



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de los extractos vegetales de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*), obtenidos mediante secado por aspersión.

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación previa a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Erika Vanessa Moya Castillo

Tutor: MSc. Yunys Pérez Betancourt

Ambato- Ecuador

Julio 2017

APROBACIÓN DEL TUTOR

MSc. Yunys Pérez Betancourt

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 21 de junio de 2017



MSc. Yunys Pérez Betancourt

C.I. 175647274-0

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Moya Castillo Erika Vanessa manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniería Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

Ambato, 21 de junio de 2017



Srta. Erika Vanessa Moya Castillo

C.I. 180434365-3

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Ph. D Orestes López Hernández

C.I 175478486-4



Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

Ambato, 6 de julio de 2017

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.

Ambato, 21 de junio de 2017



Srta. Erika Vanessa Moya Castillo

C.I. 180434365-3

AUTOR

DEDICATORIA

A Dios y a mi Morenita

Porque la vida es una bendición y se torna aún más hermosa con la presencia de Dios en mi corazón, porque gracias a él he tenido las fuerzas necesarias para continuar en ese corto caminar por la vida.

A mis padres

Edgar y María Elena, lo más importante que tengo, agradezco cada instante en el que me han apoyado porque cada consejo y cada palabra de aliento han dado fruto.

A mi hermano

Juan Diego, cómplice y compañero que la vida me ha dado, sin duda el mejor.

A mi tío

Rodrigo Moya, mi segundo padre quién con su carisma me ha alentado a perseguir mis sueños

A mis cinco ángeles en el cielo, ellos han dejado un legado muy importante la humildad detrás de cada logro y la fuerza de carácter para enfrentar la vida.

Este trabajo es producto de tantos años de esfuerzo y constancia, no solo se debe a la vida académica sino a la formación personal que he tenido.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato, institución que me abrió sus puertas durante 6 años para adquirir los conocimientos y la experiencia necesaria.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que me permitió formarme profesionalmente.

A los docentes MSc. Yunys Pérez, Ph. D Orestes López, Ing. Dolores Robalino quienes con su paciencia y su tiempo fue posible el desarrollo de la presente investigación.

Expreso mi gratitud a personas importantes como Liliana Ortiz Mayorga, Ricardo Jara Silva y mis amigas, quienes me han acompañado en esta etapa de formación profesional.

Al Ministerio del Medio Ambiente que facilitó los trámites pertinentes en la obtención de los permisos, para trabajar de forma experimental con las hojas de Marco y Quishuar.

ÍNDICE GENERAL DE COTENIDOS

ÍNDICE GENERAL DE COTENIDOS	viii
INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
INDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA	3
1.1. Tema de Investigación.....	3
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo General.....	4
1.3.2. Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO II	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Antecedentes investigativos	6
2.1.1. Propiedades medicinales de las plantas	6
2.1.2. Marco (<i>Ambrosia arborescens</i>)	6
2.1.2.1. Clasificación taxonómica.....	6
2.1.2.2. Generalidades.....	7
2.1.2.3. Descripción botánica y hábitat.	7
2.1.2.4. Usos tradicionales.....	7
2.1.2.5. Composición Química.....	8
2.1.3. Quishuar (<i>Buddleja incana</i>).....	9
2.1.3.1. Clasificación Taxonómica.....	9
2.1.3.2. Generalidades.....	9
2.1.3.3. Descripción botánica y hábitat.	9
2.1.3.4. Usos tradicionales.....	10

2.1.3.5. Composición Química.....	11
2.1.4. Actividades Biológicas con experimentación <i>in vitro</i>	11
2.1.4.1 Actividad antioxidante	11
2.1.4.1.1. Mecanismo de acción de agentes antioxidantes	12
2.1.4.2. Actividad antiinflamatoria	12
2.1.4.2.1. Mecanismo de acción de medicamentos antiinflamatorios	13
2.1.4.3. Actividad Citotóxica	14
2.1.4.3.1. Mecanismos de acción citotóxica.....	14
2.1.4.4. Elementos fenólicos en actividades antiinflamatoria, citotóxica y antioxidante	15
2.1.5. Secado por Spray	15
2.2. Hipótesis	17
Hipótesis Nula.....	17
Hipótesis Alternativa	17
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis	17
2.3.1. Variables Independientes	17
2.3.2. Variables dependientes	17
CAPÍTULO III.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Materiales	18
3.2. Equipos	18
3.3. Reactivos	18
3.3.1. Preparación de extractos vegetales	18
3.3.2. Microencapsulación	19
3.3.3. Actividad Antioxidante.....	19
3.3.4. Actividad Antiinflamatoria	19
3.3.5. Actividad Citotóxica	19
3.4. Métodos	19
3.4.1. Recolección de material vegetal	19
3.4.2. Preparación del extracto vegetal	20
3.4.2.1. Obtención de material vegetal molido	20
3.4.2.2. Obtención de extracto vegetal líquido.....	20

3.4.2.2.1. Extracto acuoso	20
3.4.2.2.2. Extracto etanol: agua (50:50)	21
3.4.2.2.3. Extracto etanólico	21
3.4.3. Concentración de extractos líquidos	22
3.4.4. Determinación de humedad de extractos líquidos	22
3.4.5. Determinación de sólidos solubles totales (SST) de extractos líquidos	22
3.4.6. Secado de los extractos líquidos con Spray Dryer	23
3.4.7. Evaluación de Actividad Antioxidante	24
3.4.8. Evaluación de Actividad Antiinflamatoria	24
3.4.8.1. Solución de glóbulos rojos o eritrocitos al 40%	24
3.4.8.2. Determinación de la actividad antiinflamatoria por el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos o eritrocitos	25
3.4.9. Evaluación de Actividad Citotóxica	26
3.4.9.1. Método de Bradford (cuantificación de proteínas)	27
3.4.10. Análisis Estadístico	27
CAPÍTULO IV	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 Análisis e interpretación de resultados	28
4.1.1. Análisis fisicoquímico	28
4.1.1.1. Determinación de sólidos solubles totales (SST) de extractos líquidos	28
4.1.2. Actividades biológicas	31
4.1.2.1. Actividad antioxidante	31
4.1.2.2. Actividad antiinflamatoria	33
4.1.2.3. Actividad citotóxica	37
4.2. Verificación de Hipótesis	39
CAPÍTULO V	41
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
5.1. Conclusiones	41
5.2. Recomendaciones	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	54

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Rendimiento de sólidos solubles totales (SST) extraídos de las hojas de Marco y Quishuar.....	28
Tabla II. Actividad antioxidante de los extractos de Marco y Quishuar.....	31

INDICE DE FIGURAS

Figura I. Comparación de la actividad antiinflamatoria de los extractos vegetales de las hojas de Marco y del antiinflamatorio testigo la aspirina	34
Figura II. Comparación de la actividad antiinflamatoria de los extractos vegetales de las hojas de Quishuar y del antiinflamatorio testigo la aspirina.....	35
Figura III Determinación de concentración inhibitoria medio máxima (IC50) de los extractos vegetales de Marco.....	37
Figura IV Determinación de concentración inhibitoria medio máxima (IC50) de los extractos vegetales de Quishuar.....	38

INDICE DE ANEXOS

Anexo I recolección y proceso de secado de las hojas de Marco y Quishuar.....	54
Anexo II Proceso de molido de hojas secas de Marco y Quishuar	55
Anexo III Obtención de extractos vegetales líquidos de Marco y Quishuar. Evaporación del disolvente en el rotoevaporador y determinación de (SST) de los extractos	55
Anexo VIII Análisis estadístico de los extractos vegetales de Marco	60
Anexo IX Análisis estadístico de los extractos vegetales de Quishuar.....	61

RESUMEN

La utilización tradicional de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) por sus propiedades medicinales han sido principal fuente de investigación para avances científicos. Los extractos acuosos, hidroalcohólicos (50:50) y etanólicos de las hojas de Marco y Quishuar se sometieron a pruebas *in vitro* para la determinación de las actividades biológicas antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica. La determinación de la actividad antioxidante se basó en el método de quimioluminiscencia en el cuál el mejor tratamiento que presentó gran capacidad antioxidante fue el extracto hidroalcohólico (50:50) de Quishuar $180629,19 \pm 293,40$ μg ácido gálico/g extracto. La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante el método de estabilización de membrana de los eritrocitos humanos, el extracto etanólico de Marco tuvo 88,57 % de capacidad antiinflamatoria, en comparación con el antiinflamatorio testigo utilizado la aspirina, 87,66 %. La capacidad citotóxica se determinó mediante el método colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, sal de tetrazolio), utilizando células MCF-7. El extracto capaz de inducir a una apoptosis celular fue el extracto etanólico de Marco ya que en el ensayo se evidenció un índice de concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) de 0,0043 lo que indica que con esa mínima cantidad la toxicidad del extracto fue letal en las células. Con los resultados obtenidos se afirma que el disolvente utilizado en la extracción de metabolitos secundarios incide en las actividades biológicas de las plantas. Adicionalmente Marco y Quishuar al tratarse de plantas aborígenes de la región Sierra de los Andes Ecuatorianos están expuestas a factores extrínsecos como el clima, la temperatura, el viento y las precipitaciones que afectan la producción de metabolitos en las plantas.

Palabra clave

Secado por aspersion, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, actividad citotóxica, Marco (Ambrosia arborescens), Quishuar (Buddleja incana)

ABSTRACT

The traditional use of Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) for their medicinal properties has been the subject of research aimed at scientific advances. The watery, hydroalcoholic (50:50) and ethanolic extracts of Marco leaves were used in *in vitro* experimentation in order to determine antioxidant, antiinflammatory and cytotoxic biological activity. The concentration of antioxidant activity was determined using the chemiluminiscence method in which the best effective treatment was the hydroalcoholic extract (50:50) of leaves of Quishuar $180629,191 \pm 293,399 \mu\text{g}$ galic acid/g extract. The antiinflammatory activity was evaluated using the membrane stabilization method with human erythrocytes, in which the ethanolic extract of Marco leaves showed 88,57% of antiinflammatory capacity, in contrast to the antiinflammatory control using aspirin, measured at 87,66%. The cytotoxic capacity was determined with a colorimetric MTT method 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide using MCF-7 cells. With the ethanolic extract, a cellular apoptosis was produced, obtaining an IC50 of 0.0043. This evidences that with a minimal quantity of the extract, lethal toxicity levels were reached in the cells. The results obtained confirm that the disolvent used in the extraction of secondary metabolites affects the biological activities of the plants. In addition, Marco and Quishuar, being plants native to the Sierra region, are exposed to extrinsic factors such as climate, temperature, wind and rainfall that affect the production of metabolites in plants.

