	18
1.4.3 Efectos adversos.....	19
<i>1.5 Compuestos antiinflamatorios de origen natural.....</i>	<i>19</i>
1.5.1 Compuestos Fenólicos	20

1.5.2	Flavonoides.....	20
1.6	<i>Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica in vitro</i>	21
1.6.1	Métodos colorimétricos in vitro con sales de tetrazolio.....	22

CAPITULO II

2	MARCO METODOLÓGICO.....	23
2.1	<i>Lugar de la investigación</i>	23
2.2	<i>Recolección del material vegetal</i>	23
2.3	<i>Identificación del material vegetal</i>	23
2.4	<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	24
2.4.1	Material Vegetal	24
2.4.2	Material Biológico.....	24
2.4.3	Material farmacológico	24
2.4.4	Materiales de laboratorio utilizados	25
2.4.5	Equipos	26
2.4.6	Reactivos.....	27
2.5	<i>Técnicas y métodos</i>	29
2.5.1	Determinación de los parámetros de control de calidad de la droga cruda	29
2.5.1.1	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	29
2.5.1.2	<i>Determinación de cenizas totales</i>	30
2.5.1.3	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	31
2.5.1.4	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	31
2.5.2	Tamizaje fitoquímico.....	32
2.5.2.1	<i>Ensayo de Sudán</i>	34
2.5.2.2	<i>Ensayo de Dragendorff</i>	35
2.5.2.3	<i>Ensayo de Mayer</i>	35
2.5.2.4	<i>Ensayo de Wagner</i>	35
2.5.2.5	<i>Ensayo de Baljet</i>	36
2.5.2.6	<i>Ensayo de Liebermann-Burchard</i>	36
2.5.2.7	<i>Ensayo de Catequinas</i>	36
2.5.2.8	<i>Ensayo de resinas</i>	37
2.5.2.9	<i>Ensayo de Fehling</i>	37
2.5.2.10	<i>Ensayo de la Espuma</i>	37
2.5.2.11	<i>Ensayo de cloruro férrico</i>	37
2.5.2.12	<i>Ensayo de Borntrager</i>	38
2.5.2.13	<i>Ensayo de la Ninhidrina</i>	38
2.5.2.14	<i>Ensayo de Kedde</i>	38

2.5.2.15	<i>Ensayo de Antocianidinas</i>	39
2.5.2.16	<i>Ensayo de Shinoda</i>	39
2.5.2.17	<i>Ensayo de Mucílagos</i>	39
2.5.2.18	<i>Ensayo de principios amargos y astringentes</i>	40
2.5.3	Preparación del extracto hidroalcohólico de <i>A. conyzoides</i>	40
2.5.4	Control de calidad del extracto hidroalcohólico	40
2.5.4.1	<i>Determinación de las características organolépticos</i>	40
2.5.4.2	<i>Determinación de densidad relativa</i>	41
2.5.4.3	<i>Índice de refracción</i>	41
2.5.4.4	<i>Medición del pH</i>	41
2.5.4.5	<i>Determinación de sólidos totales</i>	42
2.5.5	Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu	42
2.5.6	Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico	43
2.5.7	Determinación de la actividad antioxidante mediante ensayo de eliminación de DPPH	43
2.5.8	Ensayo antiinflamatorio y citotóxico in vitro	44
2.5.8.1	<i>Aislamiento de neutrófilos</i>	44
2.5.8.2	<i>Ensayo antiinflamatorio in vitro sobre neutrófilos aislados</i>	44
2.5.8.3	<i>Ensayo de citotoxicidad in vitro sobre neutrófilos aislados</i>	45
 CAPITULO III		
3	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
3.1	<i>Control de calidad de la droga cruda de <i>Ageratum conyzoides L.</i></i>	46
3.2	<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	47
3.3	<i>Control de calidad del extracto hidroalcohólico</i>	49
3.4	<i>Cuantificación de fenoles totales</i>	50
3.5	<i>Cuantificación de flavonoides totales</i>	52
3.6	<i>Actividad Antioxidante</i>	53
3.7	<i>Actividad antiinflamatoria in vitro</i>	54
3.8	<i>Citotoxicidad in vitro</i>	57
CONCLUSIONES		61
RECOMENDACIONES		62
 BIBLIOGRAFÍA		
 ANEXOS		

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Descripción taxonómica de <i>Ageratum conyzoides</i> L.....	9
Tabla 2-1: Mediadores químicos del proceso inflamatorio.....	13
Tabla 3-1: Clasificación de los aine´s según su selectividad por la enzima ciclooxigenasa.....	17
Tabla 4-1: Clasificación química de los AINE´S.....	17
Tabla 1-2: Descripción de los materiales de laboratorio utilizados	25
Tabla 2-2: Equipos utilizados en la investigación.....	26
Tabla 3-2: Descripción de los reactivos utilizados	27
Tabla 1-3: Resultados de los parámetros de calidad de la droga cruda.....	46
Tabla 2-3: Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de las partes aéreas (tallos, hojas y flores) de <i>Ageratum conyzoides</i>	47
Tabla 3-3: Control de calidad de las partes aéreas de <i>A. conyzoides</i> L.....	49
Tabla 4-3: Cuantificación de fenoles totales por el método de folin-ciocalteu.....	51
Tabla 5-3: Cuantificación de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio.	52
Tabla 6-3: Resultados de la actividad antioxidante del extracto liofilizado.	53
Tabla 7-3: Porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto y del ácido acetilsalicílico.....	55
Tabla 8-3: Porcentaje de viabilidad celular del extracto y del ácido acetilsalicílico.	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: <i>Ageratum conyzoides</i> L.	8
Figura 2-1: Representación esquemática de la vía ciclooxygenasa.....	18
Figura 3-1: Estructura general de los flavonoides y sus principales derivados.....	20
Figura 4-1: Reducción de las sales de tetrazolio (wst-1) a formazan.....	22
Figura 1-2: Protocolo para elaborar los extractos para el tamizaje fitoquímico.....	33
Figura 2-2: Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.....	33
Figura 3-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.....	34
Figura 4-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.....	34

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Curva de calibración de ácido gálico.....	51
Gráfico 2-3:	Curva de calibración de quercetina.....	52
Gráfico 3-3:	Actividad antioxidante a diferentes concentraciones del extracto liofilizado.....	54
Gráfico 4-3:	Representación gráfica del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto liofilizado y el ácido acetilsalicílico a diferentes concentraciones.	55
Gráfico 5-3:	Curva de concentración inhibitoria media del extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>A. conyzoides</i> de la actividad anti-inflamatoria	56
Gráfico 6-3:	Representación gráfica de la viabilidad celular del extracto liofilizado y el ácido acetilsalicílico a diferentes concentraciones.....	58
Gráfico 7-3:	Curva de la concentración letal media del extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>A. conyzoides</i> de la actividad citotóxica.....	59

INDICE DE ANEXOS

- Anexo A.** Preparación del material vegetal (*Ageratum conyzoides*)
- Anexo B.** Determinación de los parámetros del control de calidad de la droga cruda
- Anexo C.** Tamizaje fitoquímico de las diferentes extracciones de la droga cruda
- Anexo D.** Control de calidad del extracto
- Anexo E.** Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de *A. conyzoides*
- Anexo F.** Actividad antioxidante *in vitro* del extracto liofilizado a diferentes concentraciones
- Anexo G.** Aislamiento de neutrófilos de la sangre
- Anexo H.** Ensayo de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro*
- Anexo I.** Análisis estadístico de la actividad anti-inflamatoria del extracto liofilizado
- Anexo J.** Análisis estadístico de la actividad citotóxica del extracto liofilizado
- Anexo K.** Permiso de investigación
- Anexo L.** Permiso de movilización

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico obtenido de la porción aérea de *Ageratum conyzoides* L. para lo cual se determinó parámetros de calidad tanto de la droga cruda como del extracto hidroalcohólico. Posteriormente se realizó el tamizaje fitoquímico, con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios más representativos de esta especie vegetal. Mediante espectrofotometría UV-Vis se analizaron cuantitativamente los compuestos flavónicos y fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico liofilizado. Además, se evaluó la actividad antioxidante mediante el método colorimétrico basado en la captación de radicales libres (DPPH). Finalmente, para la evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica se utilizó una reacción colorimétrica provocada por una sal de tetrazolio (WST-1) que se reduce a formazan en presencia de neutrófilos aislados, los resultados se expresan como porcentaje de inhibición inflamatoria y viabilidad celular respectivamente. Los resultados obtenidos en el screening fitoquímico de la parte aérea de *Ageratum conyzoides* se identificó la presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, catequinas, aminoácidos, triterpenos y compuestos grasos. La cantidad de fenoles totales del extracto hidroalcohólico liofilizado fue de $24.13 \pm 0.76\%$, mientras que para flavonoides totales fue $6.14 \pm 0.08\%$. La capacidad para eliminar radicales libres de DPPH fue de 21.09% a la máxima concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. A la concentración de 2000 $\mu\text{g/mL}$ del extracto hidroalcohólico liofilizado se presenta un elevado porcentaje de inhibición inflamatoria, que fue de $88.03 \pm 0.11\%$ y una viabilidad celular de $51.89 \pm 1.56\%$ respecto al ácido acetilsalicílico que presenta valores de 72.89 ± 2.77 para la inhibición inflamatoria y $40.93 \pm 2.01\%$ de viabilidad celular a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Palabras Claves: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <ANTI-INFLAMATORIO>, <CITOTÓXICA>, <NEUTRÓFILOS>, <SAL DE TETRAZOLIO> <CELESTINA (*Ageratum conyzoides* L.)>, <FLAVONOIDES>.

SUMMARY

This research aims to evaluate the in vitro anti-inflammatory and cytotoxic activity of the hydro alcoholic extract obtained from the aerial portion of *Ageratum conyzoides* L. For which quality parameters were determined, not only the crude drug but also the hydro alcoholic extract. Subsequently, a phytochemical analysis was performed to identify the most representative secondary metabolites of this plant species. Using UV-Vis spectrophotometry, phenolic and flavonoid compounds were analyzed quantitatively in the lyophilized hydro-alcoholic extract. In addition, the antioxidant activity is evaluated by the colorimetric method based on free radical uptake (DPPH). Finally, for the evaluation of the anti-inflammatory and cytotoxic activity it is a colorimetric reaction caused by a tetrazolium salt (WST-1) that is reduced to a form in the presence of neutrals, the results obtained in the phytochemical screening of the aerial part of *Ageratum conyzoides* identified the presence of alkaloids, phenols, flavonoids, tannins, coumarins, catechins, amino acids, triterpenes and fatty compounds. The amount of total phenols of the lyophilized hydro-alcoholic extract was $24.13 \pm 0.76\%$ while for total flavonoids it was $6.14 \pm 0.08\%$. The capacity to eliminate DPPH free radicals was 21.09% at the maximum concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$. At the concentration of 2000 $\mu\text{g/mL}$ of the lyophilized hydro-alcoholic extract, there is a high percentage of inflammatory inhibition, which was $88.03 \pm 0.11\%$ and a cell viability of $51.89 \pm 1.56\%$ with respect to acetylsalicylic acid which has values of $72.89 \pm 2.77\%$ for inflammatory inhibition and $40.93 \pm 2.01\%$ cell viability at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$.

Key words: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <ANTI-INFLAMMATORY>, <CYTOTOXIC>, <NEUTROPHILS>, <TETRAZOLIAN SALT>, <CELESTINE (*Ageratum conyzoides* L.)>, <FLAVONOIDS>.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es un mecanismo de defensa del cuerpo ante diversos estímulos o agresiones del medio externo causado por agentes físicos, químicos y biológicos. Aunque también existen procesos inflamatorios que derivan de patologías pre-existentes. Por lo general, la inflamación se produce por la liberación de mediadores químicos contenidos en gránulos dentro de células como son los mastocitos, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos. Los procesos inflamatorios vienen acompañados de dolor muscular y otros síntomas inespecíficos (Chen *et al.*, 2018, p. 4).

Los fármacos de primera elección a nivel mundial para el tratamiento del dolor y la inflamación debido a su eficacia, son los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) (Lanas, 2006, pp. 16-17). Sin embargo, la aparición de efectos adversos, el uso indiscriminado y tratamientos por largos periodos de tiempo han provocado la aparición de enfermedades gastrointestinales (úlceras pépticas, hemorragia, lesión de la pared abdominal, etc.) e incluso daños irreversibles a ciertos órganos cuando no es controlado a tiempo (Gil-aldea and Azanza, 2016, p. 138).

En la actualidad, se cuenta con una diversidad de medicamentos específicos para el tratamiento de la inflamación. Sin embargo, existe un grave problema de lesiones a la mucosa gástrica. Por lo cual, ha surgido la necesidad de buscar nuevas moléculas y la naturaleza ofrece una fuente infinita de recursos, entre ellas, moléculas con la misma actividad terapéutica pero de elevada eficacia y con menores efectos adversos en tratamientos prolongados (Tene *et al.*, 2007, p. 63).

Debido a la dificultad para acceder a los distintos servicios de salud en ciertas áreas, la población ecuatoriana ha hecho uso de los conocimientos ancestrales empleando plantas medicinales como tratamiento paliativo a distintas enfermedades y así poder mantener un buen estado de salud (Tene *et al.*, 2007, pp. 64-65). El propósito de este trabajo es fomentar la investigación sobre productos naturales (plantas) de gran interés farmacológico ya sean por métodos *in vitro* o *in vivo*, en este caso se evaluó la actividad antiinflamatoria y citotóxica del extracto hidroalcohólico de *Ageratum conyzoides* (Virgínia *et al.*, 2016, pp. 15-16).

La especie vegetal *Ageratum conyzoides* en el Ecuador, es una planta con usos farmacológicos desconocidos ya que es considerada una maleza para diferentes cultivos y se localiza en la región tropical y subtropical del país (Okunade, 2010, pp. 1-2; Water *et al.*, 2018, p. 22). Actualmente, varias especies de la familia Asteraceae presentan una actividad antiinflamatoria comparable al ácido acetil salicílico, por su capacidad para inhibir la formación de moléculas de señalización pro-inflamatorias tales como prostaglandinas y leucotrienos. También se observa menos efectos

adversos debido a la distinta composición cualitativa o cuantitativa de metabolitos secundarios entre las diferentes especies de esta familia (Heras *et al.*, 1998, pp. 161-162; Shen *et al.*, 2018, pp. 3-5).

En estudios recientes de esta especie se verifico su capacidad como insecticida en los cultivos, antiinflamatorio (en forma de emplasto), antimicrobiano, antioxidante y antipirético (Rioba and Stevenson, 2017, pp. 3-4). Otro estudio demostró la actividad anticonceptiva *in vivo* del extracto de polimetoxiflavonas de esta planta, siendo una investigación de gran importancia médica para prevenir embarazos no deseados y por ende los abortos provocados (Faqueti *et al.*, 2016, pp. 17-18).

El presente trabajo de investigación se divide en cuatro capítulos que trata de explicar la línea de investigación utilizada.

Capítulo I, representado por el marco teórico que responde a las preguntas epistemológicas en cuanto al tema de interés, específicamente sobre la actividad antiinflamatoria y citotóxica que puede presentar *Ageratum conyzoides*. Por lo cual, se realizó una investigación bibliográfica exhaustiva de artículos científicos que promovió la realización de esta investigación.

Capítulo II, indica la metodología a seguir para realizar adecuadamente las diferentes pruebas y ensayos y así alcanzar los objetivos propuestos para esta investigación.

Capítulo III, se reportó los resultados obtenidos del trabajo experimental, al igual que el análisis correspondiente a cada uno de ellos y una relativa comparación con los datos obtenidos en bibliografía, resolviendo los paradigmas académicos relacionados al tema.

Finalmente se plantea las conclusiones y recomendaciones respectivas en concordancia con los objetivos propuestos. También se muestran los anexos, resultados e hipótesis analizados. Además, se adjunta la bibliografía de los libros, revistas y artículos científicos referenciados en el marco teórico sobre las variables de la investigación.

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

La ciencia en la búsqueda de alternativas para identificar nuevas moléculas con alto potencial antiinflamatorio, ha originado la ejecución de numerosas investigaciones de diferentes especies vegetales con el fin de encontrar sustancias o componentes que presenten una elevada eficacia y sobretodo mayor seguridad en el tratamiento farmacológico. Las plantas medicinales son una de las formas más antiguas de medicamento y constituyen una elección importante a considerar (Water *et al.*, 2018, pp. 3-5).

Existen varios estudios que han demostrado con evidencia experimental el papel de metabolitos aislados de plantas sobre el efecto antiinflamatorio comprobado para varias especies vegetales (plantas medicinales). Una de ellas es *Arnica montana* (Asteraceae) que contiene quercetina-3-O-glucósido, luteolina-7-O-glucósido y kaemferol-3-O-glucósido entre otros flavonoides, lo que justifica el uso de esta droga como un antiinflamatorio de uso externo. También, *Calendula officinalis* (Asteraceae) es una planta medicinal muy utilizada en la actualidad como antiinflamatoria debido a que contiene flavonoides tales como glicósidos de iso-ramnetina y quercetina que proveen su acción farmacológica (Ada *et al.*, 2015, pp. 5-12).

En la familia de las Asteraceae se ha realizado el estudio del efecto antiinflamatorio del flavonoide quercetina y sus derivados; aislados a partir de diversos géneros y especies vegetales de esta familia, mediante un ensayo de inflamación crónica en animales de experimentación (ratas) y en modelos *in vitro*, mostrando una actividad antiinflamatoria elevada y sin diferencias significativas con el control utilizado (Heras *et al.*, 1998, pp. 162-163).

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Ecuador es un país mega diverso si hablamos de fauna y flora, se encuentran especies tanto nativas como introducidas, algunas de estas son utilizadas ancestralmente como remedios caseros de culturas extendidas a lo largo y ancho del Ecuador, de allí la importancia de fomentar su investigación, a fin de generar nueva información útil para la sociedad (Tene *et al.*, 2007, pp. 66-77). Además, las plantas son necesarias e imprescindibles para el desarrollo de nuevos medicamentos para el control, tratamiento y profilaxis de varias enfermedades.

Actualmente, las enfermedades que generan un proceso inflamatorio representan un gran problema de salud, constituyendo una de las principales causas de consulta médica (Xu and Larbi, 2017, p. 2). Por lo cual, el estudio de la actividad antiinflamatoria de nuevas moléculas de síntesis como aquellas aisladas a partir de productos naturales ha sido de gran interés científico en el área de farmacología, especialmente por la capacidad que tienen ciertos compuestos de interferir en la evolución de las enfermedades que provocan procesos inflamatorios (Lin and Li, 2018, pp. 179-184).

