



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
Gnaphalium americanum Mill”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: JENNY SUSANA LAZO GOMEZ

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

Riobamba–Ecuador

2018

©2018, Jenny Susana Lazo Gomez

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
CARRERA 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 *Gnaphalium americanum* Mill**”, de responsabilidad de la señorita JENNY SUSANA LAZO GOMEZ, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Renato Vinuesa Tapia, M.Sc.

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, JENNY SUSANA LAZO GOMEZ soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Jenny Susana Lazo Gomez

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen que siempre me acompañaron hasta en los momentos que sentía no poder más, me dieron fuerzas para levantarme cada día.

A mi madre Rosa Inés Gómez que con todo su amor siempre ha confiado en mí en todos los proyectos que he emprendido y en esta etapa de mi vida que culmina ha sido mi soporte desde al inicio hasta la finalización de la carrera dándome ánimos y todo lo que ha estado a su alcance.

Jenny Susana Lazo Gomez

AGRADECIMIENTO

A mi querida Escuela Superior Politécnica de Chimborazo que en sus aulas fuimos creciendo y aprendiendo gracias a la dedicación y exigencia de mis maestros que forjaron día a día nuestro carácter y conocimientos hasta llegar a las personas que somos hoy, dignos profesionales dispuestos a enfrentar la vida laboral de la mejor manera y dejar el nombre de nuestra querida institución en alto.

A mi familia por siempre estar conmigo en todo momento.

Jenny Susana Lazo Gomez

Tabla de contenido

RESUMEN	xvii
SUMMARY	xviii
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	2
OBJETIVOS	4

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO	5
1.1 Género <i>Gamochaeta</i> Weddel	5
1.2 <i>Gnaphalium americanum</i> Mill.	5
1.2.1 <i>Descripción botánica</i>	6
1.2.2 <i>Clasificación Taxonómica</i>	7
1.2.3 <i>Usos Medicinales</i>	8
1.3 Metabolitos secundarios	8
1.3.1 <i>Clasificación</i>	9
1.3.1.1 <i>Alcaloides</i>	9
1.3.1.2 <i>Fenoles</i>	9
1.3.1.3 <i>Flavonoides</i>	10
1.3.1.4 <i>Triterpenos</i>	10
1.3.1.5 <i>Saponinas</i>	11
1.4 La Inflamación	11
1.4.1 <i>Fases de la Inflamación</i>	12
1.4.1.1 <i>Cambios vasculares</i>	12
1.4.1.2 <i>Cambios celulares</i>	12
1.4.1.3 <i>Activación y función de los leucocitos</i>	13
1.4.2 <i>Mediadores químicos de la inflamación</i>	13
1.4.2.1 <i>Ácido araquidónico (AA)</i>	14
1.4.2.2 <i>Histamina y Serotonina</i>	14
1.4.2.3 <i>Sistema del complemento</i>	14
1.4.2.4 <i>Coagulación</i>	14
1.4.2.5 <i>Citocinas</i>	14
1.4.3 <i>Mediadores celulares de la inflamación</i>	15
1.4.3.1 <i>Neutrófilos</i>	15

1.4.3.2	<i>Eosinófilos</i>	15
1.4.3.3	<i>Mastocitos</i>	15
1.4.3.4	<i>Macrófagos</i>	15
1.4.3.5	<i>Linfocitos</i>	16
1.4.3	Medicamentos Anti-inflamatorios	16
1.5	Antioxidantes	17
1.6	Citotoxicidad	18
1.7	Viabilidad celular	19

CAPÍTULO II

2	MARCO METODOLÓGICO	21
2.1	Lugar de la investigación	21
2.2	Recolección del material vegetal	21
2.3	Identificación del material vegetal	21
2.4	Equipos, reactivos y materiales	21
2.4.1	<i>Material vegetal</i>	21
2.4.2	<i>Material biológico</i>	22
2.4.3	<i>Material farmacológico</i>	22
2.4.4	<i>Materiales, reactivos y equipos</i>	22
2.4.4.1	<i>Materiales de laboratorio</i>	22
2.5	Técnicas y métodos	27
2.5.1	<i>Acondicionamiento y secado del material</i>	27
2.5.2	<i>Molienda y preparación del Extracto hidroalcohólico</i>	27
2.5.3	Control de calidad de la planta	27
2.5.3.1	<i>Determinación de Cenizas Totales</i>	27
2.5.3.2	<i>Determinación de Cenizas Solubles en Agua</i>	28
2.5.3.3	<i>Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico</i>	28
2.5.3.4	<i>Determinación de Humedad</i>	29
2.5.4	Control de calidad del extracto	29
2.5.4.1	<i>Determinación de las Características organolépticas</i>	29
2.5.4.2	<i>Densidad Relativa</i>	30
2.5.4.3	<i>Índice de Refracción</i>	30
2.5.4.4	<i>Determinación de pH</i>	30
2.5.4.5	<i>Determinación de sólidos totales</i>	30
2.5.5	Tamizaje fitoquímico	31
2.5.5.1	<i>Ensayo de Sudan</i>	33

2.5.5.2	<i>Ensayo de Dragendorff</i>	33
2.5.5.3	<i>Ensayo de Mayer</i>	33
2.5.5.4	<i>Ensayo de Wagner</i>	33
2.5.5.5	<i>Ensayo de Baljet</i>	33
2.5.5.6	<i>Ensayo de Borntrager</i>	34
2.5.5.7	<i>Ensayo de Lieberman-Burchard</i>	34
2.5.5.8	<i>Ensayo de catequinas</i>	34
2.5.5.9	<i>Ensayo de resinas</i>	34
2.5.5.10	<i>Ensayo de Fehling</i>	34
2.5.5.11	<i>Ensayo de la Espuma</i>	35
2.5.5.12	<i>Ensayo de cloruro férrico</i>	35
2.5.5.13	<i>Ensayo de la nihidrina</i>	35
2.5.5.14	<i>Ensayo de Shinoda</i>	35
2.5.5.15	<i>Ensayo de Kedde</i>	35
2.5.5.16	<i>Ensayo de antocianidinas</i>	36
2.5.5.17	<i>Ensayo de Mucílagos</i>	36
2.5.6	<i>Cuantificación de Flavonoides Totales</i>	36
2.5.7	<i>Cuantificación de Fenoles totales</i>	36
2.5.8	<i>Cuantificación de la Capacidad Antioxidante</i>	37
2.5.9	<i>Ensayo de la Actividad Anti-inflamatoria</i>	37
2.5.9.1	<i>Aislamiento de neutrófilos</i>	37
2.5.9.2	<i>Preparación de la microplaca</i>	38
2.5.10	<i>Ensayo de Citotoxicidad</i>	38

CAPÍTULO III

3	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
3.1	Control de calidad de la planta	39
3.2	Tamizaje fitoquímico	40
3.3	Control de calidad del extracto hidroalcohólico	41
3.4	Capacidad antioxidante	42
3.5	Cuantificación de flavonoides totales	43
3.6	Cuantificación de Compuestos Fenólicos	44
3.7	Ensayo Anti-inflamatorio	45
3.8	Ensayo Citotóxico	47

CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Actividad microbiana de extractos crudos	6
Tabla 2-1:	Clasificación Taxonómica de <i>G. americanum</i>	7
Tabla 3-1	Efecto de los mediadores químicos de la inflamación	15
Tabla 1-2:	Materiales de laboratorio utilizados en la obtención del extracto hidroalcohólico liofilizado, control de calidad de la planta y del extracto hidroalcohólico.....	22
Tabla 2-2:	Materiales de laboratorio utilizados en tamizaje fitoquímico	23
Tabla 3-2:	Materiales de laboratorio utilizados en la Cuantificación de Flavonoides, Fenoles y Antioxidante	23
Tabla 4-2:	Materiales de laboratorio utilizados en la Determinación Anti-inflamatoria y Citotóxica.....	23
Tabla 5-2:	Equipos utilizados en el hidroalcohólico liofilizado, control de calidad de la planta y del extracto hidroalcohólico	24
Tabla 6-2:	Equipos utilizados en tamizaje fitoquímico	24
Tabla 7-2:	Equipos de laboratorio utilizados en la Cuantificación de Flavonoides, Fenoles y Antioxidante.....	25
Tabla 8-2:	Equipos de laboratorio utilizados en la Determinación Anti-inflamatoria y Citotóxica.....	25
Tabla 9-2:	Reactivos utilizados en el extracto hidroalcohólico liofilizado, control de calidad de la planta y del extracto hidroalcohólico	25
Tabla 10-2:	Reactivos utilizados en tamizaje fitoquímico	26
Tabla 11-2:	Reactivos de laboratorio utilizados en la Cuantificación de Flavonoides, Fenoles y Antioxidante	26
Tabla 12-2:	Reactivos utilizados en la Determinación Anti-inflamatoria y Citotóxica	26
Tabla 13-2:	Absorbancias de quercetina	36
Tabla 14-2:	Absorbancias del ácido gálico	37
Tabla 1-3:	Resultados del Control de calidad de la planta	39
Tabla 2-3:	Resultados de tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de <i>G.americanum</i>	40
Tabla 3-3:	Datos obtenidos del extracto hidroalcohólico de <i>G. americanum</i>	41
Tabla 4-3:	Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de <i>G. americanum</i>	42
Tabla 5-3:	Resultados IC ₅₀	43
Tabla 6-3:	Resultados de la Cuantificación de Flavonoides de <i>G. americanum</i>	43

Tabla 7-3:	Resultados de la Cuantificación de Compuestos Fenólicos de <i>G. americanum</i> ..	44
Tabla 8-3:	Resultados del Porcentaje Inhibición Inflamatoria de <i>G. americanum</i>	45
Tabla 9-3:	Resultados del Porcentaje de Viabilidad Celular de <i>G. americanum</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: <i>G. americanum</i> Mill	7
Figura 2-1: Cambios celulares y vasculares de la inflamación.....	13
Figura 3-1: Mecanismo esquemático de la reducción WST-1	20
Figura 1-2: Proceso de Tamizaje fitoquímico	31
Figura 2-2: Esquematización para obtener el extracto etéreo	32
Figura 3-2: Proceso de los ensayos con el extracto alcohólico	32
Figura 4-2: Esquematización de las reacciones con el extracto acuoso	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Representación gráfica de la Capacidad Antioxidante del extracto liofilizado de <i>G. americanum</i>	42
Gráfico 2-3:	Representación gráfica de la Actividad Anti-inflamatoria del extracto <i>G. americanum</i>	46
Gráfico 3-3:	Representación gráfica del Porcentaje de Viabilidad Celular del extracto de <i>G. americanum</i>	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos A: Droga cruda

Anexos B: Control de calidad

Anexos C: Tamizaje fitoquímico

Anexo D: Determinación de flavonoides, fenoles, antioxidante, anti-inflamatorio y citotóxico

Anexo E: Curvas de calibración para cuantificación de Flavonoides y Fenoles

Anexos F: Análisis estadístico de la Actividad Anti-inflamatoria

Anexos G: Documentos legales

GLOSARIO

WST-1= Sal de tetrazolio

pH= Potencial de Hidrógeno

IC50 = Concentración inhibitoria media

LC50 = Concentración letal media

ADN= Ácido desoxirribonucleico

IL-1= Interleucina-1

TNF= Factor de necrosis tumoral

IL-6= Interleucina-6

AINEs= Antiinflamatorios no Esteroideos

COX= Ciclooxigenasa

NADPH= Nicotiamida adenina Dinucleótido Fosfato

NADH= Nicotin Adenin Dinucleótido

PMN= Polimorfonucleares

MTT= 3-(4, 5-di- methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

DPPH= 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

FeCl₃= Cloruro Férrico

AlCl₃= Cloruro de Aluminio

NaOH= Hidróxido de Sodio

ppm= Partes por millón

MHS= Solución Modificada de Hank´s

DMSO= Dimetilsulfóxido

HCl= Ácido clorhídrico

mEqAG= Miliequivalentes de Ácido Gálico

mg= Miligramo

mL= Mililitro

µg= Microgramos

msnm= metros sobre el nivel del mar

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad anti-inflamatoria y citotóxica de *Gnaphalium americanum* Mill *in vitro* con el fin de identificar sus potenciales aplicaciones terapéuticas. La recolección de la planta se realizó en la ciudad de Loja-Ecuador. El extracto hidroalcohólico fue obtenido por maceración durante 72 horas, utilizando como solvente alcohol potable al 96%; luego se utilizó el rotavapor y liofilizador hasta obtener el extracto final. Para identificar los metabolitos secundarios se aplicaron varios ensayos en el tamizaje fitoquímico. En la evaluación de fenoles totales utilizamos el método de Folin-Ciocalteu y el estándar ácido gálico. Para la determinación de flavonoides, fue utilizado el método Tricloruro de aluminio y el estándar quercetina; la capacidad antioxidante fue realizado con el método DPPH y los resultados fueron expresados en términos de IC₅₀. Los ensayos anti-inflamatorio y citotóxico fueron realizados sobre neutrófilos aislados para determinar la inhibición inflamatoria y la viabilidad celular respectivamente. En el tamizaje fitoquímico fueron identificados varios metabolitos como: compuestos grasos, alcaloides, triterpenos, catequinas, azúcares reductores, fenoles, flavonoides. El porcentaje de inhibición inflamatoria en *G. americanum* a 200 ppm fue de 70.34% frente al valor de la referencia ácido acetil salicílico con 50.77%, el ensayo de citotoxicidad dio el 98.96% de viabilidad celular frente al ácido acetil salicílico con 88.82%. Presentando el extracto hidroalcohólico de *G. americanum* mayor inhibición inflamatoria que la referencia, y el ensayo de citotoxicidad indica que el extracto de estudio es menos tóxico que la aspirina, al obtener un mayor valor de viabilidad celular. Se recomienda hacer estudios posteriores a la investigación, por la excelente actividad anti-inflamatoria y su bajo nivel de citotoxicidad.

PALABRAS CLAVES: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <LECHUGUILLA (*G. americanum*)>, <INFLAMACIÓN>, <CITOTOXICIDAD>, <*in vitro*>, <ASTERACEAE>, <SAL DE TETRAZOLIO (WST-1)>, <NEUTROFILOS AISLADOS>.

SUMMARY

This investigation aims to determine the anti-inflammatory and cytotoxic activity of *Gnaphalium americanum* Mill *in vitro* in order to identify its potential therapeutic applications. This plant was collected in Loja city, Ecuador. The water-alcohol extract was gotten by soaking during 72 hours using potable alcohol as solvent at 96%. After rotary evaporator and freeze dryer were used to get the final extract. Several assays were applied in the phytochemical screening to identify the secondary metabolites. We used Folin-Ciocalteu and gallic acid methods to evaluate the total phenols; aluminum trichloride and quercetin standard to determine flavonoids. The antioxidant capacity was carried out with DPPH method and the results were shown in terms of IC50. The anti-inflammatory and cytotoxic assays were carried out on aisle neutrophils to determine the inflammatory inhibition and the cell viability respectively. We identify several metabolites such as fatty compounds, alkaloids, triterpenes, catechins, reducing sugars, phenols and flavonoids in the phytochemical screening. Percentage of anti-inflammatory inhibition in *G. americanum* to 200 ppm was of 70.34% compared to value of reference acetyl salicylic acid with 50.77%. The cytotoxicity showed 98.96% of cell viability compared to acetyl salicylic acid with 88.82%. The water alcohol extract of *G. americanum* had a higher inflammatory inhibition than the reference and the cytotoxicity assay shows that this extract is less toxic than the aspirin when a higher value of cell viability is gotten. It is recommended to carry out further investigations about this plant because of its anti-inflammatory activity and low level of toxicity.

KEY WORDS: <BIO CHEMISTRY>, <PHARMACY>, <LECHUGILLA (*G. americanum*)>, <INFLAMMATION>, <CITOTOXICITY>, <*in vitro*>, <ASTERACEAE>, <TETRAZOLIUM SALT (WST-1)>, <AISLE NEUTROPHILS>.

INTRODUCCIÓN

La interrogante de la investigación fue: ¿Cuáles son los factores que permiten evaluar la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *G. americanum*?

Para lo cual se inició contestando que la inflamación es una dolencia que provoca hinchazón como frente que nuestro sistema inmunológico tiene ante agentes extraños como pueden ser bacterias o virus, esta afección daña la homeostasis del cuerpo, en muchas situaciones se ha evidenciado que los medicamentos presentes en el mercado no satisfacen los requerimientos farmacoterapéuticos indispensables para batallar con las inflamaciones que a diario se presentan (Veloz, 2015, pp.156-158).

En la bibliografía revisada, existen estudios de la planta utilizada tradicionalmente para tratar infecciones respiratorias por tener un alto potencial antimicrobiano, pero no existen estudios de la actividad anti-inflamatoria de la *G. americanum* y con esto se busca expandir la información y detectar una nueva aplicación terapéutica (Rojas et al. 2001, pp. 4-6).

G. americanum en la Amazonía como en la serranía ecuatoriana tiene diversos usos como adyuvante para tratar infecciones, para tratar la gripe y la diarrea, e incluso para tratar heridas (Aguirre, Yaguana y Moreno, 2014, pp. 26).

Los AINEs como medicamentos anti-inflamatorios son muy buenos, el inconveniente son sus efectos adversos, los cuales afectan al tejido hepático, renal, cardiovascular y gastrointestinal. Últimamente han surgido varios casos de efectos adversos cardiovasculares que tiene en alerta a la comunidad médica, sin embargo, los daños gastrointestinales son más severos (Rojas et al. 2001, pp. 4-6).

Estadísticamente se han registrado un incremento en las tasas de úlceras gastroduodenales que van del 5 al 80% en pacientes que se realizan las endoscopias a corto plazo, y del 15 al 40% en pacientes con padecimientos a plazo largo. El daño que ocasiona a nivel gastrointestinal puede llegar a ciertas complicaciones como pueden ser sangrado, perforaciones y estenosis (Rojas et al. 2001, pp. 4-6).

Los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) pueden ocasionar daños a nivel gastrointestinal, provocando un incremento considerable en la mortalidad y morbilidad. Estos medicamentos actúan en conjunto con los fosfolípidos y desencajan la fosforilación mitocondrial oxidativa, empezando en el organismo cambios a bioquímicos que dañan la barrera gastrointestinal. (Rojas et al. 2001, pp. 4-6).

Los síntomas de una inflamación son varios y pueden ser: hinchazón, fiebre, sonrojo, ciertos trastornos funcionales; cuando no es controlada a tiempo puede desencadenar en artritis, colitis, inflamación vascular y cutánea, síndrome metabólico e incluso cáncer (Yang et al. 2018, pp. 268-277).

Las fases de la inflamación van a depender de la profundidad y del tipo de agente que las produce, y tiene como finalidad producir un aumento del flujo sanguíneo, entre las fases tenemos: cambios celulares, cambios vasculares, activación y función de los leucocitos (Valencia y Áncer 2011, pp. 48-64).