Keywords:

Spray drying, antiinflammatory activity, antioxidant activity, cytotoxic activity, Marco (*Ambrosia arborescens*) and Quishuar (*Buddleja incana*)

INTRODUCCIÓN

Los compuestos terapéuticos complejos que se utilizan como tratamiento de patologías pueden ser de origen natural o sintético (Lahiou, 2014).

Enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson son producidas por un desequilibrio de especies reactivas de oxígeno (ERO) que originan el estrés oxidativo. El tratamiento farmacológico es indispensable para mejorar los síntomas de la enfermedad, pero el uso de fármacos sintéticos causan efectos secundarios como la hipotensión, vómito, alucinaciones (R. García, 2016).

El cáncer es una enfermedad que implica una proliferación celular anormal de manera descontrolada y la quimioterapia es el tratamiento indicado para combatir ésta enfermedad. Este tipo de patologías usan medicamentos de origen sintético. Los fármacos citotóxicos pueden producir depresión de la médula ósea y del sistema inmunológico, además de aumentar la susceptibilidad a procesos infecciosos, entre otros (OMS, 2004).

Un proceso inflamatorio suele tratarse con medicamentos antiinflamatorios no esteroideos o corticoides, pero este tipo de fármacos causan efectos adversos como desarrollo de la hipertensión, problemas digestivos y aumento en el deterioro de los huesos (Velázquez, Guyat, Manzanares, Aguirre, & Gelabert 2014).

En las últimas décadas se ha puesto énfasis en la fitoterapia es decir en la utilización de productos farmacéuticos de origen natural a partir de plantas medicinales porque producen menos efectos secundarios sobre la salud de quienes los consumen (Pérez & Hernández, 2014).

La región Andina del Ecuador tiene gran diversidad de plantas endémicas que son la principal fuente para la medicina tradicional. Entre las plantas que se localizan en la región sierra están Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) con propiedades medicinales reconocidas por los pobladores de la región. Marco es utilizada por sus cualidades para aliviar la migraña, dolores de cabeza y disminuye la inflamación de lesiones producidas por golpes (Correa, J, & H, 1990).

Quishuar tiene usos medicinales empíricos para tratamiento antirreumático (Reynel, 2009).

El objetivo de este trabajo es enfocarse en la determinación *in vitro* de las actividades biológicas antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de Marco y Quishuar, para tener un fundamento científico que respalde su utilización para la biosíntesis de productos farmacéuticos.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de Investigación

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE MARCO (*Ambrosia arborescens*) Y QUISHUAR (*Buddleja incana*), OBTENIDOS MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN.

1.2. Justificación

Las plantas tienen propiedades y aplicaciones específicas, el uso de plantas como medicina natural tradicional es una excelente alternativa para el tratamiento o curación de enfermedades, puesto que es el principal recurso de poblaciones ancestrales. Entre las plantas endémicas del Ecuador localizadas en la región andina del Ecuador se distinguen principalmente el Marco (*Ambrosia arborescens*) y el Quishuar (*Buddleja incana*). Estas plantas generalmente son subutilizadas, es decir son cultivadas sin fines comerciales. Por sus usos tradicionales en la medicina se ha visto la necesidad de realizar investigaciones que contribuyan con la descripción de los principios activos y otros compuestos fitoquímicos característicos de las plantas en estudio. La investigación científica servirá como fundamento para una posterior aplicación en formulaciones farmacológicas, de tal manera que en el mercado se expendan medicamentos de origen natural con la finalidad de mejorar la calidad de vida de los consumidores, ya que sus principales beneficios son los escasos efectos adversos que puedan provocarse por su ingesta. Además se generará un impacto económico positivo en las poblaciones que se dedican al cultivo silvestre de estas plantas ya que se convertirán el sector productor de materia para la industria farmacéutica. Su cultivo debe tener un sistema de desarrollo sustentable, de tal manera que sea factible su conservación en el medio ambiente.

El presente proyecto es innovador porque no hay investigaciones realizadas sobre la actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica de las planta de Quishuar que describan las propiedades de los principios activos, en cambio sí se han reportado trabajos de investigación *in vitro* con extractos vegetales de la hoja de Marco en los que se ha verificado la actividad citotóxica de sus componentes fitoquímicos, sin embargo no se han encontrado trabajos de investigación que sobre la actividad antiinflamatoria y antioxidante de dicha planta, que contribuyan con un fundamento de investigación *in vitro*.

1.3.Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica *in vitro* de los extractos vegetales de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*), obtenidos mediante secado por aspersión.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Obtener extractos vegetales secos de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) mediante la tecnología de spray dryer o secado por aspersión.
- Determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos vegetales de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) mediante el método de estabilización de la membrana de los eritrocitos.
- Cuantificar la actividad antioxidante de los extractos vegetales Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) mediante la reacción de foto-quimioluminiscencia.

- Determinar la actividad citotóxica de los extractos vegetales de la planta de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) con el uso del colorante MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, sal de tetrazolio).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

2.1.1. Propiedades medicinales de las plantas

Las plantas por sus innumerables propiedades son indispensables para mejorar la medicina moderna. Los extractos de las plantas medicinales se utilizan como drogas para aliviar sintomatologías patológicas que pueda presentar un ser humano o un animal (Cruz, 2009). Los productos del metabolismo secundario de las plantas son los principios activos los cuales proporcionan beneficios de prevención o curación con efecto fisiológico en el organismo (Carvajal & Quintero, 2012). Las infusiones y demás preparaciones caseras con plantas medicinales contienen principios activos que desempeñan su función una vez que hayan sido ingeridos (Estrada, 1985).

2.1.2. Marco (*Ambrosia arborescens*)

2.1.2.1. Clasificación taxonómica

Según Vera (2008) menciona que la clasificación taxonómica de Marco es:

Reino: Plantae

Phylum: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Ambrosia*

Epíteto Específico: *arborescens*

Especie: *Ambrosia arborescens*



2.1.2.2. Generalidades

Nombres comunes: Marku, altamira, mano de marco, marco (castellano)
(De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008)

Hábito: subarbusto.

Origen: nativa.

Etnias: Kichwa de la Sierra, Mestiza.

2.1.2.3. Descripción botánica y hábitat

Ambrosia arborescens es un arbusto campestre de color verde que mide 1,5 a 3 metros de altura, está cubierto por pubescencia sedosa de color plateado. Sus hojas miden 10-20 cm de largo y 7-18 cm de ancho con margen sectado. Las características de la cara superior de las hojas de la planta es glabrascente, y cara inferior es albescente; el peciolo mide 2-3 cm de longitud (Gupta, 1995).

Este arbusto crece en los páramos de la región interandina del Ecuador sobre los 2000-3500 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (Naranjo, 2010). Generalmente se desarrolla como matorral en los bordes de los caminos, alrededor de los huertos y cultivos, en acequias de regadío y riberas de ríos (Sotta, 2000).

2.1.2.4. Usos tradicionales

El Marco está clasificado dentro de la familia *Asteraceae*, que son plantas aromáticas con cualidades medicinales conocidas entre las poblaciones de la región. Se pueden mencionar los beneficios de sus usos para contrarrestar el estreñimiento, alteraciones de la próstata, aliviar migrañas y dolores de cabeza, efectivo para disminuir lesiones internas producidas por golpes y fracturas (Correa et al., 1990). Las poblaciones ancestrales realizaban ungüentos grasos para ser aplicados como tratamiento antirreumático y antiinflamatorio (Palacios, 1997).

Las etnias culturales locales de la región emplean las hojas con varios propósitos como evitar la formación de llagas y úlceras, propiciar la labor de parto. Además es eficiente para regular la presión arterial porque posee aceites esenciales con

propiedades hipotensoras. Un uso común es la maceración de la planta ya que sirve con anestésico para aliviar los síntomas de picazón de los granos sarampión (De la Torre et al., 2008).

Las ramas y las hojas de Marco se emplean eliminar microorganismos inferiores como moscos, pulgas, piojos debido a la gran toxicidad de sus componentes fitoquímicos tienen propiedades insecticidas (De la Torre et al., 2008). Para desarrollar una agricultura sustentable con un porcentaje mínimo de contaminación, los agricultores han considerado el uso de esta planta para contrarrestar las plagas comunes de huertos y cultivos (Vera, 2008). Frecuentemente las hojas de marco junto con el eucalipto, la santa maría y la ortiga se usan para tratar el “mal aire” (Ibarra & Paredes, 2013).

2.1.2.5. Composición Química

Análisis fitoquímicos del extracto de *Ambrosia arborescens* manifiestan la presencia de aminoácidos libres, alcaloides, antraquinonas, azúcares reductores, flavonoides, taninos (Alvarado, 2007).

La composición química de las hojas de Marco describe la presencia de una diversidad de monoterpenos en especial la crisantenona, un monoterpeno oxigenado, que se encuentra en un porcentaje alrededor de un 20,9 %. Además poseen cinco lactonas sesquiterpénicas: la psilostaquina C, dihidrocoronofilina, psilostaquina, coronofilina y la damsina (Vera, 2008). Esta última lactona tiene actividad antitumoral y moluscicida (Cruz, 2009). Experimentos publicados demuestran que la damsina y la coronopilina tienen efectos inhibitorios sobre la proliferación celular y la biosíntesis de ADN, considerándose base fundamental para el descubrimiento y desarrollo de medicamentos eficaces para el tratamiento contra el cáncer (Villagomez et al., 2013).