Las investigaciones de las plantas medicinales, que evidencien actividad antiinflamatoria son esenciales para promover su uso, y reducir el consumo indiscriminado de medicamentos convencionales (AINE's) que en muchas de las ocasiones producen una gran cantidad de efectos adversos (Lanas, 2006, p. 16).

Cabe resaltar que la planta *Ageratum conyzoides* se encuentra en regiones tropicales y subtropicales del Ecuador, presenta una buena distribución, es fácil de encontrar e identificar. Sin embargo, es considerada como maleza invasiva de los cultivos. Tradicionalmente, se consume en infusión y se emplea como anti-flatulento, antioxidante, reductor del colesterol, antipirético, y también en forma de emplastos como antiinflamatorio en casos de artritis y artrosis en las comunidades aledañas a la provincia de Loja (Okunade, 2010, pp. 1-3).

Esta investigación está dirigida al beneficio de la población en general y más aún a aquellos pacientes que utilizan los medicamentos AINE's por periodos prolongados, a su vez se utilizará los recursos naturales existentes en el Ecuador, promoviendo la concientización a la población sobre el mantenimiento y cuidado que necesitan las plantas, incentivando su utilización y evitando la desaparición de diversas especies con propiedades farmacológicas. Además de promover el desarrollo económico de las comunidades aledañas a la ciudad de Loja y entidades interesadas (Water *et al.*, 2018, p. 3).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Ageratum conyzoides* L.

Objetivos específicos

1. Identificar cualitativamente los grupos fitoquímicos representativos en la parte aérea de *A. conyzoides* mediante screening fitoquímico.
2. Determinar la cantidad relativa de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto hidroalcohólico de *A. conyzoides* por métodos colorimétricos.
3. Determinar la capacidad captadora de radicales libres del extracto hidroalcohólico de *A. conyzoides* mediante el método de DPPH.
4. Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *A. conyzoides* sobre neutrófilos aislados.

CAPITULO I

1 MARCO REFERENCIAL

1.1 Biodiversidad del Ecuador

El Ecuador, es un país pequeño pero con una extraordinaria fuente de flora y fauna en todas las regiones y rincones del país. Algunas plantas por sus peculiares sustancias bioactivas pueden ser aprovechadas con fines terapéuticos (Water *et al.*, 2018, p. 4). De allí que se han descrito alrededor de 432 especies medicinales de las cuales 273 corresponden a plantas que se expenden a través de las hierberas en los mercados y 255 son plantas silvestres. También, se ha determinado que las plantas expandidas por las hierberas tratan alrededor de 77 dolencias mientras que las plantas silvestres aproximadamente 74 dolencias (Tene *et al.*, 2007, p. 63).

El conjunto de conocimientos etnobotánicos y ancestrales que poseen las diferentes etnias y culturas, hacen de este recurso una herramienta poderosa que despierta la curiosidad de los investigadores para el desarrollo de nuevos fármacos (Stojanovi *et al.*, 2017, pp. 393-394).

1.1.1 Plantas medicinales

Las plantas medicinales son aquellas que poseen múltiples metabolitos secundarios, producto de la biosíntesis de las plantas como mecanismo de defensa ante agentes externos y que en conjunto son usados para aliviar la sintomatología de una enfermedad o reestablecer el funcionamiento adecuado del organismo (Water *et al.*, 2018, p. 3). En los últimos años la humanidad ha experimentado con diferentes partes de las plantas con la finalidad de solucionar problemas de salud. Las plantas medicinales han demostrado su eficacia en el tratamiento de ciertas patologías, incrementando los beneficios y reduciendo los efectos adversos (Shailajan *et al.*, 2013, p. 139).

En la actualidad en el Ecuador aún mantienen estos conocimientos y prácticas ancestrales que han sido transmitidos de generación en generación. El uso de estas plantas medicinales es

llevado a cabo por personas especializadas como curanderos y/o brujos de las diferentes culturas, aunque en nuestros días también es posible observarlo en mercados de la ciudad. En algunos países las plantas medicinales son usadas como parte de los sistemas de salud (Heras *et al.*, 1998, pp. 161-162).

1.1.2 Estudios etnobotánicos

En el Ecuador, los estudios etnobotánicos se inician en la época colonial, tiempo en el cual varios personajes españoles realizaron estudios botánicos recopilando valiosa información del uso terapéutico de las plantas a través de un interrogatorio a los pueblos indígenas, sobre todo a las personas responsables de cuidar y conservar estos conocimientos ancestrales y culturales. Charles Marie de la Condamine y Joseph de Jussieu, miembros de la misión geodésica Francesa (1736) son los que inician la historia científica etnobotánica en la región andina (Tene *et al.*, 2007, pp. 3-5).

Cuando desapareció la sociedad nativa del país junto con ella, también se eliminaron varios de los conocimientos acerca del uso de plantas y animales. Además, el manejo y utilización adecuada de los diferentes modelos ancestrales. En este lapso de tiempo fue donde se reveló por primera vez propiedades, características taxonómicas y usos medicinales de diversos frutos, vegetales, plantas medicinales, entre otras (Sargin, 2018, pp. 3-4).

1.2 Familia Asteraceae

Es la familia de plantas más numerosa en nuestro país, y está altamente distribuida por todo el mundo (cosmopolita) pero se halla mejor representada en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales. El origen etimológico del nombre de la familia Asteraceae proviene del término latino “aster” que significa “estrella” y que se refiere a la forma de sus inflorescencias (Kenny *et al.*, 2014, p. 4).

Las asteráceas comprenden alrededor de 1700 géneros y unas 24.000-30.000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida (Kenny *et al.*, 2014, p. 5). En esta familia se incluyen desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta árboles de más de 30 m. Son fácilmente reconocibles por su estructura reproductiva sus inflorescencias se disponen en forma sésil sobre un receptáculo ensanchado (capítulo) (Okunade, 2010, pp. 1-2). En el Ecuador existe

aproximadamente 160 géneros, en los bosques andinos y páramos se ha registrado 44 géneros nativos de tipo arbustivos o arbóreos y son un componente importante de la vegetación andina (Shen *et al.*, 2018, p. 1).

1.2.1 Genero Ageratum

Es un conjunto de plantas pertenecientes a la familia Asteraceae con flores pomposas a manera de pequeñas umbelas y de colores vistosos tales como el azul-lavanda, rosa, lila o blanco. Comprende aproximadamente 200 especies que han sido descritos en regiones tropicales y subtropicales. Estas son plantas herbáceas anuales o perennes nativas de América (Faqueti *et al.*, 2016, p. 5).

1.2.2 Ageratum conyzoides L.

Es una especie vegetal nativa de Brasil, Argentina y Paraguay. Su nombre deriva del latín *ageraton*/griego *agératos*, que significa “no envejece/ de larga duración”, es decir, una planta que conserva el color de sus flores prolongadamente y *conyzoides* del epíteto latino que alude semejanza al género *Conyza*; *konops* = "pulga", o *konis* = "polvo", refiriéndose al polvo de la planta seca que se utiliza para repeler insectos (Shirwaikar *et al.*, 2003, pp. 117-118).



Figura 1-1: *Ageratum conyzoides* L.

Fuente: (Okunade, 2010, p. 3)

1.2.2.1 Características y sinónimos

Es una planta herbácea y erecta que llega a crecer cerca de los 70 centímetros de altura. Sus hojas son opuestas, el tallo es piloso (presenta pequeños vellos suaves en toda la superficie del mismo), las flores pueden variar de color entre los tonos blanco y rosado, teniendo los extremos de las ramas de un tono rojizo (Shirwaikar *et al.*, 2003, pp.118). Su olor es desagradable, a pesar de que sus familiares más cercanos no producen aroma alguno. Se conoce también con el nombre de “caángay, pedorrera, celestina azul, mejorana, flor noble, hierba de chucho, hierba de perro, mastranto o santa lucía” (Faqueti *et al.*, 2016, p. 5).

1.2.2.2 Hábitat

A. conyzoides es una hierba que se desarrolla en ambientes tropicales y subtropicales, distribuidas ampliamente en África, Asia y Sudamérica. En el Ecuador, esta planta es considerada una maleza que se desarrolla fácilmente en cultivos, pastos, plantaciones, terrenos baldíos y bordes de caminos (Shirwaikar *et al.*, 2003, p. 17).

1.2.2.3 Taxonomía

Tabla 1-1: Descripción taxonómica de *Ageratum conyzoides* L.

Reino	Plantae	Familia	Asteraceae
Subreino	Tracheobionta	Tribu	Eupatorieae
División	Magnoliophyta	Género	Ageratum
Clase	Magnoliopsida	Especie	Ageratum conyzoides L.
Orden	Asterales		

Fuente: (Shailajan *et al.*, 2013, p. 2)

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

1.2.2.4 Composición química

La planta *A. conyzoides* tiene numerosos componentes con actividad biológica tales como glucósido cianogénico, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos (linalool, limoneno, eugenol, etc), esteroides, fenoles, flavonoides, alcaloides (lycopsamina y eguinatina son los únicos alcaloides aislados de esta planta) y otros compuestos (aurantiamida acetato, ácido fumárico, ácido cafeico y fitol) (Rioba and Stevenson, 2017, p. 2). El aceite esencial contiene cumarina, ageratocromeno, β -cariofileno y 7 metoxi-2,2 dimetilcromeno, siendo el último un componente importante en cantidad (representa el 30%) (Okunade, 2010, p. 4). La planta denominada *A. conyzoides* contiene alrededor de 21 flavonoides polioxigenados, 14 flavonas polimetoxiladas (derivados de tricina y 3, 4, 5-flavonas oxigenadas, sustancia química rara en los productos naturales) y otros como la 5-metoxinobiletina, linderoflavona B, quercetina, eupalestina entre otros (Chen, Mu and Kitts, 2018, p. 139).

1.2.2.5 Usos farmacológicos

Las hojas son usadas para diversas afecciones tales como analgésico, antiespasmódico, antiinflamatorio, antipirético, antioxidante, antimicrobiano, purgante, tratamiento de heridas producidas por cortes y de parásitos intestinales (Faqueti *et al.*, 2016, p. 19; Rioba and Stevenson, 2017, pp. 4-5); la planta entera se emplea en infusión como emenagogo, expectorante, antihemorrágico, contra la diarrea y cuando se producen cólicos por flatulencia entre otros usos; la semillas y flores presentan vitaminas A y B; el aceite esencial demuestra actividad reguladora del crecimiento e insecticida contra la langosta del desierto *Schistocera gregaria* (Shailajan *et al.*, 2013, pp. 139-142).

En la medicina tradicional de distintas regiones del mundo se usa en dependencia a su ubicación y experiencias de las distintas culturas por ejemplo en Asia y América del Sur es empleada en el tratamiento de reumatismo, cólicos, fiebre, diarrea. Mientras que en el Ecuador el conocimiento etno-farmacológico, describe su uso como anti-flatulento, antiinflamatorio en el tratamiento de heridas y afecciones de piel. Se recomienda evitar su uso a elevadas dosis ya que producen mareos (efecto adverso) (Okunade, 2010, pp. 12-14).

1.3 Inflamación

1.3.1 Definición

La inflamación es un mecanismo defensivo natural del organismo formado con un conjunto de fenómenos moleculares, celulares y vasculares frente a una lesión tisular o focal causado por agentes físicos, químicos o biológicos (Xu and Larbi, 2017, p. 1). El foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos, mientras que las alteraciones vasculares permitirán la llegada de moléculas inmunes desde la sangre (Bektas *et al.*, 2017, p. 3).

Celso describió los cuatro signos de todo proceso inflamatorio los cuales son: calor, rubor, tumor y dolor. El *calor* y *rubor* son ocasionadas debido a las alteraciones vasculares cuando existe acumulación sanguínea en el foco de inflamación, el *tumor* se produce por el edema y acúmulo de células inmunes, mientras que el *dolor* es producido por la acción de ciertos mediadores químicos sobre las terminaciones nerviosas responsables del dolor (Gonzalez and Beltrán, 2010, p. 1).

1.3.2 Etapas de la inflamación

La inflamación se divide en cinco etapas bien definidas y son:

1.3.2.1 Liberación de mediadores

Al producirse un daño tisular el mastocito libera los mediadores de la inflamación ante diversos estímulos. Al progresar la inflamación en el foco inflamatorio se acumulan suficientes factores activados del complemento (C3a y C5a), los cuales actúan sobre los receptores de membrana, activando a los mastocitos y la liberación de mediadores. El mastocito es una célula sanguínea procedente de la médula ósea y localizada en casi todos los tejidos. Además, presenta en el citoplasma gránulos con mediadores preformados (Chhetri *et al.*, 2017, p. 4).

Otro mecanismo con el que se activa la liberación de mediadores del mastocito, es por la IgE, molécula que es captada por la membrana y se activa solo cuando el antígeno se conecta específicamente con dos IgE contiguas sobre la membrana del mastocito. Los mediadores

preformados son principalmente histamina, enzimas proteolíticas, factor quimiotáctico del eosinófilo, factor quimiotáctico del neutrófilo y heparina (Xu and Larbi, 2017, pp. 1-2).

El ácido araquidónico formado seguirá dos vías metabólicas, el ciclo de la enzima ciclooxigenasas a través de la cual se producen prostaglandinas (PG) y tromboxanos; y el ciclo de la lipooxigenasa que produce leucotrienos (LT). Todos estos compuestos corresponden a un segundo grupo de mediadores de la inflamación de carácter lipídico, que se sintetizan en el mastocito. El basófilo es otra célula responsable de liberar mediadores de la inflamación y se activan por los mismos mecanismos que el mastocito (Innes and Calder, 2018, p. 3).

1.3.2.2 Efecto de los mediadores

Estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos con la finalidad de favorecer el transporte y llegada de células inmunes y otras moléculas al foco inflamatorio. Cada uno de los mediadores presenta una función específica que se detalla a continuación:

Mediadores preformados

- **Histamina:** Es un mediador derivado del aminoácido histidina por descarboxilación y almacenado en el mastocito y el basófilo. Actúan en los receptores H1 de los vasos sanguíneos generando vasodilatación e incremento de la permeabilidad, mientras que, en los receptores H2 provoca efectos inhibidores o reguladores de la inflamación. La vasodilatación aumenta el flujo sanguíneo, causando enrojecimiento y aumento de la temperatura (sensación de calor); la permeabilidad capilar incrementada permite el flujo de proteínas y agua a través de los vasos sanguíneos produciendo un edema.
- **Enzimas proteolíticas:** De todas las enzimas proteolíticas liberadas por el mastocito, quizás la más importante es la kininogenasa, la cual, actúa sobre las proteínas presentes en la sangre conocidas como kininógenos, y que al producirse una ruptura en moléculas más pequeñas (péptidos) llamados kininas. Estas moléculas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor.
- **Factores quimiotácticos:** Son proteínas de alta peso molecular que se encargan de atraer a los eosinófilos y neutrófilos al sitio de la inflamación y activarlos de forma inmediata.
- **Heparina:** Su principal función es inhibir la coagulación facilitando la llegada de moléculas y células al foco inflamatorio.
- **Bradicininas:** Sintetizados y almacenados en las plaquetas, causantes de la contracción de los músculos lisos, aumento de la permeabilidad capilar, dilatación arterial, etc.
- **Citocinas:** Regulan el mecanismo de la inflamación (Fingleton, 2017, pp. 3-5).

Mediadores sintetizados de novo

- Prostaglandina E2: Es la prostaglandina más importante en el proceso inflamatorio ya que produce vasodilatación y dolor. La aspirina como antiinflamatorio bloquea la vía de la ciclooxigenasa y por ende evita la síntesis de esta prostaglandina.
- Leucotrieno B4: Es un factor quimiotáctico de los eosinófilos, mastocitos, macrófagos y neutrófilos.
- Factor activador de plaquetas (PAF): Se encarga de varias funciones como activar las plaquetas para liberar mediadores e iniciar los procesos de la coagulación. Además, produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. También es considerado un factor quimiotáctico y activador de neutrófilos (Innes and Calder, 2018, pp. 1-2).

Tabla 2-1: Mediadores químicos del proceso inflamatorio

MEDIADOR QUÍMICO	ACCIÓN
Histamina y serotonina (aminas vasoactivas)	Incremento de la permeabilidad
Bradicinina	Incremento de la permeabilidad y dolor
C _{3a} (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad opsonina
C _{5a} (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria.
Prostaglandinas (metabolitos del ácido araquidónico)	Vasodilatación, dolor, fiebre, activa a otros mediadores
Leucotrieno B ₄ (metabolito del ácido araquidónico)	Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Leucotrieno C ₄ , D ₄ , E ₄ (metabolitos del ácido araquidónico)	Incremento de la permeabilidad, bronco-constricción, vasoconstricción
Metabolitos del oxígeno (radicales libres)	Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular
Factor activador de plaquetas (PAF)	Incremento de la permeabilidad, bronco-constricción, cebado de leucocitos
Interleucina (IL-1) y Factor de necrosis tumoral (TNF) (citosinas)	Reacciones de fase aguda, activación endotelial, quimiotaxis
Óxido nítrico	Incremento de la permeabilidad, vasodilatación, citotoxicidad

Fuente: (Borges and Alvarado, 2016, p. 49)

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

1.3.2.3 Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

Los mediadores de la inflamación de forma cronológica generan dos efectos. Inicialmente alteraciones vasculares que facilitan la llegada de moléculas desde la sangre al sitio de inflamación al mismo tiempo que el edema. Después se libera factores quimiotácticos que favorecen la llegada de las células inmunes provenientes de la sangre y tejidos cercanos al foco inflamatorio. A continuación, se describen las funciones de cada uno de ellos.

Fase inicial: llegada de moléculas

- Inmunoglobulinas: Se unen al agente para bloquearlo, especialmente la IgG encargada de activar al complemento por la vía clásica. También, tienen la capacidad para unirse a los receptores por la porción Fc (FcR), localizados en la membrana de los fagocitos con lo cual potencia la fagocitosis.
- Factores del complemento: El complemento se activa por la vía alternativa (por productos generados por el germen), alcanzando la vía común y produciendo la lisis del agente causal. Los factores C3a y C5a, actúan sobre los receptores de membrana, con lo cual activan al mastocito y basófilo produciendo la liberación de mediadores y amplificando el fenómeno de la inflamación. El C5a es un factor quimiotáctico potente, mientras que el C3a, se une a receptores de los fagocitos, con lo cual potencia la fagocitosis.
- Proteína C reactiva (PCR): Encargada de activar el sistema del complemento por la vía clásica y fijar antígenos como el neumococo (Jiang *et al.*, 2018, pp. 1-2).