Los mediadores químicos de la inflamación más importantes son: ácido araquidónico, histamina y serotonina, sistema del complemento, factores de coagulación, citocinas (Valencia y Áncer 2011, pp. 48-64).

Los ensayos de citotoxicidad se los realiza *in vitro*, evitando así el uso de animales. Se conocen varios métodos desde 1950 los cuales se han ido modificando hasta llegar a la viabilidad celular y el metabolismo celular que tiene una respuesta *in vivo* baja pero muy útil con métodos de tamizaje (Cordero et al. 2014, pp. 100-106).

La viabilidad celular demuestra la cantidad de células sanas en una muestra y para realizar esta determinación existen varios métodos como el azul de tripano, métodos de resazurina, reducción de sales de tetrazolio; estos métodos reflejan la viabilidad celular simplemente por la actividad metabólica que es capaz de estimarse cuantitativamente mediante la adición de sales de tetrazolio a las células (Yin et al. 2012, pp. 68-72).

Para los ensayos anti-inflamatorio y citotóxico se utilizó el WST-1, el cual se reduce a formazan que tiene un rango lineal más amplio y una mayor sensibilidad.

El área de salud en la actualidad tiene varios puntos por resolver, los cuales son padecimientos que afectan a la población a menudo y los pocos estudios realizados no han aportado satisfactoriamente a identificar nuevos fármacos que ayuden a sobrellevar en este caso problemas de inflamación.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El Ecuador presenta una gran variedad de especies con poderes curativos, pero en especial la actividad anti-inflamatoria no se evidencia normalmente en cualquier planta; por lo cual *Gnaphalium americanum* Mill es utilizada en la Región Sierra, donde es conocida por sus inmensos conocimientos etnobotánicos, la han utilizado con excelentes resultados por sus propiedades anti-inflamatorias, conocimientos que no han sido difundidos al resto del país y del mundo y que la presente investigación procura dar a conocer las bondades de este principio activo. La evaluación anti-inflamatoria en productos naturales ha tenido un importante interés científico y farmacológico últimamente, con la finalidad de encontrar compuestos que cumplan su meta terapéutica y que no interfieran en el desarrollo de otras enfermedades en el paciente, brindando en varios casos ventajas ante los medicamentos comercializados.

Los anti-inflamatorios más utilizados son los AINEs, los cuales presentan efectos adversos a nivel gastrointestinal, razón por la cual se intenta dar una nueva alternativa para este padecimiento y

poder reemplazar a estos fármacos que son prescritos a diario en casas de salud e incluso varios de ellos son medicamentos de venta libre.

A través de nuestra propuesta contribuimos al Plan Nacional del Buen Vivir, Objetivo tres Mejorar la calidad de vida de la población, Políticas y Lineamientos Estratégicos: promover el mejoramiento de la calidad en la prestación de servicios de atención que componen el Sistema Nacional de Inclusión y Equidad social.

El impacto que se pretende es por el momento de corto plazo, que sería la evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica, pero queda de base para futuras investigaciones en las que se pueda aplicar el principio en la elaboración de nuevos medicamentos con actividad anti-inflamatoria.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Gnaphalium americanum* Mill.

Objetivos Específicos

- Determinar los metabolitos secundarios presentes en la parte aérea de *G. americanum* mediante tamizaje fitoquímico.
- Establecer cuantitativamente mediante ensayos colorimétricos, la presencia de grupos fenoles y flavonoides en el extracto de *G. americanum*.
- Evaluar el efecto anti-inflamatorio del extracto *G. americanum* a diferentes concentraciones, frente a un estándar (ASA), midiendo el grado de inhibición de la producción de ROS de neutrófilos aislados.
- Evaluar la actividad citotóxica de *G. americanum* por el método de viabilidad celular, observando la reducción de la sal de tetrazolio WST-1 a formazán.
- Evidenciar la actividad antioxidante del extracto de *G. americanum* a través del método de captación del radical libre DPPH[•].

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Género *Gamochaeta* Weddel

Weddel en su obra “Chloris Andina” en 1856, instauró el género *Gamochaeta* para ordenar las especies de *Gnaphalium* que tienen como características cerdas del pápus unidas en un anillo o también llamado conjunto de pelos simples o escamas que rodean las flores. Posteriormente, en 1961 Cabrera identificó a *Gamochaeta* estadounidense como representante del género, ya que es una de las especies con más amplia distribución geográfica y fue la primera en ser citada por Weddel (Deble y Marchiori 2014, p.21).

Bentham en 1873 en su obra “Genera Plantarum” cambió *Gamochaeta* al sub-género *Gnaphalium*. En el siglo XIX y parte del siglo XX todos los autores siguieron esta propuesta. Baker en 1882 en su obra “Flora Brasiliensis” reconoció a *Gnaphalium purpureum* como la única especie del subgénero *Gamochaeta* (Deble y Marchiori 2014, p.21).

Cabrera en 1961 en un estudio sobre las Gnaphalineae de América del Sur, restableció *Gamochaeta* reconociendo especies nuevas para la ciencia como son: *G argentina*, *G deserticola*, *G neuquensis* y *G rizzinii*; y en total conforman treinta y dos especies. Los siguientes autores en este ámbito de la ciencia (Drury, 1970, 1971; Merxmüller, 1977; Hilliard & Burt, 1981), volvieron a reducir *Gamochaeta* a subgénero de *Gnaphalium* (Deble y Marchiori 2014, p.21).

La especie *Gnaphalium oxyphyllum* una de las plantas principales reportadas en México como Hipoglicemiantes, se tiene como información fotoquímica la obtención de Diterpenos y Flavonoides. Pertenece a la familia Asteraceae una de las más comúnmente mencionadas en este país y en el cual se encontraron 47 especies de plantas antidiabéticas (Andrade-Cetto y Heinrich 2005, pp. 325-348).

1.2 *Gnaphalium americanum* Mill.

TAMBIÉN CITADA COMO: *Gamochaeta americana* Wedd.

HÁBITO: Hierba terrestre.

ORIGEN: Nativa

NOMBRES COMUNES: Lancetilla, lechuguilla, rabo de danta (castellano)

ETNIAS: Kichwa de la Sierra, -mestiza (Aguirre, Yaguana Moreno, 2014, pp.20-22)

Los extractos de *Gnaphalium oxyphyllum* DC. y *Gnaphalium americanum* Mill. poseen una fuerte actividad antimicrobiana contra patógenos probados y se encuentran dentro de los dieciocho

extractos crudos de seis diferentes especies de plantas utilizadas en medicina tradicional mexicana para el tratamiento de infecciones respiratorias y fueron evaluados por actividad antimicrobiana potencial contra *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans* (Rojas et al. 2001, pp. 97-101).

G. americanum posee actividad probada contra *C. albicans* al mostrar un gran poder antimicrobiano ante esta levadura; por tener cloroformo en su extracto. También demostró buena actividad contra bacterias Gram-positivos como son *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. En la literatura no se han hallado datos e información acerca de la actividad antimicrobiana ni de la composición química de estas especies. Ciertas especies de *Gnaphalium* como: *G. americanum*, *Gnaphalium gracile*, *G. oxyphyllum* y *Gnaphalium robustum*; tienen estudios de actividad antimicrobiana e identificaron grupos metoxi flavonas como componentes antimicrobianos. *Gnaphalium oxyphyllum* y *Gnaphalium americanum* son, Asteraceae reconocidas por tener lactonas sesquiterpénicas, varias lactonas son considerados antimicrobianos que actúan básicamente en Gram-positivas (Rojas et al. 2001, pp. 97-101).

Tabla 1-1: Actividad antimicrobiana de extractos crudos.

Botanical species	Plant part tested ^a	Extract ^b	Extract yield (%) ^c	Antimicrobial activity MIC (mg/ml)					
				<i>S.a.</i>	<i>S.p.</i>	<i>S.p.y.</i>	<i>S.f.</i>	<i>E.c.</i>	<i>C.a.</i> ^d
<i>B. glabra</i>	F	H	2.10	>5	2.5	>5	>5	>5	>5
		C	1.96	>5	>5	>5	>5	>5	
		M	3.24	>5	5	5	>5	>5	
<i>C. alata</i>	Fr	H	1.05	5	2.5	5	5	>5	>5
		C	1.40	2.5	1.2	1.2	5	>5	5
		M	2.94	>5	5	5	>5	>5	
<i>C. lythrifolia</i>	AP	H	2.5	>5	2.5	>5	>5	>5	>5
		C	3.16	>5	>5	>5	>5	>5	
		M	2.28	>5	2.5	1.2	>5	>5	
<i>G. americanum</i>	AP	H	2.31	>5	2.5	>5	>5	>5	>5
		C	6.88	5	1.2	1.2	5	>5	5
		M	3.45	>5	2.5	2.5	>5	>5	
<i>G. hirsutum</i>	L	H	2.22	2.5	1.2	2.5	>5	>5	>5
		C	3.21	5	2.5	2.5	>5	>5	
		M	2.33	>5	2.5	2.5	>5	>5	
<i>G. oxyphyllum</i>	AP	H	1.76	2.5	2.5	>5	>5	>5	>5
		C	5.64	2.5	2.5	2.5	5	>5	5
		M	2.54	5	1.2	2.5	>5	2.5	>5
Gentamicin				0.005	0.005	0.005	0.010	0.010	NT
Nystatin				NT	NT	NT	NT	NT	0.010

^a Plant part tested: AP, aerial parts; F, flower; Fr, fruits; L, leaves.
^b Extract: H, hexanic; C, chloroformic; M, methanolic.
^c Dry residue of the extract in terms of dry starting material.
^d Bacterial species: *S.a.*, *Staphylococcus aureus*; *S.p.*, *Streptococcus pneumoniae*; *S.p.y.*, *Streptococcus pyogenes*; *S.f.*, *Enterococcus faecalis*; *E.c.*, *Escherichia coli*; *C.a.*, *Candida albicans*.

Fuente: Rojas et al., 2001

1.2.1 Descripción botánica

Basiónimo: *Gnaphalium americanum*

Distribución & Hábitat: Estados Unidos, México, América Central, Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay, desde el nivel del mar hasta 3.000 msnm. Florece y fructifica en primavera-verano (De la torre L. et al, 2008, pp. 150-155).

Especie muy característica, por las hojas discoloras, las basales en roseta y las caulinares reducidas, por la capitulencia en pseudoespigas compactas, terminales, y las brácteas de las intervenciones agudas (De la torre L. et al, 2008, pp. 150-155).



Figura 1-1: *Gnaphalium americanum* Mill

Fuente: Trópicos. 2018

1.2.2 Clasificación Taxonómica

Tabla 2-1: Clasificación Taxonómica de *Gnaphalium americanum* Mill

Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden:	Asteranae Takht.
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae Bercht. & J. Presl
Género:	<i>Gnaphalium</i> L.
Especie:	<i>Gnaphalium americanum</i> Mill

Fuente: Trópicos. 2018

Realizado: Jenny Lazo, 2018

1.2.3 Usos Medicinales

La planta se usa para tratar afecciones indeterminadas (Mestiza-Morona Santiago). La savia se toma, con un endulzante y huevos, para tratar la gripe y la diarrea (Kichwa de la Sierra-Loja). Se usa para tratar heridas (Kichwa de la Sierra, Etnia no especificada-Cotopaxi) (Aguirre, Yaguana and Moreno, 2014, pp.20-22).

Tiene actividad antimicrobiana contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*; se estudió dieciocho extractos de seis diferentes especies de las cuales *Gnaphalium americanum* Mill y *Gnaphalium oxyphyllum* demostraron tener una fuerte acción antimicrobiana contra estos patógenos (Martinez et al. 2008, pp. 445-516).

En este estudio se realizaron decocciones utilizadas por los habitantes de la Amazonía peruana para combatir infecciones, con cuatro plantas diferentes evaluando la acción antimicrobiana por el método en placas de agar (Martinez et al. 2008, pp. 445-516).

Demostrando así que a pesar de que la medicina sintética ha tenido muchos avances, la materia vegetal sigue siendo fundamental en la terapéutica, comprendiendo aproximadamente el 25% de medicina recetada; incluso en varias partes del mundo las sustancias naturales son primordiales para combatir enfermedades infecciosas, como son los agentes antimicrobianos que ante la resistencia a los antibióticos es necesario ir descubriendo nuevas alternativas derivadas de plantas (Martinez et al. 2008, pp. 445-516).

Gnaphalium americanum Mill o con su sinónimo *Gnaphalium purpureum* L. en su parte aérea con sus extractos de metanol, cloroformo y hexano tiene una concentración inhibitoria de (5.0; 1.2-2.5) mg/ml; en cepas bacterianas probadas (Sharma et al. 2016, pp. 264-329).

1.3 Metabolitos secundarios

Estos compuestos a diferencia de los metabolitos primarios, difieren de acuerdo a las especies y se los denomina metabolitos secundarios porque no todas las plantas los tienen y el papel que cumplen en el funcionamiento de las plantas no es esencial y en varios casos no se les ha hallado una función determinada (Vilela, González-Paleo y Ravetta, 2011, pp. 317-327).

Las plantas son productoras de un sinnúmero de metabolitos secundarios que son aprovechados por varias industrias como: farmacéutica, cosméticos, alimenticia. Gracias a plantas superiores cada año se descubren alrededor de 1600 nuevas estructuras químicas cada año; por lo cual es necesario el uso de nuevas tecnologías para analizar los nuevos compuestos. El costo de la medicina natural ha limitado un poco las investigaciones y la explotación en masa ha puesto en peligro de extinción a varias especies naturales (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011, pp. 195-211).

1.3.1 Clasificación

Los metabolitos secundarios provienen del metabolismo primario y tiene funciones importantes y varias en las plantas; estos cumplen una función ecológica en las plantas a manera de defensa contra microorganismos, animales y ciertas sustancias alelopáticas. Los alcaloides cumplen una función fisiológica, pectinas sirven para almacenar compuestos y transportar nitrógeno tóxico, los flavonoides protegen a la planta de las radiaciones UV, también son utilizados sus principios activos en la elaboración de medicamentos y productos de origen químico (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011, pp. 195-211).

En los compuestos de interés comercial hay tres grupos según las rutas biosintéticas por las que atraviesan:

1. Terpenos: Glicósidos cardiotónicos, carotenos, taxol, aceites esenciales, resinas.
2. Compuestos fenólicos: Flavonoides, ácidos fenólicos, polifenoles, antocianidinas, taninos, cumarinas, flavonas, lignanos, charconas. Aplicaciones terapéuticas como antitumorales, analgésicos, inmunoestimulantes, antibacterianos etc.
3. Compuestos nitrogenados: Glucósidos cianogénicos, alcaloides (Pérez-Alonso y Jiménez 2011, pp. 195-211).

Se los puede distinguir en un mismo grupo su estructura por modificaciones químicas básicas, dadas por reacciones químicas como: metilación, glucosilación, hidroxilación, epoxidación, malonilación; dando como resultado varios perfiles metabólicos, y como resultado un mecanismo de defensa y adaptación de las plantas (Sepúlveda-jiménez 2003, pp. 355-363).

Las plantas medicinales debido a su composición química han contribuido a curar muchas enfermedades a nivel mundial por lo cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) registra 119 sustancias químicas que corresponden a 60 familias, al ser las plantas una excelente alternativa para reemplazar a los antibióticos debido a la resistencia que se ha ido incrementando (Más Toro et al. 2017, pp. 1-9).

1.3.1.1 Alcaloides

Contienen nitrógeno y son compuestos cíclicos y son considerados de gran importancia a nivel comercial, como: nicotina, cafeína, morfina, bromelina; se han encontrado más de 1200 alcaloides y alrededor del 20% de las plantas contienen alcaloides. Se lo encuentra en lugares áridos y en regiones tropicales. Son muy utilizados como antiparasitarios, antidepresivos, antitusivos, analgésicos, relajantes musculares (Vilela, González-Paleo y Ravetta 2011, pp. 317-327).

1.3.1.2 Fenoles

En su estructura tienen un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Se sintetizan a partir de dos rutas: ácido malónico y la ruta del ácido shiquímico, siendo la última ruta la responsable de la

presencia de una gran cantidad de compuestos fenólicos en las plantas (Ávalos y Elena 2009, pp.119-145).

Como estructura representativa tenemos al ácido benzoico y cambiando de sustituyentes tenemos compuestos como: ácido cinámico, cumárico, ferúlico, cafeico. Otorgando así cualidades antivirales, fungicidas, bactericidas y antitumorales (Stewart et al. 2014, pp. 61-104).

Se han identificado cerca de 8000 fenoles y en la industria farmacéutica se los utiliza como anti-inflamatorios, analgésicos y antioxidantes (Vilela, González-Paleo y Ravetta 2011, pp.317-327).

Los componentes fenólicos ayudan a secuestrar radicales libres y esto es gracias con la molécula del grupo hidroxilo presenta en su estructura (Valenzuela et al. 2014, pp. 19-24).

1.3.1.3 Flavonoides

Actúa como protector de la radiación UV junto con los taninos, lignina y cumarinas, haciendo menor el efecto dañino de las radiaciones ultravioleta que afectan al crecimiento y en el proceso de fotosíntesis, la acumulación de metabolitos secundarios está relacionada con la radiación UV (Vilela, González-Paleo y Ravetta 2011, pp. 317-327).

Estos compuestos disminuyen la peroxidación lipídica y la formación de radicales libres, existen indicadores en Francia donde el consumo de vino a marcado la diferencia en la reducción de enfermedades cardiovasculares, el vino tinto presenta en su composición química flavonoides y polifenoles (Stewart et al. 2014, pp. 61-104).

Se dividen de acuerdo al grado de oxidación del puente de carbonos, tenemos: isoflavonas, antocianidinas, flavonoles, flavonas (Vilela, González-Paleo y Ravetta 2011, pp. 317-327).

Estos compuestos poseen características: citotóxicas, antibacterianas, anticancerígenas, antifúngicas, antioxidantes, anti-inflamatorias y antiprotozoarias, esto lo realizan gracias a su conformación estructural de dos sistemas aromáticos: benzoílo y cinamoílo, los cuales tienen lugares en los que se pueden realizar sustituciones como -OH, OCH₃, CH₃COO-, O-Gli, éstas actúan conjuntamente para atacar a la membrana celular, nuclear y generar acoplamiento con el ADN y otras actividades evitan el daño del tipo viral, microbios y cancerígenos (Gil, Gómez y Trejos 2009, pp. 93-101).

Los flavonoides tienen la cualidad de unirse a proteínas y macromoléculas como ácidos nucleicos, hormonas, y iones metálicos. Se han descubierto que tienen acción terapéutica contra enfermedades como infecciones virales y bacterianas, cáncer, úlcera estomacal y la participación en procesos inflamatorios (Ballester 2006, pp. 23-26).