Las plantas tienen mecanismos de defensa ante la presencia de insectos y microorganismos patógenos debido a su actividad oleopática (Naranjo, 2010). Los sesquiterpenos, hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados se encuentran en el aceite esencial de Marco (Gupta, 1995). La toxicidad característica

del marco se debe a la presencia de sesquiterpenos y monoterpenos, como las tuyonas (Vera, 2008). Estudios toxicológicos han demostrado que la sobredosis de tuyona es letalmente tóxica para el cerebro y el hígado (Bravo, 2014).

2.1.3. Quishuar (*Buddleja incana*)

2.1.3.1. Clasificación Taxonómica

Según Reynel (2009) la clasificación taxonómica de Quishuar es:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Scrophulariaceae

Tribu: Buddlejeae

Género: *Buddleja*

Especie: *Buddleja incana*



2.1.3.2. Generalidades

Nombres comunes: Quiswar orcko, quiswar china.

2.1.3.3. Descripción botánica y hábitat

Es un árbol mediano que mide aproximadamente entre 3-12 m de altura, de tronco robusto y frondoso. Sus hojas son alargadas y simples, tienen una longitud de 10-12 cm, y 2-2,5 cm de ancho, el envés está completamente cubierto por pequeños

pelos que le atribuyen un color blanco y aspecto afelpado. Posee pequeñas flores agrupadas en racimos (Reynel, 2009).

Buddleja incana comúnmente llamado “Quishuar” es un árbol autóctono de la región interandina y crece en zonas de dispersión ubicadas entre 2200-3500 m.s.n.m. en mayor proporción se la encuentra en la cordillera oriental y occidental. Tiene un desarrollo lento, se regenera con facilidad cuando es ramoneado por el ganado o cuando una de sus partes es talada para ser utilizado como leña (M. Gómez, 2007). Entre los años 1980 y 1990 se evidenció una reducción marcada de la cobertura de esta especie por lo que se crearon programas de reforestación para el Quishuar, con la finalidad de propagarlo en las regiones centro y sur del país. Obteniendo resultados positivos ahora ésta especie se encuentra fuera de peligro (Reynel, 2009).

2.1.3.4. Usos tradicionales

Quishuar es una planta con cualidades medicinales utilizada de manera tradicional para el tratamiento de enfermedades de la piel, papilomatosis cutánea y con análisis *in vivo* se ha demostrado su efecto antiinflamatorio en gastritis (Tasayco, Vasquez, Loarte, & Palomino, 2008). En el caso del tratamiento de heridas con infecciones se emplean las hojas tiernas del Quishuar (Sotta, 2000). La infusión acuosa de las ramas de la planta se utiliza de manera empírica como antirreumático. Actualmente se tienen otros beneficios por sus propiedades antimicótico, antibacteriana y antioxidante. Varias investigaciones *in vivo* utilizando ratones como biomodelos de investigación y demuestran su actividad antioxidante de las hojas de Quishuar, ya que es regenerador cutáneo al inhibir COX-2 (Reynel, 2009).

Tiene una particular aplicación en el teñido de textiles ya que de las flores de la planta se extrae un tinte de color amarillo. La construcción de cercos para huertos y cultivos agrícolas con la madera de Quishuar favorece la protección ante las adversidades climáticas de la región andina, las heladas y el viento. También significa un aporte para mejorar la eficiencia de protección de los suelos (Reynel &

León, 1990). Adicionalmente su madera es usada tradicionalmente como carbón y leña (Reynel, 2009).

2.1.3.5. Composición Química

Algunas plantas de la especie *Buddleja* han sido investigadas *in vitro* en el laboratorio cuyos resultados han aportado con la identificación de algunos metabolitos secundarios como: triperpenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides en escasas cantidades (Avila et al., 2005) y antiocianidinas (Vieira et al., 2009). Se ha demostrado que los principios activos anteriormente mencionados tienen actividad antiinflamatoria. Adicionalmente la presencia de terpenoides y compuestos fenólicos otorgan una actividad antioxidante (Avila et al., 2005).

Investigaciones en otras plantas de la especie *Buddleja* reportan que los flavonoides, compuestos verbascósidos y el linarin extraídos de *Buddleja scordioides*, tienen una propiedad fotoprotectora contra los rayos ultravioletas. Los compuestos verbascósidos presentan una propiedad antiinflamatoria y antioxidante (Santos et al., 2012).

2.1.4. Actividades Biológicas con experimentación *in vitro*

2.1.4.1 Actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) que se producen de manera exógena son primordiales en la activación o inactivación de biomoléculas, producción de energía y regulación metabólica (Echavarría, Franco, & Martínez, 2009). Si existe un desequilibrio en la producción de ERO hacia la sobreproducción, se origina el estrés oxidativo (Sies, 1997). El estrés oxidativo puede producir algunas afecciones en el funcionamiento normal de una célula como alterar el código genético, ruptura de la pared celular, activar o inactivar biomoléculas esenciales como las enzimas. Todas estas alteraciones han sido evidenciadas en investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo* con biomodelos de experimentación (Nakamura, Nakamura, & Yodoi, 1997).

2.1.4.1.1. Mecanismo de acción de agentes antioxidantes

El exceso de producción de especies reactivas de oxígeno atacan a lípidos, proteínas y ADN de las células y se desencadenan varias reacciones químicas que causan alteraciones fisiológicas (Juránek & Bezek, 2005). Los antioxidantes protegen a la célula frente al daño de los radicales libres, de manera que son fuentes de hidrógeno y se oxidan en lugar de los componentes celulares mencionados (M. García, Quintero, & López, 2000). Enfermedades como la cirrosis, VIH, Parkinson y artritis son consecuencia del desorden en la producción de ERO, esto se ha comprobado con diversas investigaciones *in vivo* en ratones de experimentación (Pincemail, 1995)

En el mecanismo de defensa antioxidante están involucrados componentes enzimáticos y no enzimáticos que en conjunto protegen a las células. En el elemento enzimático forman parte las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, la epóxido hidrolasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (B. Ruíz, 2009) que permiten la cesión de electrones del sustrato hacia los radicales libres para impedir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Yu, 1994). Los componentes no enzimáticos son partículas hidrófobas e hidrofílicas como el ácido úrico, bilirrubina, ubiquinol, glutatión y algunos carotenoides tales como la vitamina , vitamina E, vitamina C (B. Ruíz, 2009). La función de estos componentes consiste en atrapar los radicales libres, cederles un electrón y provocar la desintegración de las ERO para disminuir la concentración de partículas más perjudiciales para las células (Holben & Smith, 1999). Los principales ERO son el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Yu, 1994).

2.1.4.2. Actividad antiinflamatoria

La inflamación es un proceso inmunológico que lleva a cabo interacciones moleculares, vasculares y celulares con la segregación de citocinas pro-inflamatorias (Torres, 2011) en respuesta a lesiones biológicas, químicas y físicas (Bórdes, Martínez, García, & R., 2010). En la medicina tradicional es frecuente la utilización de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades

inflamatorias como la artritis, reumatismo, arteriosclerosis y cáncer (P. García, 2008).

Las enfermedades inflamatorias afectan al tejido conjuntivo vascularizado, lo cual perjudica a las células y por lo tanto a las membranas lisosomales (De Alvear, 1992). Los lisosomas son orgánulos que se forman en el retículo endoplasmático, contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas, con la función de degradar sustancias y moléculas orgánicas que ingresan a la célula por medio de los procesos de fagocitosis o endocitosis para permitir la digestión celular (Chávez, Arenas, Sada, & Lascurain, 2009). En un proceso inflamatorio los lisosomas de la célula tienen una estimulación por parte de factores quimiotácticos o un almacenamiento excesivo de elementos cristalinos fagocitados como es el caso de uriato que no pueden ser digeridos, causando una ruptura de la membrana lisosomal por ende la liberación del contenido enzimático en el citosol y finalmente ocasiona la lisis celular (Bermejo, M., & Bedoya, 2014).

Los beneficios que ofrecen las sustancias antiinflamatorias de procedencia vegetal son evidentes porque los efectos colaterales de su consumo son mínimos, en comparación con medicamentos sintéticos (H. Gómez, Gonzalez, & Medina, 2011).

2.1.4.2.1. Mecanismo de acción de medicamentos antiinflamatorios

Los medicamentos contienen compuestos fenólicos que son elementos que protegen las células frente a condiciones de estrés como las infecciones, las lesiones y la excesiva exposición a la luz ultravioleta (Harbone & Baxter, 1999). La membrana de los glóbulos rojos o eritrocitos es similar a la membrana del lisosoma por lo que la estabilización de la membrana eritrocitaria es primordial para disminuir la respuesta frente al proceso de inflamación y por lo tanto evitar la liberación de elementos lisosómicos como las enzimas proteasas y bactericidas que producen una inflamación más severa en los tejidos adyacentes (Kumar, Bhat, Kumar, Bohra, & Sheela, 2011). Esto es posible mediante la estabilización de las proteínas en especial el colágeno que compone la membrana basal de la célula, dándole propiedades de resistencia frente a la degradación proteolítica (Caltagirone et al., 2000).

2.1.4.3. Actividad Citotóxica

El cáncer es una enfermedad que implica una proliferación celular anormal de manera descontrolada afectando los procesos fisiológicos y bioquímicos indispensables para el crecimiento celular. A nivel celular causa alteraciones en el ADN tanto en la transcripción, síntesis y reparación. La inestabilidad de estos procesos otorga a la célula maligna la capacidad de producir metástasis en órganos y tejidos adyacentes (Kufe et al., 2003). Las células cancerígenas van evolucionando y alcanzan un genotipo y fenotipo determinado que ayuda a la identificación, pronóstico y tratamiento del cáncer (Hanahan, 2000).

2.1.4.3.1. Mecanismos de acción citotóxica

La quimioterapia consiste en el uso de fármacos que sean capaces de contrarrestar el cáncer para lo cual se necesitan investigaciones que identifiquen el tipo y la localización del tumor. El mecanismo de acción de los medicamentos es el incremento de la apoptosis celular y la activación de procesos de reparación del ADN (Skeel, 2000).