Fase tardía: llegada de células inmunológicas

- Basófilo: En conjunto con los mastocitos contribuyen con la liberación de mediadores.
- Neutrófilos: Son las primeras células en llegar al sitio de la inflamación, se encargan de eliminar al agente causal mediante la fagocitosis o excreción de sustancias tóxicas.
- Monocito/ Macrófago: proviene de la sangre/ tejidos respectivamente, se encargan de múltiples funciones relacionadas a la fagocitosis. Estas células cumplen con el proceso de fagocitosis de antígenos y como célula presentadora del antígeno a las células T y B. El macrófago sintetiza un péptido inespecífico, la interleucina 1 (IL-1) que favorece la producción y liberación de los neutrófilos, a nivel local activa la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B.
- Linfocitos T y B: Las células B producen IgE, pero unidas a los mastocitos o basófilos, potencian la inflamación. Por otro lado, las células T generan linfoquinas que promueven la respuesta inmune.

- Eosinófilo. Es una célula citotóxica en infecciones parasitarias pero en el proceso inflamatorio, tiene una función reguladora (Moriya, 2018, pp. 2-3).

1.3.2.4 Regulación del proceso inflamatorio

Esta etapa es fundamental en el proceso inflamatorio ya que se encarga de regular la respuesta de la inflamación mediante una serie de mecanismos inhibidores con la intención de finalizar o equilibrar el proceso evitando que la respuesta inmune sea exagerada. A continuación, algunos de los mediadores y su función para inhibir y equilibrar la respuesta inflamatoria.

- Histamina: actúa sobre los receptores H₂, activando las células T supresoras, inhibiendo la liberación de mediadores y suprimiendo la actividad de los neutrófilos.
- Prostaglandina E: Impide que los mastocitos y basófilos liberen mediadores de la inflamación y frena la proliferación y diferenciación de linfocitos.
- Agonistas autonómicos: El mastocito y el basófilo presentan en la membrana receptores α y β -adrenérgicos que regulan o controlan la liberación de mediadores. El receptor β -adrenérgico induce inhibición mientras que el α -adrenérgico produce la estimulación.
- Heparina: Impide la coagulación y estimula los factores del complemento.
- Eosinófilo. Son atraídas al sitio de la inflamación, donde liberan enzimas capaces de degradar a los mediadores de la inflamación; tales como la histaminasa que actúa sobre la histamina, la arilsulfatasa sobre los leucotrienos y la fosfolipasa sobre el factor activador de plaquetas (Fingleton, 2017, p. 4).

1.3.2.5 Reparación

En esta fase varios fenómenos van a intervenir en la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria. La reparación de tejidos inicia cuando el agente causal de la lesión ha sido eliminado o destruido. Estos procesos inician con la llegada de los fibroblastos al sitio de la inflamación, los cuales se activan por la interleucina-1, induciendo la proliferación y síntesis de colágeno, proliferación de células epiteliales y de vasos sanguíneos dentro de la herida (Borges and Alvarado, 2016, p. 48; Bektas *et al.*, 2017, p. 2).

1.3.3 Tipos de inflamación

La inflamación se clasifica de diversas formas entre ellas de acuerdo al tiempo de duración, carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización.

1.3.3.1 Por su duración

- a) Agudas: se caracteriza por ser una respuesta inmediata y de corta duración ante el agente agresor cuyo fin es liberar mediadores y la migración de leucocitos especialmente neutrófilos como defensa del organismo en el sitio de la lesión.
- b) Crónicas: se identifica por ser un proceso prolongado en el tiempo, que provoca destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación. Generalmente la inflamación aguda evoluciona a crónica cuando el agente causal no ha logrado ser eliminado y por ende impide el proceso de reparación (Xu and Larbi, 2017, pp. 1-2).

1.3.3.2 Por su localización

- a) Focales: cuando la inflamación se genera en determinadas zonas u órganos específicos, en cuyo caso se utiliza el sufijo “-itis”, por ejemplo, faringitis, otitis, laringitis, conjuntivitis, peritonitis.
- b) Diseminados: es el resultado de la propagación de procesos inflamatorios persistentes ya sea por fistulización o metástasis (Xu and Larbi, 2017, p. 3).

1.3.3.3 Por su etiología

- a) Infecciosas: el agente causal son bacterias, virus, parásitos o por toxinas microbianas.
- b) Traumáticas: ocasionadas por golpes intensos con respuesta inmediata o tardía, como ocurre con los esguinces.
- c) Térmicas: resultantes de quemaduras por calor o congelamiento.
- d) Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad: cuando existe alergias a determinados objetos u objetos o por procesos autoinmunes (Xu and Larbi, 2017, p. 2).

1.4 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's)

Actualmente, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) a nivel mundial son considerados de primera elección, para tratar dolencias de tipo inflamatorio, principalmente musculares, esqueléticas y articulares. Muchos de estos compuestos no tienen relación química entre sí a pesar de pertenecer al mismo grupo, pero presentan similitud en sus actividades farmacoterapéuticas (antipirético, analgésico y antiinflamatorio) y efectos adversos (Areia *et al.*, 2013, p. 244).

1.4.1 Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos

Tabla 3-1: Clasificación de los AINE's según su selectividad por la enzima ciclooxigenasa

No selectivos (COX-1 y COX-2)	Selectivos (COX-2) (COXIBE's)
Ácido acetilsalicílico (Aspirina)	Rofecoxib (Vioxx)
Acetaminofen (Paracetamol)	Valdecoxib (Bextra)
Indometacina	Parecoxib
Ibuprofeno y Cetoprofeno	Celecoxib
Naproxeno	Etoricoxib
Meloxicam y Piroxicam	Lumiracoxib

Fuente: (Batlouni, 2009, p. 538)

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

Tabla 4-1: Clasificación química de los AINE's

ÁCIDOS		NO ÁCIDOS	
Salicilatos	F. prototipo: Ácido acetilsalicílico	Sulfonilidas	Fármaco prototipo: Nimesulida
Pirazolona	F. prototipo: Metamizol		
Pirazolidindionas	F. prototipo: Fenilbutazona		
Oxicam	F. prototipo: Piroxicam		
Acético	-----	Alcanonas	Fármaco prototipo: Nabumetona

- Indolacético	F. prototipo: Indometacina		
- Pirrolacético	F. prototipo: Ketorolaco		
- Fenilacético	F. prototipo: Diclofenaco		
- Piranoindolacético	F. prototipo: Etodolaco	Paraaminofenoles	Fármaco prototipo: Paracetamol
Propiónico	F. prototipo: Naproxeno		
Nicotínico	F. prototipo: Clonixina		

Fuente: (Gil-aldea and Azanza, 2016, pp. 141-140)

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

1.4.2 Mecanismo de acción

Los AINE's actúan en la producción de prostaglandinas y tromboxanos, mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. En el caso de la COX-1 está relacionada con la formación de prostaglandinas y tromboxanos en las funciones fisiológicas; mientras que la COX-2 es una enzima que actúa en la inflamación inducida por citoquinas y mediadores (Gil-aldea and Azanza, 2016, pp. 139-140). Actualmente, existen fármacos con una alta especificidad sobre la enzima COX-2. El bloqueo de las ciclooxigenasas les proporcionan su efecto terapéutico como analgésico, antipirético y antiinflamatorio. Sin embargo, la inhibición de la enzima COX-1 tienen como consecuencia la aparición de efectos secundarios a nivel gástrico, renal y en la coagulación (Araia *et al.*, 2013, p. 245).

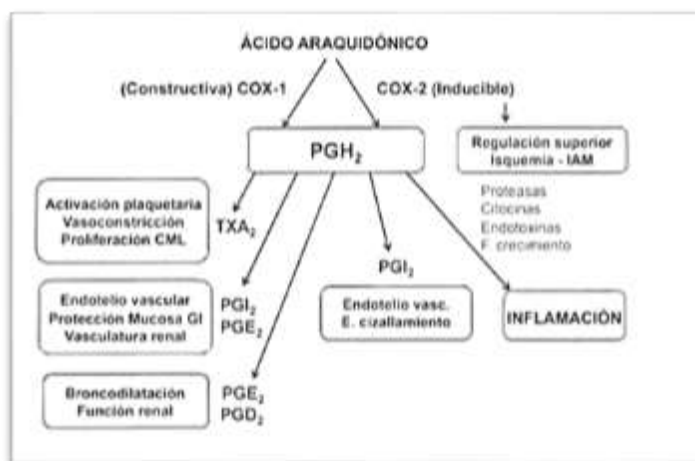


Figura 2-1: Representación esquemática de la vía ciclooxygenasa

Fuente: (Batlouni, 2009, p. 539)

1.4.3 Efectos adversos

Como todo medicamento los antiinflamatorios no esteroideos también presentan efectos adversos ya que bloquean la vía de las ciclooxigenasas, sobretodo de la COX-2. Estos efectos adversos pueden ser a nivel del:

- Sistema nervioso central (SNC): Cefalea, mareo, adormecimiento, insomnio.
- Hematológico: Anemia, trombocitopenia, neutropenia, eosinofilia. La aspirina inhibe de forma irreversible la agregación plaquetaria.
- Renal: Nefritis, síndrome nefrotóxico, falla renal, retención de fluido y de sodio debido a la inhibición de prostaglandinas necesaria para mantener la hemodinámica renal. El abuso de estos fármacos está asociado con nefropatía.
- Pulmonar: La neumonitis, alveolitis, infiltrado pulmonar y fibrosis pulmonar, indican una reacción inmune presentada hacia ciertos AINE´s como: naproxeno, y ácido tolfenámico.
- Efecto hipertensivo: Los AINE´s son causantes del incremento en la presión arterial en 5 mm Hg; ya que antagonizan el efecto de los hipertensivos (β -bloqueadores y vasodilatadores).
- Hipersensibilidad: Pueden ocasionar urticaria, rinitis, bronco-constricción y shock anafiláctico; debido al bloqueo de la ciclooxigenasa y al desvío del ácido araquidónico a la vía de la lipooxigenasa, aumentando la producción de leucotrienos, mediador del broncoespasmo induciendo al asma (Gil-aldea and Azanza, 2016, pp. 137-140).

1.5 Compuestos antiinflamatorios de origen natural

Las plantas medicinales con actividad antiinflamatoria son consideradas como terapia alternativa, ya que han demostrado cierta eficacia y presentan menor cantidad de efectos secundarios. Actualmente, existen varios estudios que evalúan la actividad antiinflamatoria de compuestos químicos o metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales (plantas), mediante modelos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*. La diversidad de compuestos químicos de una planta, permiten obtener una actividad farmacoterapéutico potenciada (actúan en sinergia) o reducida, siendo los fenoles y flavonoides de mayor importancia al presentar una actividad antiinflamatoria significativa (Lin and Li, 2018, pp. 288-289).

1.5.1 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios biosintetizados por las plantas, y se caracterizan por poseer un anillo aromático unido por lo menos a un grupo hidroxilo en su estructura química (Ferreira *et al.*, 2017, p. 6). Dentro de este grupo se destaca la diversidad de compuestos tales como taninos, lignanos, alcoholes fenólicos, estilbenos, entre otros. Los compuestos fenólicos debido a su diseño estructural han mostrado diversas propiedades farmacológicas en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* (Liu *et al.*, 2018, p. 18; Lin *et al.*, 2018, pp. 3-5).

En las plantas, los polifenoles se producen por dos vías biosintéticas. La ruta de los poliacetatos que producen quinonas y xantonas; y la ruta del ácido shikímico que provee la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina), ácido cinámico y sus derivados tales como fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas y derivados del fenilpropano (Singh *et al.*, 2018, p. 76).

1.5.2 Flavonoides

Los compuestos flavónicos se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza, se caracterizan por su bajo peso molecular y una estructura común de benzo- γ -pirona ($C_6-C_3-C_6$). Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA. La reacción bioquímica que da origen a los flavonoides está controlada por dos enzimas: la chalcona sintasa y la chalcona flavonona isomerasa (Stoclet and Schini-Kerth, 2011, pp. 79-80).

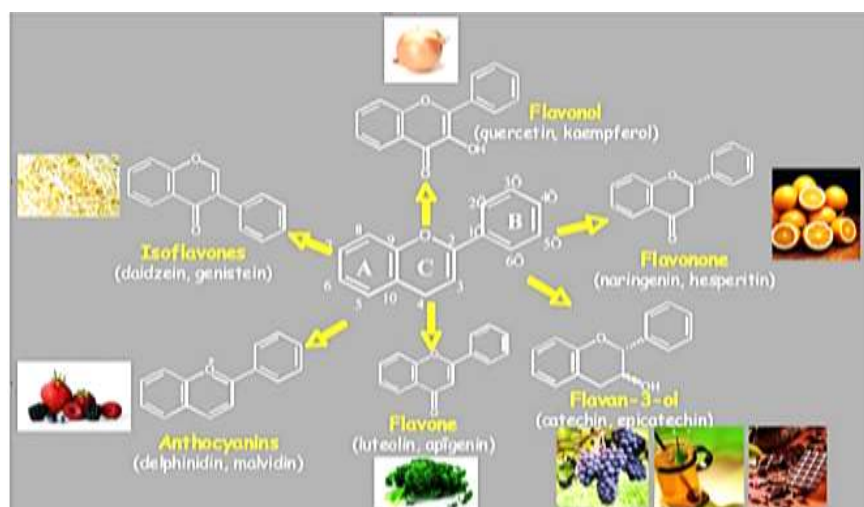


Figura 3-1: Estructura general de los flavonoides y sus principales derivados

Fuente: (Stoclet and Schini-Kerth, 2011, p. 80)

Generalmente, los flavonoides naturales presentan al menos tres hidroxilos fenólicos combinados con azúcares en forma de glicósidos. La diversidad de flavonoides se debe al grado de oxidación del puente de tres carbonos. Los compuestos de mayor importancia en este grupo son las antocianinas, flavonoles, flavonas e isoflavonas (Masek *et al.*, 2011, pp. 483-484). Actualmente, estos compuestos son altamente estudiados por sus diversas propiedades farmacológicas, entre ellas, capacidad antioxidante, anti-inflamatoria y desórdenes cardiovasculares. En otros estudios científicos se demostró su capacidad como antibacteriana, hepatoprotector, antialérgico, anticancerígena, etc (Kokkou *et al.*, 2016, pp. 266-267).

En el proceso inflamatorio el estrés oxidativo causado por los radicales libres provoca un incremento de enzimas como la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, implicadas en la liberación de mediadores inflamatorios (interleucinas y quimiocina), la quercetina (flavonoides natural) impide la biosíntesis de la enzima ciclooxigenasa y reduce la presencia de la prostaglandina E, el resveratrol es otro flavonoide que bloque la síntesis de prostaglandinas (Kokkou *et al.*, 2016, pp. 268-270).

1.6 Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro*

Los leucocitos y macrófagos, se encargan de la iniciación, modulación y persistencia de la respuesta inflamatoria, por su capacidad para sintetizar y liberar mediadores biológicos (citoquinas, prostaglandinas, etc.) los cuales tienen numerosos efectos cardiovasculares e inflamatorios (Lin and Li, 2018, pp. 278-280). La inflamación es producto de la producción y liberación extracelular de moléculas reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), que estimulan la membrana de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos. A estas reacciones bioquímicas coordinadas se denomina estallido oxidativo e inicia al aumentarse la recaptación de oxígeno, mientras se produce la reducción de un e^- del oxígeno a superóxido (O_2^-), a través de la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) o la nicotinamida-adenina dinucleótido (NADH) como donador del e^- , en una reacción catalizada por la oxidasa dependiente de NADPH (Valacchi *et al.*, 2016, p. 234).

La citotoxicidad es la capacidad de un compuesto químico para provocar una adúlteración en la funcionalidad celular induciendo una destrucción o lesión de las células. La citotoxicidad en los leucocitos se debe al óxido nítrico, debido a que al reaccionar con el radical libre superóxido (O_2^-), se origina un oxidante altamente tóxico (radical peroxinitrito “ONOO $^-$ ”). Existen otros métodos colorimétricos de citotoxicidad *in vitro*, como los métodos de sulforrodamina B y

cristal violeta, que colorean elementos específicos de las células permitiendo la medición de restos celulares luego de un período de incubación (Berridge *et al.*, 2008, p. 14).

En condiciones normales, las células responsables de la inflamación crean pequeñas proporciones de óxido nítrico (NO) y trazas de especies reactivas de oxígeno (ROS), disponibles para recoger el NO. Mientras que, en un proceso inflamatorio la isoforma inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS) produce grandes cantidades de NO, conjuntamente con una alta producción de ROS, lo que sugiere un cambio en la química del NO a peroxinitrito, anhídrido nítrico (N₂O₃), que son fuertes agentes oxidantes, nitrantes y nitrosantes (Peskin and Winterbourn, 2016, p. 3).

1.6.1 Métodos colorimétricos *in vitro* con sales de tetrazolio

Para este modelo *in vitro* se aplica sales de tetrazolio (WST-1) sobre neutrófilos aislados que son transformados a formazan por la acción metabólica de deshidrogenasas mitocondriales en células viables (neutrófilos), para determinar el grado de proliferación celular (inhibición inflamatoria) y viabilidad celular (citotoxicidad) (Frenzel *et al.*, 2008, p. 198). Los ensayos que utilizan WST-1, son métodos modificados que se fundamentan en la reducción intracelular de sales de tetrazolio a compuestos solubles de formazan coloreados por el sistema mitocondrial succinato-tetrazolim reductasa y cuantificados por espectrofotometría, reacción química mediada por oxidasas dependientes de NADPH. Este método se caracteriza por su alta sensibilidad, debido a su baja masa molecular y alto coeficiente de extinción molar de formazan reducido, que desciende eficazmente por la membrana plasmática NADPH-oxidasa de los neutrófilos activos en comparación con el método MMT y sus variantes (XTT o MTS) (Tan and Berridge, 2000, p. 60).

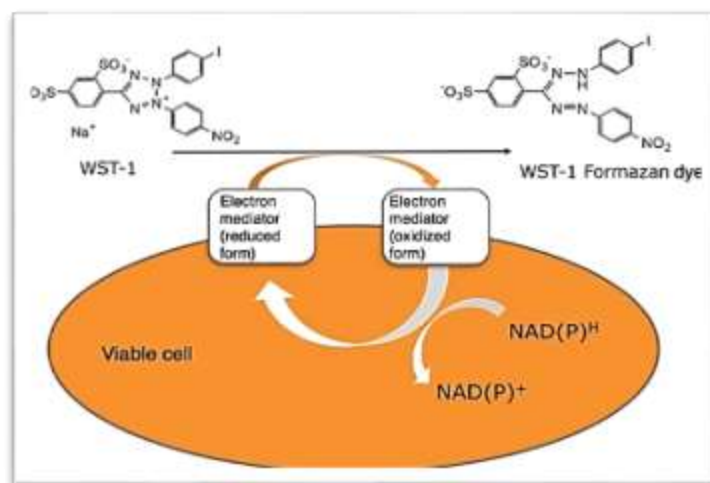


Figura 4-1: Reducción de las sales de tetrazolio (WST-1) a formazan

Fuente: <https://immunservice.com/produkt/wst-1-cell-proliferation-kit-ready-use/?lang=en>

CAPITULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de la investigación

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Fitoquímica y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Recolección del material vegetal

La especie vegetal denominada *Ageratum conyzoides* L. se recolectó en la parroquia Argelia en el cantón de Loja, localizadas específicamente en las coordenadas geográficas: Latitud (Y): 9554220 ; Longitud (X): 699776 y Altitud: 2127 m.s.n.m.