1.3.1.4 Triterpenos

En su estructura contienen 30 carbonos, se sintetizan de los metabolitos primarios a través de la ruta del ácido mevalónico o por la ruta del metileritritol fosfato. Son importantes a nivel comercial

para elaborar fragancias, perfumes o en productos de uso agrícola. En el área de la salud son importantes para elaborar productos: antiulcerosos, antimicrobianos, anticancerosos, etc. (Ávalos y Elena 2009, pp. 119-145).

Tenemos a los esteroides y esteroides, los esteroides vegetales se los llama esteroides y entre los más abundantes tenemos el sitosterol y estigmasterol. Los esteroides su función principal es ayudar en la estabilidad y viscosidad en la membrana de las plantas (Ávalos y Elena 2009, pp. 119-145).

1.3.1.5 Saponinas

Son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los Glicósidos, se presentan como glicósidos esteroideos que presentan en sus estructuras una o más moléculas de azúcar. Las propiedades detergentes o surfactantes que tienen las saponinas son debido a la adición de un azúcar (grupo hidrofílico) a un glicósido triterpénico hidrofóbico (Ávalos y Elena 2009, pp. 119-145).

1.4 La Inflamación

Inflamación del latín *inflamatio* que significa “encender” o “Hacer fuego”. En la inflamación se dan modificaciones de los vasos sanguíneos y del tejido conjuntivo, que podrían modificar el equilibrio del organismo y cuya función es aislar el agente dañino y al finalizar el proceso se da la reparación del tejido afectado (Valencia y Áncer 2011, pp. 48-64).

La inflamación es un proceso normal del organismo, en el cual nuestro sistema inmunitario reacciona ante daños químicos, físicos y patógenos. En la inflamación aguda, el organismo da una respuesta espontánea, pero se puede transformar en crónica en varios casos: procesos fisiológicos, deficiencias de vitaminas o antioxidantes. Las investigaciones actuales en el campo de la medicina se enfatizan en el estudio del sistema inmune puesto que es la característica de la inflamación crónica. Por lo cual la farmacoterapia busca mejorar los tratamientos disminuyendo efectos secundarios (Muszyńska et al. 2017, pp. 373-381).

Durante la inflamación se pueden presentar síntomas como fiebre, sonrojo, malestar, hinchazón y ciertos trastornos funcionales. Cuando no se logra controlar la inflamación y ésta dura más de lo normal puede ocasionar daños más graves como colitis, inflamación vascular y cutánea, artritis, síndrome metabólico, cáncer. Existe un tratamiento contra la inflamación que es a base de enzimas que en su mecanismo catalítico muy eficiente se tiene como resultado una baja toxicidad en comparación con la farmacoterapia. En la historia de la medicina tiene las enzimas anti-inflamatoria ha tenido buena acogida para dolencias como: sinusitis, artritis, edemas, traumas, etc. (Yang et al. 2017, pp. 268-277).

Alteraciones de la insulina pueden ocasionar un bajo grado de inflamación y encontrarse relacionada la obesidad con la subida de los marcadores de inflamación vasculares, el tejido

adiposo es capaz de producir productos proinflamatorios como el TNF- α e IL-6 y también produce un producto anti-inflamatorio como es la adinopectina que corresponde al 0,01% de proteínas plasmáticas; la cual podría ayudar a la prevención de la resistencia a la insulina, tener propiedades anti-inflamatorias e incluso combatir la arterioesclerosis. La adinopectina en estudios se ha demostrado que inhibe la fagocitosis y la obtención de TNF- α de los macrófagos, hechos que aportan a la acción anti-inflamatoria (Recasens, Ricart y Fernández-Real 2004, pp. 49-54).

1.4.1 Fases de la Inflamación

Se divide en varias fases dependiendo de la profundidad y del tipo de agente que la produce, estos pueden ser agentes: químicos, físicos o biológicos. Estas fases tienen como finalidad producir un aumento en el flujo sanguíneo en las zonas afectadas y que se desencadenen células inflamatorias, entre estas fases tenemos:

- a) Cambios vasculares
- b) Cambios celulares
- c) Activación y función de los leucocitos (Valencia y Áncer 2011, pp. 48-64).

1.4.1.1 Cambios vasculares

El objetivo de esta fase es optimizar el transporte de los leucocitos al sitio de la lesión, empezando por una dilatación capilar y arteriolar para luego darse un espasmo con una duración de 3 a 5 s, al producir este paso se evidencia el eritema y el calor en la lesión, aquí actúan la histamina y el ácido nítrico como mediadores químicos, produciendo un trasudado que es la salida de líquidos y moléculas de bajo peso ocasionadas por un aumento de la presión hidrostática; esto da como consecuencia una estasis que es la acumulación de eritrocitos, trasladando a los leucocitos a la periferia, donde las vénulas localizadas en el endotelio se contraen llevando a la salida de los leucocitos (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.1.2 Cambios celulares

Estos se dan desde el traslado o salida de los leucocitos hasta el tejido, lo cual se da en los siguientes pasos: a) Marginación, los eritrocitos se concentran en el centro de los vasos a lo que se denomina estasis, por lo cual los leucocitos salen; b) Rodadura, es la agregación de células nucleadas al leucocito; c) Adhesión, los leucocitos se unen al endotelio gracias a moléculas de adhesión vascular como son inmunoglobulinas I-CAM-1 y VCAM-1 que se unen por integrinas que son glucoproteínas, la afinidad entre moléculas está dado por citocinas; d) Transmigración, es el traslado de leucocitos por las células endoteliales; e) Quimiotaxis, son los mediadores químicos que guían a las células (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

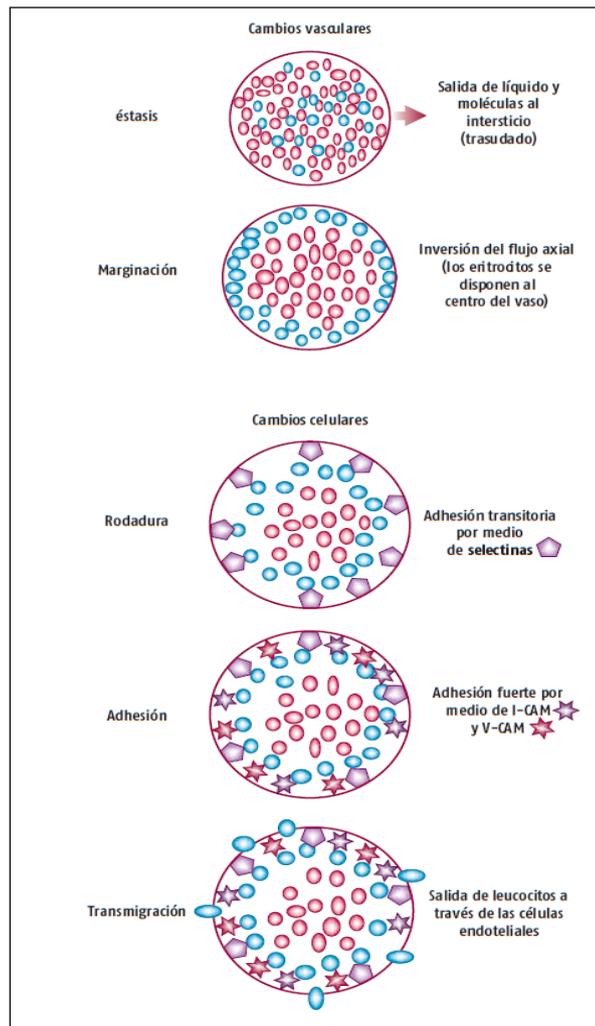


Figura 2-2: Cambios celulares y vasculares de la inflamación

Fuente: (Valencia y Áncer 2011).

1.4.1.3 Activación y función de los leucocitos

La activación inicia al reconocer los receptores a los microorganismos y a los complejos inmunes como la manosa que forman parte de los microorganismos, receptores de opsoninas, receptores TLR y lectinas, RNA de algunos virus. Al ser activados los leucocitos originan citocinas que amplifican la respuesta inmune o también pueden producir factores citotóxicos, identifican al agente extraño para que sea fagocitado (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.2 Mediadores químicos de la inflamación

Estas sustancias participan en todo el proceso inflamatorio, tiene origen en la sangre circulante del tejido afectado y entre los más importantes tenemos:

1.4.2.1 Ácido araquidónico (AA)

Es un ácido graso poliinsaturado, derivado del ácido linoleico y se lo encuentra en la dieta o al incorporar fosfatidilcolina. Hay hormonas producto del metabolismo de este ácido como son los leucotrienos y las prostaglandinas. Puede ser metabolizado por dos vías: las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y los tromboxanos (TXA2) y como segunda vía están las lipoxigenasas las cuales convierten al AA en leucotrienos y lipoxinas (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.2.2 Histamina y Serotonina

Son aminas vasoactivas. La histamina dilata las arteriolas e incrementa la permeabilidad de las vénulas y participa en el incremento de la permeabilidad vascular. La serotonina la encontramos en las plaquetas y en algunas células neuroendocrinas (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.2.3 Sistema del complemento

Son veinte proteasas inactivas que se encuentran en el plasma que al activarse se obtienen enzimas proteolíticas que ayudan a la degradación de otras proteínas. Se inicia con el C1q, C3a, C5a, C4a (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.2.4 Coagulación

Al darse la inflamación se incrementan varios factores que participan en el proceso de coagulación como la trombina que ayuda a la inflamación al activar receptores PAR (receptores de actividad proteasa). Entre los mediadores más importantes en la inflamación in vivo están trombina, bradiquinina, C3a, C5a (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.2.5 Citocinas

Son proteínas que permiten el intercambio celular en el proceso de inflamación, respuesta inmune y en la hematopoyesis. La información emitida por una citocina va a ser captada solo por el receptor propio de ésta. Tenemos: factores del crecimiento, familia del TNF, quimiocinas, IL-1, TNF- α . Entre los mensajes importantes emitidos por estas proteínas están la estimulación de los linfocitos T (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

Tabla 3-1 Efecto de los mediadores químicos de la inflamación

Mediador	Origen	Efecto
Prostaglandinas	Mastocitos y fosfolípidos	Vasodilatación, dolor y fiebre
Óxido nítrico	Endotelio, macrófagos	Vasodilatación, citotóxico
Histamina y serotonina	Mastocitos y plaquetas	Vasodilatación
Bradicinina	Proteínas plasmáticas	Aumento de la permeabilidad vascular
Leucotrienos C4, D4, E4	Leucocitos, mastocitos	Vasoconstricción y broncoconstricción
Leucotrieno B4	Leucocitos	Activación leucocitaria
C5a	Macrófago	Activación y adhesión leucocitaria, quimiotaxis
C3a	Proteína plasmática	Opsonina
Quimiocinas (citocinas)	Leucocitos	Activación leucocitaria
IL-1 y FNT	Macrófagos	Activación endotelial
Metabolitos del oxígeno	Leucocitos	Daño tisular y endotelial

Fuente: Valencia y Áncer 2011

1.4.3 Mediadores celulares de la inflamación

1.4.3.1 Neutrófilos

Son las primeras células en llegar al lugar de la inflamación, es el leucocito que el ser humano tiene en mayor cantidad. Su periodo de vida dura de horas a varios días. Realizar la fagocitosis es su principal función en el organismo. Los neutrófilos activan la fosfolipasa C y desencadena una serie de reacciones que incluyen el IP3 (inositol trifosfato), IL-8, selectina-E, lisozimas, lactoferrina, colagenasa, fosfatasa alcalina, histamina. Los neutrófilos mueren una vez cumplida su función al eliminar microorganismos con la consecuente formación de pus por la acumulación de leucocitos, líquido extracelular y células muertas (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.3.2 Eosinófilos

Son células fagocitarias con afinidad a los complejos antígeno-anticuerpo, especialmente IGE de alta y baja afinidad, IgG e IgA. Los eosinófilos neutralizan la histamina para dar lugar a la reacción de la respuesta alérgica de hipersensibilidad y defienden contra parásitos gracias a sus receptores IgA (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.3.3 Mastocitos

Se originan en la médula ósea y ayudan en la respuesta frente a alergias, sintetizan y almacenan histamina y otras sustancias (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.3.4 Macrófagos

Participan en todas las fases de la inflamación, fagocitar es su función principal, sin embargo, son varias las acciones en el proceso de inflamación y en la respuesta inmune. Son los encargados de la presentación de antígenos a los linfocitos T colaboradores, esto gracias a que poseen en sus

membranas MHC (moléculas del complejo principal de histocompatibilidad) (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.3.5 Linfocitos

Hay de dos tipos: recepta las señales del timo (células T) y originarias del hígado, bazo y médula ósea (células B). Tienen varias funciones como: citotoxicidad, cooperación, producción de linfocinas que modula la respuesta inflamatoria (Valencia y Áncer 2011, pp.48-64).

1.4.3 Medicamentos Anti-inflamatorios

En el mundo aproximadamente 30 millones de personas consumen medicamentos AINE (medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos), la eficacia de estos medicamentos no está en duda sin embargo los efectos adversos son muy drásticos como: daño gastrointestinal, renal y hepático e incluso en el tejido cardiovascular (Bjarnason et al. 2018, pp. 500-514).

El más alarmante es el daño gastrointestinal ya que éste se presenta como úlcera gastroduodenal, daño en el intestino delgado y estómago; pudiendo desencadenar en perforaciones, estenosis y sangrado. En la mucosa pueden dañar las prostaglandinas por inhibición de la COX-1. Los daños producidos en el estómago pueden ser aumento del ácido gástrico, cambios en la mucosa (Bjarnason et al. 2018, pp. 500-514).

Los mecanismos por los que actúan los AINE son inhibiendo las COX1 y COX2, esto se da por las propiedades tanto químicas como físicas que tienen estos medicamentos al ser ácidos débiles que se solubilizan en lípidos (Bjarnason et al. 2018, pp. 500-514).

Al inhibir las COX-1 se está estimulando las reacciones adversas como son daños gastrointestinales y renales. Al contrario, al inhibir la COX-2 es fundamental para las respuestas terapéuticas de los AINE. El mecanismo COX actúa produciendo prostaglandinas inhibiendo COX y así producir analgesia (Terzi et al. 2017, pp. 12-24).

Al producir prostaglandinas disminuyen la liberación de la enzima lisosomal, inhibiendo la activación del complemento, aumentando quinasas plasmáticas y la supresión de la actividad de la cinasa en plasma, inhibiendo la lipoxigenasa, reduciendo la síntesis de leucotrienos y la supresión de las funciones y la proliferación de células inflamatorias (Terzi et al. 2017, pp. 12-24).

Las prostaglandinas son importantes al participar como mediadores fisiológicos y patológicos en el tratamiento de inflamación, cáncer, dolor, pirexia, enfermedades neurológicas. Como principal fuente de ácido araquidónico tenemos a los fosfolípidos en la membrana celular. Los esteroides tienen excelentes efectos analgésicos y anti-inflamatorios al inhibir la fosfolipasa A2 (Terzi et al. 2017, pp. 12-24).

Los endoperóxidos vienen a ser prostaglandinas como prostaciclina y tromboxanos (PGE2, PGI1, TxA2) y estos tienen un papel importante en la fiebre, dolor, coagulación, metabolismo

óseo, ovulación, mucosa gástrica, crecimiento, funciones renales, curación de heridas, nervios, aumento de tono de los vasos sanguíneos (Terzi et al. 2017, pp. 12-24).

Los AINE ejercen su efecto anti-inflamatorio, analgésico y antipirético al bloquear la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la actividad COX, reducen la fiebre al inhibir la PGE2, analgesia al inhibir PGE2 y PGI2, reducen el edema disminuyendo vasodilatación al inhibir PGE2 y PGI2 (Terzi et al. 2017, pp. 12-24).

Las diferencias en la composición de los AINE no son un buen indicador de la toxicidad que presentan estos medicamentos en caso de una sobredosis. Casi todos los medicamentos incluidos los selectivos de la COX-2, son altamente nefróticos si se llegara a dar una sobredosis (Sandilands y Bateman, 2015, p. 185).

En cuanto al mecanismo de acción como ya se ha señalado, actúan interfiriendo en las enzimas COX que son responsables de la producción de prostaglandinas que reaccionan en los procesos de inflamación. En caso de una sobredosis puede darse una hemorragia gastrointestinal y el daño renal puede darse en cualquier momento (Sandilands y Bateman, 2015, p. 185).

Entre los AINE más utilizados están el ibuprofeno y el diclofenaco, siendo este último el más utilizado a nivel mundial. El uso de estos medicamentos ha aumentado en personas mayores de 65 años, del 10-40% (Terzi et al. 2017, pp. 12-24).

1.5 Antioxidantes

Los radicales libres tienen en su estructura uno o más electrones desapareados en su orbital externo, por lo cual son altamente reactivos. En el ser humano se producen radicales libres en la cadena respiratoria mitocondrial, en la unión de la vitamina C con el ion ferroso, etc. (Guija et al. 2015, pp. 1-4).

Nuestro organismo tiene métodos que ayudan a eliminar radicales libres como el sistema de defensa antioxidante que utiliza sustancias de naturaleza enzimática como la catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa etc., y no enzimática como ferritina, antocianidinas, polifenoles, etc (Guija et al. 2015, pp. 1-4).

Sin embargo, no es suficiente las acciones del organismo, por lo cual se han desarrollado métodos antioxidantes como la técnica con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), el cual reacciona con compuestos antioxidantes cediéndole un átomo de hidrógeno (Guija et al. 2015, pp. 1-4).

La reacción antioxidante es representada de la siguiente manera:



De acuerdo a las condiciones de ensayo a las que se someta el análisis, se tiene la siguiente ecuación:

$$\frac{d[\text{DPPH}^{\cdot}]}{dt} = k_{\text{obs}} [\text{DPPH}^{\cdot}]_t$$

La técnica del DPPH se la utiliza desde hace ya cincuenta años, para evaluar la concentración de compuestos antioxidantes, sin embargo se ha observado que no se utiliza una concentración equitativa del DPPH, por esta razón los datos no son precisos, y los resultados son expresados por el IC50, que indica la concentración del extracto a analizar que genera una inhibición del 50% del DPPH (Guija et al. 2015, pp. 1-4).

Los resultados arrojados por el IC50 dependen de la concentración del DPPH y de la naturaleza de la muestra a analizar, en los resultados se observa que al incrementar la concentración del DPPH de igual manera se incrementa el IC50 (Guija et al. 2015, pp. 1-4).

En los antioxidantes encontramos a los polifenoles cuya función principal es actuar como antioxidantes y están asociados a la prevención y cura de enfermedades degenerativas como el cáncer y cardiovasculares entre otras (Vilela, González-Paleo y Ravetta 2011, pp. 317-327).