Se han realizado pruebas *in vitro* con la finalidad de verificar y fundamentar la actividad antitumoral de distintas plantas que se emplean de manera tradicional para el tratamiento contra el cáncer. La metodología consiste en exponer líneas celulares de biopsias de tumores en extractos que van a ser evaluados para determinar su actividad citotóxica (Cortés, 2005). Una técnica aplicada en farmacología para medir cuantitativamente la eficacia de un medicamento es la Concentración Inhibitoria medio-máxima (IC50), que indica la cantidad de un determinado fármaco para la inhibición de un proceso biológico (Sebaugh, 2011). La actividad citotóxica de un extracto vegetal es evaluada por su efectividad en la disminución de la mitad del número de células desde que inicia hasta que termina el experimento (Irwin, Jelic, & Antolovic, 2008).

Reportes de publicaciones científicas mencionan que la coronopilina extraída de *Ambrosia arborescens*, tiene un efecto inhibitorio contra células de la leucemia con un IC50 de $\leq 20 \mu\text{m}$ desencadenando apoptosis celular (Cotugno et al., 2011)

2.1.4.4. Elementos fenólicos en actividades antiinflamatoria, citotóxica y antioxidante

Los compuestos fenólicos que se obtienen a partir de extractos vegetales presentan actividad antioxidante, contribuyen de manera preventiva para evitar enfermedades causadas por alteraciones inmunológicas. Los polifenoles, los flavonoides y los ácidos fenólicos son los compuestos más distinguidos de este grupo (Ochoa, Claudia, Ayala, & Alfredo, 2011).

En el reino vegetal existe una gran diversidad de polifenoles que forman parte de los productos del metabolismo secundario de las plantas. Algunos estudios han notificado que los polifenoles tienen relación con la actividad citotóxica (Quideau, 2011).

Elementos fenólicos como los flavonoides actúan en las fases de la carcinogénesis debido a la actividad antiangiogénica (Middleton, Kandaswami, & Theoharides, 2000). En resultados de experimentación *in vivo* se han identificado algunos flavonoides que incrementan las posibilidades de supervivencia de los animales en condiciones de metástasis pulmonares (Fernández et al., 2007). Tienen actividad para inhibir la proliferación celular evitando daños en el ADN y en enzimas específicas como fosfodiesterasas, kinasas y fosfolipasas (Erhart et al., 2005). También poseen actividad quimioprotectora (Middleton et al., 2000), y propiedades antioxidantes (Kameoka, Leavitt, Chang, & Kuo, 1999). Adicionalmente varias evidencias científicas afirman el poder inhibitorio de los flavonoides sobre enzimas que actúan en procesos antiinflamatorios (V. García et al., 2007).

2.1.5. Secado por Spray

El secado por aspersión es una tecnología muy empleada en las industrias porque permite obtener partículas en polvo microencapsuladas con una alta estabilidad a partir de soluciones líquidas. En el secado por spray la sustancia inicial de alimentación que puede ser una emulsión, una suspensión o una solución, pasa por un flujo de gas caliente y de manera inmediata se obtiene un fino polvo 10-50 μm , (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007). Las características de

las partículas del polvo dependen de las propiedades del material alimentado y de además de las condiciones de las operaciones unitarias de este proceso como: la temperatura, presión, flujo de corriente, tipo de atomizador empleado (Ferrari, Marconi, & De Aguirre, 2011).

Uno de los principales beneficios de emplear esta tecnología es la utilización de parámetros de temperatura controlados en el proceso, de tal manera que es apto para productos que son susceptibles a altas temperaturas, además de tiempos corto de producción (Ahmed, Akter, Lee, & Eun, 2010). Con el secado por aspersion se mejora la estabilidad de los principios activos microencapsulados obtenidos de los extractos vegetales (Esquivel, Ochoa, & Rutiaga, 2015), esta técnica evita la pérdida de compuestos volátiles y favorece la prolongación de la durabilidad producto (Medina et al., 2013).

2.2. Hipótesis

2.2.1. El disolvente utilizado para la extracción de principios activos de las plantas Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) incide en las actividades biológicas antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica.

Hipótesis Nula

El disolvente utilizado para la extracción de principios activos de las plantas Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) no incide en las actividades biológicas antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica.

Hipótesis Alternativa

El disolvente utilizado para la extracción de principios activos de las plantas Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) si incide en las actividades biológicas antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica.

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1. Variables Independientes

Disolventes utilizados

- Agua destilada
- Agua destilada: Etanol 99,9% (proporción 50:50)
- Etanol 99,9%

2.3.2. Variables dependientes

Actividades biológicas

- Antioxidante
- Antiinflamatoria
- Citotóxica

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Fundas herméticas, papel aluminio, lienzo, vasos de precipitación de 1000, 500 y 250 ml (PYREX \pm 0,05 ml), probetas graduadas de vidrio de 1000, 500 y 100 ml (Boro 3.3 \pm 0,01 ml), agitador magnético, frascos ámbar de 1000 ml, tubos tapa rosca de 15 y 25 ml, varilla de agitación, gradilla plástica, tubos plásticos de centrífuga, micropipetas de 100–1000 μ L, balones de aforo de 1000 y 100 ml (\pm 0,01 ml), jeringuillas de 5 ml, balón rotaevaporador (IKA RU8, USA), celdas plásticas de 1 ml para espectrofotómetro.

3.2. Equipos

Secador de Bandejas (GANDER MTN, China), licuadora (OSTER), balanza analítica (OHASUS, PA214), balanza de Humedad (KERN MLS 50-3), plancha de calentamiento con agitador magnético (Super Nouva Multiplace, Thermo Scientific), refrigeradora, rotaevaporador (IKA RU8, USA), baño María (IKA, USA), spray dryer (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290, Switzerland), centrífuga (Hettich Zentrifugen, Germany), espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000, Germany), vortex (Fisher Scientific, USA), microscopio óptico (Meiji Techno, Japón), cámara de flujo laminar (Thermo Scientific Fisher, USA), incubadora de CO₂ (Thermo Scientific Fisher, USA), lector microplaca de ELISA (Victor X3, PerkinElmer)

3.3. Reactivos

3.3.1. Preparación de extractos vegetales

Etanol 99,9 % grado analítico (EMSURE, USA), agua destilada.

3.3.2. Microencapsulación

Maltodextrina y goma arábiga calidad farmacéutica.

3.3.3. Actividad Antioxidante

Luminol (Western Blotting Luminol Reagent Sc- 2048), Sulfato ferroso (FeSO_4) (Hierro II sulfato heptahidratado, ERBApharm), Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (ACS Reagent Grade, Ricca Chemical), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Sigma).

3.3.4. Actividad Antiinflamatoria

Sangre de pacientes voluntarios sanos que no consuman medicamentos antiinflamatorios, aspirina (ácido salicílico de 500 mg) (Bayer), solución tampón fosfato (PBS) pH 7.4 (Thermo Scientific Fisher, USA), tubos con anticoagulante EDTA (MONOJECT, USA)

3.3.5. Actividad Citotóxica

Línea celular de cáncer de mama (MCF-7 ATCC) para su conservación y almacenamiento se utilizó nitrógeno líquido. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), filtros estériles (MILLEX –GP Syringe Filter Unit 0,22 μm), reactivo Docedil Sulfato de Sodio (SDS)-HCl al 0,01%, medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco™ DMEM, Thermo Fisher Scientific)

3.4. Métodos

3.4.1. Recolección de material vegetal

En las zonas de la región andina se recolectaron las hojas de las plantas, Quishuar se la localizó en los páramos a 3540 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) en la

Comunidad San José del Guanto, y Marco a 2920 m.s.n.m. en Pueblo Viejo en el cantón Quero provincia de Tungurahua.

3.4.2. Preparación del extracto vegetal

3.4.2.1. Obtención de material vegetal molido

El material vegetal recolectado se lavó con agua corriente las veces que fueron necesarias para eliminar las impurezas y sustancias extrañas, seguido de esto aproximadamente 6 kg del material vegetal limpio, se colocaron en el secador de bandejas (GANDER MTN, China) a una temperatura de 60 °C hasta que se encontraron completamente secas. Se molieron las hojas secas en la licuadora (OSTER) y se guardaron en fundas plásticas herméticas y se almacenaron en un lugar seco. La materia vegetal molida se pesó en una balanza analítica (OHASUS, PA214) cuyo peso se registró antes de empezar con la extracción utilizando los disolventes establecidos, agua y etanol.

3.4.2.2. Obtención de extracto vegetal líquido

3.4.2.2.1. Extracto acuoso

Para la obtención de los extractos acuosos se pesaron 66,7 g del material vegetal molido y se mezcló con 1000 ml de agua destilada (proporción 1/15) contenido en un vaso de precipitación de 1000 ml (PYREX \pm 0,05 ml), además se utilizó un agitador magnético para que la mezcla del vaso de precipitación tenga una agitación constante. Se colocó en una plancha de calentamiento con agitación (Super Nouva Multiplace, Thermo Scientific) a 100 °C y 800 rpm, hasta que la mezcla alcanzó la temperatura de ebullición, se mantuvo en estas condiciones durante 30 minutos. La mezcla caliente se filtró a través de un lienzo para eliminar lo sólidos y el extracto líquido se guardó en una botella ámbar de 1000 ml rotulada respectivamente, almacenándolo en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

3.4.2.2.2. Extracto etanol: agua (50:50)

Para la obtención de los extractos etanol: agua en una proporción 50:50 de los disolventes, se pesaron 66,7 g del material vegetal molido y se mezclaron con 500 ml de agua destilada y 500 ml de etanol al 99,9 % grado analítico (EMSURE, USA) resultando una proporción 1/15 con respecto al material vegetal. La mezcla se colocó en un vaso de precipitación de 1000 ml (PYREX \pm 0,05 ml) y se utilizó un agitador magnético para que la mezcla del vaso de precipitación tenga una agitación constante. Se colocó en una plancha de calentamiento con agitación constante (Super Nouva Multiplace, Thermo Scientific) a 100 °C y 800 rpm, hasta que la mezcla alcanzó la temperatura de ebullición, se mantuvo en estas condiciones durante 30 minutos. La mezcla caliente se filtró a través de un lienzo para eliminar lo sólidos y el extracto líquido se guardó en una botella ámbar de 1000 ml rotulada respectivamente, almacenándolo en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

3.4.2.2.3. Extracto etanólico

Para la obtención de los extractos etanólicos se pesaron 66,7 g del material vegetal molido y se mezclaron con 1000 ml de etanol al 99,9% grado analítico (EMSURE, USA) en una proporción 1/15, contenido en un vaso de precipitación de 1000 ml (PYREX \pm 0,05 ml) y se utilizó un agitador magnético para que la mezcla del vaso de precipitación tenga una agitación constante. Se colocó en una plancha de calentamiento con agitación (Super Nouva Multiplace, Thermo Scientific) a 100 °C y 800 rpm, hasta que la mezcla alcanzó la temperatura de ebullición, se mantuvo en estas condiciones durante 30 minutos. La mezcla caliente se filtró a través de un lienzo para eliminar lo sólidos y el extracto líquido se guardó en una botella ámbar de 1000 ml rotulada respectivamente, almacenándolo en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

3.4.3. Concentración de extractos líquidos

Aproximadamente entre 550 a 700 ml del extracto líquido se colocaron en el balón de vidrio del rotoevaporador (IKA RU8, USA) y con la utilización del baño María se calentó el extracto a 74 °C con una constante rotación de 202 rpm, hasta alcanzar un volumen de alrededor de 150 a 250 ml para los extractos etanol: agua y 75 ml para extractos etanólicos lográndose la evaporación de la mayor parte del disolvente.