El desarrollo de esta investigación se efectuó bajo el 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 asignado con el Nro. MAE-CNB-CM-2018-0086.

2.3 Identificación del material vegetal

Se tomaron dos muestras distintas del material vegetal, las mismas que se identificaron en el Jardín Botánico y Herbario “Reinaldo Espinosa” de la Universidad Nacional de Loja a cargo del

Ing. Zhofre Aguirre Mendoza, Ph.D. Finalmente se trasladaron al Laboratorio de Productos Naturales, para el desarrollo de esta investigación.

2.4 Materiales, equipos y reactivos

Para la presente investigación se utilizaron los siguientes materiales, equipos y reactivos; los cuales se detallan a continuación:

2.4.1 *Material Vegetal*

Se utilizó todas las partes aéreas de la planta *Ageratum conyzoides*, es decir; flores, hojas y tallos. La planta fue secada a una temperatura de 50°C en la estufa por 12 horas, luego fue triturada en un molino marca Arthur H. Thomas C.O hasta obtener pequeñas partículas; para verificar los parámetros de calidad de la droga cruda, obtención de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso) para realizar el tamizaje fitoquímico, obtención del extracto hidroalcohólico para el respectivo ensayo antiinflamatorio y citotóxico *in vitro*. La planta triturada se almacenó en una funda de papel las cuales fueron selladas herméticamente con cinta adhesiva.

2.4.2 *Material Biológico*

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

2.4.3 *Material farmacológico*

Como control positivo comparativo en el ensayo para determinar la actividad antiinflamatoria del extracto de *Ageratum conyzoides* se utilizó ácido acetilsalicílico 100mg.

2.4.4 Materiales de laboratorio utilizados

Tabla 5-2: Descripción de los materiales de laboratorio utilizados

TÉCNICAS	MATERIALES
CONTROL DE CALIDAD DEL MATERIAL VEGETAL	Cápsulas de porcelana
	Pinzas para cápsulas
	Crises de porcelana
	Desecador
	Papel filtro
	Reverbero
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Frasco ámbar de 250 MI
	Papel filtro y Embudo
	Vasos de precipitación de 250MI
	Gradilla y tubos de ensayo
	Pipetas de 5 y 10 mL
CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	Frasco ámbar de 1000MI
	Picnómetro
	Vaso de precipitación de 50 mL
	Probeta de 50 mL
	Pipeta 10 mL
	Cápsula de porcelana
	Pinza para cápsula
CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES	Micropipeta de 100 μ L y 1000 μ L
	Pipeta de 5 mL y 10 mL
	Balón de aforo de 25 mL y 100 mL
	Vasos de precipitación
	Tubos de ensayo
	Puntas amarillas
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	Micropipeta de 100 μ L
	Gradilla
	Balón aforado de 25 mL y 250 mL

ENSAYO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTÓXICO <i>in vitro</i>	Tubos de ensayo
	Pipetas graduadas de 5 mL
	Pipeta automática multicanal de 10 -1000 uL
	Pipeta automática de 10-100 uL
	Balones de aforo de 25 mL
	Gradilla
	Papel aluminio
	Alcohol antiséptico
	Puntas amarillas
	Placa de 96 pocillos
	Jeringas de 3mL, 5mL y 10mL
	Tubos de vidrio
Torniquete	
Algodón	

Realizado por: Dennis Alvarez, 2018

2.4.5 Equipos

Tabla 6-2: Equipos utilizados en la investigación

ANÁLISIS	EQUIPOS
CONTROL DE CALIDAD DEL MATERIAL VEGETAL Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Sonicador Marca Branson 2510
	Estufa Memmert SNB400
	Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C
	Balanza analítica Radwag
OBTENCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	Refractómetro
	pH-metro
	Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath
	Liofilizador Thermo Scientific
	Vórtex mixer MRC S1 – 100

CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES (ESPECTRO UV) Y ENSAYO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTÓXICO	Balanza analítica Radwag
	Vórtex mixer MRC S1 – 100
	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220
	Estufa Memmert SNB400
	Centrifuga

Realizado por: Dennis Alvarez, 2018

2.4.6 Reactivos

Tabla 7-2: Descripción de los reactivos utilizados

ANÁLISIS	REACTIVOS
CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA	Agua destilada
	Ácido clorhídrico al 10%
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Éter etílico
	Etanol al 96%
	Agua destilada
	Reactivo Sudan III
	Reactivo de Dragendorff
	Reactivo de Mayer
	Reactivo de Wagner
	Reactivo de Baljet
	Reactivo de Lieberma-Burchard
	Reactivo de Fehling A y B
	Reactivo de FeCl ₃
	Reactivo de Borntrager
	Reactivo para Catequinas
	Cloroformo
	Ácido clorhídrico concentrado
Ácido clorhídrico al 1%	
Anhídrido acético	

	Alcohol amílico
	Magnesio metálico
	Ácido sulfúrico concentrado
	Hidróxido de sodio al 5%
	Carbonato de sodio
	Cloruro de sodio (polvo)
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	Etanol 70%
	Agua destilada
CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES	Metanol 98%
	Agua destilada
	Nitrito de Sodio 5% (NaNO_2)
	Tricloruro de aluminio 10% (AlCl_3)
	Hidróxido de potasio 1M (KOH)
	Soluciones de quercetina
	Soluciones de ácido gálico
	Carbonato de sodio al 7,5% (Na_2CO_3)
	Reactivo de Folin-Ciocalteu
ENSAYO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTÓXICO <i>IN VITRO</i>	Agua bidestilada
	Ficoll Paque
	Zimozan A
	Reactivo WST-1
	Solución modificada de Hanks
	Dimetilsulfóxido 5%
	Tritón X-100
	Cloruro de Amonio
	Heparina Sódica
	Soluciones de Ácido Acetilsalicílico

Realizado por: Dennis Alvarez, 2018

2.5 Técnicas y métodos

2.5.1 Determinación de los parámetros de control de calidad de la droga cruda

Después de recolectar la planta se procede a realizar el control de calidad de la droga cruda, se realizó ensayos por triplicado basados a métodos físico-químicos con el fin de garantizar la eficacia y seguridad de la droga cruda en los análisis de interés. A continuación, se describen los procedimientos cada uno de los parámetros analizados, los cuales se encuentran en el folleto de Farmacognosia y Productos Naturales (Bolzan *et al.*, 2007, p. 264).

2.5.1.1 Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad en la droga cruda es un parámetro imprescindible para determinar la calidad de la misma. Un elevado contenido de agua en las drogas vegetales incrementa el riesgo de hidrólisis de los metabolitos secundarios que presenta la droga y contaminación microbiana lo que provoca su deterioro. Por tal motivo es importante la determinación del contenido de humedad, como indicativo de la estabilidad de los componentes químicos presentes en las drogas vegetales, en especial por aquellas que contienen un elevado porcentaje de humedad o que absorben humedad con gran facilidad.

Para este análisis se utiliza con mayor frecuencia el método gravimétrico, debido a su facilidad y sencillez; aunque no es recomendable utilizarlo en drogas que presenten sustancias volátiles.

Procedimiento:

Se pesaron 2g de la droga cruda, seca y molida con una desviación permisible de 0.5mg en una cápsula de porcelana previamente tarada. La cápsula con la muestra fue colocada en la estufa a 105 °C durante 3 horas y seguidamente en un desecador durante 15 minutos, donde se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesó. Nuevamente se llevó a la estufa durante una hora más, se colocó en el desecador para enfriarla hasta temperatura ambiente y se pesó. Se repite el proceso hasta obtener peso constante (Bolzan *et al.*, 2007, pp. 278-279).

Para realizar el cálculo y determinar el contenido de humedad de la droga cruda se aplicó la siguiente ecuación:

$$H = \frac{M1 - M2}{M1 - M} * 100$$

Dónde:

H = pérdida en peso por desecación.

M = masa de la cápsula vacía.

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

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

2.5.1.2 Determinación de cenizas totales

Las cenizas totales es el residuo inorgánico (contenido total de minerales) que queda tras la incineración (eliminación de los compuestos orgánicos) de la muestra seca en estudio. El porcentaje de cenizas totales se determinó gravimétricamente.

Procedimiento:

Se pesaron $2g \pm 0.5mg$ de droga cruda, seca, molida y tamizada, se colocó en un crisol de porcelana previamente tarado. La muestra se carbonizó en el reverbero hasta que esté libre de humo, luego se colocó en una mufla a una temperatura de $750^{\circ}C$ para su incineración, durante 2-3 horas. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco.

Se enfría el crisol en el desecador por hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5mg (masa constante), los intervalos entre el calentamiento y el pesaje fueron de 30 minutos (Capasso *et al.*, 2011, p. 39).

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

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

Dónde:

C = porcentaje de cenizas totales.

M = masa del crisol vacío (g)

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

M2= masa del crisol con la ceniza (g)

2.5.1.3 *Determinación de cenizas solubles en agua*

Este ensayo tiene como finalidad determinar cuantitativamente el material inorgánico existente en las cenizas totales.

Procedimiento:

A las cenizas totales obtenidas mediante el procedimiento anterior se añadió 15mL de agua al crisol, el mismo que se tapó con un vidrio reloj y se dejó hervir durante 5 minutos. La solución obtenida se filtró mediante un papel filtro libre de cenizas. El papel filtro y el residuo se colocó en el crisol utilizado inicialmente y calentó hasta su carbonización, el crisol con la muestra carbonizada se colocó en la mufla a una temperatura de 750°C durante 2 horas. Seguidamente, el crisol se colocó en el desecador para enfriarlo hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesó. El proceso se repite en intervalos de 30 minutos hasta obtener dos pesadas consecutivas constantes (Miranda, 2006, p. 33).

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

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

Donde:

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua.

M = masa del crisol vacío.

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

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

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

2.5.1.4 *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

La finalidad de este ensayo fue determinar el contenido de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico que contiene la droga vegetal cruda.

Procedimiento:

Al crisol con las cenizas totales se añadió 3 mL de ácido clorhídrico al 10%. Se tapó con un vidrio reloj y se calienta en un baño de agua hirviente durante 10 minutos, se lavó el vidrio

reloj con 5 mL de agua caliente uniendo esto al contenido del crisol. La solución obtenida se filtró a través de un papel filtro libre de cenizas, el residuo se lavó con agua caliente repetidamente hasta que la solución filtrada acidulada con ácido nítrico (a la cual se añadió dos gotas de nitrato de plata 0.1 mol/L), no indique la presencia de cloruros. El filtrado y el residuo se desecaron en una estufa a 105°C y se trasladó al crisol de porcelana utilizado inicialmente.

Se colocó el crisol con la muestra en la mufla a 750°C durante 2 horas. Luego se trasladó a una estufa a 105 °C durante 15 minutos. Finalmente, el crisol se colocó en el desecador para enfriarlo hasta temperatura ambiente y se pesó hasta obtener peso constante; cabe resaltar que para alcanzar un peso constante los intervalos entre el calentamiento y el pesaje fueron de 30 minutos (Capasso *et al.*, 2011, p. 39).

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

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

Dónde:

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

M = masa del crisol vacío (g)

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

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

2.5.2 Tamizaje fitoquímico

Los ensayos del tamizaje fitoquímico o “screening” permiten identificar los distintos metabolitos primarios y secundarios presentes en la droga vegetal mediante reacciones de coloración o precipitación y que son de interés fitoquímico. Estos ensayos se caracterizan por ser sencillas, rápidas y selectivas en la determinación de los componentes fitoquímicos que contiene la droga vegetal, utilizando un mínimo de recursos instrumentales de laboratorio (Bolzan *et al.*, 2007, p. 229).

Procedimiento:

Las partes aéreas de la planta (tallos, hojas y flores) seca y molida, se sometieron a extracciones consecutivas con solventes de polaridad creciente (Bolzan *et al.*, 2007, pp. 230).

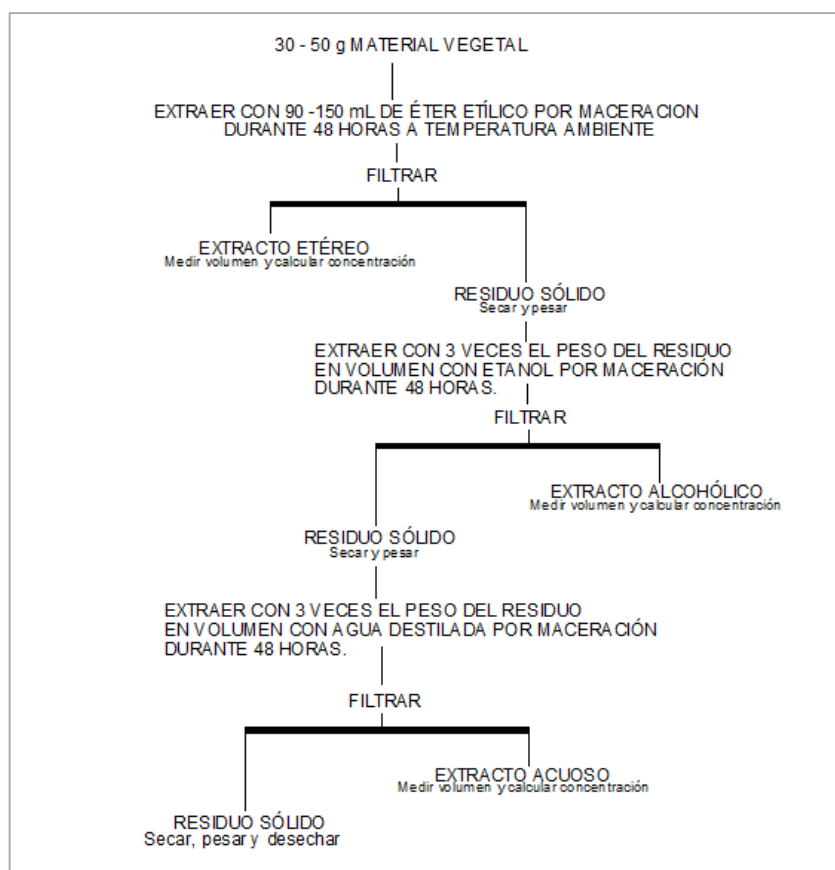


Figura 5-2: Protocolo para elaborar los extractos para el tamizaje fitoquímico

Fuente: (Bolzan et al., 2007, p. 236)

Obtenidos cada uno de los extractos se procedió a realizar las diferentes pruebas de identificación de metabolitos secundarios siguiéndose los esquemas basados en Las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas.

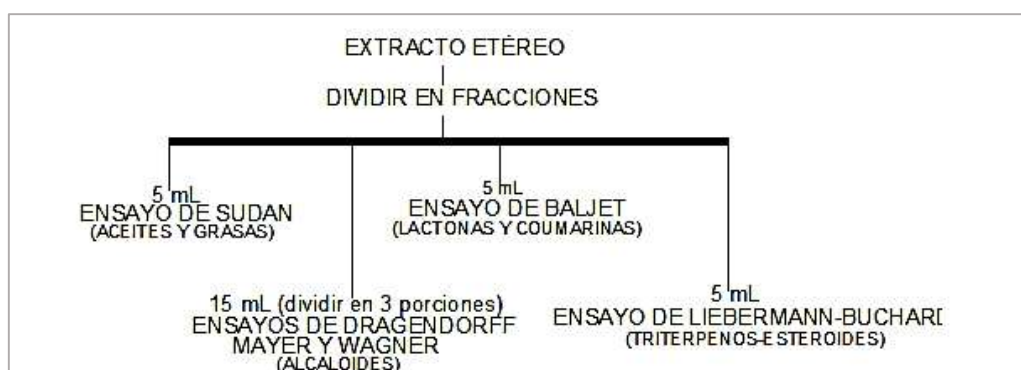


Figura 6-2: Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo

Fuente: (Miranda, 2006, p. 40)

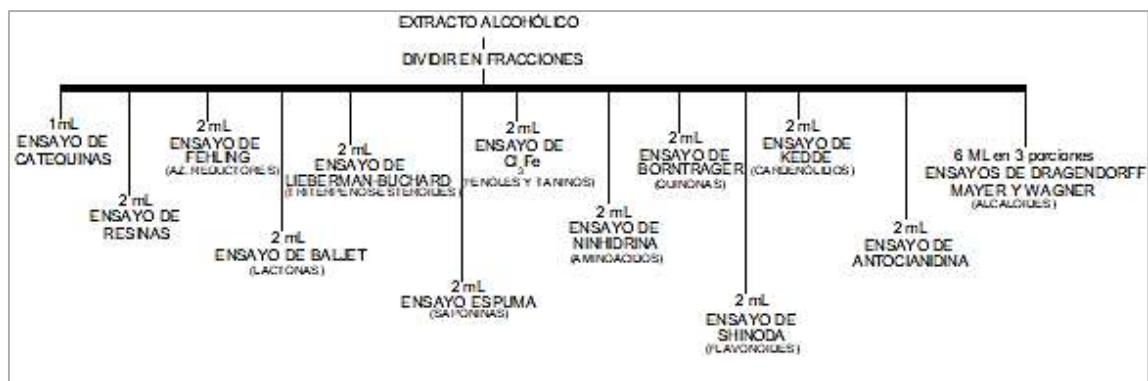


Figura 7-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico

Fuente: (Miranda, 2006, p. 40)



Figura 8-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto acuoso

Fuente: (Miranda, 2006, p. 41)

La metodología de los ensayos descritos anteriormente para la realización del tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos se detallan a continuación y se basan en las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Bolzan *et al.*, 2007, p. 235).

2.5.2.1 *Ensayo de Sudán*

Mediante este ensayo se determina la presencia de compuestos grasos, para lo cual se colocó 5 mL del extracto en un tubo de ensayo y se adicionó 1 mL de colorante de Sudán III o Sudán IV. Se evaporó el solvente en un baño de agua caliente. Se considera positivo si se observa gotas o una delgada capa de color rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayo.

2.5.2.2 *Ensayo de Dragendorff*

Determina la presencia de alcaloides, para lo cual se tomó una alícuota del extracto. Si el solvente del extracto es orgánico se debe evaporar a sequedad, el residuo se disuelve en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua, mientras que, en el extracto acuoso se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado. A la solución acuosa ácida se adicionó 3 gotas del reactivo de Dragendorff. El ensayo se considera positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++).