Los radicales libres actúan en los componentes celulares favoreciendo la oxidación, ocasionando el envejecimiento celular y varias enfermedades. Aquí actúan principalmente los compuestos fenólicos donando electrones que neutralizan las especies de oxígeno reactivas, también pueden quelar elementos como Cu, Fe para evitar que formen oxígeno reactivo; los compuestos fenólicos pueden actuar también en el sistema enzimático inhibiendo enzimas como la ciclooxigenasa, NADH oxigenasa, lipoxigenasa, microsomal monooxigenasa, glutatión transferasa; enzimas que intervienen en procesos de inflamación (Muszyńska et al. 2017, pp. 373-381).

1.6 Citotoxicidad

La determinación de citotoxicidad se realiza a través de ensayos *in vitro*, que son reconocidos a nivel internacional, son accesibles, rápidos; evitando el uso de animales y abriendo una puerta a estudios moleculares (Cordero et al. 2014, pp. 100-106).

La citotoxicidad celular es considerada como una proliferación celular, es una modificación de las actividades celulares básicas, provocando un daño a nivel celular y esto puede ser determinado por las diferentes pruebas *in vitro*, para lo cual se pueden utilizar métodos como líneas celulares, cultivo de órganos aislados y cultivos primarios; para determinar cuáles son los efectos que alteran la estructura o las propiedades de la célula (Favela Hernández J. 2012, pp. 5-6).

El ensayo *in vitro* se lo conoce desde 1950, al anunciar la actividad *in vivo* de un agente neoplásico, esto fue una prueba clonogénica utilizada por primera vez para este fin. Al pasar el tiempo la metodología se ha ido modificando hasta llegar a la viabilidad celular y al metabolismo celular. Estos métodos tienen una respuesta baja *in vivo* en comparación con una terapia quimioterapéutica, pero indicaron ser muy útiles en métodos de tamizaje (Cordero et al. 2014, pp. 100-106).

En un estudio se avalúa la actividad potencial para combatir el cáncer de varios extractos, al evaluar la citotoxicidad en líneas celulares que se derivan de sólidos tumores humanos, utilizando el método colorimétrico de reducción MTT (metil tiazol tetrazolio) y también la fijación de la Sulforodamina B (Cordero et al. 2014, pp. 100-106).

Como un método alternativo de estudios de citotoxicidad *in vitro* se dio con el cultivo de embriones, con este método se pudo reproducir los ensayos de acuerdo a los requerimientos deseados. Observando una gran sensibilidad de los embriones a los agentes de toxicidad empleados (Osorio et al. 2004, pp. 31-35).

La Food & Drug Administration de Estados Unidos (FDA 1995) considera al estudio de embriones en animales como metodología llamada *One cell test*. El estudio de toxicidad se lo realiza al cuantificar los embriones que llegan a los estadios de mórula y blastocitos y se evalúa las alteraciones embrionarias que se puedan producir; y si la planta tiene una toxicidad considerable no se va a desarrollar el embrión a otros estados celulares a parte de los ya mencionados, al ser aplicadas las concentraciones del extracto a analizar la toxicidad (Osorio et al. 2004, pp. 31-35).

Otro ensayo de citotoxicidad se realizó con la línea celular VERO (células de riñón de mono verde: *Cercopithecus aethiops*), se realiza todo el protocolo y se deja incubar por 48 horas para realizar el conteo de células viables con azul de Tripan, determinando la concentración citotóxica media (CC₅₀), la cual reduce al 50% el número de células viables (Gil, Gómez y Trejos 2009, pp. 31-35).

1.7 Viabilidad celular

El estudio de viabilidad celular demuestra la cantidad de células sanas en una muestra. Hay varios métodos con esta finalidad: azul tripano ensayo de exclusión es el método más antiguo para estudiar la viabilidad celular y es muy simple en sus procesos y reactivos, métodos de resazurina (azul de alamar) que se pueden medir por colorimetría o fluorimetría, reducción de sales de tetrazolio que refleja la viabilidad celular simplemente por la actividad metabólica que es capaz de estimarse cuantitativamente mediante la adición de sales de tetrazolio a las células, etc. (Yin et al. 2012, pp. 31-35).

Métodos colorimétricos que actualmente se utilizan como el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio), XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-carboxanilida-2H-tetrazolio, monosodiosal), MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil) -2H-tetrazolio, sal interna), WST-1 (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica), etc. (Yin et al. 2012, pp. 31-35).

El ensayo MTT es una de las formas más comúnmente utilizadas para detectar el nivel de metabolismo celular, que produce un color intenso sobre la reducción celular (Yin et al. 2012, pp. 31-35).

El reactivo WST-1 podría reducirse a formazan soluble en agua por deshidrogenasas celulares en presencia de aceptor de electrones intermedio, como mPMS (1-metoxi-5-methyl-phenazinium methyl sulfate). El formazan producido por WST-1 es más soluble que el de XTT y MTS, lo que conduce a un rango lineal más amplio y una mayor sensibilidad. Aunque se informa que el derivado de WST-1 podría aún metabolizarse al producto de formazan después de 48 h de incubación, el tiempo de incubación estándar del tiempo de WST-1 es de 2 h. Aún no está claro si la adición única de WST-1 puede reflejar el efecto de los agentes de prueba en diferentes momentos en la tendencia de la viabilidad celular relativa. Para mejorar la eficiencia y simplificar la manipulación, los efectos del tiempo de incubación estándar 2h e incubación a largo plazo (2h + 24h, 2h + 48h) de WST-1 en las células del músculo liso de la vía aérea de rata se compararon después de la adición de la proteína de prueba MRP-14 (Yin et al. 2012, pp. 31-35).

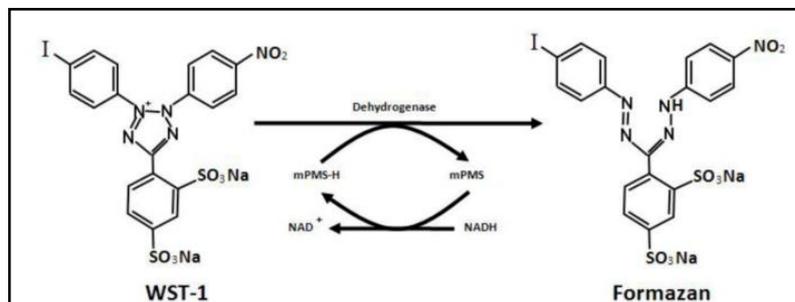


Figura 3-1: Mecanismo esquemático de la reducción WST-1

Fuente: Yin et al. 2012

Con un aceptor intermedio de electrones metil sulfato de 1-metoxi-5-metil-fenazinio (mPMS), el reactivo WST-1 podría ser reducido a formazan altamente soluble en agua por deshidrogenasas celulares (Yin et al. 2012, pp. 31-35).

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Recolección del material vegetal

La recolección se realizó en las afueras de la Universidad Nacional de Loja, Parroquia Argelia, cantón Loja, Provincia de Loja con las siguientes coordenadas geográficas:

- Latitud: -4.0329396
- Longitud: -79.20254
- Altitud: 2137 metros

2.3 Identificación del material vegetal

Las plantas a ser investigadas fueron identificadas por el Ing. Nelson Jaramillo en el lugar de la recolección y verificadas por el Ing. Zhofre Aguirre Mendoza Ph.D. Director del Herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja. Esta investigación se realizó dentro del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos firmado entre el MAE y la ESPOCH asignado con el número MAE-DNB-CM-2018-0086 y con número de orden de movilización 024-2018-UPN-VS-DPAL-MAE.

2.4 Equipos, reactivos y materiales

2.4.1 *Material vegetal*

Se utilizó la parte aérea de *Gnaphalium americanum* Mill.

2.4.2 Material biológico

Sangre humana de un donante sano sin haber ingerido alcohol ni medicamentos, para realizar el aislamiento de neutrófilos en la determinación anti-inflamatoria y citotóxica.

2.4.3 Material farmacológico

Ácido acetil salicílico para niños 100 mg triturado y pesado correctamente para ser utilizado como control positivo en la determinación anti-inflamatoria y citotóxica.

2.4.4 Materiales, reactivos y equipos

2.4.4.1 Materiales de laboratorio

Tabla 1-2: Materiales de laboratorio utilizados en la obtención del extracto hidroalcohólico liofilizado, control de calidad de la planta y del extracto hidroalcohólico

Pruebas realizadas	Materiales
Obtención del extracto hidroalcohólico liofilizado	Frasco de vidrio ámbar Probeta de 1000 ml Embudo Papel filtro
Cenizas totales	Crisol de porcelana Pinzas Guantes
Cenizas solubles en agua	Crisol de porcelana Pinzas Guantes Papel filtro Embudo Trípode
Cenizas solubles en ácido clorhídrico	Crisol de porcelana Pinzas Guantes Vidrio reloj Papel filtro
Humedad	Cápsula de porcelana Pinzas Guantes Desecador
Sólidos totales	Cápsula de porcelana Pipeta de 5 mL.
Densidad	Picnómetro
pH	Vaso de precipitación 250 ml Varilla de agitación
Grados Brix	Varilla de agitación
Índice de refracción	Varilla de agitación

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Tabla 2-2: Materiales de laboratorio utilizados en tamizaje fitoquímico

Materiales
Gradilla
Tubos de ensayo
Embudo
Trípode
Papel filtro
Pipetas graduadas de 2 ml, 5 mL, 10 mL
Pinzas para tubo

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Tabla 3-2: Materiales de laboratorio utilizados en la Cuantificación de Flavonoides, Fenoles y Antioxidante

Pruebas realizadas	Materiales
Flavonoides y Fenoles	Pipeta graduada de 2 mL, 5 mL, 10 mL Cronómetro Balón aforado de 25 ml, 100 mL Tubos de ensayo Gradilla Papel aluminio
Antioxidante	Pipeta automática del 100 µL Pipeta graduada de 5 mL Puntas amarillas Papel aluminio

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Tabla 4-2: Materiales de laboratorio utilizados en la Determinación Anti-inflamatoria y Citotóxica

Materiales
Tubos tapa roja
Cápsula vacutainer
Torniquete
Algodón
Alcohol
Pipeta graduada de 5 mL
Jeringuillas de 3 ml, 5 mL
Matraz de aforo de 10 ml, 25 mL
Microplaca de 96 micropocillos
Pipeta multicanal Eppendorf
Vasos de precipitación
Guantes quirúrgicos
Gradillas
Cofia
Mascarilla
Puntas amarillas

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

2.4.4.2 Equipos

Tabla 5-2: Equipos utilizados en el hidroalcohólico liofilizado, control de calidad de la planta y del extracto hidroalcohólico

Pruebas realizadas	Equipos
Extracto hidroalcohólico liofilizado	Rotavapor Balanza analítica Bomba de presión al vacío Liofilizador
Cenizas totales	Molino Desecador Reverbero Mufla Balanza analítica
Cenizas solubles en agua	Desecador Reverbero Mufla Balanza analítica Mechero
Cenizas solubles en ácido clorhídrico	Desecador Reverbero Mufla Balanza analítica Baño María
Humedad	Balanza analítica Estufa Desecador
Sólidos totales	Balanza analítica Estufa Desecador Baño maría
Densidad	Balanza analítica
pH	pH-metro
Grados Brix	Refractómetro
Índice de refracción	Refractómetro

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Tabla 6-2: Equipos utilizados en tamizaje fitoquímico

Equipos
Gradilla
Tubos de ensayo
Embudo
Trípode
Papel filtro
Pipetas graduadas de 2 ml, 5 mL, 10 mL
Pinzas para tubo

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Tabla 7-2: Equipos de laboratorio utilizados en la Cuantificación de Flavonoides, Fenoles y Antioxidante

Pruebas realizadas	Equipos
Flavonoides y Fenoles	Vortex Espectrofotómetro Sonicador Agitador magnético
Antioxidante	Espectrofotómetro Sonicador Agitador magnético

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Tabla 8-2: Equipos de laboratorio utilizados en la Determinación Anti-inflamatoria y Citotóxica

Equipos
Centrifuga
Microscopio
Cámara de Neubauer
Vortex
Baño maría
Cronómetro
Lector de microplacas

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

2.4.4.3 Reactivos

Tabla 9-2: Reactivos utilizados en el extracto hidroalcohólico liofilizado, control de calidad de la planta y del extracto hidroalcohólico

Pruebas realizadas	Reactivos
Extracto hidroalcohólico liofilizado	Alcohol potable al 96% Agua destilada
Cenizas totales	Peróxido de hidrógeno
Cenizas solubles en ácido clorhídrico	Ácido clorhídrico Ácido nítrico Nitrato de plata

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Tabla 10-2: Reactivos utilizados en tamizaje fitoquímico

Reactivos	
Agua destilada	Reactivo de Wagner
Etanol	Reactivo de FeCl ₃
Reactivo Sudan III	Reactivo de Fehling A y B
Reactivo de Dragendorff	Ácido clorhídrico al 1%
Reactivo de Mayer	Reactivo de Baljet
Cloruro de Sodio	Alcohol amílico
Reactivo de Borntrager	Carbonato de sodio
Ácido clorhídrico concentrado	Hidróxido de sodio al 5%
Cloruro Férrico	

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Tabla 11-2: Reactivos de laboratorio utilizados en la Cuantificación de Flavonoides, Fenoles y Antioxidante

Pruebas realizadas	Reactivos
Flavonoides	Nitrito de Sodio al 5% Cloruro de amonio al 10% NaOH Agua destilada
Fenoles	Reactivo de Folin Ciocalteu Agua destilada Carbonato de sodio 7.5%
Antioxidante	Agua destilada DPPH

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Tabla 12-2: Reactivos utilizados en la Determinación Anti-inflamatoria y Citotóxica

Reactivos
Heparina sódica
Solución modificada de Hank's
Ficoll – Paque
NH ₄ Cl 0.83%
Zymosan A opsonizado
Dimetilsulfóxido al 5%
Tritón X-100 al 0.1%
WST-1

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

2.5 Técnicas y métodos

La investigación se la realizó por partes de acuerdo a las pruebas a realizarse y de manera consecutiva para obtener los resultados correspondientes a la planta analizada, como se detalla a continuación:

2.5.1 Acondicionamiento y secado del material

La muestra de *Gnaphalium americanum* Mill una vez recolectada se le realizó una limpieza para retirar el polvo, insectos y demás contaminantes que pudieran afectar a la investigación. Se procedió a secar en estufa con circulación de aire y ventilación, a una temperatura máxima de 50°C por un lapso de tiempo de 6 a 8 horas.

2.5.2 Molienda y preparación del Extracto hidroalcohólico

La muestra seca se procedió a moler en un molino de cuchillas, previa limpieza exhaustiva; para obtener el extracto se utilizó 100 g de la muestra seca y triturada y se procedió a macerar por 72 horas con constante agitación en un frasco ámbar de 1000 mL con etanol-agua en proporciones 70:30 respectivamente.

2.5.3 Control de calidad de la planta

La muestra *Gnaphalium americanum* Mill una vez seca y triturada se procedió a realizar los siguientes análisis por triplicado.

2.5.3.1 Determinación de Cenizas Totales

Pesamos 2 g de la planta seca y pulverizada y colocamos en un crisol de porcelana previamente tarado. Se calentó la muestra en un reverbero hasta conseguir la carbonización, una vez conseguido esto se introdujo la muestra con el crisol en la mufla a una temperatura de 700 a 750 °C por el lapso de 2 horas hasta observar que la muestra tome un color blanquecino. Luego se colocó en el desecador por una media hora y se procedió a pesar, se repitió este proceso varias veces hasta conseguir un peso constante. Con los resultados obtenidos se aplica la siguiente fórmula para obtener los valores finales de cenizas totales:

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

Donde:

C = porcentaje de cenizas totales.

M = masa del crisol vacío (g).

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

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático

2.5.3.2 Determinación de Cenizas Solubles en Agua

A una muestra de cenizas totales se añadió 15 mL de agua, tapado hacer hervir por 5 min suavemente. Luego se filtró y el residuo se traspasó al crisol inicial para proceder a carbonizar y posteriormente colocar en la mufla a 700 °C por 2 horas. Se sacó de la mufla y se colocó en el desecador por 30 min y se pesó hasta obtener peso constante. Con los datos obtenidos se aplicó la siguiente fórmula:

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

Ca: porcentaje de cenizas solubles en agua

M = masa del crisol vacío

M₁ = masa del crisol con la muestra de ensayo

M₂ = masa del crisol con las cenizas totales

M_a = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua

100 = factor matemático

2.5.3.3 Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico

A una muestra obtenida de cenizas totales se añadió 2 mL de ácido clorhídrico al 10% se tapó con vidrio reloj y se puso a hervir en baño maría durante 10 minutos. Lavamos el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y se añadió al mismo crisol. Se filtró la solución y se lavó con agua caliente hasta que el residuo filtrado que anteriormente fue acidulado con ácido nítrico y puesto 2 gotas de nitrato de plata, no muestre restos de cloruros. Se secó el residuo a 100 °C y se colocó en el crisol inicial para ser incinerado en la mufla a 750 °C por 2 horas. Luego se colocó la muestra en el desecador por 30 min y se pesó varias veces hasta obtener peso constante. Con la aplicación de la siguiente fórmula se calculó las cenizas insolubles en ácido clorhídrico:

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

B = porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

M = masa del crisol con la porción de ensayo

M₂ = masa del crisol con la ceniza

100 = factor matemático

2.5.3.4 Determinación de Humedad

La muestra seca y triturada se pesó 2 g en una cápsula de porcelana anteriormente tarada, se desecó en estufa a 105 °C por 3 horas. Luego se colocó la cápsula en el desecador por 30 minutos y de nuevo a la estufa por 1 hora y se pesó, se repitió este proceso hasta conseguir peso constante. Se aplica la siguiente fórmula:

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

Hg = porcentaje en peso por desecación

M = masa de la cápsula vacía

M₁ = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada

M₂ = masa de la capsula con la muestra de ensayos

100 = factor matemático

2.5.4 Control de calidad del extracto

El control de calidad del extracto hidroalcohólico se realizó una vez filtrado el extracto y las pruebas se realizaron por triplicado y fueron las siguientes: características organolépticas, densidad relativa, índice de refracción, pH y sólidos totales.

2.5.4.1 Determinación de las Características organolépticas

Olor: Con una tira de papel de 1x10 cm se introdujo en el extracto y se determinó si el olor corresponde a lo analizado.

Color: En tubos de ensayo limpios y secos se coloca una cierta cantidad de extracto y se observa a contraluz para apreciar su color, transparencia y presencias de alguna sedimentación o partículas.