3.4.4. Determinación de humedad de extractos líquidos

La determinación de la humedad de los extractos líquidos se realizó antes del proceso de secado por aspersión. La balanza de humedad (KERN MLS 50-3) fue previamente calibrada, en el porta muestras de la balanza se colocaron 3 g del extracto líquido a ser analizado, se programó a la balanza para determinar la humedad de la muestra y una vez transcurrido el tiempo necesario, el equipo indicó el valor de la humedad del extracto líquido obtenido.

3.4.5. Determinación de sólidos solubles totales (SST) de extractos líquidos

La determinación de sólidos solubles totales (SST) de los extractos líquidos se realizó mediante la resta del porcentaje de humedad con respecto al cien por ciento.

$$SST = 100\% - \% Humedad \quad [\text{Ec. 1}]$$

Posteriormente se calculó la masa de sólidos extraídos aplicando la siguiente ecuación:

$$Masa \ de \ sólidos \ extraídos = \frac{SST}{100} * V_{extracto} \quad [\text{Ec. 2}]$$

Donde:

SST: sólidos solubles totales

V_{extracto} : Volumen del extracto (ml)

(López, Muñoz, Carmona, Torres, & González, 2006)

Con los valores obtenidos anteriormente se calculó el rendimiento en relación al material vegetal

$$\% \text{ *Rendimiento sólidos extraídos* } = \frac{\text{masa sólidos extraídos}}{MV} * 100 \quad [\text{Ec. 3}]$$

Donde:

MV: material vegetal

(López et al., 2006)

3.4.6. Secado de los extractos líquidos con Spray Dryer

Para el secado por aspersión fue necesario la determinación de la cantidad de maltodextrina para la microencapsulación, siendo el 30% de una relación que se establece entre la cantidad de sólidos solubles totales (SST) y el volumen del extracto concentrado. El extracto contenido en un vaso de precipitación de 1000 ml se calentó en una plancha de calentamiento y se agregó la maltodextrina, mezclándole constantemente hasta que se disuelva en su totalidad.

En el Spray dryer (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290, Switzerland) las condiciones fueron reguladas para el secado por aspersión, como la temperatura de entrada (140 °C), temperatura de salida (78 °C), porcentaje de aspiración (100%), porcentaje de la bomba (34%). El extracto vegetal seco se pesó en la balanza analítica (OHASUS, PA214) y cuyo valor se registró para calcular el rendimiento del proceso de secado.

3.4.7. Evaluación de Actividad Antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante de los extractos vegetales secos se realizó mediante el método de quimioluminiscencia, que consta en una reacción de transferencia de átomos de hidrógeno, en la que el agente oxidante del proceso es el 2',2'-azobis-2-metilpropionamida (APPH) y el monitor o sonda es el Luminol. La reacción ocurre cuando el agente oxidante o radical libre oxida a una molécula monitor y emite luz, cuyo proceso se conoce como quimioluminiscencia. La reacción tiene lugar en la región visible del espectro electromagnético. Se prepararon los extractos vegetales a una concentración de 2 mg/ml, el luminol 0,042 mM, sulfato ferroso 2,5 mM y peróxido de oxígeno. En una celda de vidrio se agregó 1 ml de cada solución mencionada anteriormente y se mezclaron de tal manera que quede una solución homogénea e inmediatamente se procedió a medir la quimioluminiscencia cada 6 segundos durante 90 segundos a una longitud de onda de 490 nm. Para la preparación del blanco en una celda de vidrio se añadieron el extracto vegetal, el luminol y el sulfato ferroso. Los valores de absorbancias se interpolaron con una curva estándar de ácido gálico. Los resultados de la actividad antioxidante se expresó en μg de ácido gálico/ g de muestra.

3.4.8. Evaluación de Actividad Antiinflamatoria

3.4.8.1. Solución de glóbulos rojos o eritrocitos al 40%

En la preparación de la solución de eritrocitos al 40 % se realizaron ciertas modificaciones en el método de realizado por Kumar et al. (2011). Se extrajeron 5 ml de sangre de un paciente voluntario sano con previo consentimiento informado, sin ingerir medicamentos antiinflamatorios al menos durante los anteriores 15 días. La sangre se colocó en un tubo de 5 ml con anticoagulante EDTA (MONOJECT, USA) y se centrifugó durante 5 minutos en la centrífuga (Hettich Zentrifugen, Germany) a 3000 rpm. Con una micropipeta se procedió a retirar el sobrenadante o plasma sanguíneo y a los eritrocitos precipitados se les añadieron 3 ml de solución tampón fosfato (PBS) pH 7.4 (Thermo Scientific Fisher, USA), se mezcló el

contenido y nuevamente se llevó a centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm, el proceso de lavado de los eritrocitos se repitió 4 veces. En el último lavado se preparó la solución de eritrocitos al 40 % en PBS.

3.4.8.2. Determinación de la actividad antiinflamatoria por el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos o eritrocitos

El método desarrollado por Rashid et al. (2011) y con algunas modificaciones realizadas en dicha metodología, se determinó el porcentaje de actividad antiinflamatoria de los extractos vegetales de Marco y Quishuar.

Se preparó una solución del extracto vegetal en PBS a una concentración de 40 mg/ml, esta fue la solución madre. Partiendo de ésta solución se prepararon 30 ml de solución del extracto vegetal en PBS a distintas concentraciones (1; 1,5; 2; 2,5 mg/ml).

Para la solución antiinflamatoria patrón o testigo se utilizó aspirina de 500 mg (Bayer) (Fernández et al., 2007) de la cual se realizaron soluciones con las mismas concentraciones de los extractos vegetales a evaluar.

Para cada experimento se utilizaron 3 tubos: OD₁, OD₂ y OD₃. En OD₁ y OD₂ se añadieron 3 ml del extracto vegetal y para OD₃ 3 ml de PBS, a los 3 tubos se adicionaron 30 µL de la solución de glóbulos rojos al 40 % y se mezcló ligeramente el contenido de los tubos. Los tubos OD₂ y OD₃ se llevaron a baño María a 54 °C durante 20 minutos, la temperatura induce a lisis de los eritrocitos en ausencia de un antiinflamatorio. Mientras que OD₁ no se lo sometió a calor y se lo dejó reposar durante 20 minutos. Seguido los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. Se midieron las absorbancias de los sobrenadantes en el espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000, Germany) a una longitud de onda de 540 nm. Se utilizó como blanco de lectura PBS. Los valores fueron registrados para aplicar la ecuación para la determinación del porcentaje de actividad antiinflamatoria.

$$\% \text{ Actividad antiinflamatoria} = 100 * \left[1 - \frac{OD_2 - OD_1}{OD_3 - OD_1} \right] \quad [\text{Ec. 4}]$$

Donde:

OD₁: Tubo sin extracto sin calentar

OD₂: Tubo con extracto sometido a temperatura

OD₃: Tubo control sometido a temperatura

(Rashid et al., 2011)

3.4.9. Evaluación de Actividad Citotóxica

El método colorimétrico MTT se aplicó para determinación de la evaluación citotóxica de los extractos vegetales, éste método cuantitativo consta de una reacción de reducción metabólica del Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrasol (MTT), proceso que lo realiza la enzima succinato deshidrogenasa en la mitocondria, y como producto de la reacción se obtiene un compuesto de color azul, llamado formazán.

Se prepararon soluciones de los extractos vegetales en PBS con concentración de 50 mg/ml. Se filtraron los extractos en filtros estériles (MILLEX –GP Syringe Filter Unit 0,22 µm) para eliminar cualquier sustancia extraña que contenga el extracto y evitar causas de contaminación en las pruebas *in vitro*. Se realizaron diluciones seriadas desde $1 \cdot 10^{-1}$ hasta $1 \cdot 10^{-9}$.

En distintos tratamientos se incubaron durante 48 horas las células MCF-7 procedentes de un tumor de tejido mamario. Luego se descartó el medio, tomando en cuenta las medidas de bioseguridad y eliminación de desechos, se procedieron a lavar los pocillos de las placas con 100 µL de PBS 1X, para una completa eliminación de restos celulares. Posteriormente se mezclaron 10 ml de medio DMEN sin rojo fenol, con 1 ml de PBS y 5 mg de MTT. En cada pocillo se añadieron 100 µL de la mezcla y se incubaron durante 4 horas en condiciones de temperatura de 37 °C y 5 %, de dióxido de carbono, de tal manera que se favorezca la obtención de formazán. Transcurrido el tiempo de incubación mencionado se añadieron 100 µL del reactivo Docedil Sulfato de Sodio (SDS)-HCl al 0,01 %, con

lo que se detuvo la reacción y los cristales de formazán se disolvieron, y nuevamente se incubaron durante 12 horas. Por último se midieron las absorbancias de las placas de todos los experimentos en el espectrofotómetro lector de microplacas a 570 nm. El blanco de lectura en este ensayo fueron células MCF-7. La regresión no lineal estableció el porcentaje de células vivas para cada caso. La IC50 determinada se utilizó para determinar la actividad biológica del extracto vegetal.