2.5.2.3 *Ensayo de Mayer*

Este ensayo también permite detectar la presencia de alcaloides. Se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito hasta obtener la solución ácida. Luego, se añade una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y se filtró. Finalmente, se agrega 3 gotas del reactivo de Mayer. El ensayo se considera positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++)

Nota: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, solo se observarán en el extracto acuoso y para confirmar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

2.5.2.4 *Ensayo de Wagner*

Este ensayo también identifica la presencia de alcaloides, para realizar este ensayo se procede de la misma forma hasta obtener la solución ácida. Posteriormente, se añadió 3 gotas del reactivo de Wagner. El ensayo se considera positivo cuando se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++).

2.5.2.5 *Ensayo de Baljet*

Mediante este ensayo se identifica compuestos con agrupamiento lactónico, especialmente cumarinas. Para este ensayo se tomó una alícuota del extracto, en caso de no estar disuelto en alcohol se procede a evaporar el solvente en un baño de agua caliente y el residuo se re-disuelve en 1 mL de alcohol etílico. Posteriormente, se añadió 1 mL de reactivo de Baljet. Se considera positivo cuando aparece una coloración rojiza (++) o un precipitado rojo (+++) (Capasso *et al.*, 2011, pp. 21-22).

2.5.2.6 *Ensayo de Liebermann-Burchard*

Este ensayo permite determinar triterpenos y/o esteroides, ya que ambos compuestos poseen un núcleo de androstano, por lo general insaturado en el anillo B en la posición 5 y 6. Para lo cual se tomó una alícuota del extracto, se evaporó a sequedad en un baño de agua caliente y el residuo se re-disolvió en 1 mL de cloroformo, se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló. Finalmente, se adicionó cuidadosamente 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo de ensayo (sin agitar). Se considera positivo cuando se observa un cambio rápido de coloración como se detalla a continuación:

- Rosado - Azul (muy rápido).
- Verde intenso - visible (aunque rápido).
- Verde oscuro – negro - final de la reacción (Miranda, 2006, p. 42)

2.5.2.7 *Ensayo de Catequinas*

Para este ensayo se tomó una gota del extracto etanólico con un capilar y se aplicó sobre papel filtro y se adicionó una gota de solución de carbonato de sodio sobre la mancha del extracto en el papel filtro. El ensayo se considera positivo cuando al observarse el papel filtro en una cámara UV se distingue una mancha verde carmelita.

2.5.2.8 *Ensayo de resinas*

Se tomó una alícuota del extracto etanólico y se adicionó 10 mL de agua destilada. El ensayo se considera positivo cuando se observa la aparición de precipitado.

2.5.2.9 *Ensayo de Fehling*

Este ensayo permite reconocer la presencia de azúcares reductores en el extracto. Para lo cual se evaporó el solvente a sequedad (en caso de que este no se encuentra en agua), y se redisolvió el residuo en 2 mL de agua. Luego, se adicionó 2 mL de reactivo de Fehling y se calentó la mezcla en un baño de agua durante 10 minutos. El ensayo se considera positivo si la solución se torna de color rojo o aparece un precipitado rojo (Bolzan *et al.*, 2007, pp. 237-238).

2.5.2.10 *Ensayo de la Espuma*

Este ensayo identifica a las saponinas tanto esteroidales como triterpénicas. Para lo cual, se coloca 2 mL del extracto etanólico en un tubo de ensayo, se diluyó con 5 veces su volumen en agua, se mezcló y se agitó durante 10 minutos. Se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persiste por un tiempo mínimo de 2 minutos.

2.5.2.11 *Ensayo de cloruro férrico*

Este ensayo permite identificar compuestos fenólicos y taninos. En el extracto etanólico se determina fenoles y taninos, mientras que, en el extracto acuoso principalmente taninos. Para realizar este ensayo se tomó una alícuota del extracto y se neutralizó adicionando acetato de sodio (solo en el extracto acuoso). Posteriormente se añadió 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (solución de cloruro de sodio 0.9%). El ensayo es positivo cuando existe un cambio de coloración e indica la presencia de los siguientes componentes:

- Coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

2.5.2.12 *Ensayo de Borntrager*

Este ensayo detecta la presencia de quinonas en los extractos vegetales. Para este ensayo se tomó una alícuota del extracto y se evaporó en un baño de agua hasta sequedad, el residuo se redisolvió con 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua. Se mezcló, agitó, y se dejó en reposo hasta la separación de las fases. Se considera positivo cuando en la fase superior (fase acuosa alcalina) toma una coloración rosada (++) o roja (+++) (Miranda, 2006z, pp. 41-42).

2.5.2.13 *Ensayo de la Ninhidrina*

Este ensayo identifica la presencia de aminoácidos libres/ aminas en general en los extractos vegetales. Inicialmente, se toma 1mL del extracto en alcohol/ el residuo de la concentración en baño de agua (si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico), se adiciona 2 mL de la solución de ninhidrina al 2% en agua. La solución se calienta por 5-10 minutos en baño de agua. El ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul-violáceo (Capasso *et al.*, 2011, pp. 22-25).

2.5.2.14 *Ensayo de Kedde*

Permite identificar la presencia de glicósidos cardiotónicos en un extracto vegetal. A una alícuota del extracto etanólico se adiciona 1mL del reactivo de Kedde y se deja en reposo durante 5-10 minutos. Es positivo cuando se desarrolla una coloración violácea persistente durante 1-2 horas. El reactivo de Kedde se prepara de la siguiente forma:

Solución 1: Ácido 3,5-dinitrobenzóico al 2% en metanol.

Solución 2: Hidróxido de potasio al 5,7% en agua.

Las soluciones se mantienen preparadas de forma independiente y se mezclan en proporciones iguales de volumen de cada una de ellas, en el momento de realizar el ensayo.

2.5.2.15 Ensayo de Antocianidinas

En los extractos vegetales determina la presencia de las estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. Se toma una alícuota del extracto etanólico y se calienta por 10 minutos junto con 1mL de ácido clorhídrico concentrado. Se deja enfriar y se adiciona 1mL de agua y 2mL de alcohol amílico. Se agita y se deja en reposo hasta la separación de las fases. Una coloración de rojo a marrón en la fase amílica, es indicativo de un ensayo positivo (Bolzan *et al.*, 2007, pp. 238- 239).

2.5.2.16 Ensayo de Shinoda

Mediante este ensayo se determina la existencia de flavonoides en el extracto. Para lo cual, se diluyó una alícuota del extracto alcohólico o acuoso en 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Se esperó 5 minutos hasta que finalice la reacción y finalmente se adicionó 1mL de alcohol amílico, se mezcló y se dejó reposar hasta separar las fases. Cuando el alcohol amílico se torna de color amarillo, naranja, carmelita o rojo el ensayo se considera positivo.

2.5.2.17 Ensayo de Mucílagos

Determina la presencia de estructuras de tipo polisacárido que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que eleva la densidad del agua con la cual se extrae. Para lo cual, se toma una alícuota del extracto en agua y se enfría a una temperatura de 0-5°C. Si la solución presenta una consistencia gelatinosa se considera positivo para este ensayo.

2.5.2.18 Ensayo de principios amargos y astringentes

Para este ensayo se toma una 1 gota del extracto acuoso, se saborea y se reconoce el sabor de cada uno de los principios y diferenciarlos al paladar de forma adecuada (Miranda, 2006, pp. 40-41).

2.5.3 Preparación del extracto hidroalcohólico de *A. conyzoides*

La preparación del extracto se realizó en una proporción 1:10, para lo cual, se pesó 100 g de la droga cruda, seca y molida, y se colocó en un frasco ámbar. Se adicionó 1 L de etanol al 70 % y se dejó reposar durante 3 días. Posteriormente, se filtró y concentró el extracto a $\frac{1}{4}$ del volumen en el rotavapor a 60°C aproximadamente. Finalmente, el extracto se filtró, congeló y liofilizó por un lapso de tiempo pertinente hasta que la muestra quedó libre de agua.

2.5.4 Control de calidad del extracto hidroalcohólico

El extracto hidroalcohólico filtrado se utilizó para determinar los parámetros de calidad que se realizan por triplicado y se describen a continuación:

2.5.4.1 Determinación de las características organolépticas

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

Determinación de olor: Se introduce una tira de papel en el extracto. Se analizó si el olor pertenece a las características propias del extracto obtenido.

Determinación de color: En un tubo de ensayo limpio y seco, se colocó una alícuota del extracto y se definió el color y la transparencia de la muestra.

2.5.4.2 *Determinación de densidad relativa*

La densidad es el producto de la relación entre la masa y el volumen de la sustancia a ensayar a 25°C. Para determinar la densidad relativa, se procedió a pesar el picnómetro vacío y seco. Después se llenó con el extracto, se dejó en reposo durante 15 minutos a 25 °C y se pesó adecuadamente. Se repitió el ensayo usando agua destilada a 25°C.

Para calcular la densidad del extracto se utilizó la siguiente ecuación:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M} * 100$$

Donde:

D_{25} : Densidad relativa

M_1 : Peso del picnómetro con la muestra en g

M_2 : Peso del picnómetro con el agua en g

M : Peso el picnómetro vacío en g

2.5.4.3 *Índice de refracción*

Se colocó una gota de la muestra sobre el prisma de medición, se enfocó la luz moviendo el compensador cromático hasta obtener la línea de intersección entre el campo claro y oscuro.

2.5.4.4 *Medición del pH*

Se midió el pH con ayuda de un pH-metro digital, para lo cual, se ajustó el equipo con la solución buffer reguladora. Finalmente, se introdujo el electrodo del equipo en la solución y se determinó el pH de la muestra.

2.5.4.5 *Determinación de sólidos totales*

Los sólidos totales es el residuo obtenido de una porción de muestra cuando es sometida a un proceso de evaporación y secado en una estufa. Para este ensayo se colocó 5 mL del extracto en una cápsula previamente tarada, se evaporó hasta sequedad en un baño de agua caliente. La cápsula se transfirió a una estufa a 105°C durante 2 horas. Finalmente, se dejó enfriar en el desecador y se pesó. El proceso se repite hasta obtener 2 pesos constantes (Capasso *et al.*, 2011, p. 42).

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

$$ST = \frac{Pr - P}{V} * 100$$

Donde:

Pr= masa de la cápsula más el residuo en g

P= masa de la cápsula vacía en g

V= volumen de la porción de ensayo

2.5.5 *Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu*

El método de Folin-Ciocalteu consiste en una reacción redox, donde los compuestos fenólicos interaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, pasando de un color amarillo a un complejo de color azul intenso. Para llevar a cabo este método se preparó soluciones estándar de ácido gálico a 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, se realizó las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm, para elaborar la respectiva curva de calibración. También se preparó una solución del extracto (1000 ppm).

Procedimiento:

Se tomó una alícuota de la muestra y las soluciones estándar de ácido gálico, y se añadió 15 mL de agua destilada junto con 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se dejó en reposo por 8 minutos, para luego añadir 3,75 mL de solución de Na₂CO₃ al 7,5% y aforar a 25 mL con agua destilada. Vortear por 1 minuto y se dejar reposar 2 horas en completa oscuridad. Las lecturas se realizan en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765nm (Vinueza *et al.*, 2017, p. 2).

2.5.6 Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico

Se preparó soluciones estándar de quercetina a 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, realizar las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm, para elaborar la respectiva curva de calibración. También se preparó una solución del extracto (1000 ppm).

Procedimiento:

Se tomó una porción de la muestra y de las soluciones estándar de quercetina, y se añadió 4 mL de agua destilada y 300 µl de nitrito de sodio al 5%. Después de 5 minutos se añadió 300 µl de cloruro de aluminio al 10%, se vortericizó por 1 minuto y se dejó reposar 5 minutos en absoluta oscuridad. Finalmente, se añade 2 mL de hidróxido de potasio (KOH) 1M, homogenizar y leer las absorbancias en el espectrofotómetro a 510nm (Vinueza *et al.*, 2017, p. 2).

2.5.7 Determinación de la actividad antioxidante mediante ensayo de eliminación de DPPH

Este ensayo se fundamenta en una reacción de óxido-reducción entre el DPPH[·] y un átomo de hidrógeno del agente antioxidante (extracto/ estándar de ácido gálico), lo que produce la reducción del DPPH[·] a DPPH₂, originando un cambio de coloración de púrpura a amarillo y una reducción de la absorbancia cuando es medido por espectrofotometría a 517 nm. Para cuantificar la actividad antioxidante, se preparó soluciones de la muestra (extracto) a diferentes concentraciones (10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm).

Procedimiento:

Se preparó una solución de 250 mL del reactivo DPPH (se disolvió 5.9 mg de DPPH en metanol), y se dejó reposar por 2 horas en completa oscuridad hasta que el reactivo se estabilice y presente una absorbancia entre 0.6-0.8. Se colocó 100 µL de la solución de la muestra en etanol en un tubo de ensayo y se homogeniza con 3.9 mL de la solución de DPPH, después se incubaba en un baño de agua caliente a una temperatura de 37°C por 20 minutos. Finalmente, se realiza la lectura de la absorbancia a 517 nm (Alhakmani *et al.*, 2014, pp. 657-658).

La inhibición de los radicales libres DPPH[·] en porcentaje se calculó de la siguiente manera:

$$\%I = \frac{\text{ABS control} - \text{ABS muestra}}{\text{ABS control}} * 100$$

Donde:

% I = porcentaje de inhibición

ABS control= la absorbancia de la muestra control

ABS muestra= absorbancia del extracto de ensayo

2.5.8 *Ensayo antiinflamatorio y citotóxico in vitro*

2.5.8.1 *Aislamiento de neutrófilos*

En un tubo de ensayo completamente limpio se colocó 0,5 mL de heparina sódica al 5% y se procedió a extraer sangre venosa y se añadió 4 mL de MHS y se homogeniza suavemente. En otro tubo de ensayo se colocó 3mL de Ficoll paque, se añadió lentamente por las paredes 4 mL de sangre extraída, se dejó reposar 5 minutos y finalmente centrifugar a 1500 RPM durante 30 minutos. Inmediatamente, se separó los neutrófilos en otro tubo de ensayo, se re-disolvió en MHS en una proporción 1:2, para centrifugar nuevamente. Después se desechará el sobrenadante, se diluyó con 1mL de MHS y gotas de una solución hipotónica de cloruro de amonio para centrifugar por última vez. Finalmente, se desecha el sobrenadante y el precipitado se reconstituye con 1 ml de MHS a una concentración de 10^7 células/mL (Vinueza *et al.*, 2017, p. 2).

2.5.8.2 *Ensayo antiinflamatorio in vitro sobre neutrófilos aislados*

Se preparó soluciones del extracto liofilizado en Dimetilsulfóxido al 5% disuelto en MHS a diferentes concentraciones (100, 200, 500, 800 y 1000 $\mu\text{g/mL}$). Se preparó Tritón X-100 al 0.1% en solución modificada de Hank's. y soluciones de ácido acetilsalicílico a concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$) disueltos en solución modificada de Hank's.

Para el ensayo se preparó los siguientes controles:

Control Positivo: Solución de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS.

Control Negativo: Solución de Tritón X-100 0.1% en MHS.

La actividad antiinflamatoria *in vitro* se determina mezclando 140 μl de una suspensión de neutrófilos aislados en MHS (pH 7.4), 10 μl WST-1 y 100 μl de cada una de las diluciones

preparadas e incubar a 37 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se añade 50 µL de una solución de Zymosan A opsonizado que inicia la reacción, y se incuba nuevamente a 37°C, durante una hora. Finalmente se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 450nm mediante un lector de microplacas (Choudhary and Jalil, 2005, p. 2349).

Para calcular el porcentaje de inhibición inflamatoria se empleará la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inh. Inflamatoria} = 100 - \left(A_M * \frac{100}{A_{\text{DMSO}}} \right)$$

Dónde:

A_M corresponde a la absorbancia de la muestra

A_{DMSO} a la absorbancia del control.

2.5.8.3 Ensayo de citotoxicidad *in vitro* sobre neutrófilos aislados

Se preparó soluciones del extracto liofilizado en Dimetilsulfóxido al 5% disuelto en MHS a diferentes concentraciones (100, 200, 500, 800 y 1000 µg/mL). Se preparó Triton X-100 al 0.1% en solución modificada de Hank's. y soluciones de ácido acetilsalicílico a concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL disueltos en solución modificada de Hank's.

La actividad antiinflamatoria *in vitro* se determina mezclando 140µl de una suspensión de neutrófilos aislados en MHS (pH 7.4), 10µl WST-1 y 100µl de cada una de las diluciones preparadas e incubar a 37 °C durante 3 horas. Finalmente se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 450nm mediante un lector de microplacas (Berridge *et al.*, 2008, pp. 15-16).

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular se empleará la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad Celular} = \frac{A_M}{A_{\text{DMSO}}} * 100$$

Donde:

A_M corresponde a la absorbancia de la muestra

A_{DMSO} a la absorbancia del control.

CAPITULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Control de calidad de la droga cruda de *Ageratum conyzoides* L.

Tras realizar el control de calidad por triplicado de la droga cruda se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 8-3: Resultados de los parámetros de calidad de la droga cruda

Parámetros	Partes aéreas de <i>Ageratum conyzoides</i> (%)	Límites aceptados por la USP #35
Humedad	12.19 ± 0.04	≤ 14%
Cenizas Totales	11.24 ± 0.01	≤ 12%
Cenizas Solubles en Agua (H ₂ O)	2.17 ± 0.03	≤ 7%
Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico (HCl)	1.80 ± 0.02	≤ 5%

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

El control de calidad define las condiciones óptimas de la droga vegetal para ser utilizada, como se observa en la Tabla 1-3, el contenido de humedad de las partes aéreas (tallo, hojas y flores) de *Ageratum conyzoides* fue de 12.19 ± 0.04% siendo inferior a los límites establecidos por la USP 35 que indica que debe ser ≤ 14%. Este valor refleja una adecuada recolección, secado, conservación y almacenamiento de la droga vegetal, ya que un elevado contenido de humedad (agua) favorece la proliferación de bacterias, hongos e insectos. Además, induce una rápida descomposición e hidrólisis de los compuestos fitoquímicos de la planta.

En la droga cruda las cenizas totales representan la cantidad de sales minerales e inorgánicas, entre las cuales se encuentran fosfatos, carbonatos, nitritos, sulfatos, potasio y calcio; que son los más frecuentes. Al Igual que ciertos ácidos orgánicos como: málico, oxálico, acético, entre otros.

La cantidad de cenizas solubles en agua indica el contenido de sales solubles de la muestra; mientras que, el porcentaje de cenizas insolubles en ácido, indican el contenido de oxalatos o carbonatos que puede poseer el material vegetal. Cuando los valores para estos parámetros son elevados, se presume de una contaminación por tierra o material extraño en el momento de la recolección del material vegetal, y que no fue eliminado en el proceso de acondicionamiento.