2.5.4.2 Densidad Relativa

Un picnómetro vacío, limpio y seco se pesó con anterioridad a ser llenado con el extracto y mantenerlo durante 15 min a 25 °C, se retiró el exceso de agua que rebosa al tapar el picnómetro, con una tira de papel y secar también todo el exterior del mismo. Se pesó el picnómetro con el extracto y se hace lo mismo con agua destilada una vez limpio el picnómetro. Se calculó con la siguiente fórmula:

$$H_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M} \times 100$$

Donde:

M = peso del picnómetro vacío

M₁ = peso del picnómetro con la muestra

M₂ = peso del picnómetro con agua

2.5.4.3 Índice de Refracción

En el prisma del refractómetro se colocó una gota de agua destilada para ajustar el equipo a la zona del espectro visible. Luego se coloca una gota del extracto en el refractómetro se cierra y se enfoca la luz con el espejo hasta ver la línea límite de los campos claro y oscuro.

2.5.4.4 Determinación de pH

La muestra se colocó en un vaso de precipitación y se introdujo el pH-metro una vez estabilizado se obtienen los valores.

2.5.4.5 Determinación de sólidos totales

En una cápsula previamente tarada se colocó 5 ml del extracto y se colocó en la estufa a 105 °C, se hizo hervir a baño maría hasta que esté totalmente seco. En la estufa se dejó por 3 horas y se pesó hasta obtener peso constante. Luego se colocó en el desecador por 30 min y se pesó finalmente. Aplicando la siguiente fórmula se obtuvieron los resultados:

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

Donde:

P = masa de la cápsula vacía

Pr =masa de la cápsula más el residuo
V =volumen de la porción de ensayo
100 = factor matemático

2.5.5 Tamizaje fitoquímico

Es una serie de ensayos que se realizan para determinar los diferentes metabolitos tanto primarios como secundarios presentes en una planta con solventes de polaridad creciente.

El tamizaje se lo realizó con el extracto hidroalcohólico obtenido con la relación planta-solvente 1:10, extracto que es macerado con éter etílico para obtener los extractos: etéreo, alcohólico y acuoso con los que se van a realizar las diferentes pruebas que se detallan.

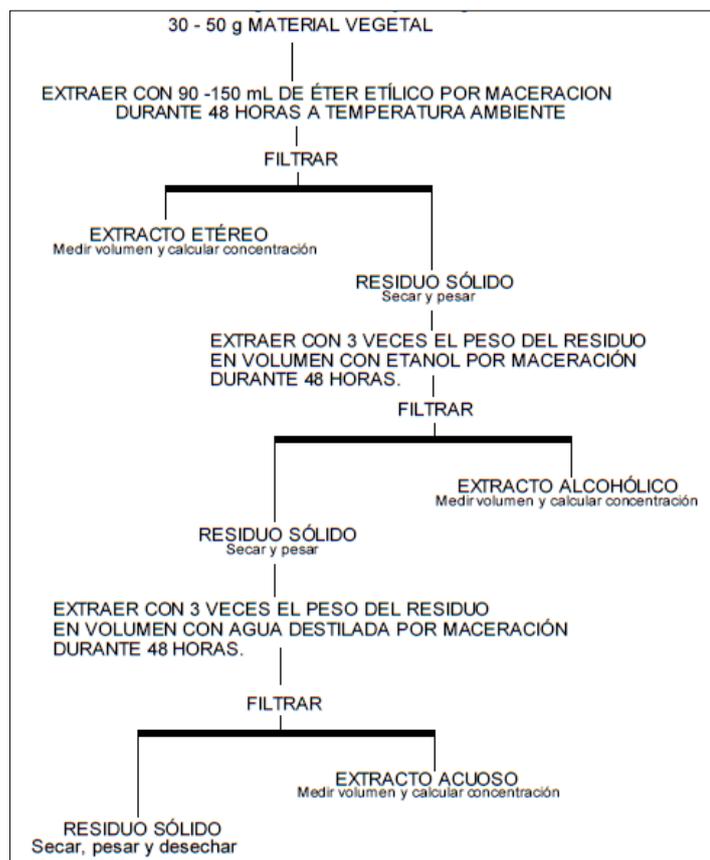


Figura 1-2: Proceso de Tamizaje fitoquímico

Fuente: Miranda, 2006

Los tres extractos obtenidos se midió el volumen y se procede a efectuar cada análisis por separado y obtener los diferentes resultados.

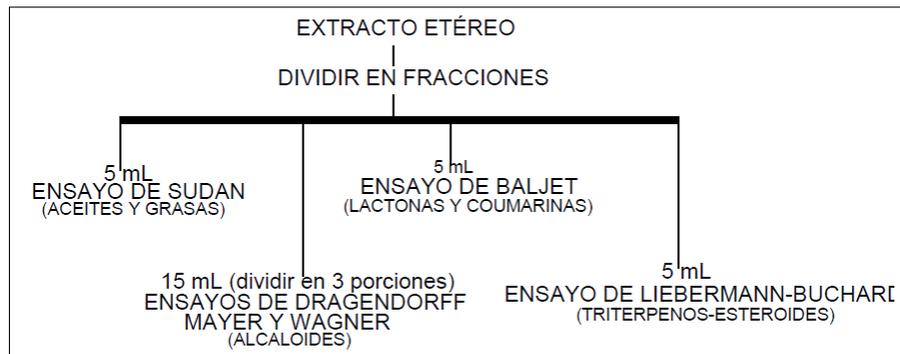


Figura 2-2: Esquemización para obtener el extracto etéreo

Fuente: Miranda, 2006

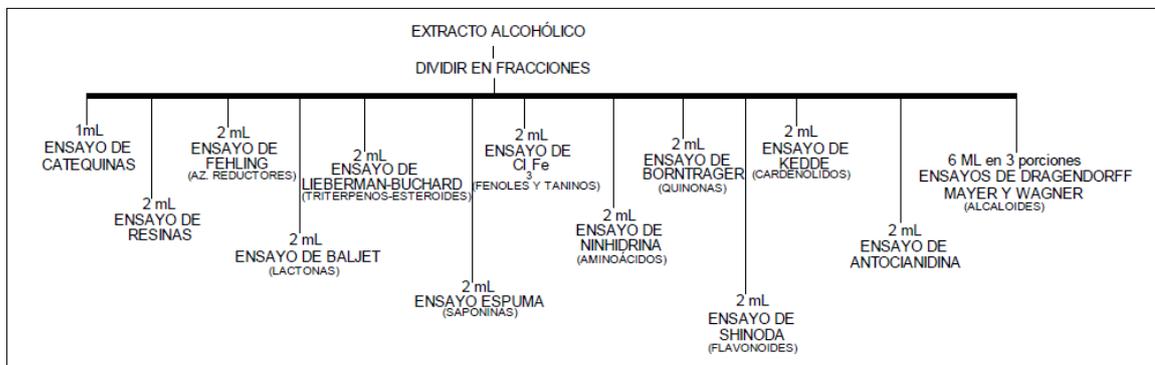


Figura 3-2: Proceso de los ensayos con el extracto alcohólico

Fuente: Miranda, 2006

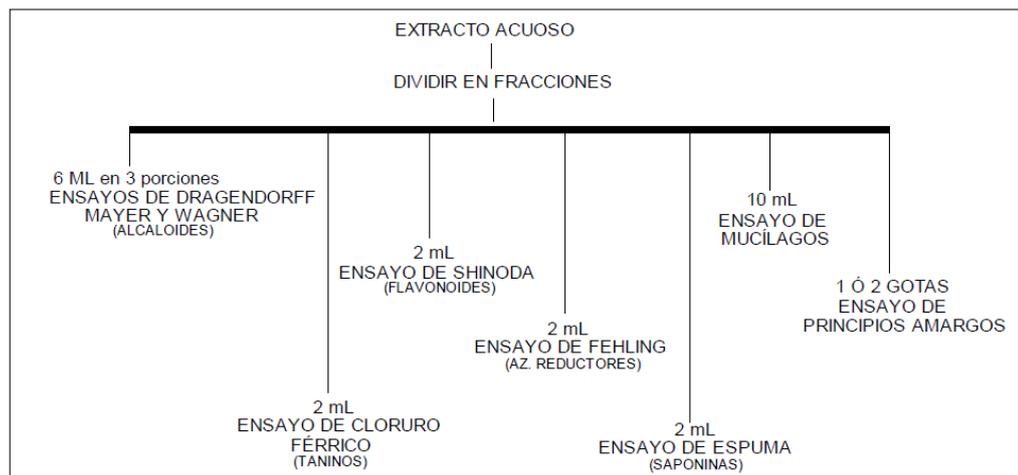


Figura 4-2: Esquemización de las reacciones con el extracto acuoso

Fuente: Miranda, 2006

2.5.5.1 Ensayo de Sudan

Con este ensayo se identifican compuestos grasos. Para lo cual a 5 mL del extracto etéreo se le añade 1 mL del reactivo Sudan III o Sudan IV. Se procedió a calentar la mezcla hasta total evaporización del solvente.

El resultado positivo se lo obtiene al presentar una coloración roja en el líquido o en las paredes de los tubos.

2.5.5.2 Ensayo de Dragendorff

Este ensayo nos permite determinar la presencia de alcaloides en la muestra. Se tomó una alícuota del extracto etéreo y se puso a evaporar a baño maría, al residuo se añadió ácido clorhídrico al 1%; para el extracto acuoso se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado se calentó suavemente y se dejó enfriar; a esta mezcla ácida añadimos 3 gotas del reactivo Dragendorff y se reportó los resultados si hay opalescencia considerado (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

2.5.5.3 Ensayo de Mayer

Se procedió de la misma manera que el ensayo de Dragendorff hasta obtener la solución ácida, se añadió una pizca de cloruro de sodio en polvo luego se agitó y filtró. Se añadió 2 a 3 gotas del reactivo de Mayer.

Los resultados positivos se dan al observar opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

2.5.5.4 Ensayo de Wagner

Se procedió de la misma manera que en el ensayo de Dragendorff de la solución ácida, se añadió 3 gotas del reactivo Wagner y los resultados positivos se reportan de manera similar.

2.5.5.5 Ensayo de Baljet

Este ensayo nos permite identificar Lactonas y Cumarinas. Para lo cual a la muestra que no se encuentra en solvente alcohólico se evapora en baño maría y se añadió 1 mL de alcohol y 1 mL del reactivo Baljet.

Se reportó positivo al observar coloración roja (++) y precipitado rojo (+++).

2.5.5.6 Ensayo de Borntrager

Nos permite determinar la presencia de quinonas. Del extracto alcohólico se evaporó el solvente en baño maría. Se añadió 1 ml de NaOH o KOH. Luego se agitó hasta mezclar completamente y se dejó en reposo para que las fases se separen.

Resultado positivo se evidencia si la fase acuosa superior se pinta de rosado (++), rojo (+++).

2.5.5.7 Ensayo de Lieberman-Burchard

Con este ensayo se evalúa la presencia de triterpenos y/o esteroides. Se evaporó el solvente en baño maría y se añadió 1 mL de anhídrido acético y se mezcló. Se adicionó de 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

Resultado positivo se da muy rápido con coloración rosado-azul, verde intenso visible pero rápido, final de la reacción verde oscuro-negro.

2.5.5.8 Ensayo de catequinas

Se tomó una gota del extracto alcohólico con un capilar y se aplicó en papel filtro. Sobre la gota del papel filtro se aplicó solución de carbonato de sodio. Se observó a la luz UV la aparición de una mancha verde carmelita para reportar resultado positivo.

2.5.5.9 Ensayo de resinas

A 2 ml de extracto alcohólico se adicionó 10 ml de agua destilada. Se reporta positivo al observar precipitado en el tubo de ensayo.

2.5.5.10 Ensayo de Fehling

Identificamos azúcares reductores con este ensayo. A la muestra alcohólica se añadió de 1-2 mL de agua, la muestra acuosa no se realiza el paso anterior, se añadió 2 mL del reactivo y se calentó en baño maría de 5 a 10 min.

Resultado positivo con la aparición de coloración roja o precipitado.

2.5.5.11 Ensayo de la Espuma

Se evalúa la presencia de Saponinas. A la mezcla alcohólica se diluyó en 5 veces su volumen y se agitó fuertemente de 5 a 10 minutos. El resultado es positivo cuando se forma espuma de más de 2 mm de altura en la superficie que se mantiene por 2 minutos.

2.5.5.12 Ensayo de cloruro férrico

Se identifican taninos y compuestos fenólicos. Una porción del extracto alcohólico se añadió 3 gotas de solución de tricloruro férrico al 5%, en este extracto el ensayo determina taninos como fenoles. En el extracto acuoso determina el ensayo taninos. En una alícuota del extracto se añadió acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de cloruro férrico al 5%.

Resultado positivo con coloración rojo-vino indica presencia de compuestos fenólicos, coloración verde intensa indica la presencia de taninos tipo pirocatecólicos, una coloración azul indica la presencia de taninos tipo pirogalotánicos.

2.5.5.13 Ensayo de la ninhidrina

A una alícuota del extracto se mezcló con 2 mL de solución de ninhidrina al 2%, se calentó de 5 a 10 min en baño maría. Se considera positivos con la aparición de una coloración azul violáceo.

2.5.5.14 Ensayo de Shinoda

Indica la presencia de flavonoides. A la muestra alcohólica se diluyó con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se espera 5 minutos, luego se añadió 1 mL de alcohol amílico y se mezclaron las fases. Se dejó reposar para que las fases se separen. En la muestra acuosa se procede de la manera similar a partir del ácido clorhídrico concentrado.

Es positivo al colorearse de amarillo el alcohol amílico, naranja, o rojo intenso.

2.5.5.15 Ensayo de Kedde

Permite identificar glicósidos cardiotónicos. A una alícuota del extracto alcohólico se mezcló con 1 mL del reactivo y se dejó reposar por 5-10 min. Es positivo al colorearse violáceo que se manetnga por 1-2 horas.

2.5.5.16 Ensayo de antocianidinas

Se calentó 2 mL del extracto alcohólico por 10 min, con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se dejó enfriar y se añadió 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agitó y se dejó reposar las fases. Es positivo la aparición de coloración roja a marrón en el alcohol amílico.

2.5.5.17 Ensayo de Mucílagos

A una alícuota del extracto acuoso se enfrió a 0-5 °C. Es positivo si la muestra se torna con una consistencia gelatinosa

2.5.6 Cuantificación de Flavonoides

Se procedió a partir de la preparación de una solución a 1000 ppm con el extracto liofilizado, de la cual se toma 1 ml y se adicionan 4 mL de agua destilada, también se adiciona 0.3 mL de Nitrito de Sodio al 5%. Se deja reposar por 5 min y se adiciona 0.3 mL de Cloruro de Aluminio al 10%. Esta mezcla se la deja reposar durante 5 min en oscuridad completa.

Luego se añade 2 mL de NaOH 1M y se homogeniza, en el espectrofotómetro se realizan las lecturas a una longitud de onda de 510 nm.

Los valores obtenidos de las absorbancias se reemplazan en la curva de calibración $Y=0.0014x+0.0144$ obtenida de la quercetina que se obtiene con los siguientes datos:

Tabla 13-2: Absorbancias de quercetina

Concentración (ppm)	Absorbancias
20	0.044
40	0.07
60	0.098
80	0.126
100	0.157

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

2.5.7 Cuantificación de Fenoles

Se preparó la solución con el extracto liofilizado a 1000 ppm, de la que tomamos 1 mL y adicionamos 15 mL de agua destilada con 1.25 mL del Reactivo Folin Ciocalteu. Dejamos reposar durante 8 minutos y adicionamos 3.75 mL de Carbonato de Sodio al 7.5%, luego en un balón de

aforo de 25 mL lo aforamos con agua destilada. Vortimizamos durante 1 min y dejamos reposar durante 2 horas en oscuridad completa.

Medimos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

Con los valores obtenidos trabajamos con la curva de calibración del ácido gálico $Y = 0.001x + 0.0017$, $R^2 = 0.999$ que tiene las siguientes absorbancias:

Tabla 14-2: Absorbancias del ácido gálico

Concentración (ppm)	Absorbancias
20	0.023
40	0.041
60	0.061
80	0.082
100	0.103

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

2.5.8 Cuantificación de la Capacidad Antioxidante

Se toma 100 μ L de la solución de 1000 ppm del extracto liofilizado, homogenizamos con 3.9 mL de solución de DPPH, luego incubamos a 37 °C por el lapso de 20 minutos. Posteriormente se miden las absorbancias a 517 nm. Con los datos obtenidos se aplica la siguiente fórmula:

$$1\% = \frac{ABS\ Control - ABS\ Muestra}{ABS\ Control} \times 100$$

Donde:

1% = porcentaje de los radicales libres inhibidos

ABS Control = absorbancias de la muestra control

ABS Muestra = absorbancia del extracto de *Gnaphalium americanum* Mill

Con el valor obtenido de la curva de calibración de *Gnaphalium americanum* Mill, una vez reemplazados los valores en la formula, se calcula el IC 50.

2.5.9 Ensayo de la Actividad Anti-inflamatoria

2.5.9.1 Aislamiento de neutrófilos

La sangre extraída de un donador sano es colocada en tubos con 0.5 mL de heparina sódica con posterior homogenización lenta, agregamos solución modificada de Hank's y seguimos

homogenizando. En 5 tubos colocamos 3 mL de Ficol con 4 mL de la solución de la inicial lentamente, centrifugar por 30 min a 1500 rpm. Dejamos reposar y retiramos la porción intermedia de neutrófilos y colocamos en tubos con el doble de volumen de Hank's y centrifugamos por 30 min a 1500 rpm. Desechamos el sobrenadante y reconstituimos con Hank's con 2 gotas de NH₄Cl al 0.83% y volvemos a centrifugar. Eliminamos el sobrenadante y reconstituimos con Hank's para realizar el conteo de neutrófilos.

2.5.9.2 Preparación de la microplaca

Se preparan los controles para realizar las lecturas:

Control positivo: Solución de DMSO al 5%

Control comparativo: Aspirina

Control negativo: Triton X-100 al 1%

Colocamos el estándar de ácido acetil salicílico y las soluciones del extracto de *Gnaphalium americanum* Mill en concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12.5 ppm, se adiciona el Triton X-100, Dimetilsulfóxido al 5%, el WST-1 y se incuba por 30 minutos y se adiciona Zymosan. Por último, se realiza las lecturas en el lector de microplacas.

2.5.10 Ensayo de Citotoxicidad

Se procede de la misma que el ensayo antiinflamatorio hasta el periodo de incubación de 30 minutos sin colocar el Zymosan y procedemos a dejar reposar por 3 horas en el Lector de microplacas y que se realicen las lecturas.