3.4.9.1. Método de Bradford (cuantificación de proteínas)

La cuantificación de proteínas de los extractos vegetales de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*), se realizaron por el método de Bradford como estipula la casa comercial, estableciendo una curva patrón estándar de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Se determinó su absorbancia a 595 nm en un lector de placas Victor X3 (PerkinElmer,USA).

3.4.10. Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos en la parte experimental del proyecto se utilizó el programa estadístico INFOSTAT. Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se aplicó un diseño experimental A*B+1, porque se empleó como antiinflamatorio testigo la aspirina. Además fue posible comparar los factores de estudio como el tipo de disolvente (agua destilada, etanol 99,9 %: agua destilada y etanol 99,9 %). Mientras que para la actividad antioxidante y citotóxica se realizó un análisis de varianza con una tabla ANOVA simple, para evidenciar el mejor tratamiento en cada actividad biológica evaluada.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis e interpretación de resultados

4.1.1. Análisis fisicoquímico

4.1.1.1. Determinación de sólidos solubles totales (SST) de extractos líquidos

Se prepararon extractos acuosos, hidroalcohólicos (50:50) y etanólicos de las hojas de Marco y Quishuar para la extracción de los principios activos. Con los datos obtenidos no se aplicó un análisis estadístico, únicamente en la tabla I se muestran los valores del rendimiento de los sólidos solubles totales (SST) extraídos por cada extracto.

Tabla I. Rendimiento de sólidos solubles totales (SST) extraídos de las hojas de Marco y Quishuar

Muestra	Disolvente	Sólidos extraídos del extracto % (p/v)	Rendimiento de sólidos extraídos % (p/v)
Marco			
EAAM	agua destilada	51,45 ± 0,01	77,14 ± 0,03
EEAM	etanol (99,9 %) :agua destilada	24,87 ± 0,03	37,29 ± 0,01
EEM	etanol (99,9 %)	15,55 ± 0,02	23,32 ± 0,03
Quishuar			
EAQ	agua destilada	33,92 ± 0,07	50,85 ± 0,04
EEAQ	etanol (99,9 %) :agua destilada	13,75 ± 0,01	20,61 ± 0,02
EEQ	etanol (99,9 %)	14,31 ± 0,01	21,46 ± 0,01

EAM: extracto acuoso de hojas de Marco, EEAM: extracto etanol-agua (50:50) de hojas de Marco, EEM: extracto etanólico de hojas de Marco, EAQ: extracto acuoso de hojas de Quishuar, EEAQ: extracto etanol-agua (50:50) de hojas de Quishuar, EEQ: extracto etanólico de hojas de Quishuar.

Las propiedades químicas de los metabolitos de origen vegetal y la polaridad de los disolventes utilizados son factores que inciden en la extracción los principios activos de las plantas (Robins, 2003). La determinación de sólidos solubles totales es esencial para el análisis del rendimiento de los distintos tratamientos en la extracción de los principios activos de las plantas en estudio.

Los rendimientos de las extracciones a partir de las hojas de Marco se encuentran en un rango entre $23,32 \pm 0,03$ y $77,14 \pm 0,03$ % (p/v), el mejor tratamiento es la extracción acuosa porque se obtiene $77,14 \pm 0,03$ % (p/v) de rendimiento. Con los extractos de Quishuar se obtuvieron rendimientos entre $20,61 \pm 0,02$ y $50,85 \pm 0,04$ % (p/v), los resultados indican que con el extracto acuoso se obtiene el mayor rendimiento de sólidos solubles extraídos $50,848 \pm 0,04$ % (p/v). De los resultados obtenidos se puede inferir que las moléculas bioactivas extraídas en su mayor porcentaje tienen una gran afinidad con el agua, por lo tanto son moléculas hidrofílicas ya que interaccionan con disolventes polares mediante la formación de enlaces de hidrógeno (F. García, 2013). Los flavonoides, los cianógenos, los taninos y glucosinolatos son algunos de los metabolitos secundarios hidrofílicos presentes en las plantas (Tomás, 2003).

El análisis fitoquímico del extracto de *Ambrosia arborescens* realizado por Alvarado (2007) ha identificado la presencia de alcaloides, azúcares reductores, aminoácidos libres, flavonoides y taninos. Según Muñoz et al. (2015) la utilización de agua a 90 °C como disolvente facilita la extracción de flavonoides, taninos (oligómeros de ácidos benzoicos y ácidos hidroxicinámicos) y polifenoles hidrosolubles (galotaninos, ácidos benzoicos, elagitaninos) de la materia vegetal (Beecher, 2003).

Los tratamientos en los que se utilizó agua: etanol en una proporción 50:50 presentaron un rendimiento 37,285 % (p/v) para Marco y 20,611 % (p/v) para Quishuar. Con la utilización del disolvente hidroalcohólico se logró extraer compuestos fenólicos de polaridad media de bajo o medio peso molecular (Monroy, Totosaus, & García, 2005) que se encuentran en sustancias orgánicas, ya que etanol tiene un polo lipofílico que ayuda a la extracción de estos compuestos (Durst & Gokel, 2007). Indistintamente del disolvente utilizado la extracción de metabolitos secundarios es incompleta, es decir que una gran cantidad de moléculas bioactivas permanecen en los residuos de la extracción (Arranz, 2010).

Según Arranz (2010) la acción biológica de los compuestos fitoquímicos está relacionada con la estructura y concentración de estas sustancias, porque influyen en su biodisponibilidad y bioaccesibilidad. Las hojas Marco y Quishuar fueron recolectadas en los páramos de la región sierra por lo tanto la producción de compuestos fitoquímicos en las plantas están sujetos a factores extrínsecos como la temperatura, la humedad, la calidad del suelo, el clima; y por factores intrínsecos a nivel genético (Sharapin, 2000) que inciden directamente en la producción de metabolitos secundarios. Estudios realizados por Acosta (2003) mencionan que el viento es un factor que aumenta la evaporación de los aceites esenciales de las plantas. En la región Sierra las precipitaciones son frecuentes, Acosta (1995) afirma que un exceso de humedad si influye en la producción de principios activos de las plantas, especialmente de los alcaloides porque estas biomoléculas al ser excretadas por las hojas se disminuye su concentración.

4.1.2. Actividades biológicas

4.1.2.1. Actividad antioxidante

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de las hojas de Marco y Quishuar con el método de quimioluminiscencia, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla II. Actividad antioxidante de los extractos de Marco y Quishuar

Muestra	Actividad antioxidante (μg ácido gálico/g extracto)	Desviación estándar
Marco		
EAM ^a	64138,742	273,129
EEAM ^b	49079,140	914,807
Quishuar		
EAQ ^a	110203,406	229,836
EFAQ ^b	180629,191	293,399

EAM: extracto acuoso de hojas de Marco, EEAM: extracto etanol-agua de hojas de Marco, EAQ: extracto acuoso de hojas de Quishuar, EFAQ: extracto etanol-agua de hojas de Quishuar. Mediante un análisis de varianza ANOVA y con un valor de significancia de 0,05 $a \neq b$ son diferentes estadísticamente.

Según Hernández, Pabón, and Rodríguez (2015) el disolvente o reactivo utilizado en la extracción tiene relación directa con la capacidad antioxidante de las moléculas bioactivas. En la tabla II se evidencia que el mejor ensayo de las hojas de Marco es el extracto acuoso porque muestra una actividad antioxidante de $64138,742 \pm 273,129 \mu\text{g}$ ácido gálico/g extracto, superior al extracto etanol-agua.

Alvarado (2007) afirma que los flavonoides y los taninos forman parte de la composición química de las hojas de *Ambrosia arborescens*, éstos compuestos

hidrosolubles se obtienen en extractos acuosos (Beecher, 2003). La actividad antioxidante de las moléculas fitoquímicas se debe a la estructura que poseen. Los taninos son compuestos poliméricos porque tienen más de tres subunidades fenólicas, lo que atribuye gran potencial antioxidante (Paladio, 2008). La hidrólisis de los taninos libera ácido gálico y la asociación con los flavonoides ayuda a elevar la capacidad antioxidante (Avello & Pastene, 2005).

EL extracto hidroalcohólico (50:50) de las hojas de Quishuar fue el mejor tratamiento que presentó una actividad antioxidante de $180629,191 \pm 293,399$ μg ácido gálico/g extracto. Análisis fitoquímicos realizados en las hojas de *Buddleja incana* realizados por Labre (2015) manifiesta la presencia de sustancias terpénicas, elementos fenólicos y compuestos verbascósidos (Arano, Cruz, Estrada, & Fernández, 2015) en los extractos vegetales de Quishuar que confiere propiedades antioxidantes. Además en su investigación Labre (2015) menciona que con la mezcla de agua y etanol, se realiza la extracción de compuestos fitoquímicos de polaridad media como son los polifenoles, terpenoides y antocianidinas (Vieira et al., 2009).

Hernández et al. (2015) en su investigación mencionan que el potencial antioxidante de una planta contra el estrés oxidativo, se debe a que sus compuestos fitoquímicos tienen la capacidad de estabilizar la concentración de radicales libres. La actividad antioxidante de los polifenoles es el precursor para otras actividades biológicas (Proestos, Bozarisb, Nychasb, & Komaitisa, 2006).

4.1.2.2. Actividad antiinflamatoria

Los lisosomas son componentes celulares que contienen enzimas proteolíticas y cuando se ven afectados por procesos inflamatorios su membrana lisosomal se lisa y por lo tanto causa afecciones a tejidos adyacentes (Kumar et al., 2011). El modelo biológico utilizado en esta investigación fueron los eritrocitos, porque imitan la membrana de los lisosomas (Alberts et al., 2002).