Los resultados obtenidos para estos parámetros de calidad fueron: cenizas totales $11.24 \pm 0.01\%$, cenizas solubles en agua $2.17 \pm 0.03\%$, cenizas insolubles en ácido clorhídrico $1.80 \pm 0.02\%$. Todos los parámetros de calidad cumplen con los requisitos establecidos en la USP #35, indicando la ausencia de contaminación por arena, tierra, sílices o material extraño en la droga cruda.

3.2 Tamizaje Fitoquímico

Para la determinación cualitativa de los diferentes grupos fitoquímicos, se procedió con una extracción sucesiva de metabolitos de las partes aéreas de *A. conyzoides*, en solventes de polaridad creciente (hexano, etanol y agua) permitiendo identificar la presencia de componentes tanto hidrófilos como lipófilos. Cada solvente puede extraer componentes fitoquímicos diferentes en dependencia del solvente utilizado, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 9-3: Resultados obtenidos del Tamizaje Fitoquímico de las partes aéreas (tallo, hojas y flores) de *Ageratum conyzoides*.

Ensayo	Metabolitos	Extracto Etéreo	Extracto Etanólico	Extracto Acuoso
DRAGENDORFF	Alcaloides	++	-	+
MAYER		+	++	+
WAGNER		++	+	++

SUDAN	Aceites-grasas	+	NA	NA
BALJET	Latonas-cumarinas	-	+++	NA
LIEBERMAN-BURCHARD	Triterpenos y esteroides	+	+	NA
NIHIDRINA	Aminoácidos libres o Aminas en general	NA	+	NA
BORNTRAGER	Quinonas	NA	++	NA
KEDDE	Glicósidos cardiotónicos	NA	-	NA
ANTOCIANIDINAS	Secuencia del grupo de los flavonoides.	NA	+	NA
CATEQUINAS		NA	+	NA
RESINAS		NA	-	NA
SHINODA	Flavonoides	NA	+	+
FEHLING	Azúcares reductores	NA	+	+
CLORURO FERRICO	Fenoles-taninos	NA	+	-
ESPUMA	Saponinas	NA	-	-
MUCILAGOS	Polisacáridos	NA	NA	+
PRINCIPIOS AMARGOS		NA	NA	-

(N/A) No aplica, (-) Ausencia, (+) Presencia, (++) Moderado, (+++) Abundante

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

En la tabla 2-3, se observan los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de las diferentes extracciones. En el extracto etéreo se identificó la presencia de compuestos grasos, alcaloides, triterpenos y esteroides; debido a un resultado positivo en los ensayos de Sudán, Dragendorff, Mayer, Wagner y Lieberman-Burchard. En el extracto etanólico se determinó la presencia de alcaloides, cumarinas, aminoácidos, triterpenos, esteroides, quinonas, catequinas, fenoles, taninos, flavonoides y azúcares reductores; por tal motivo mostró resultados positivos en las pruebas de Mayer, Wagner, Baljet, Nihidrina, Lieberman-Burchard, Borntrager, Catequinas,

Cloruro Férrico, Antocianidinas, Shinoda y Fehling respectivamente; en este extracto, se pudo determinar la presencia dominante de compuestos fenólicos, flavonoides, y de azúcares, ya que los resultados para los ensayos de Cloruro férrico, Shinoda y Fehling, respectivamente. Finalmente, en los ensayos del extracto acuoso se encontró alcaloides, polisacáridos, flavonoides y azúcares reductores; identificados por los ensayos de Dragendorff, Mayer, Wagner, Mucilagos, Shinoda y Fehling. Los alcaloides y flavonoides y azúcares reductores presentan dominancia en los diferentes extractos de la droga cruda.

En un estudio realizado por Stevenson (2017, pp. 2-4) de la planta *A. conyzoides*, se identificó una diversidad de grupos fitoquímicos con actividad biológica tales como glucósido cianogénicos, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, esteroides, fenoles y flavonoides; los mismos que coinciden con los resultados obtenidos en la tabla 2-3. En otro estudio, Okunade (2010, p. 4) aisló e identificó alrededor de 21 flavonoides polioxigenados, 14 flavonas polimetoxiladas (derivados de tricina y 3, 4, 5-flavonas oxigenadas, sustancia química rara en los productos naturales) y otros como la 5-metoxinobiletina, linderoflavona B, quercetina, eupalestina entre otros. En un estudio botánico sobre *A. conyzoides* se determinó la presencia de los mismo componentes fitoquímicos encontrándose en mayor proporción los triterpenos y compuestos fenólicos, seguidos de grasas, ceras, taninos, cumarinas flavonoides y alcaloides (Shailajan *et al.*, 2013, p. 141).

3.3 Control de calidad del extracto hidroalcohólico

Se preparó el extracto hidroalcohólico (70%) de las partes aéreas de *A. conyzoides* y se procedió a determinar los diferentes parámetros de calidad.

Tabla 10-3: Control de calidad de las partes aéreas de *A. conyzoides* L.

Parámetros de calidad		Resultados
Características Organolépticas	Aspecto	Turbio
	Color	Café intenso
	Olor	Característico
	Sabor	Amargo

Características Físico-Químicas	pH	5.86 ± 0.02
	Densidad	0.92 ± 0.01
	Índice de Refracción	1.367 ± 0.01
	Sólidos Totales	1.54 ± 0.01

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

Dentro del control de calidad del extracto tenemos el análisis de las características organolépticas, aspecto turbio, color café intenso, olor característico y sabor amargo; todas estas son características propias de la planta y solvente utilizado. El pH del extracto hidroalcohólico de la droga fue de 5.86 ± 0.02 ; un valor ligeramente lo que indica la presencia de componentes de ácidos débiles. La densidad relativa fue de 0.92 ± 0.01 que al realizar una comparación con la densidad inicial del etanol al 70% (0.68) se denota un incremento significativo asumiendo una buena extracción de componentes fitoquímicos solubles.

El índice de refracción fue de 1.367 ± 0.01 ; superior al índice de refracción del agua que es de 1, lo que demuestra la presencia de metabolitos secundarios, especialmente azúcares capaces de disolverse con facilidad en el extracto. Finalmente, el porcentaje de sólidos totales del extracto es de 1.54 ± 0.01 ; que indica una extracción eficiente de metabolitos secundarios. Además, sobrepasa el porcentaje mínimo (no debe ser menor a 1.20%), valor establecido por la Real Farmacopea Española.

3.4 Cuantificación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales del extracto se utilizó el método colorimétrico de Folin – Ciocalteu, con el cual se elaboró una curva de calibración con soluciones estándar de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm; presentando la siguiente ecuación de la recta: $A = 0.0014C + 0.0144$ y un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9997$.

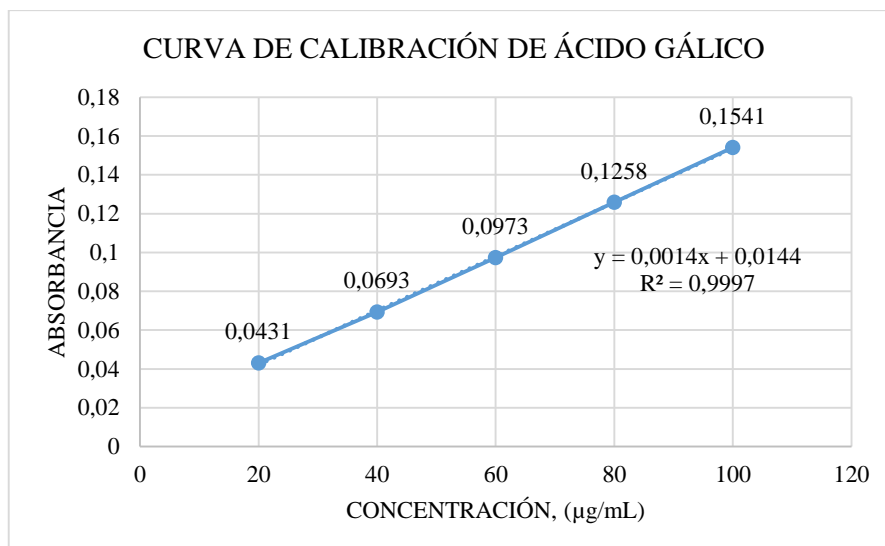


Gráfico 1-3: Curva de calibración de ácido gálico.

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

Para obtener la concentración de los fenoles totales, se interpoló el valor de la absorbancia de la muestra con la curva de calibración del ácido gálico (Gráfico 1-3), obteniendo los siguientes resultados expresados en mg equivalentes de ácido gálico por g del extracto liofilizado.

Tabla 11-3: Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>A. conyzoides</i>	Fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto liofilizado	Porcentaje
1000 µg/mL en etanol al 70%	241.33±7.64	24.13±0.76

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

En la tabla 4-3 nos indica que la concentración de fenoles totales es de 241.33±7.64 expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto liofilizado de la parte aérea de *A. conyzoides*, es decir, que los fenoles totales representan el 24.13% ±0.76 del extracto liofilizado, un valor elevado que se relaciona con la posible actividad antiinflamatoria de la planta. Sin embargo, no existen datos bibliográficos de la cuantificación de fenoles totales de esta especie vegetal, para realizar una comparación con los resultados obtenidos.

3.5 Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides totales del extracto se utilizó el método colorimétrico de tricloruro de aluminio (AlCl_3), con el cual se elaboró una curva de calibración con soluciones estándar de quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm; presentando la siguiente ecuación de la recta $A = 0.0014C + 0.0144$ y un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9997$.

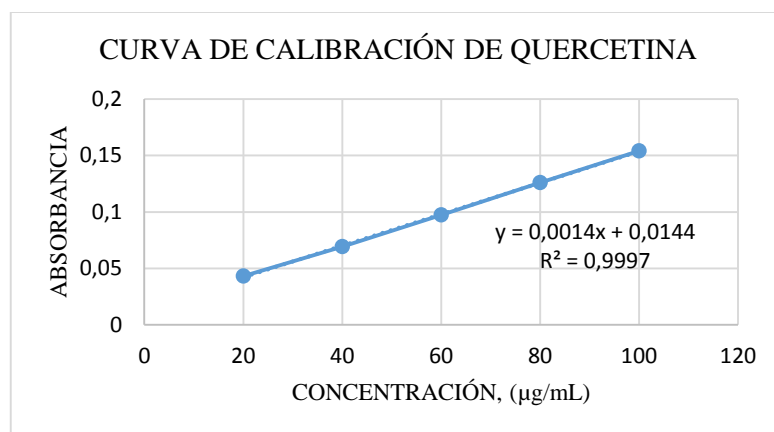


Gráfico 2-3: Curva de calibración de quercetina.

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

Para obtener la concentración de los flavonoides totales, se interpoló el valor de la absorbancia de la muestra con la curva de calibración de quercetina (Gráfico 2-3), obteniendo los siguientes resultados expresados en mg equivalentes de quercetina por g del extracto liofilizado.

Tabla 12-3: Cuantificación de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio.

Extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>A. conyzoides</i>	Flavonoides totales expresados como mg equivalentes de quercetina/ g de extracto liofilizado	Porcentaje
1000 $\mu\text{g/mL}$ en etanol al 70%	61.38 \pm 0.82	6.14 \pm 0.08

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

En la tabla 5-3 nos muestra la concentración de fenoles totales que es de 61.38 \pm 0.82 expresados como mg equivalentes de quercetina por g de extracto liofilizado de la parte aérea de *A. conyzoides*, es decir, que los flavonoides totales representan el 6.14 \pm 0.08% del extracto

liofilizado, un valor relativamente bajo pero que se relaciona con la posible actividad antiinflamatoria de la planta. Sin embargo, no existen datos bibliográficos de la cuantificación de flavonoides totales de esta especie vegetal y ninguna otra de este género, para realizar una comparación con los resultados obtenidos. Sin embargo, existen estudios de algunas especies de esta familia las cuales demuestran un alto porcentaje de flavonoides que varía entre 40 y 60 % tales como *Bidens andicola*, *Baccharis genistelloides*, *Gnaphalium americanum* y *Sigesbeckia serrata*.

En un estudio de identificación de flavonoides en un extracto seco de la parte aérea de este espécimen nos indica la presencia de flavonoides metoxylados. Sin embargo, por las características físico químicas de este tipo en particular de estos flavonoides (elevada volatilidad) los fenoles se encuentra en mayor cantidad (Nour *et al.*, 2010, pp. 128-129).

3.6 Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó por el método DPPH el cual determinó la capacidad de eliminación de radicales libres del extracto hidroalcohólico de *A. conyzoides* a diferentes concentraciones y así obtener la concentración inhibitoria media (IC₅₀) del extracto.

Tabla 13-3: Resultados de la actividad antioxidante del extracto liofilizado.

Concentración del extracto, (µg/mL)	Actividad antioxidante, (% de Eliminación de Radicales)
10	5.56
20	5.82
50	6.08
100	6.86
200	9.18
500	16.17
1000	21.09

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018.

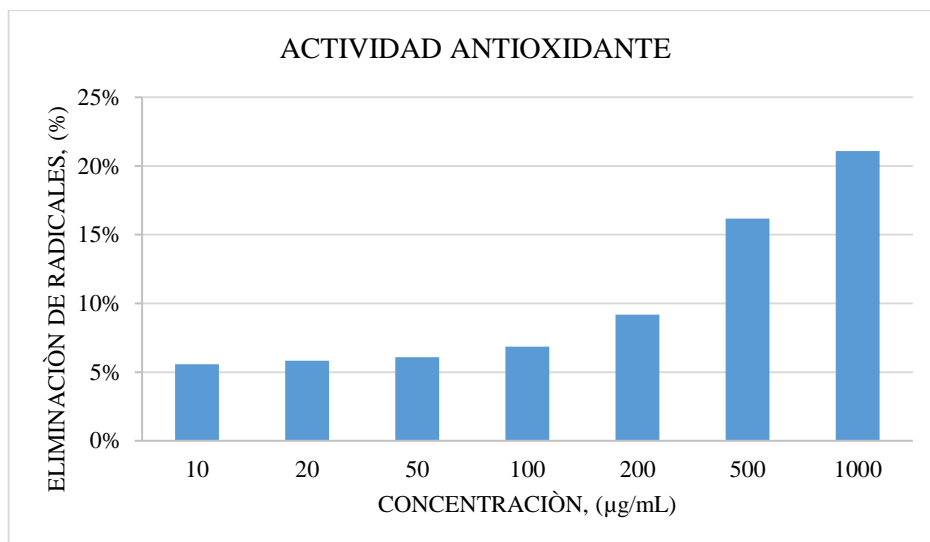


Gráfico 3-3: Actividad antioxidante a diferentes concentraciones del extracto liofilizado.

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018.

Shem-Tov et al. (2012, p.303) concluye que el potencial antioxidante se debe principalmente a la capacidad de eliminar la formación de radicales libres y donar átomos de hidrógeno. Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante, demuestran baja capacidad de captación de radicales libres de DPPH debido a la baja cantidad de flavonoides presentes en el extracto. No se pudo determinar la IC_{50} ya que el porcentaje de eliminación de radicales no supera ni el 30% (Gráfico 3-3). No existen investigaciones con las que se puedan comparar los resultados obtenidos.

3.7 Actividad antiinflamatoria *in vitro*

La determinación de la actividad anti-inflamatoria *in vitro* del extracto hidroalcohólico liofilizado, se llevó a cabo mediante el método colorimétrico descrito por Tan y Berridge, el cual, mide la reducción de las sales de tetrazolio (WST-1) a formazan por espectrofotometría, en presencia de neutrófilos aislados. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición inflamatoria.

Tabla 14-3: Porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto y del ácido acetilsalicílico.

Extracto Liofilizado de <i>A. conyzoides</i>		Ácido Acetilsalicílico	
Concentración, (µg/mL)	Inhibición Inflamatoria, (%)	Concentración, (µg/mL)	Inhibición Inflamatoria, (%)
1000	88.03±0.11	200	72.89±2.77
800	37.67±2.97	100	41.88±0.55
500	24.42±1.82	50	25.11±1.77
200	18.64±1.43	25	12.23±2.26
100	11.49±2.57	12,5	6.07±1.99

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

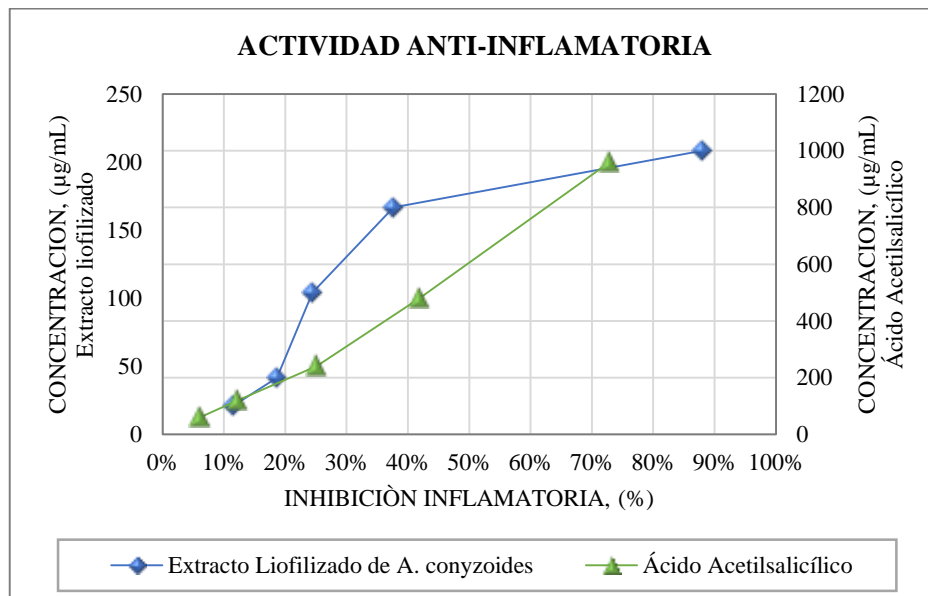


Gráfico 4-3: Representación gráfica del porcentaje de Inhibición Inflamatoria del extracto liofilizado y el ácido acetilsalicílico a diferentes concentraciones.