Con las absorbancias obtenidas tanto de la aspirina como de las soluciones de *Gnaphalium americanum* se aplica la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de viabilidad celular:

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

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Control de calidad de la planta

Los ensayos se realizaron por triplicado arrojando los siguientes resultados:

Tabla 1-3: Resultados del Control de calidad de la planta

Parámetro	Resultados	Referencia Farmacopea USP 35
Cenizas totales	10.00 ± 0.15 %	12%
Cenizas solubles en agua	2.18 ± 0.08 %	7%
Cenizas insolubles en HCl	2.47 ± 0.06 %	5%
Humedad	12.03 ± 0.36 %	14%

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Todas las determinaciones se realizaron por el método gravimétrico. El valor obtenido de cenizas totales corresponde al 10.00% y representa una medida del contenido mineral que tiene la muestra una vez separada el material inorgánico, encontrándose dentro de los límites establecidos según la USP 35. Este ensayo ayuda a determinar la materia mineral que tiene la planta, y que tiene relación con su efecto farmacológico y si el contenido se encontrara por encima de los límites podría indicar contaminación por tierra o minerales (Ochoa Pacheco et al. 2013, pp 57).

Las cenizas solubles en agua dieron un resultado de 2.18% indicando la presencia de metales alcalinos dentro del rango de la USP 35. Las cenizas insolubles en ácido clorhídrico presentaron un valor de 2.47% dentro de los límites, indicando la presencia de minerales como la arena.

La humedad presentó un valor de 12.03% dentro del rango establecido por la farmacopea, esto es indicativo del grado de contaminación que puede tener la planta y que puede incidir en sus metabolitos.

3.2 Tamizaje fitoquímico

Tabla 2-3: Resultados de tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Gnaphalium americanum* Mill

Metabolitos	Nombre de la prueba	Tipo de extracto		
		Etéreo	Alcohólico	Acuoso
Compuestos grasos	Sudan	(+)		
Alcaloides	Dragendorff	(++)	(++)	(+++)
Alcaloides	Mayer	(++)	(-)	(++)
Alcaloides	Wagner	(+++)	(-)	(++)
Lactonas-Cumarinas	Baljet	(-)	(-)	
Triterpenos-Esteroides	Liebermann-Burchard	(++)	(+++)	
Glicósidos cardiotónicos	Kedde		(-)	
Catequinas	Catequinas		(+)	
Azúcares reductores	Fehling		(+)	(++)
Resinas	Resinas		(-)	
Fenoles-Taninos	Cl ₃ Fe		(+)	(+)
Flavonoides	Shinoda		(+)	(+)
Quinonas	Bortrager		(-)	
Saponinas	Espuma		(-)	(-)
Aminoácidos libres o aminas	Nihidrina		(-)	
Secuencias de grupos de flavonoides	Antocianidinas		(+)	
	Mucilagos			(-)
	Principios amargos			(+)

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

En el screening aplicado se obtuvo información acerca de los metabolitos presentes en *Gnaphalium americanum* Mill y da una idea de las posibles aplicaciones terapéuticas que se le puede dar a la planta.

El resultado positivo de Sudan indica la presencia de grasas en la muestra y esto se confirmó al momento de la liofilización al presenciar una capa amarillenta que cubría el extracto liofilizado. Los ensayos Mayer, Dragendorff y Wagner dieron positivos en los tres extractos indicando la presencia de alcaloides en la muestra.

En los extractos etéreo y alcohólico de Liebermann-Burchard se señala la presencia de triterpenos-esteroides, con una coloración verde intenso en el etéreo y azul en el alcohólico. Hay presencia de catequinas, azúcares reductores, fenoles-taninos, flavonoides y antocianidinas encontrados en el extracto alcohólico, en el ensayo Cl₃Fe con una coloración verde intenso que puede ser indicativo de taninos tipo pirocatecólicos. El extracto acuoso confirma la presencia de azúcares reductores, fenoles-taninos, flavonoides y principios amargos.

No se encontraron datos de control de calidad de *Gnaphalium americanum* Mill en bibliografía para realizar una comparación.

3.3 Control de calidad del extracto hidroalcohólico

Tabla 3-3: Datos obtenidos del extracto hidroalcohólico de *Gnaphalium americanum* Mill

Parámetros	Resultados
Organolépticos	Aspecto: opaco Color: verde oscuro Olor: Característico herbario Sabor: Amargo
pH	6.00
Densidad relativa	0.89 g/mL
Índice de refracción	1.363
Grados Brix	20 °
Sólidos totales	0.92 ± 0.02

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

En las características organolépticas que son propias de cada planta, se determinó un aspecto opaco, color verde oscuro por la gran presencia de clorofila, olor característico herbario y al solvente utilizado.

Observamos un valor de pH = 6.00 que indica un carácter algo ácido cercano a la neutralidad lo que podría ocasionar una disminución de la catálisis ácida o básica, al tener un carácter ácido conjuntamente con el medio etanólico puede indicar una mejor estabilidad del extracto o en una formulación farmacéutica (Moralez et al. 2011, pp. 532-539).

El índice de refracción con un valor de 1.36 superior al valor del agua, este parámetro viene dado por la relación que existe entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad que presenta la solución de la muestra.

Los sólidos totales arrojaron un resultado de 0.92%, indicando que los compuestos diluidos se encuentran poco concentrados, sugiriendo que en las cuantificaciones se hallen concentraciones bajas de los compuestos. En la densidad relativa 0.89 g/mL muestra una densidad menor a la del agua (Moralez, et al. 2011, pp. 532-539.)

3.4 Capacidad antioxidante

Tabla 4-3: Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Gnaphalium americanum* Mill

Concentración (ppm)	% Radicales libres inhibidos
10	3.99
20	7.19
50	12.65
100	17.31
200	27.83
500	54.06
1000	92.54

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

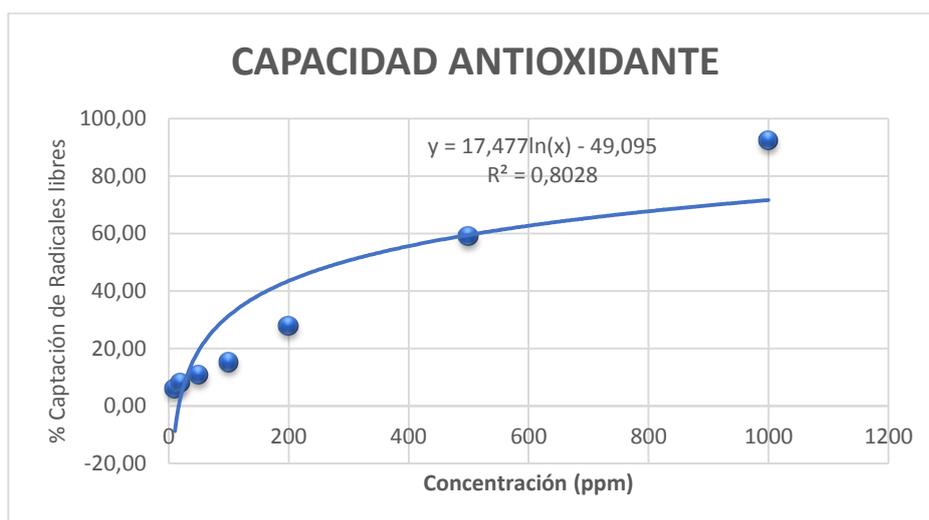


Gráfico 1-3: Representación gráfica de la Capacidad Antioxidante del extracto liofilizado de *Gnaphalium americanum* Mill

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Para calcular la capacidad antioxidante de *Gnaphalium americanum* Mill se utilizó el método establecido por Brand-Williams, basado en la reacción que se dan al reducirse una solución alcohólica de DPPH, al estar presente un donador de hidrógeno como antioxidante, con el cual se cuantificó los antioxidantes necesarios para que el radical DPPH sea reducido al 50% de su concentración inicial (Valenzuela et al. 2014, p. 3).

Los datos obtenidos se reportan como IC_{50} , que significa concentración inhibitoria media, indicando la capacidad antioxidante que tiene el compuesto con la que puede inhibir el 50% del radical DPPH en la reacción (Valenzuela et al. 2014, p. 4)

En la determinación antioxidante se obtuvo una regresión logarítmica con los datos obtenidos de las concentraciones del extracto liofilizado *Gnaphalium americanum* Mill que fueron de 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000.

Se obtuvo una curva de calibración $Y = 17.477\ln(x) - 49.095$ con un $R^2 = 0.8028$, con estos datos se elaboró una regresión logarítmica que proporciona los valores para el cálculo del IC_{50} representando la capacidad antioxidante que tiene la planta, y se compara con el estándar de ácido gálico.

Tabla 5-3: Resultados IC_{50}

Tipo de extracto	IC_{50}
Ácido gálico	35.33 $\mu\text{g/mL}$
<i>Gnaphalium americanum</i> Mill	290.04 $\mu\text{g/mL}$

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

El resultado obtenido indica que *G. americanum* si posee capacidad para neutralizar radicales libres, pero en comparación con el estándar de ácido gálico, la planta analizada neutraliza radicales libres a concentraciones elevadas y para interpretar los resultados se hace una relación inversamente proporcional, mientras menor es el IC_{50} mayor es la capacidad antioxidante.

G. americanum tiene en su composición flavonoides lo cuales tienen una gran actividad antioxidante por su estructura que posee grupos hidroxilo y tiene propiedades quelantes para el hierro y otros metales; y en un captador de radicales libres (Moroney et al., 1988; Emin et al., 1994) (Ballester 2006, pp. 23-26)

3.5 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se efectuó por el método Tricloruro de aluminio y la medición se la realizó espectrofotométricamente; tomando en cuenta la curva de la quercetina con la medición de sus absorbancias, obteniendo la siguiente curva de calibración $Y = 0.0014x + 0.0144$ con un $R^2 = 0.999$, datos con los cuales se trabaja para realizar una interpolación con el valor obtenido de la medición de la absorbancia de *Gnaphalium americanum* Mill alcanzando los valores indicados en la tabla.

Tabla 6-3: Resultados de la Cuantificación de Flavonoides de *Gnaphalium americanum* Mill

mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto liofilizado	mg Equivalentes de Quercetina /100 g de extracto liofilizado
259.43 ± 1.78	25.94 ± 0.18

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Se obtuvo un resultado de 259.43 mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto liofilizado siendo este valor indicativo de la cantidad de flavonoides presentes en la planta por cada gramo de extracto liofilizado obtenido en el análisis.

Los flavonoides actúan en la planta como metabolitos encargados de la protección UV, junto con los taninos, lignina y cumarinas, ayudando así a la planta a evitar los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (Vilela, González-Paleo y Ravetta 2011, pp. 317-327).

Estos compuestos ayudan a evitar la formación de radicales libres y la peroxidación lipídica contribuyendo así a disminuir enfermedades cardiovasculares (Stewart et al. 2014, pp. 317-327).

Tienen propiedades anti-inflamatorias, antifúngicas, antioxidantes, citotóxicas entre otras que las realizan gracias a su estructura que contiene bezoílo y cinamoílo que gracias a las sustituciones que presentan pueden atacar la membrana nuclear, celular y generar acoplamiento con el ADN y otras actividades que evitan el daño del tipo viral, microbios y cancerígenos (Gil, Gómez y Trejos 2009, pp. 317-327)

Varios estudios indican la aportación de estos compuestos para combatir enfermedades como cáncer, úlcera estomacal, actividad anti-inflamatoria. Los flavonoides tienen buena actividad antioxidante por su estructura que posee grupos hidroxilo y tiene propiedades quelantes para el hierro y otros metales (Moroney et al., 1988; Emin et al., 1994) (Ballester 2006, pp. 23-26)

3.6 Cuantificación de Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos se los analizó mediante el método Folin-Ciocalteu y como estándar ácido gálico obteniendo la curva de calibración $Y = 0.001x + 0.0017$, $R^2 = 0.999$, en la ecuación se reemplazó con el valor de la absorbancia de *G. americanum* Mill medido espectrofotométricamente y se tiene el siguiente valor:

Tabla 7-3: Resultados de la Cuantificación de Compuestos Fenólicos de *G. americanum*

mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto liofilizado	Porcentaje %
451.64 ± 1.72	45.16 ± 0.17

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Al tener una buena actividad los compuestos fenólicos, aporta a la actividad antioxidante donando electrones para neutralizar las especies reactivas de oxígeno protegiendo así las células contra el daño, también pueden elementos como el Cu y el Fe que pueden ayudar a generar especies

reactivas de oxígeno. También pueden inhibir la formación de radicales libres, al inhibir varias enzimas que participan en los procesos inflamatorios (Muszyńska et al. 2017, pp 373-381)

El principio del método utilizado está en que los fenoles reducen el reactivo Folin-Ciocalteu formando un compuesto azulado. El contenido de fenoles está relacionado con el contenido de flavonoides de la planta, al ser los flavonoides un subgrupo de los fenoles (Muszyńska et al. 2017, pp 373-381)

3.7 Ensayo Anti-inflamatorio

El ensayo anti-inflamatorio se lo realizó mediante el método WST-1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno), con el aislamiento de neutrófilos activos; en el proceso se utilizó varios reactivos que contribuyeron a la culminación del ensayo exitosamente, la lectura de las muestras se las realizó mediante el equipo de Lector de microplacas y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 8-3: Resultados del Porcentaje Inhibición Inflamatoria de *Gnaphalium americanum* Mill

CONCENTRACIÓN (ppm)	% INHIBICIÓN INFLAMATORIA ASA	% INHIBICIÓN INFLAMATORIA <i>G. americanum</i>
200	50.77 ± 14.78	70.34 ± 13.71
100	23.21 ± 2.92	50.73 ± 10.96
50	5.64 ± 1.68	37.01 ± 2.96
25	6.09 ± 12.75	25.79 ± 4.70
12.5	7.88 ± 4.09	21.23 ± 6.52

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Como blanco positivo se utilizó el ácido acetil salicílico en las mismas concentraciones para realizar las comparaciones, y se realizó el análisis estadístico mediante el programa SPSS, método ANOVA modelo lineal general; el cual nos indica que la concentración es <0.05 ; por lo tanto si marca diferencias en la absorbancia y el tipo de factor que son la planta y la aspirina, también hace diferencias en el resultado obtenido de las absorbancias, pero la unión de los dos factores no indica diferencias al ser >0.05 .

En el gráfico arrojado por el programa estadístico se observa la mayor absorbancia que se da a la concentración de 200 ppm, es con la planta que se obtiene un mejor resultado de porcentaje de inhibición inflamatoria que con la aspirina. Se aplicó un test T-student para lo cual se debió determinar primero si es normal o no con una prueba no paramétrica, con un resultado >0.05

indicando que si es normal y está balanceado. Con la prueba de Levene indica un valor de 0.038 que es <0.05 indicando que los datos si están homogenizados.

Con la prueba T-student se comparan dos colaterales, entre inferior y superior no se obtienen signos diferentes, por lo tanto, los datos no son iguales, está es un aprueba paramétrica que indica si son iguales o no las medias de una muestra.

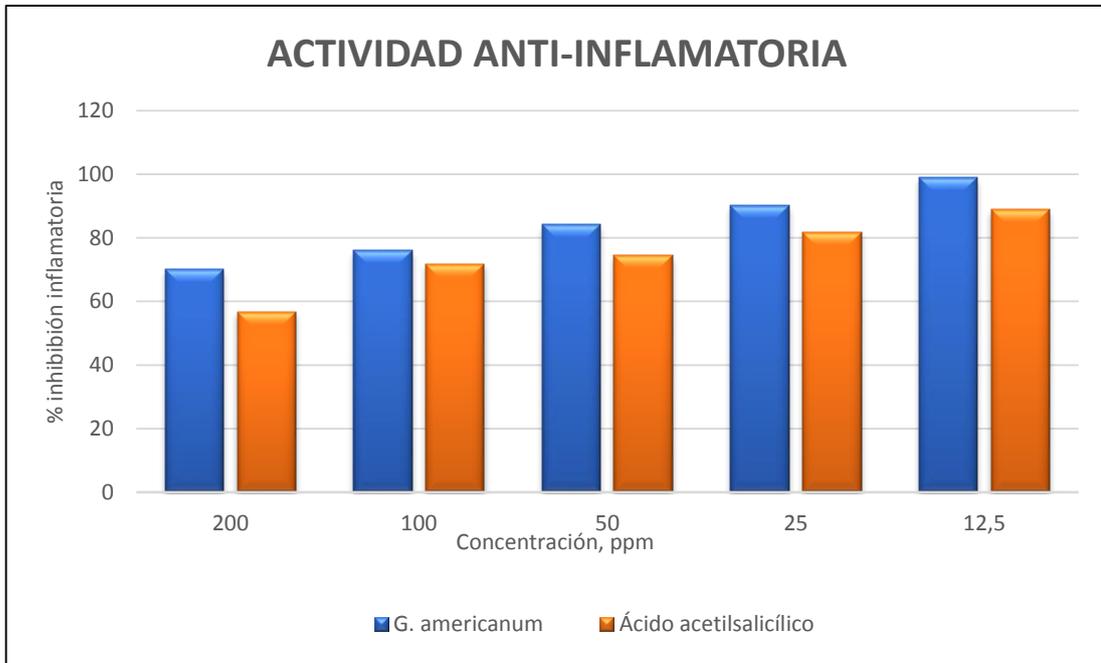


Gráfico 2-3: Representación gráfica de la Actividad Anti-inflamatoria del extracto *Gnaphalium americanum* Mill.

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

La actividad anti-inflamatoria de *Gnaphalium americanum* Mill puede deberse a la presencia de flavonoides, estos compuestos están relacionados con la lipoxigenasa y ciclooxigenasa, enzimas que actúan en el metabolismo de ácido araquidónico, los flavonoides polihidroxiados inhiben la 5-LOX (flavonas) y de la COX (flavonoles). También actúan sobre los neutrófilos y macrófagos (Kim et al.,2004) (Ballester 2006, pp.28)

Los flavonoides que tienen actividad anti-inflamatoria pueden interactuar con varios tipos celulares, como con los linfocitos B y T al estar activas; y modulan el efecto de la proliferación de los linfocitos ejerciendo un efecto inhibitor (Cerqueira et al, 2003) (Ballester 2006, p.28)

En los resultados podemos observar la concentración del ácido acetyl salicílico a 200 ppm con un porcentaje de inhibición inflamatoria de 50.77%, el extracto *Gnaphalium americanum* Mill a la misma concentración presenta 70.34%; siendo a esta concentración que exhibe el mayor porcentaje de inhibición inflamatoria para reducir las sales de tetrazolio a formazan. Demostrando que *Gnaphalium americanum* Mill tiene una mayor actividad inflamatoria a esta concentración que la referencia utilizada aspirina.

Los flavonoides pueden intervenir en otras partes del proceso anti-inflamatorio como pueden ser: inhibir la migración celular que se da cuando los leucocitos se direccionan por quimiotactismo hasta llegar al foco inflamatorio, acción anti-rradicalaria que se da frente a los radicales libres al empezar la inflamación, e inhiben la salida de histamina (Enciso y Arroyo 2011, 00. 231-237).