Según Muñoz et al. (2015) el aumento de la temperatura en el ensayo ocasiona un incremento de la vibración celular lo que causa el debilitamiento de las fuerzas intermoleculares y por lo tanto la ruptura de la pared celular . Los extractos vegetales con componentes bioactivos que tuvieron propiedades antiinflamatorias permitieron la estabilización de la membrana eritrocitaria frente al factor temperatura, con lo cual fue posible la determinación del porcentaje de protección de membrana (Kumar et al., 2011), en las Figuras I y II se muestran los resultados obtenidos.

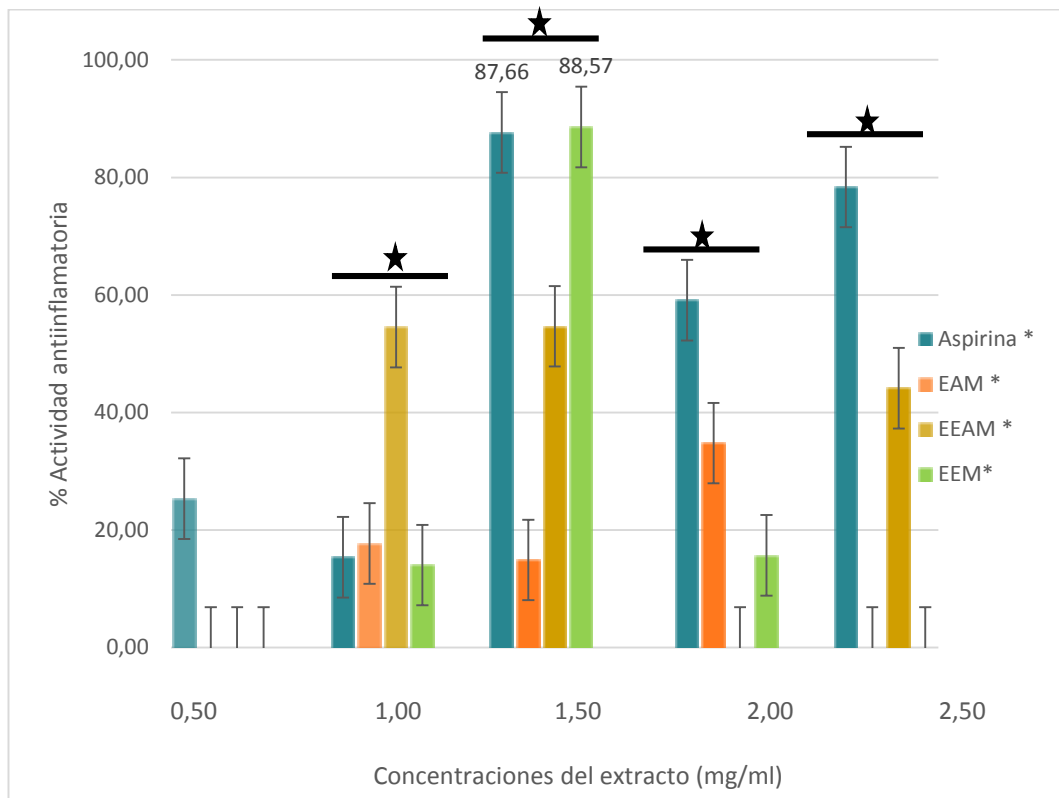


Figura I. Comparación de la actividad antiinflamatoria de los extractos vegetales de las hojas de Marco y del antiinflamatorio testigo la aspirina EAM: extracto acuoso de hojas de Marco, EEAM: extracto etanol-agua de hojas de Marco, EEM: extracto etanólico de hojas de Marco. ★ Mediante un análisis de varianza ANOVA diseño experimental A*B+1 con un valor de significancia de $P > 0.05$ si existe diferencia significativa.

Con los resultados obtenidos se determinó el mejor ensayo, el extracto etanólico de las hojas de Marco obtuvo una actividad antiinflamatoria de 88,57 %, superior al antiinflamatorio testigo aspirina con una actividad de 87,66 %. Es evidente observar en la figura I que la actividad antiinflamatoria no tiene una relación directamente proporcional con la concentración del extracto. Alvarado (2007) afirma que los taninos y los flavonoides son los principales componentes fitoquímicos de las hojas de Marco, biomoléculas que atribuyen a la planta propiedades antiinflamatorias (Casares, 2010)

En un trabajo de investigación Cartaya and Reynaldo (2001) mencionan que los flavonoides son compuestos de polaridad media y son solubles en etanol. Adicionalmente demostraron la propiedad antiinflamatoria de los flavonoides, porque son capaces de disminuir los síntomas que se manifiestan en un proceso inflamatorio y de mejorar la circulación periférica. Según Limón et al. (2013) el mecanismo de acción de los flavonoides es la inhibición de la producción de prostaglandina

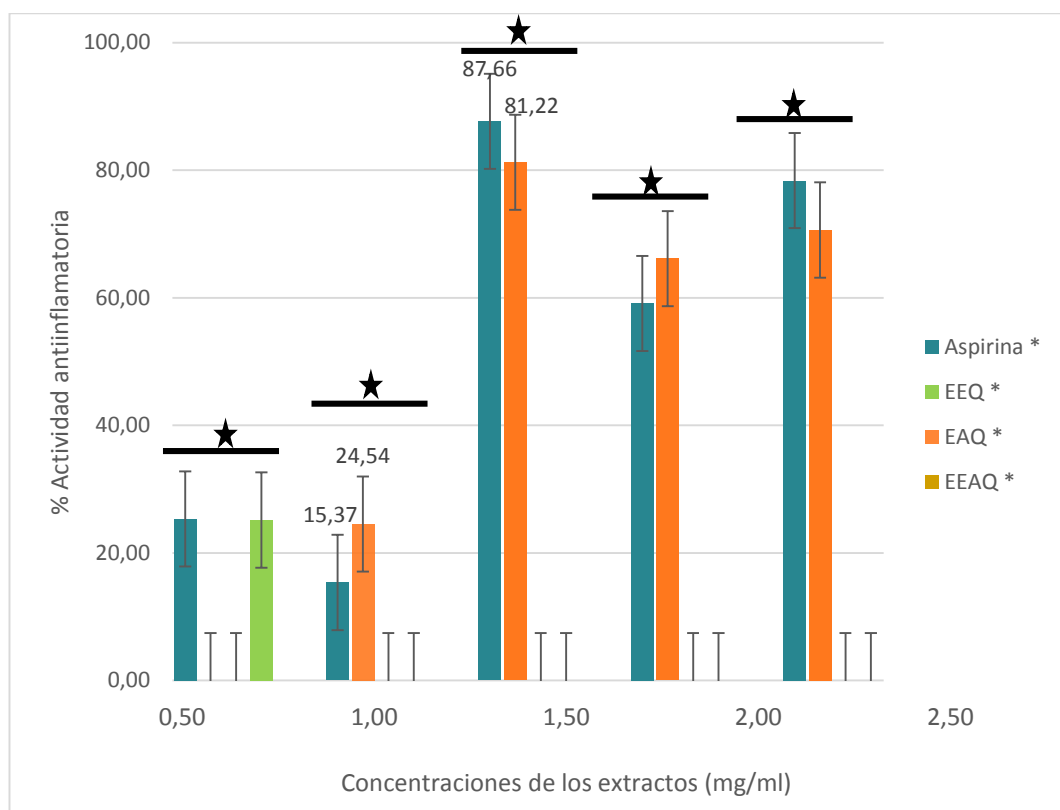


Figura II. Comparación de la actividad antiinflamatoria de los extractos vegetales de las hojas de Quishuar y del antiinflamatorio testigo la aspirina. EAQ: extracto acuoso de hojas de Quishuar, EEAQ: extracto etanol-agua de hojas de Quishuar, EEQ: extracto etanólico de hojas de Quishuar. ★ Mediante un análisis de varianza ANOVA diseño experimental A*B+1 con un valor de significancia de $P > 0.05$ si existe diferencia significativa.

Analizando los resultados obtenidos con los extractos de las hojas de Quishuar, el extracto acuoso presentó una actividad de 81,22 %, mientras que la aspirina tuvo

87,66 %. Una investigación realizada por Labre (2015) en algunas plantas del género *Buddleja* ha identificado compuestos bioactivos entre los que se caracterizan los terpenoides, flavonoides y compuestos verbascósidos (Santos et al., 2012). Los elementos verbascósidos son feniletanolglicósidos que tienen actividad antiinflamatoria (Díaz, Jiménez, & Auró, 2000). Según Valenzuela (2009) el mecanismo antiinflamatorio de los compuestos verbascósidos consiste en la inhibición de mediadores involucrados en el proceso inflamatorio.

4.1.2.3. Actividad citotóxica

La determinación de concentración inhibitoria máxima media IC50, de los extractos de Marco y Quishuar es un indicador cuantitativo que permite conocer la cantidad necesaria del extracto para provocar una reducción de las células MCF-7. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras III y IV.