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

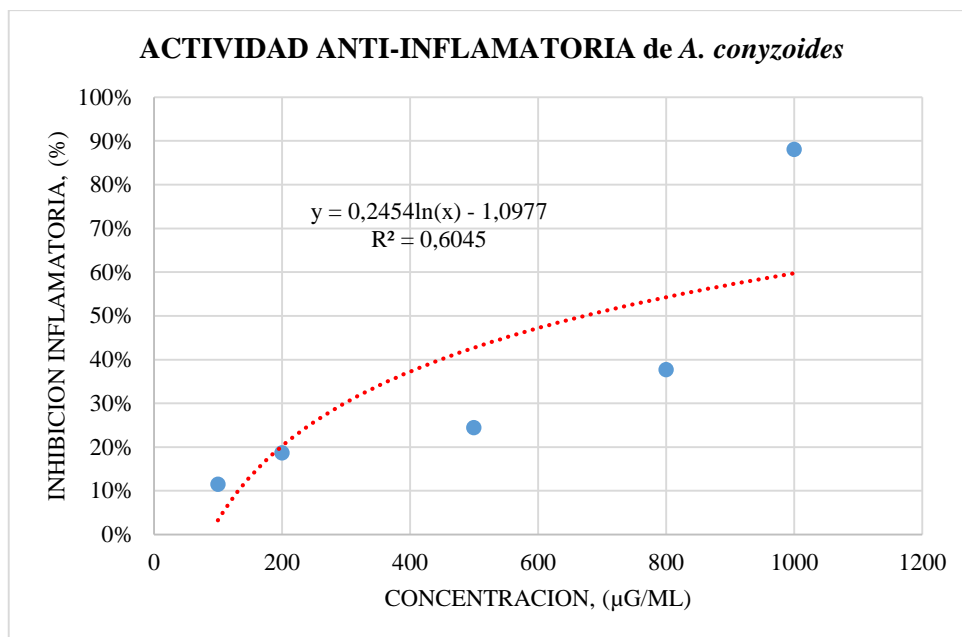


Gráfico 5-3: Curva de concentración inhibitoria media del extracto hidroalcohólico liofilizado de *A. conyzoides* de la actividad anti-inflamatoria

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

En el Gráfico 4-3 se observa una comparación del porcentaje de inhibición inflamatoria entre los resultados obtenidos del extracto liofilizado de *A. conyzoides* y del ácido acetilsalicílico, mostrando una leve superioridad en la actividad anti-inflamatoria del extracto respecto al ácido acetilsalicílico. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que las concentraciones utilizadas del extracto son superiores al ácido acetilsalicílico.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente por un diseño completamente aleatorio con el programa estadístico SPSS 23, aplicando el test ANOVA de un factor, para determinar si existen diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición inflamatoria y las concentraciones del extracto utilizadas. Inicialmente, se aplicó el Test de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk y la Prueba de Levene, para verificar si los datos cumplen con los dos supuestos fundamentales de la estadística paramétrica, distribución normal y homogeneidad de varianzas, respectivamente.

Para el test de Kolmogorov Smirnov y Shapiro-Wilk, se obtuvo un nivel de significación de $p > 0.05$ como se indica en el Gráfico 1I. Por lo cual, se acepta la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$) que afirma que no existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición inflamatoria en todos los casos, demostrando que los datos presentan una distribución normal. El test de Levene presenta un nivel de significancia mayor a 0.05 (Gráfico 2I), que indica que

no existen diferencias significativas entre los grupos dentro de esta investigación, es decir, poseen una varianza equivalente o similar.

Al cumplir con el test de Normalidad y Homogeneidad de varianzas, se analiza los datos con el test ANOVA de un factor, en el Gráfico 3I, nos muestra un p valor de cero, por ende se rechazó la hipótesis nula ($H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3=\mu_4$) y se aceptó la hipótesis alternativa ($H_1= \mu_1\neq\mu_2\neq\mu_3\neq\mu_4$), que postula que si existe diferencias significativas entre los grupos (% de inhibición inflamatoria y la concentración). Finalmente, se procesaron los datos con el test de Tukey como se observa en el Gráfico 4I de comparaciones múltiples, mostrando un nivel de significancia menor a 0.05 para todos los casos. Esto significa que el porcentaje de inhibición inflamatoria es diferente para cada concentración al igual que la sustancia de referencia (ácido acetilsalicílico).

En la tabla 7-3 se observa que el mayor porcentaje de inhibición inflamatoria es de 72.89 ± 2.77 para el ácido acetilsalicílico (sustancia de referencia) y 88.03 ± 0.11 para el extracto liofilizado de *A. conyzoides* que se presenta a concentraciones de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 1000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Al comparar estos datos se observa que el extracto liofilizado presenta mayor actividad anti-inflamatoria debido a su elevada concentración aunque también influye la presencia de varios grupos fitoquímicos que actúan en completo sinergismo.

En el Gráfico 5-3 se muestra la Curva de concentración inhibitoria media del extracto hidroalcohólico liofilizado para la actividad anti-inflamatoria, con una IC_{50} de 672.23 $\mu\text{g/mL}$; concentración del extracto requerido para inhibir el 50% de la inflamación. Por lo tanto este extracto requiere concentraciones altas para generar una buena actividad antiinflamatoria.

3.8 Citotoxicidad *in vitro*

La determinación de la actividad citotóxica *in vitro*, se realizó mediante el método colorimétrico descrito por Tan y Berridge, el cual, mide la reducción de las sales de tetrazolio (WST-1) a formazan por espectrofotometría, específicamente la detección de células viables (neutrófilos metabólicamente activos). Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, que se indican en la tabla.

Tabla 15-3: Porcentaje de viabilidad celular del extracto y del ácido acetilsalicílico.

Extracto Liofilizado de <i>A. conyzoides</i>		Ácido Acetilsalicílico	
Concentración, (µg/mL)	Viabilidad celular, (%)	Concentración, (µg/mL)	Viabilidad celular, (%)
1000	51.89±1.56	200	40.93±2.01
800	61.76±1.79	100	67.07±1.55
500	77.67±2.74	50	87.34±0.78
200	92.11±0.67	25	98.10±0.91
100	99.98±0.71	12,5	99.45±0.69

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

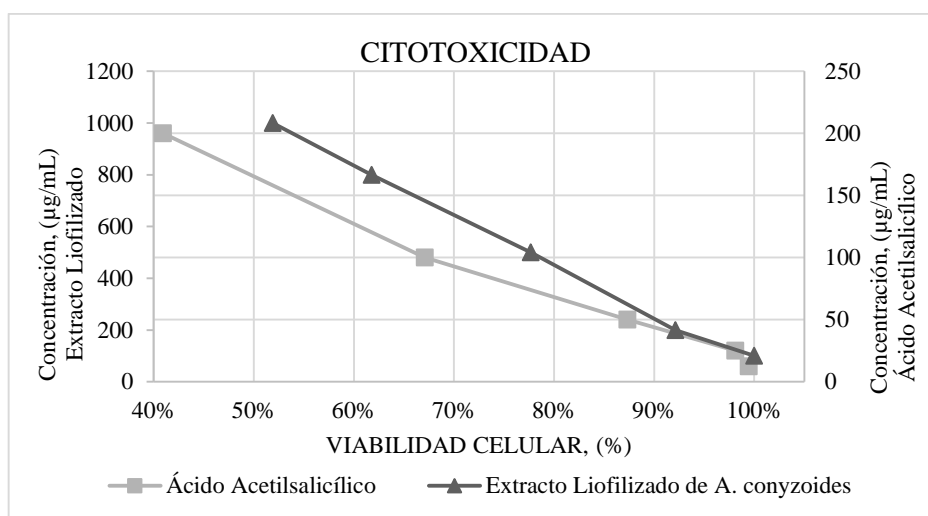


Gráfico 6-3: Representación gráfica de la viabilidad celular del extracto liofilizado y el ácido acetilsalicílico a diferentes concentraciones.

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

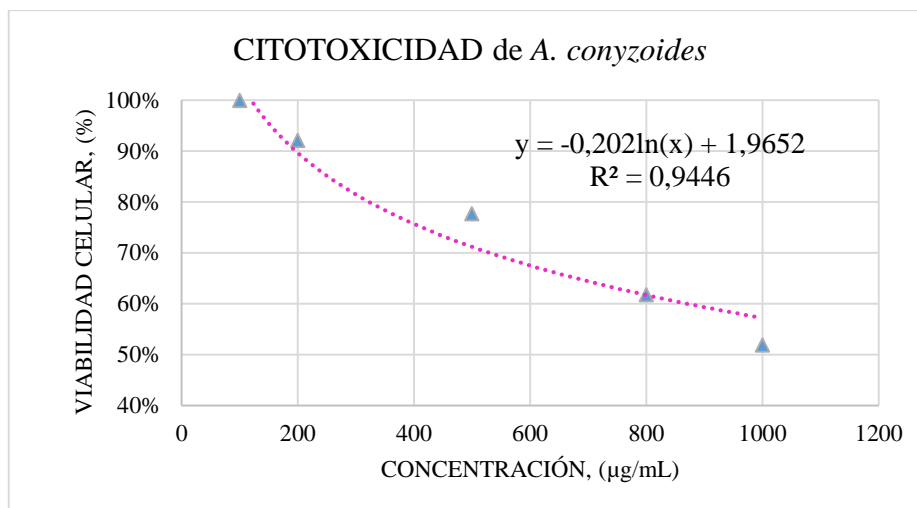


Gráfico 7-3: Curva de la concentración letal media del extracto hidroalcohólico liofilizado de *A. conyzoides* de la actividad citotóxica.

Elaborado por: Dennis Alvarez, 2018

En el Gráfico 5-3 se observa una comparación de la viabilidad celular entre los resultados obtenidos del extracto liofilizado de *A. conyzoides* y del ácido acetilsalicílico, donde se observa una marcada superioridad en la viabilidad celular del extracto respecto al ácido acetilsalicílico. A pesar de que el extracto presenta concentraciones elevadas con respecto al ácido acetilsalicílico.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente por un diseño completamente aleatorio con el programa estadístico SPSS 23, aplicando el test ANOVA de un factor, para determinar si existen diferencias significativas entre el porcentaje de viabilidad celular y las concentraciones del extracto utilizadas. Inicialmente, se aplicó el Test de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk y la Prueba de Levene, para verificar si los datos cumplen con los dos supuestos fundamentales de la estadística paramétrica, distribución normal y homogeneidad de varianzas, respectivamente.

Para el test de Kolmogorov Smirnov y Shapiro-Wilk, se obtuvo un nivel de significación de $p > 0.05$ como se indica en el Gráfico 1J. Por lo cual, se acepta la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$) que afirma que no existe diferencias significativas en el porcentaje viabilidad celular en todos los casos, demostrando que los datos presentan una distribución normal. El test de Levene presenta un nivel de significancia mayor a 0.05 (Gráfico 2J), que indica que no existen diferencias significativas entre los grupos dentro de esta investigación, es decir, poseen una varianza equivalente o similar.

Al cumplir con el test de Normalidad y Homogeneidad de varianzas, se analiza los datos con el test ANOVA de un factor, en el Gráfico 3J nos muestra un p valor de cero, por ende se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, que postula que si existe diferencias significativas entre los grupos (% de viabilidad celular y la concentración). Finalmente, se procesaron los datos con el test de Tukey como se observa en el Gráfico 4J de comparaciones múltiples, mostrando un nivel de significancia menor a 0.05 para todos los casos. Esto significa que el porcentaje de viabilidad celular es diferente para cada concentración al igual que el ácido acetilsalicílico.

En la tabla 8-3 se observa que el menor porcentaje de viabilidad celular es de 40.93 ± 2.01 para el ácido acetilsalicílico (sustancia de referencia) y 51.89 ± 1.56 para el extracto liofilizado de *A. conyzoides* que se presenta a concentraciones de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 1000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Al comparar estos datos se observa que el extracto liofilizado presenta menor citotoxicidad, a pesar de presentar una elevada concentración en comparación con el ácido acetilsalicílico, ya que los grupos fitoquímicos no causan daño celular (menores efectos adversos).

En el Gráfico 7-3 que nos indica la concentración necesaria para alcanzar el 50% (LC50) de la viabilidad celular en este ensayo, la cual es de 1412.99 $\mu\text{g/mL}$, que indica que se requiere de concentraciones muy elevadas para provocar daños. No existen estudios realizados sobre la actividad antiinflamatoria y citotóxica de esta especie con los cuales se puedan comparar los resultados obtenidos en esta investigación. Sin embargo existen estudios realizados en géneros de la misma familia, mostrándonos resultados superiores a la de *A. conyzoides* en cada una de estas actividades.

CONCLUSIONES

- Tras realizar el control de calidad de la droga cruda y del extracto hidroalcohólico se determinó que todos los parámetros se encuentran dentro del límite establecido por la Real Farmacopea Española (USP 35), con lo cual se garantiza uniformidad en los resultados de la investigación. En el tamizaje fitoquímico se define la presencia de alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y azúcares reductores como metabolitos secundarios representativos de la parte aérea de *A. conyzoides*. Adicionalmente, en los extractos etanólico y acuoso se detectó la presencia de catequinas, aminoácidos, quinonas y mucílagos, mientras que en el extracto etéreo se identificó compuestos grasos y alcaloides.
- En la cuantificación espectrofotométrica de los fenoles y flavonoides totales, se obtuvieron valores de 241.33 ± 7.64 mg Eq de ácido gálico/g del extracto hidroalcohólico liofilizado, una elevada cantidad de fenoles presentes en el extracto (24.13%) con respecto a otras especies de la familia Asteraceae y 61.38 ± 0.82 mg Eq Quercetina/g del extracto hidroalcohólico liofilizado, representando el 6.14% del extracto liofilizado.
- Se demostró que el extracto presenta una baja capacidad de eliminación de radicales libres de DPPH (actividad antioxidante), ya que a la máxima concentración (1000 $\mu\text{g/mL}$) se observa una capacidad de eliminación de radicales del 21.09%. Esto podría ocurrir por las condiciones ambientales a las cuales la planta estaba expuesta antes de su recolección, ya que es un factor importante en la síntesis de los componentes químicos responsables de la actividad antioxidante.
- Se evaluó la capacidad anti-inflamatoria y citotóxica del extracto hidroalcohólico de *A. conyzoides* a diferentes concentraciones, presentando un alto porcentaje de inhibición inflamatoria (88.03%) a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ del extracto, siendo superior a la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ del ácido acetilsalicílico. El porcentaje de inhibición inflamatoria para el extracto fluctúa entre 11–88% y para el ácido acetilsalicílico oscila entre 6-73%. Mientras que, en términos de viabilidad celular el extracto presenta una baja citotoxicidad a sus diferentes concentraciones respecto del ácido acetilsalicílico. La viabilidad celular del extracto varía entre 51.89-99.98% frente al ácido acetilsalicílico que oscila entre 40.93-99.45%. Se ha demostrado que la actividad anti-inflamatoria y citotóxica del extracto hidroalcohólico de *A. conyzoides* es ligeramente superior al ácido acetilsalicílico, aunque no es superior a la acción farmacológica de otras especies (*Bidens andicola*, *Arnica montana*, *Baccharis genistelloides*, entre otros) de la misma familia

RECOMENDACIONES

- Se recomienda para futuros trabajos de investigación determinar los componentes responsables de la actividad antiinflamatoria y aislar dichos compuestos de esta especie vegetal mediante técnicas cromatográficas.
- Se recomienda evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo* de extractos de diferente polaridad.
- Se recomienda evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de las hojas de esta planta por los antecedentes etnofarmacológicos encontrados en bibliografía.
- Se recomienda realizar un estudio de la actividad antimicrobiana *in vitro* como *in vivo* de la parte aérea de *A. conyzoides* debido a los antecedentes que presenta esta planta.
- Se recomienda evaluar la actividad ansiolítica *in vivo* de esta planta, que presenta una moderada cantidad de alcaloides.

BIBLIOGRAFÍA

Ada, L., et.al. ‘Plantas cubanas con efecto antiinflamatorio Cuban plants with anti-inflammatory effects’, (2015), 49(1), pp. 156–164. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613019328>.

Alhakmani, F., et.al. ‘Determination of total phenol, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of seeds and fruits of *Zizyphus spina-christi* grown in Oman’, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Suppl 2), (2014), pp. 656–660. doi: 10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0273. Disponible en: <http://www.redalyc.org/service/redalyc/downloadPdf/856/85618379003/Actividad+Anti+inflama+toria+de+Productos+Naturales/1>.

Areia, M., et.al. ‘Non-steroidal anti-inflammatory drugs and gastroprotection gap among Family Physicians : Results from a survey’, *Journal Portugues de Gastreenterologia*, (2013), 20(6), pp. 243–249. doi: 10.1016/j.jpg.2012.11.004.

Bektas, A., et.al. ‘Aging, inflammation and the environment’, *Experimental Gerontology journal*, (2017), (October), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.exger.2017.12.015. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556517307799>.

Berridge, M. V, et.al. ‘The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts’, (2008), *Clinical Pharmacology*, (4), pp. 14–19. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387265605110047>.

Bolzan, A., et.al. *FARMACOGNOSIA da planta ao medicamento*. (2007), 6° Edicion. Edited by R. R. (Editorial da U. Barcelos. Porto Alegre, Brasil: Universidae Federal Do Rio Grande Do Sul.

Borges, A. A. and Alvarado, L. M. ‘Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares’, *Finlay, Universidad de Ciencias Médicas*, (2016), 5, pp. 47–62. doi: CP: 55100.

Capasso, R., et.al. *Farmacognosia applicata/ Controllo di qualita delle droghe vegetali.* (2011), 1° Edicion. Edited by C. (Editorial S. Simona. Verlag, Italia.

Chen, X., Mu, K. and Kitts, D. D. ‘Characterization of phytochemical mixtures with inflammatory modulation potential from coffee leaves processed by green and black tea processing methods’, *Food Chemistry*, 6, (2018), pp. 1–38. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.097.

Chhetri, J. K., et.al. ‘Chronic inflammation and sarcopenia: A regenerative cell therapy perspective’, *Experimental Gerontology*, (2017), pp. 1–32. doi: 10.1016/j.exger.2017.12.023.

Choudhary, M. I. and Jalil, S. ‘Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen , *Usnea longissima*’, *Phytochemistry (Elsevier)*, 66, (2005), pp. 2346–2350. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.06.023.

Faqueti, L. G., et.al. ‘Antinociceptive and anti-inflammatory activities of standardized extract of polymethoxyflavones from *Ageratum conyzoides*’, *Journal of Ethnopharmacology.* (2016), Elsevier, 16, pp. 1–31. doi: 10.1016/j.jep.2016.09.025.

Ferreira, I. C. F. R., et.al. ‘Phenolic Compounds and Its Bioavailability : In Vitro Bioactive Compounds or Health Promoters?’, *Advances in Food and Nutrition Research (Elsevier Inc.)*, 82, (2017), pp. 1–44. doi: 10.1016/bs.afnr.2016.12.004.

Fingleton, B. ‘Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes’, *BBA - Molecular Cell Research.* Elsevier B.V., 34, (2017), pp. 1–34. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.010.

Frenzel, S., et.al. ‘Investigation of cellular metabolism using the tetrazolium salt WST-1’, *Free Radical Biology and Medicine*, (September), (2008), p. 198. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804999811964>.