Durante el proceso inflamatorio se activan monocitos y macrófagos que liberan sustancias proinflamatorias; citosinas TNF- α , IL-6 e IL-8 que actúan sobre los neutrófilos y varias células muertas, los metabolitos que tienen actividad anti-inflamatoria dependiendo de la familia a la que pertenecen, pueden ser capaces de inhibir estas sustancias (Borrero-Girón 2016.pp. 27).

No existen estudios realizados a la planta sobre actividad anti-inflamatoria, solo se encontraron estudios acerca de la actividad antimicrobiana. Por lo cual no se pueden hacer comparaciones. Sin embargo, mediante el tamizaje fitoquímico se pudo determinar la presencia de varios compuestos que podrían aportar a la actividad anti-inflamatoria, como los flavonoides, fenoles, alcaloides, triterpenos, taninos; que con un estudio detallado se puede determinar el compuesto que aporta con mayor eficiencia a la actividad anti-inflamatoria.

3.8 Ensayo Citotóxico

En esta determinación se utilizó el método de viabilidad celular el cual demuestra la cantidad de células sanas en una muestra, donde los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad celular. El ensayo se lo realizó con la sal de tetrazolio WST-1 que refleja la viabilidad celular simplemente por la actividad metabólica que es capaz de estimarse cuantitativamente mediante la adición de la sal de tetrazolio a las células. Los resultados obtenidos a las diferentes concentraciones con los siguientes:

Tabla 9-3: Resultados del Porcentaje de Viabilidad Celular de *G. americanum*

CONCENTRACIÓN (ppm)	% VIABILIDAD CELULAR <i>G. americanum</i>	% VIABILIDAD CELULAR ASA
200	70.09 \pm 4.39	56.83 \pm 3.05
100	76.14 \pm 7.74	71.85 \pm 1.88
50	84.18 \pm 2.91	74.42 \pm 6.05
25	90.17 \pm 2.95	81.92 \pm 3.08
12.5	98.96 \pm 2.57	88.82 \pm 14.02

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

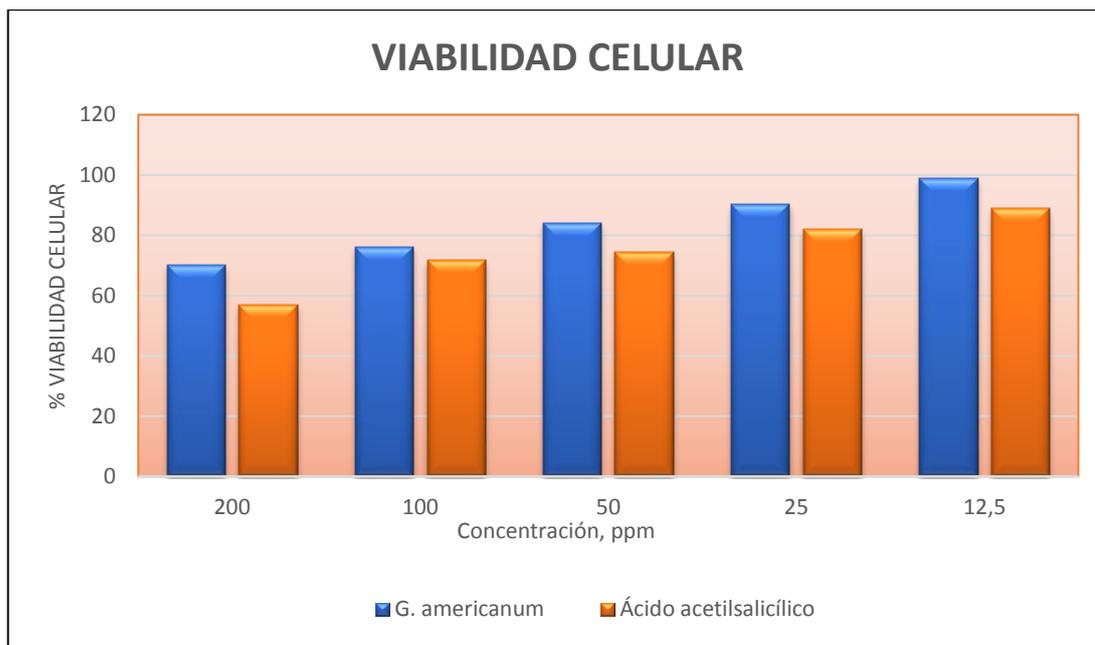


Gráfico 3-3: Representación gráfica del Porcentaje de Viabilidad Celular del extracto de *Gnaphalium americanum* Mill.

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

El fundamento del método está en la transformación del WST-1 a formazán, esto se da por el sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa presente solo en células vivas. La cantidad de formazán que se forma durante el ensayo es medida con el equipo a 450 nm y esto está relacionado directamente con la cuantificación de células vivas (Cayman Chemical Company 2007; Torres et al., 2003) (Favela Hernández J. 2012, pp. 8).

A la concentración de 12.5 ppm dio 98.96% de viabilidad celular y con la mayor concentración de 200 ppm dio como resultado 70.09%.

En los resultados se observa la acción citotóxica del extracto de *Gnaphalium americanum* Mill a las tres horas de incubación que sugiere el método, obteniendo un porcentaje de viabilidad celular en el extracto hidroalcohólico de 98.96% y con el ácido acil salicílico 88.82% a la misma concentración de 12.5 ppm; siendo el extracto estudiado menos citotóxico que la referencia al tener un mayor porcentaje de viabilidad celular.

Según estudios realizados indican que la actividad citotóxica puede ayudar a prevenir ciertos tipos de cáncer como el de colón y de mama; el estudio habla de la evaluación citotóxica de la xantona GAG que es un metabolito secundario de una planta que es producido como un mecanismo de defensa de la misma. (Borrero-Girón 2016, pp. 27-28). En este contexto sería útil el análisis de los compuestos que son encargados de la actividad citotóxica de la planta para identificar sus compuestos y determinar si tiene actividad anti-cáncer u otras actividades.

CONCLUSIONES

- Se determinó los metabolitos presentes en *Gnaphalium americanum* Mill, los ensayos se realizaron por triplicado para ser confirmados en los tres extractos: alcohólico, étereo y acuoso identificando; alcaloides, esteroides-triterpenos, catequinas, azúcares reductores, fenoles-taninos, flavonoides y antocianidinas.
- Se cuantificó flavonoides mediante el método tricloruro de aluminio y con la curva de calibración de la quercetina como estándar, obteniendo un valor de 259.43 mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto liofilizado. Los compuestos fenólicos totales se encontraron 451.64mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto liofilizado.
- La actividad anti-inflamatoria de *G. americanum* se determinó sobre neutrófilos aislados con las concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 ppm de extracto liofilizado obteniendo 21.23%, 25.79%, 37.01%, 50.73% y 70.34% de inhibición inflamatoria respectivamente; del ácido acetil salicílico a 200 ppm presentó 50.77%, siendo mayor la inhibición inflamatoria obtenida por *G. americanum* a la misma concentración.
- Se evaluó la citotoxicidad de *G. americanum* por el método viabilidad celular con la reducción de la sal de tetrazolio con WST-1, obteniendo a 12.5 ppm, 98.96% de viabilidad celular en relación con 88.82% obtenido con la aspirina a la misma concentración, siendo menos citotóxico el extracto de estudio que la referencia, al tener mayor viabilidad celular.
- Se evidenció la capacidad antioxidante del extracto de *G. americanum* mediante el método DPPH obteniendo a 10 ppm, 3.99% y a 1000 ppm, 92.54% de radicales libre inhibidos; con estos valores se calculó el $IC_{50} = 290.04 \mu\text{g/mL}$ frente al obtenido con el ácido gálico de $IC_{50} = 35.33 \mu\text{g/mL}$. Observando que el extracto tiene un valor moderado de capacidad antioxidante en relación al estándar de ácido gálico, siendo mayor la capacidad antioxidante mientras menor es su IC_{50} .

RECOMENDACIONES

- El material vegetal debe ser acondicionado de manera correcta para evitar la presencia de agentes contaminantes en la muestra que puedan perjudicar los análisis.
- En el control de calidad debe realizarse de manera minuciosa y siguiendo la técnica establecida para obtener resultados certeros que contribuyan a la investigación.
- En la elaboración del reactivo DPPH para determinar la capacidad antioxidante, una vez preparado se deben realizar mediciones consecutivas de absorbancias en el espectrofotómetro; hasta lograr un resultado constante que demuestra la estabilidad del reactivo.
- Al colocar tanto la sangre humanada como la solución de neutrófilos en los diferentes tubos, se lo debe realizar gota a gota en un ángulo de 45° para evitar que se dañen los neutrófilos.
- La colocación en la placa de micropocillos debe realizarse con mucho cuidado con cada reactivo y muestras utilizadas para obtener una correcta lectura del equipo.
- Exhortar a las autoridades competentes; los debidos materiales, reactivos y equipos a ser utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre Z. Yaguana C. Moreno B. Plantas medicinales de la zona andina de la provincia de Loja. Primera edición. Loja-Ecuador. 2014. pp. 20-22

Andrade-Cetto, a. y Heinrich, M., Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 99, no. 3, (2005) pp. 325-348. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2005.04.019.

Ávalos, A. y elena, G. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal* [en línea], vol. 2, no. 3, (2009) pp. 119-145. ISSN 1989-3620. DOI 1989-3620. Disponible en: <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>.

Ballester, I., *Relación estructura-actividad de los flavonoides como agentes antiinflamatorios intestinales.* (2006) pp. 23-26. S.l.: s.n. ISBN 9788433841070.

Bjarnason, I., et.al. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Gastroenterology* [en línea], vol. 154, no. 3, (2018.) pp. 500-514. ISSN 15280012. DOI 10.1053/j.gastro.2017.10.049. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.049>.

Borrero-Girón, I. Estudios de actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica de compuestos de origen natural. *Universidad de Sevilla*, (2016),pp. 1-38.

De la Torre L. Navarrete H. Muriel P. Macia M. Balslev H. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA. Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Primera edición. (2008) pp. 150-155.

Deble, L.P. Y Marchiori, J.N.C. Sinopse do gênero Gamochaeta Weddel (Asteraceae-Gnaphalieae) no Brasil. *Balduinia*, no. 10, (2014) pp. p-21. ISSN 2358-1980.

Enciso, E. y Arroyo, J. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *An Fac med*, vol. 72, no. 4, (2011) pp. 231-237.

Favela Hernández J. Aislamiento Y Caracterización De Los Compuestos Antibacterianos Y Antituberculosos De *Larrea Tridentata*, Determinación De Su Toxicidad Y Mecanismo De Acción Del Compuesto Más Activo. *Universidad Autónoma de Nuevo León*, (2012) pp. 5-6.

Gil, J.F.R., Gómez, M.B. y Trejos, J.S. Citotoxicidad y actividad anticancerígena de dos flavonoides aislados y purificados. *Vitae*, vol. 16, no. 1, (2009) pp. 93-101. ISSN 01214004.

Guija, E., Inocente, M., Ponce, J. y Zarzosa, E. Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, vol. 2, no. 1, (2015) pp. 0-4.

Moralez, J. et. al Control de la calidad de formulaciones farmacéuticas obtenidas de cassia uniflora mill. *Rev haban cienc méd* [en línea], vol. 10, no. 4, (2011) pp. 532-539. ISSN 1729519X. Disponible en: /scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lang=pt.

Martinez, M.J.A., Lazaro, R.M., Del Olmo, L.M.B. y Benito, P.B. Anti-infectious activity in the anthemideae tribe. *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 35, no. C, (2008) pp. 445-516. ISSN 15725995. DOI 10.1016/S1572-5995(08)80012-9.

Más Toro, D., et. al. Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales Preliminary analysis of secondary metabolites in mixed powders of leaves of medicinal plants. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 22, no. 1, (2017) pp. 1-9.

Miranda, M. Farmacognosia y productos naturales. (2006) La Habana Cuba.

Muszyńska, B., Grzywacz-Kisielewska, A., Kała, K. y Gdula-Argasińska, J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry* [en línea], vol. 243. (2017) pp. 373-381. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.09.149. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.149>.

Ochoa Pacheco, A., et.al. Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. Con acción antimicrobiana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, vol. 44, no. 1. (2013.) pp. 52-59. ISSN 10273956.

Osorio, A.M. De, Saul, D., Martinez, C. y Cardozo De Martinez, C.A. Citotoxicity in vitro study of the extract of a Colombian flora plant using One cell test. *Revista colombiana de biotecnologia*, vol. 6, no. 1, (2004) pp. 31-35.

Patricia, C., Camacho, C., Ancizar, F. y Gutierrez, A. Evaluacion preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales , empleando metodos colorimetricos. *Revista Colombiana de Biotecnologia*, vol. 4. (2014) pp. 100-106.

Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*, vol. 11, no. 4. (2011) pp. 195-211. ISSN 1609-1841.

Recasens, M., Ricart, W. y Fernández-Real, J. Obesidad e inflamación. *Rev Med Univ Navarra*, vol. 48. (2004) pp. 49-54. ISSN 0556-6177. DOI 10.1016/S0214-9168(06)73667-1.

Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J. y Navarro, V. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of*

Ethnopharmacology, vol. 74, no. 1. (2001) pp. 97-101. ISSN 03788741. DOI 10.1016/S0378-8741(00)00349-4.

Sandilands, E.A. y Bateman, D.N. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Medicine (United Kingdom)* [en línea], vol. 44, no. 3. (2015) pp. 185. ISSN 13654357. DOI 10.1016/j.mpmed.2015.12.022. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.12.022>.

Sepúlveda-Jiménez, G. Sepúlveda Jiménez , Gabriela; Porta Ducoing, Helena; Rocha Sosa, Mario. *Rev Mex Fitopatol* [en línea], vol. 21, no. 3. (2003) pp. 355-363. ISSN 0185-3309. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx>.

Sharma, A., Flores-Vallejo, R. Del C., Cardoso-Taketa, A. y Villarreal, M.L. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], vol. 208. (2016) pp. 264-329. ISSN 18727573. DOI 10.1016/j.jep.2016.04.045. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.045>.

Stewart, J.J.P. et al. Capítulo II. *Revista Cubana De Cardiología Y Cirugía Cardiovascular* [en línea], vol. 22, no. 1. (2014) pp. 61-104. ISSN 1989-3620. Disponible en: http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814%5Cnhttp://bvs.sld.cu/revistas/car/vol14_1_00/car08100.htm%5Cnhttps://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01134421%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10920275%5Cnhttp://riaa.unad.edu.co/PDF11/RIAA1_1_NC_M.

Tropicos.Org. Missouri Botanical Garden. (2018) Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/2741289>.

Terzi, M., et. al. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in neurological diseases. *Journal of Chemical Neuroanatomy* [en línea], vol. 87. (2017) pp. 12-24. ISSN 18736300. DOI 10.1016/j.jchemneu.2017.03.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.03.003>.

Valencia, P. Áncer, J. Patología. McGraw-Hill Interamericana de España S.L. Primera edición. (2011) pp.48-64

Veloz, A.I.R. I Perera, L.M.S. Plantas cubanas con efecto anti-inflamatorio. A: *Revista Cubana de Farmacia*. Vol. 49, núm. 1. (2015) p. 156-164. ISSN 15612988.

Valenzuela, G.,et. al. Relación entre actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en semillas de Cucurbita spp. *Dominquezia*, vol. 30, no. 1. (2014) pp. 19-24.

Vilela, A.E., González-Paleo, L. y Ravetta, D.A. Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: Mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología Austral*, vol. 21, no. 3. (2011) pp. 317-327. ISSN 03275477.

Yang, L., et. al. Novel enzyme formulations for improved pharmacokinetic properties and anti-inflammatory efficacies. *International Journal of Pharmaceutics* [en línea], vol. 537, no. 1-2. (2017) pp. 268-277. ISSN 18733476. DOI 10.1016/j.ijpharm.2017.12.030. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.030>.

Yin, et. al. Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*, vol. 10, no. 1. (2012) pp. 68-72. ISSN 14491907. DOI 10.7150/ijms.5256.

ANEXOS

Anexos A: Droga cruda



Gráfico 1A: Material vegetal (*Gnaphalium americanum* Mill)

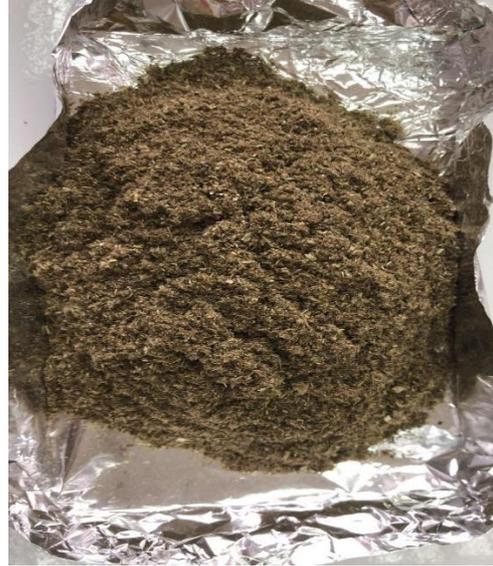


Gráfico 2A: *Gnaphalium americanum* Mill molido



Gráfico 3A: Tamizado del material vegetal



Gráfico 4A: Concentrado de la muestra

Anexos B: Control de calidad



Gráfico 1B: Determinación de sólidos totales



Gráfico 2B: Calcinación para determinar humedad



Gráfico 3B: Filtrado del extracto hidroalcohólico



Gráfico 4B: Desechado para la determinación de cenizas



Gráfico 5B: Medición del Índice de Refracción



Gráfico 6B: Medición de pH



Gráfico 7B: Secado del marco



Gráfico 8B: Filtrado del extracto etéreo



Gráfico 9B: Desechado de cenizas con adición de peróxido de hidrógeno



Gráfico 10B: Filtrado del extracto alcohólico



Gráfico 11B: Extracto acuoso



Gráfico 12B: Incineración en mufla de cenizas



Gráfico 13B: Pesada de la muestra para realizar cenizas



Gráfico 14B: Filtrado de los extractos para tamizaje



Gráfico 15B: Secado del marco de los extractos etéreo, acuoso y alcohólico

Anexos C: Tamizaje fitoquímico



Gráfico 1C: Ensayo de catequinas



Gráfico 2C: Ensayos para extracto alcohólico



Gráfico 3C: Ensayo de Liebermann-Bouchard



Gráfico 4C: Ensayos para extracto etéreo

Anexo D: Determinación de flavonoides, fenoles, antioxidante, anti-inflamatorio y citotóxico



Gráfico 1D: Reactivo Folin-Ciocalteu para cuantificar fenoles



Gráfico 2D: Peso del extracto liofilizado *Gnaphalium americanum* Mill para preparar las soluciones



Gráfico 3D: Preparación del reactivo Folin-Ciocalteu



Gráfico 4D: Disolución en agitador magnético

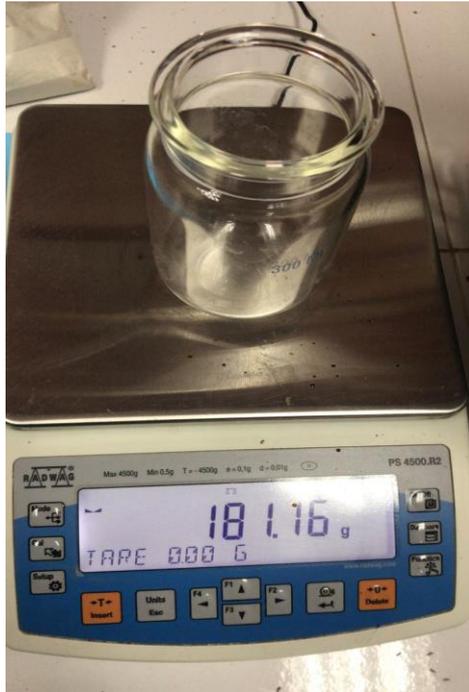


Gráfico 5D: Pesaje del vaso para realizar la liofilización del extracto hidroalcohólico



Gráfico 6D: Soluciones de *Gnaphalium americanum* Mill para determinar la actividad antioxidante.