Gil-aldea, I. and Azanza, J. R. ‘Complicaciones gástricas de tratamientos farmacológicos’, *Revista de la educación superior*. Elsevier España, S.L.U., 12(3), (2016), pp. 137–142. doi: 10.1016/j.med.2016.02.004.

Gonzalez, R. and Beltrán, M. ‘El proceso inflamatorio’, *Departamento de Enfermería y Fisioterapia Escuela*, 4, (2010), pp. 9–12. Available at: http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero_4/pinflamatorio4.htm.

Heras, B. DE, et.al. ‘Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador’, *Journal of Ethnopharmacology*, 61, (1998), pp. 161–166. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198000294>.

Innes, J. K. and Calder, P. C. ‘Prostaglandins , Leukotrienes and Essential Fatty Acids Omega-6 fatty acids and in fl ammation’, *Elsevier, Plefa (Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids)*, 7(March), (2018), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.plefa.2018.03.004.

Jiang, N. M., et.al. ‘The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment’, *Cell Press Reviews, Molecular Medicine*, xx, (2018), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.molmed.2018.06.008.

Kenny, O., et.al. ‘Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts’, *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 5, (2014), pp. 1–27. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.126.

Kokkou, E., et.al. ‘The impact of dietary flavonoid supplementation on smoking-induced in fl ammatory process and fi brinolytic impairment’, *Atherosclerosis (Elsevier)*, 251, (2016), pp.

266–272. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.054.

Lanas, Á. ‘Nuevos avances en efectos adversos por AINE en el tracto gastrointestinal’, *Gastroenterología y hepatología*. Elsevier, 29(Supl 3), (2006), pp. 16–22. doi: 10.1157/13098291.

Lin, G. D. and Li, R. W. ‘Natural Products Targeting Inflammation Processes and Multiple Mediators’, in University, T. A. N. (ed.) *Natural Products and Drug Discovery: An Integrated Approach*. 8th edn. Australia: Elsevier Ltd, (2018), pp. 277–308. doi: 10.1016/B978-0-08-102081-4.00010-1.

Lin, H., Chang, T. and Chang, S. ‘A review of antioxidant and pharmacological properties of phenolic compounds in *Acacia confusa*’, *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. Elsevier Ltd, 6, (2018), pp. 4–11. doi: 10.1016/j.jtcme.2018.05.002.

Liu, J., et.al. ‘Two new farnesyl phenolic compounds with anti-inflammatory activities from *Ganoderma lucidum*’, *Food Chemistry*, 12, (2018), pp. 1–36. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.097.

Masek, A., Zaborski, M. and Kosmalka, A. ‘Derivatives of flavonoides as anti-ageing substances in elastomers’, *Comptes rendus - Chimie*. Academie des sciences, 14(5), (2011), pp. 483–488. doi: 10.1016/j.crci.2011.01.001.

Moriya, J. ‘Critical roles of inflammation in atherosclerosis’, *Journal of Cardiology*. Japanese College of Cardiology, 23, (2018), pp. 1–6. doi: 10.1016/j.jjcc.2018.05.010.

Nour, A. et.al. ‘The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L . &’, *Journal of Ethnopharmacology (Elsevier)*, 129, (2010), pp. 127–130. doi: 10.1016/j.jep.2010.02.015.

Peskin, A. V and Winterbourn, C. C. ‘Assay of superoxide dismutase activity in a plate assay using WST-1’, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 13, (2016), pp. 1–14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.033.

Rioba, N. B. and Stevenson, P. C. ‘Ageratum conyzoides L. for the management of pests and diseases by small holder farmers’, *Industrial Crops & Products*. Elsevier, (June), (2017), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.06.068.

Sargin, S. A. *Plants used in Ethnomedicinal practices in Gulnar district of Mersin*. 24th edn, *Journal of Herbal Medicine*. 24th edn. (2018), Edited by S. A. Sargin. Mersin, Turkey: Elsevier GmbH. doi: 10.1016/j.hermed.2018.06.003.

Shailajan, S., et.al. ‘Evaluation of quality and efficacy of an ethnomedicinal plant Ageratum conyzoides L. in the management of pediculosis’, *Journal of Young Pharmacists*. Elsevier Ltd, 5(4), (2013), pp. 139–143. doi: 10.1016/j.jyp.2013.10.005.

Shen, Q., et.al. ‘The Genome of *Artemisia annua* Provides Insight into the Evolution of Asteraceae Family and Artemisinin Biosynthesis’, *Cell Press Partner, Molecular Plant*, 15, (2018), pp. 1–13. doi: 10.1016/j.molp.2018.03.015.

Shirwaikar, A., et.al. ‘The gastroprotective activity of the ethanol extract of Ageratum conyzoides’, *Journal of Ethnopharmacology*, 86, (2003), pp. 117–121. doi: 10.1016/S0378-8741(03)00050-3.
Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874103000503>.

Stoclet, J. and Schini-kerth, V. ‘Flavonoïdes alimentaires et santé humaine’, *Annales Pharmaceutiques Françaises (Elsevier Masson)*, 69, (2011), pp. 78–90. doi: 10.1016/j.pharma.2010.11.004.

Stojanovi, Z., Vázquez-pardo, F. M. and Ruiz-téllez, T. ‘Screening of selected species from Spanish flora as a source of bioactive substances’, *Industrial Crops & Products*, 95, (2017), pp.

493–501. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.09.070.

Tan, A. S. and Berridge, M. V. ‘Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: A simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents’, *Journal of Immunological Methods*, 238(1–2), (2000), pp. 59–68. doi: 10.1016/S0022-1759(00)00156-3.

Tene, V., et.al. ‘An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador’, *Journal of Ethnopharmacology*, 111, (2007), pp. 63–81. doi: 10.1016/j.jep.2006.10.032.

Valacchi, G., et.al. ‘Redox regulation of inflammatory processes’, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd, 81, (2016), pp. 234–235. doi: 10.1016/j.biocel.2016.11.002.

Vinueza, D., et.al. ‘Assessment of anti-inflammatory activity and cytotoxicity of freeze dried hydroalcoholic extract of *bidens andicola* on isolated neutrophils’, (2017), *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(6). Disponible en: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/17574>.

Virgínia, S., et.al. ‘Beneficial effect of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae) upon inflammatory response induced by carrageenan into the mice pleural cavity’, *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 10, (2016), pp. 1–44. doi: 10.1016/j.jep.2016.09.003.

Water, S., et.al. *Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites*. 1st edn, *Advances in Agronomy*. 1st edn. Edited by H. U. of Ethnomedicine Innovation&Development Laboratory, School of Pharmacy and C. Chinese Medicine, Changsha. China: Elsevier Inc. (2018), doi: 10.1016/bs.agron.2018.02.003.

Xu, W. and Larbi, A. ‘Immunity and Inflammation: From Jekyll to Hyde Regulatory functions Unbalanced Inflammation Controlled’, *Experimental Gerontology*, 56(July), (2017), pp. 1–4. doi: 10.1016/j.exger.2017.11.018.

ANEXOS

Anexo A. Preparación del material vegetal (*Ageratum conyzoides*)



Gráfico 1A: Secado de la planta



Gráfico 2A: Planta seca y molida

Anexo B. Determinación de los parámetros del control de calidad de la droga cruda



Gráfico 1B. Contenido de Humedad



Gráfico 2B. Cenizas Totales



Gráfico 3B. Cenizas Solubles en agua



Gráfico 4B. Cenizas Insolubles en HCl

Anexo C. Tamizaje fitoquímico de las diferentes extracciones de la droga cruda



Gráfico 1C. Extracto etéreo



Gráfico 2C. Extracto etanólico



Gráfico 3C. Extracto acuoso



Gráfico 4C. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico



Gráfico 5C. Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo. .



Gráfico 6C. Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.

Anexo D. Control de calidad del extracto



Gráfico 1D. Determinación del pH



Gráfico 2D. Determinación de la densidad relativa



Gráfico 3D. Índice de refracción



Gráfico 4D. Determinación de sólidos totales.

Anexo E. Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de *A. conyzoides*



Gráfico 1E. Concentración

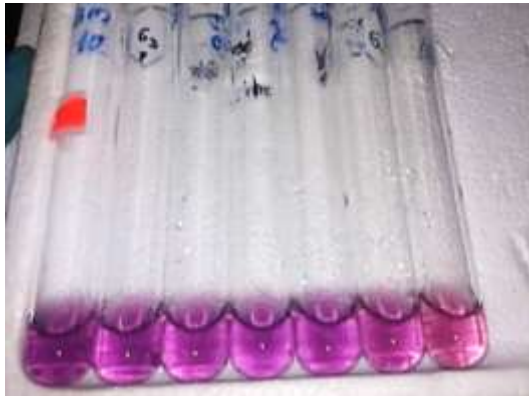


Gráfico 2E. Liofilización

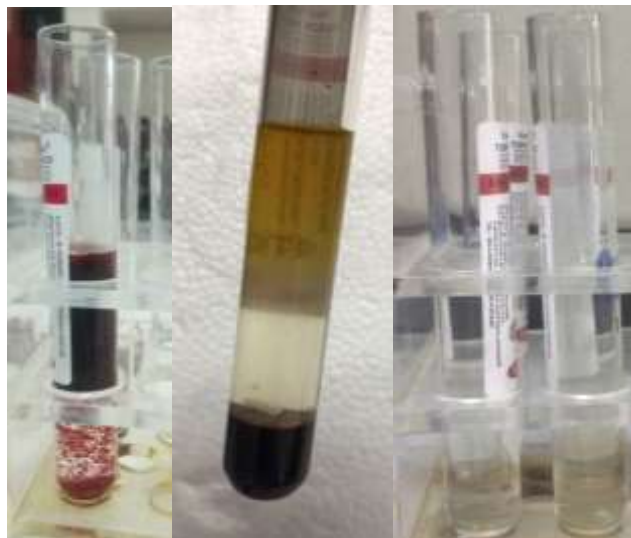


Gráfico 3E. Extracto liofilizado

Anexo F. Actividad Antioxidante *in vitro* del extracto liofilizado a diferentes concentraciones



Anexo G. Aislamiento de neutrófilos de la sangre



Anexo H. Ensayo de la actividad anti-inflamatoria (Grafico 1H) y citotóxica (Grafico 2H) *in vitro*.

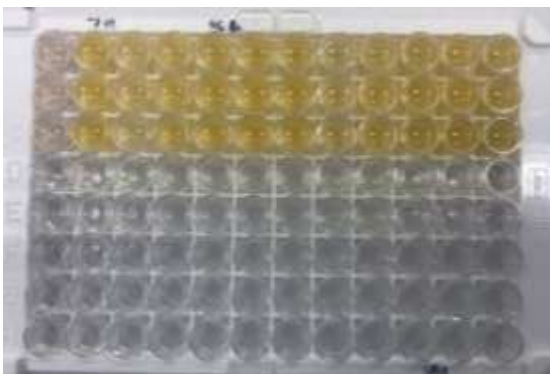


Grafico 1H.

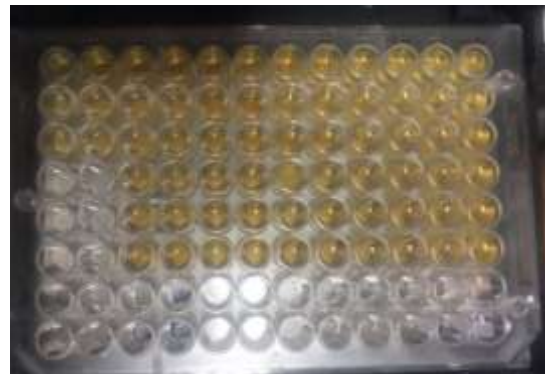


Grafico 2H.

Anexo I. Análisis estadístico de la actividad anti-inflamatoria del extracto liofilizado.

	CONCENTRACIONES	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
		1000	.311	6	.072	.797	6
800	.281	6	.151	.861	6	.192	
500	.148	6	.200*	.967	6	.870	
200	.176	6	.200*	.959	6	.810	
100	.152	6	.200*	.985	6	.974	

Gráfico 1I. Test de normalidad

		Prueba de Levene de calidad de varianzas	
		F	Sig.
INHIBICION INFLAMATORIA	Se asumen varianzas iguales	.033	.856

Gráfico 2I. Test de Homogeneidad de varianzas

ANOVA de un factor					
INHIBICION_INFLAMATORIA					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11240.133	4	2810.033	676.011	.000
Dentro de grupos	41.568	10	4.157		
Total	11281.701	14			

Gráfico 3I. Test ANOVA de un factor

Comparaciones múltiples/ Variable dependiente: INHIBICION_INFLAMATORIA							
	(I) CONC	(J) CONC	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	1000	800	50,36039*	1,66469	,000	44,8818	55,8390
		500	63,61276*	1,66469	,000	58,1341	69,0914
		200	69,39749*	1,66469	,000	63,9189	74,8761
		100	76,54578*	1,66469	,000	71,0671	82,0244
	800	1000	-50,36039*	1,66469	,000	-55,8390	-44,8818
		500	13,25237*	1,66469	,000	7,7737	18,7310
		200	19,03710*	1,66469	,000	13,5585	24,5157
		100	26,18539*	1,66469	,000	20,7068	31,6640
	500	1000	-63,61276*	1,66469	,000	-69,0914	-58,1341
		800	-13,25237*	1,66469	,000	-18,7310	-7,7737
		200	5,78473*	1,66469	,038	,3061	11,2634
		100	12,93302*	1,66469	,000	7,4544	18,4116
	200	1000	-69,39749*	1,66469	,000	-74,8761	-63,9189
		800	-19,03710*	1,66469	,000	-24,5157	-13,5585
		500	-5,78473*	1,66469	,038	-11,2634	-,3061
		100	7,14828*	1,66469	,011	1,6697	12,6269
	100	1000	-76,54578*	1,66469	,000	-82,0244	-71,0671
		800	-26,18539*	1,66469	,000	-31,6640	-20,7068
		500	-12,93302*	1,66469	,000	-18,4116	-7,4544
		200	-7,14828*	1,66469	,011	-12,6269	-1,6697

Gráfico 4I. Test de Tukey

Anexo J. Análisis estadístico de la actividad citotóxica del extracto liofilizado

	CONCENTRACIONES	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
	VIABILIDAD CELULAR	1000	.230	6	.200*	.883	6
	800	.147	6	.200*	.961	6	.826
	500	.261	6	.200*	.833	6	.114
	200	.261	6	.200*	.837	6	.123
	100	.177	6	.200*	.973	6	.909

Gráfico 1J. Test de Normalidad

		Prueba de Levene de calidad de varianzas	
		F	Sig.
VIABILIDAD CELULAR	Se asumen varianzas iguales	1.020	.321

Gráfico 2J. Test de Homogeneidad de varianzas

ANOVA de un factor: VIABILIDAD_CELULAR					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4857.230	4	1214.307	431.005	.000
Dentro de grupos	28.174	10	2.817		
Total	4885.403	14			

Gráfico 3J. Test ANOVA de un factor

Comparaciones múltiples/ Variable dependiente: VIABILIDAD_CELULAR							
	(I) CONC	(J) CONC	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	1000	800	-9,87667*	1,37050	,000	-14,3871	-5,3663
		500	-25,78741*	1,37050	,000	-30,2978	-21,2770
		200	-40,22000*	1,37050	,000	-44,7304	-35,7096
		100	-48,09333*	1,37050	,000	-52,6037	-43,5829
	800	1000	9,87667*	1,37050	,000	5,3663	14,3871
		500	-15,91075*	1,37050	,000	-20,4212	-11,4003
		200	-30,34333*	1,37050	,000	-34,8537	-25,8329
		100	-38,21667*	1,37050	,000	-42,7271	-33,7063
	500	1000	25,78741*	1,37050	,000	21,2770	30,2978
		800	15,91075*	1,37050	,000	11,4003	20,4212
		200	-14,43259*	1,37050	,000	-18,9430	-9,9222
		100	-22,30592*	1,37050	,000	-26,8163	-17,7955
	200	1000	40,22000*	1,37050	,000	35,7096	44,7304
		800	30,34333*	1,37050	,000	25,8329	34,8537
		500	14,43259*	1,37050	,000	9,9222	18,9430
		100	-7,87333*	1,37050	,001	-12,3837	-3,3629
	100	1000	48,09333*	1,37050	,000	43,5829	52,6037
		800	38,21667*	1,37050	,000	33,7063	42,7271
		500	22,30592*	1,37050	,000	17,7955	26,8163
		200	7,87333*	1,37050	,001	3,3629	12,3837

Gráfico 4J. Test de Tukey

Anexo K. Permiso de investigación

Formulario del pago

SECRETARIA GENERAL
Ministerio del Ambiente
FECHA REG 14 SEP 2018
REGISTRO 6367
FOLIO 402

MINISTERIO DEL AMBIENTE

EL GOBIERNO DE TODOS

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, conforme 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 las ecuatorianas 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 1159 y Andalucía Código Postal: 170517 / Quito – Ecuador. Teléfono: 593-2 398-7600

1

Anexo L. Permiso de movilización

MINISTERIO DEL AMBIENTE



GUIA DE MOVILIZACIÓN INTERNA DE ESPECIMENES DE FLORA SILVESTRE

Nro: 023-2018-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 Dennis Álvarez con CI. Nro. 0604693671 y a Ebelin Inca con CI. Nro. 0604122234, para que movilice desde el sitio La Argelia, parroquia Punzara, cantón y provincia de Loja, muestras de flora silvestre, hasta el Herbario de la ESPOCH ubicado en la avenida 11 de noviembre y Canónigo Ramos perteneciente a la parroquia Lizarzaburu cantón Riobamba provincia de Chimborazo. Basado en el contrato Marco MAE-DNB-CM-2018-0086.

La movilización se realizará en transporte terrestre: Público: como equipaje
El día 09 de octubre del 2018.

ORDEN	FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	NATIVA ENDEMICA INTRODUCIDA	APENDICE CITES	LISTA ROJA IUCN	LISTA ROJA ECUADOR	ELEMENTOS CONSTITUTIVOS	NUMERO	ESTADO	OBSERVACIONES/PROCEDENCIA
Asteraceae	Asteraceae	Ageratum conyzoides	Pedernera	Endemica	X	X	X		2	Planta fresca	Funda plástica
Proteales	Proteales	Roupala ferruginea		Nativa	X	X	X		2	Planta fresca	Funda plástica
TOTAL									4		

Observaciones:

Las muestras permanecerán bajo la responsabilidad del BQF, Diego Vinuesa 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
COORDINADOR GENERAL ZONAL
ZONA 7 LOJA -EL ORO- ZAMORA
CHINCHIPE (Subrogante)


 Srta. Ebelin Inca
BENEFICIARIO
 CI. 0604122234

Elaborado por: Blga. Guadalupe Calle