Gráfico 7D: Cuantificación de fenoles totales



Gráfico 8D: Colocación de la solución sanguínea en tubo con Ficol

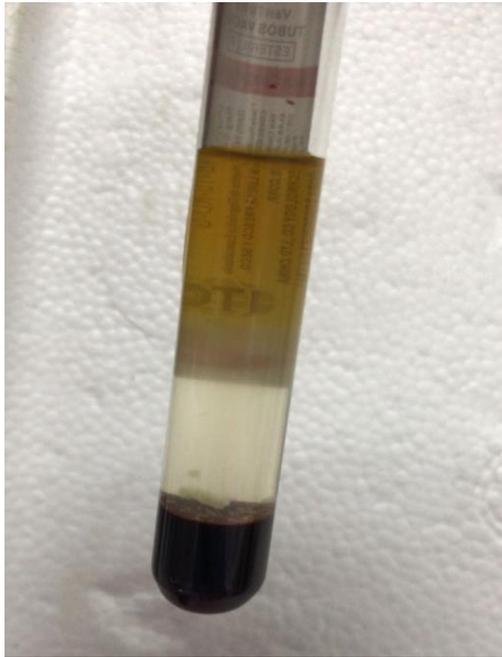


Gráfico 9D: Separación de las tres fases una vez centrifugado la solución sanguínea

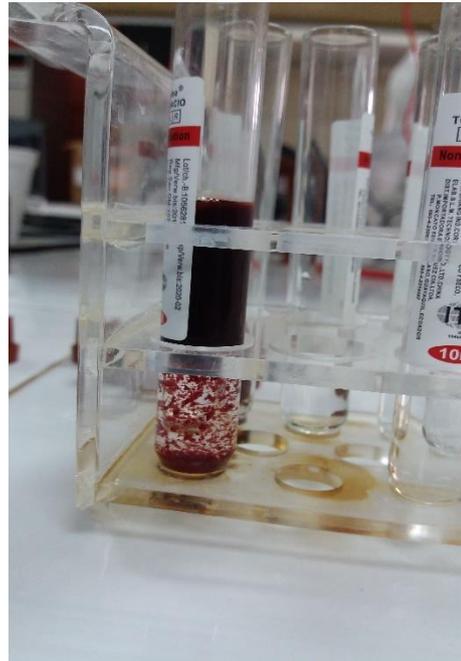


Gráfico 10D: Sedimentación de los eritrocitos



Gráfico 11D: Extracción de la sangre heparinizada

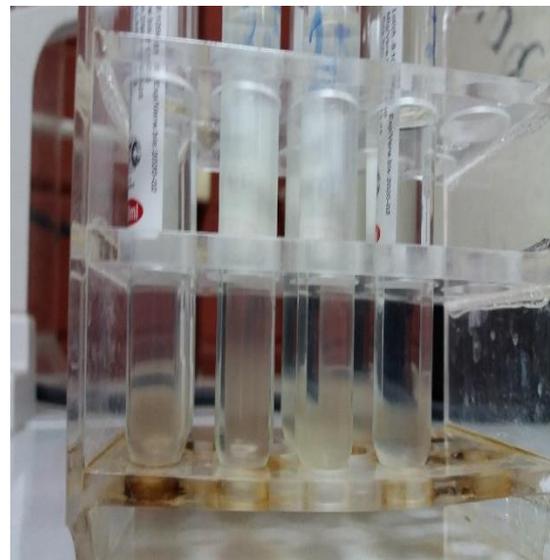


Gráfico 12D: Sedimentación de los neutrófilos una vez centrifugados



Gráfico 13D: Medición en espectrofotómetro

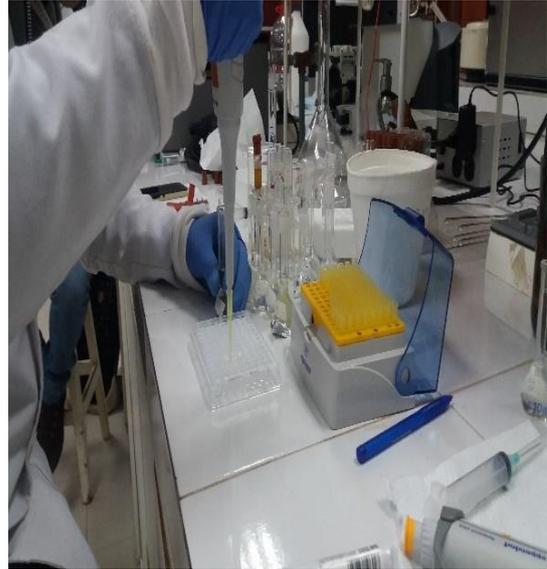


Gráfico 14D: Colocación en micropocillos

Anexo E: Curvas de calibración para cuantificación de Flavonoides y Fenoles

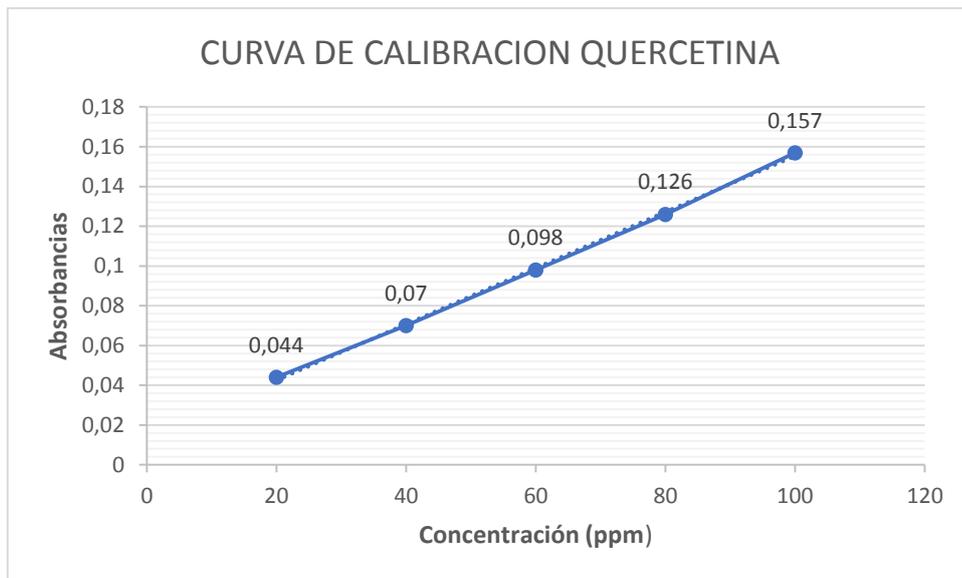


Gráfico 1E: Curva de calibración Quercetina

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

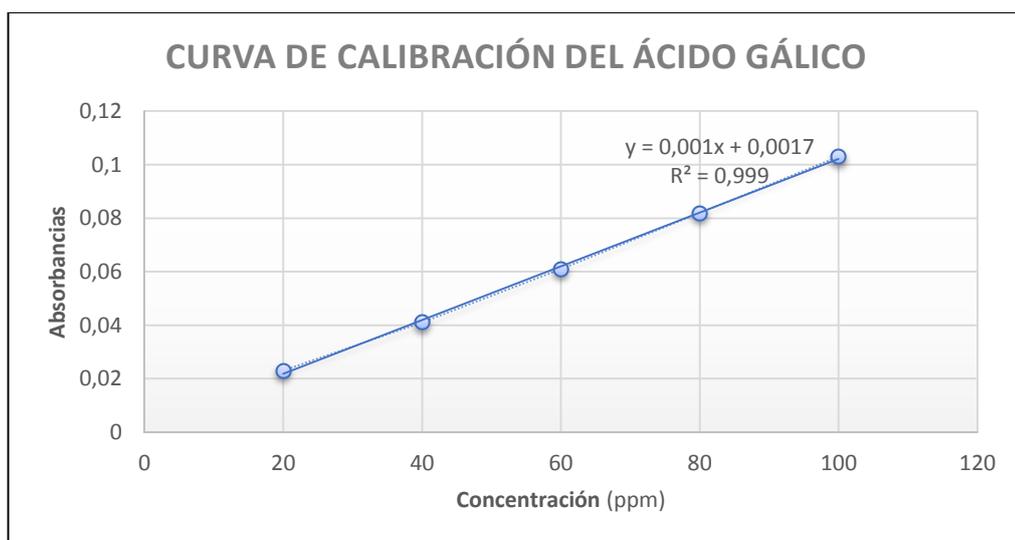


Gráfico 2E: Curva de calibración Ácido Gálico

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Anexos F: Análisis estadístico de la Actividad Anti-inflamatoria

Variable dependiente: Absorbancia

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	12734.407 ^a	9	1414.934	20.085	.000
Intersección	27117.127	1	27117.127	384.923	.000
Concentración.ppm	8819.629	4	2204.907	31.298	.000
FACTOR	3599.484	1	3599.484	51.094	.000
Concentración.ppm * FACTOR	315.294	4	78.823	1.119	.375
Error	1408.964	20	70.448		
Total	41260.498	30			
Total corregido	14143.371	29			

a. R al cuadrado = .900 (R al cuadrado ajustada = .856)

Gráfico 1F: Prueba de efectos inter-sujetos. Modelo lineal general. Anova

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

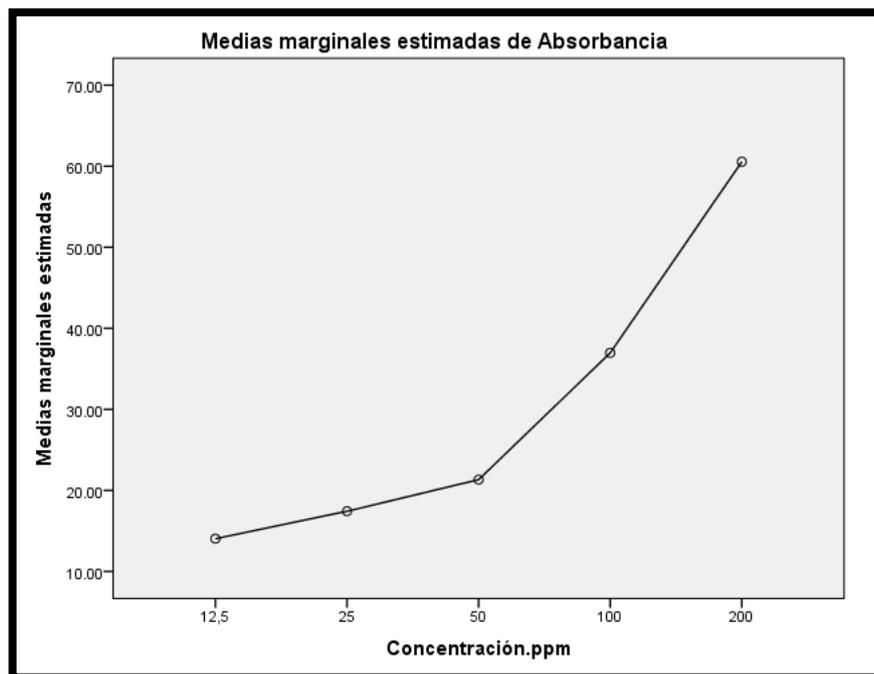


Gráfico 2F: Gráfico de la tabla Prueba de efectos inter-sujetos, Medias marginales estimadas vs Concentración. Anova

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

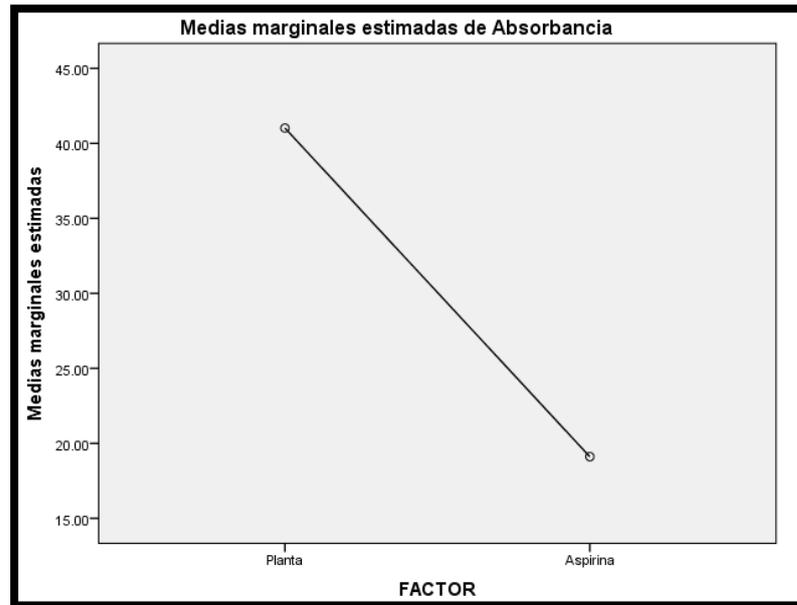


Gráfico 3F: Gráfico de la tabla Prueba de efectos inter-sujetos, Medias marginales estimadas vs Factor. Anova

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Absorbancia
N		30
Parámetros normales ^{a,b}	Media	30.0650
	Desviación estándar	22.08399
Máximas diferencias extremas	Absoluta	.125
	Positivo	.125
	Negativo	-.110
Estadístico de prueba		.125
Sig. asintótica (bilateral)		.200 ^{c,d}

Gráfico 4F: Prueba de Komogorov-Smirnov para determinar la Normalidad

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error^a

Variable dependiente: Absorbancia

F	df1	df2	Sig.
2.567	9	20	.038

Gráfico 5F: Prueba para determinar homogeneidad, Levene.

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Absorbancia	Se asumen varianzas iguales	.101	.754	3.092	28	.004	21.90733	7.08583	7.39267	36.42200
	No se asumen varianzas iguales			3.092	27.926	.004	21.90733	7.08583	7.39092	36.42374

Gráfico 6F: Prueba T-Student para determinar las diferencias

Realizado por: Jenny Lazo, 2018

Anexos G: Documentos legales

 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

Gráfico 1G: Contrato Marco de Investigación

Realizado por: Ministerio del Ambiente



PATENTE NO COMERCIAL DE MANEJO DE FLORA SILVESTRE

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

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

Datos Generales

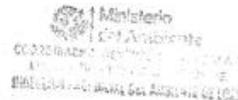
- 1.- Nombre de la empresa: **Herbario de la Universidad Nacional de Loja**
- 2.- Representante Legal: **Ing. Zhofre Aguirre Mendoza**
- 3.- Nacionalidad: **ecuatoriana**
- 4.- Domicilio legal: **Ciudadela Universitaria La Argelia.**
- 5.- Teléfono: **072547275**
- 6.- Domicilio: **Federico Chopín y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

Especificaciones

- 1.- Solicitud de Patente dirigida a la Dirección Provincial: **Ing. Zhofre Aguirre Mendoza Director del Herbario y Jardín Botánico "Reinaldo Espinosa".**
- 2.- Complementos autorizados de manejo: préstamo, donación e intercambio (exportación-importación), investigación, colección exhibición y educación.
- 3.- Contraparte institucional del Ministerio del Ambiente: **Dirección Provincial Ambiental Loja**
- 4.- Responsabilidad técnica delegada por el Ministerio del Ambiente: **Blga. Guadalupe Calle Cueva.**
- 5.- Duración: **1 año – del 12 de julio del 2018 al 11 de julio del 2019**
- 6.- **Obligaciones del beneficiario:**
 - 6.1.- Llevar un registro completo de actividades realizadas.
 - 6.2.- Presentar un informe anual para la renovación de la patente y aquella que fuera requerida Por la autoridad en el transcurso del año, incluyendo la planificación de trabajo para el próximo año.
 - 6.3.- Regirse a las disposiciones citadas al reverso del presente documento.
 - 6.4.- Facilitar información y permitir el acceso de los funcionarios del Ministerio del Ambiente a sus instalaciones para el respectivo control.

Ing. Víctor Hugo Domínguez Esparza

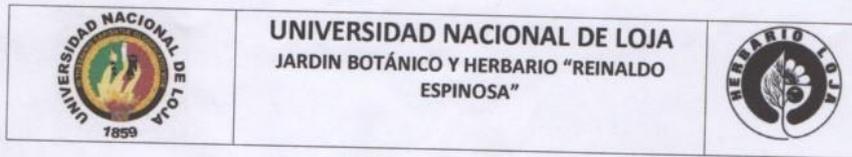
COORDINADOR GENERAL ZONAL- ZONA 7 (LOJA, EL ORO Y ZAMORA CHINCHIPE)
DIRECTOR PROVINCIAL DE LOJA (SUBROGANTE)



VHDE@gcc.ec



Gráfico 2G: Patente no comercial de manejo de flora silvestre
Realizado por: Ministerio del Ambiente



A QUIEN INTERESE/CORRESPONDA:

Certifico que en el herbario "Reinaldo Espinosa" –LOJA- de la Universidad Nacional de Loja, se ha realizado la identificación taxonómica de la planta denominada Lechuguilla, que corresponde a la especie *Gnaphalium americanum* Mill. de la familia Asteraceae, que consta en el catálogo de plantas vasculares del Ecuador y en las bases Tropicos y The Plant List.

Debo indicar que *Gamochoeta americana* (Mill) Wedd, es el sinónimo de *Gnaphalium americanum* Mill, siendo este último el nombre válido.

Lo certifico para los fines pertinentes.

Loja, 16 de marzo del 2018

A handwritten signature in blue ink, which appears to be "Zhofre Aguirre", is written over a circular stamp. The stamp contains the text "Herbario y Jardín Botánico U. N. L." and "Reinaldo Espinosa".

Ing. Zhofre Aguirre Mendoza Ph.D.
DIRECTOR DEL HERBARIO LOJA

Gráfico 4G: Certificado de identificación botánica
Realizado por: Herbario Loja