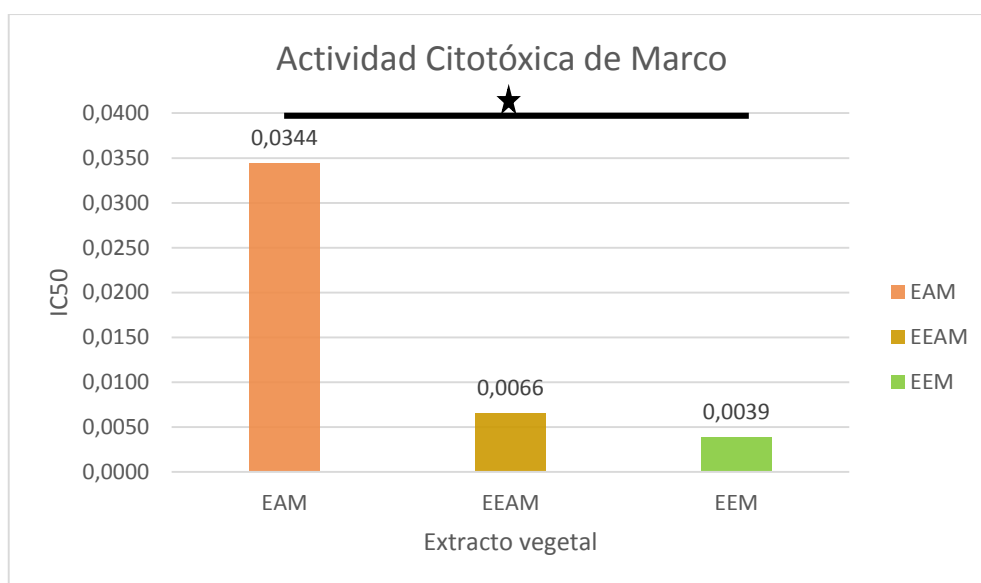


Figura III Determinación de concentración inhibitoria medio máxima (IC50) de los extractos vegetales de Marco. EAM: extracto acuoso de hojas de Marco, EEAM: extracto etanol-agua de hojas de Marco, EEM: extracto etanólico de hojas de Marco. ★ Mediante un análisis de varianza ANOVA con un valor de significancia de $P > 0.05$ si existe diferencia significativa

En un estudio realizado con *Ambrosia arborescens* se confirma la actividad antitumoral en un extracto etanólico (Hinojosa & Moreno, 2013). Los resultados de la presente investigación coinciden con fundamentos bibliográficos ya que el mejor tratamiento en la determinación de citotoxicidad de los extractos de Marco fue el extracto etanólico porque muestra un valor de IC50 de 0,0039 lo que quiere decir que se necesitó una mínima cantidad del extracto para que su toxicidad en células MCF7 fuera letal.

En una investigación realizada por Naranjo (2010) afirma la presencia de compuestos fenólicos en la composición química del aceite esencial de Marco. Según Alvarado (2007) en su investigación *in vivo* realizada con ratones como biomodelos afirma que los flavonoides, sesquiterpenos y monoterpenos como las tuyonas atribuyen propiedades de toxicidad a *Ambrosia arborescens*. Ávalos and Pérez (2009) mencionan que los terpenos son insolubles en agua y para su extracción es indispensable la utilización de un disolvente orgánico, como el etanol.

La actividad citotóxica del extracto etanólico de las hojas de Marco puede deberse a la presencia de lactonas sesquiterpénicas: coronofilina y damsina como lo afirma Cruz (2009) en su investigación comprobando la presencia de estos compuestos en el aceite esencial de Marco y adicionalmente menciona que estos elementos tienen un rol importante en la inhibición de la proliferación celular y biosíntesis del ADN (Villagomez et al., 2013)

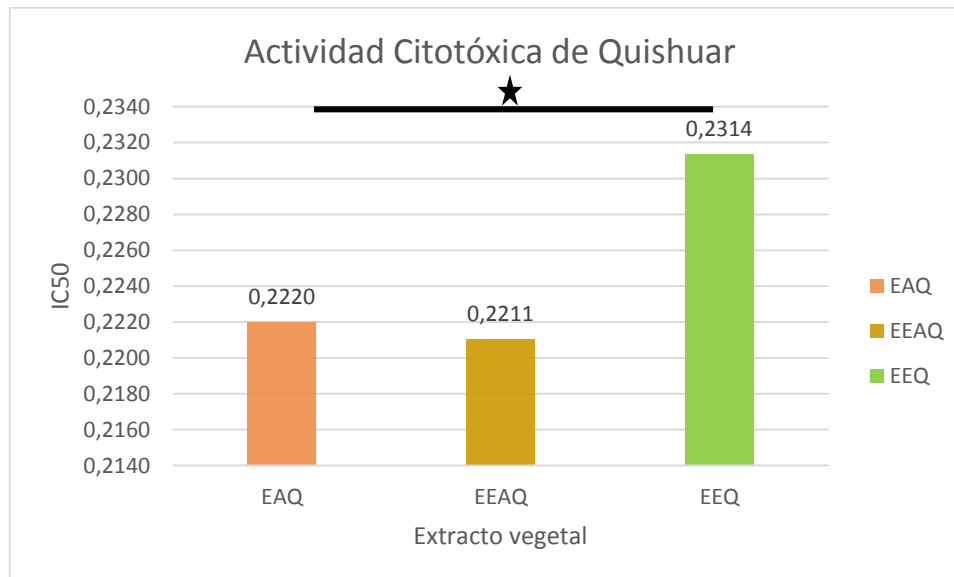


Figura IV Determinación de concentración inhibitoria medio máxima (IC50) de los extractos vegetales de Quishuar. EAQ: extracto acuoso de hojas de Quishuar, EEAQ: extracto etanol-agua de hojas de Quishuar, EEQ: extracto etanólico de hojas de Quishuar. ★ Mediante un análisis de varianza ANOVA con un valor de significancia de 0,05 si existe diferencia significativa

El mejor tratamiento en la evaluación de la actividad citotóxica de las hojas de Quishuar fue el extracto acuoso porque tuvo un IC50 de 0,2211. Según Mashamaite, Ng'ambi, Norris, Ndlovu, and Mbajiorgu (2009) los compuestos fitoquímicos responsables de las actividades biológicas como la citotoxicidad de las plantas, son los alcaloides y fenoles. Con una investigación realizada por Avila et al. (2005) se han identificado alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides (Labre, 2015) como componentes de naturaleza química de las hojas de Quishuar, por lo tanto la obtención de estos compuestos se realizaría mediante el extracto acuoso (Muñoz et al., 2015).

Los resultados obtenidos tal vez se deben a la presencia de flavonoides en el extracto vegetal de las hojas de Quishuar porque según S. Ruíz, Venegas, Chávez, and Eustaquio (2010) los flavonoides cumplen la función de inhibir la formación de tumores, el mecanismo de acción de estos compuestos tiene lugar en los diferentes niveles de la carcinogénesis.

Además una investigación *in vitro* del aceite de oliva realizadas por Oliveras et al. (2011) confirman la presencia de compuestos fenólicos como lignanos y secoiridoides que tienen propiedades anticancerígenas en células MCF-7 del cáncer de mama debido a que estos compuestos pueden reaccionar con intermediarios carcinógenos (Van Erk et al., 2005)

4.2. Verificación de Hipótesis

Con los resultados obtenidos en la parte experimental *in vitro* de las actividades antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica cabe mencionar con respecto a la hipótesis de la presente investigación:

Ho \neq 0 La hipótesis nula se rechaza

Ha = 0 La hipótesis alternativa se acepta

Lo que significa que el solvente utilizado para la extracción de principios activos de las plantas Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) si incide en las actividades biológicas antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se obtuvieron extractos vegetales secos de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) mediante la tecnología de spray dryer o secado por aspersión con la finalidad de microencapsular los principios activos de los extractos, propiciando estabilidad y evitando la pérdida de compuestos volátiles. Se consiguió un gran rendimiento de sólidos solubles totales (SST) con los extractos acuosos de Marco (77,14 %) y Quishuar (50,85 %)
- Se determinó la actividad antiinflamatoria de los extractos vegetales de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) mediante el método de estabilización de la membrana de los eritrocitos. El extracto etanólico de Marco tuvo mayor actividad antiinflamatoria 88,57 % con respecto al antiinflamatorio testigo aspirina 87,66 %. Sin embargo el extracto acuoso de las hojas de Quishuar tuvo 81,22 % de actividad antiinflamatoria.
- Se cuantificó la actividad antioxidante de los extractos vegetales Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) con el método de quimioluminiscencia. El extracto acuoso de las hojas de Marco presentó una actividad antioxidante de 64138,42 μg ácido gálico/d extracto y el extracto hidroalcohólico de Quishuar 180629,191 μg ácido gálico/d extracto. Los extractos vegetales de las plantas en estudio presentaron un potencial antioxidante con capacidad de evitar el estrés oxidativo.
- Se determinó la actividad citotóxica de los extractos vegetales de la planta de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) con el uso del colorante MTT. El biomodelo para la evaluación de la citotoxicidad de los extractos fueron las células MCF-7 y fue posible evidenciar que el extracto etanólico de

Marco con un IC50 de 0,0043 tiene gran capacidad para inducir la apoptosis celular, mientras que Quishuar con el extracto hidroalcohólico (50:50) un IC50 de 0,2211.

5.2. Recomendaciones

- Profundizar la investigación para especificar la función de los principios activos extraídos de las hojas de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*).
- Determinar el mecanismo de acción de los principios activos de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*) en la actividad citotóxica frente a células MCF-7.
- Realizar un análisis cuantitativo de la concentración de moléculas bioactivas en los extractos de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*).
- Realizar experimentación *in vivo* de las actividades antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de los extractos de Marco (*Ambrosia arborescens*) y Quishuar (*Buddleja incana*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, L. (1995). Una planta Medicinal. *Editorial Científico Técnica*.
- Acosta, L. (2003). Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *SCIELO. Revista Cubana de Plantas Medicinales (Campinas)*, 8.
- Ahmed, M., Akter, S., Lee, J., & Eun, J. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *ELSEVIER*, 43. doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.014
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (Vol. 4). New York.
- Alvarado, B. (2007). Plantas medicinales de la Cordillera Negra. *Revista Académica Perú Salud*.
- Arano, H., Cruz, F., Estrada, M., & Fernández, F. (2015). Incremento en la producción de verbascósido en cultivos en suspensión de *Buddleja cordata kunth* empleando l-fenilalanina como precursor. *XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- Arranz, S. (2010). *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación*. (Doctor), Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/11255/1/T32158.pdf>
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *REDUCA. Serie Fisiología Vegetal*, 3, 119-145.
- Avello, M., & Pastene, E. (2005). Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae Turcz* "Murtilla". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(33-39).
- Avila, A., Castañeda, C., Benitez, L., Durán, D., Barroso, V., Martínez, C., . . . Romo de Vivar, A. (2005). Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *ELSEVIER*. doi: <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.009>
- Beecher, G. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition*, 133.

- Bermejo, P., M., A., & Bedoya, L. (2014). *Actividad antiviral y antiinflamatoria de plantas medicinales: aislamiento de polisacáridos activos*. (Doctoral), Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Retrieved from <http://eprints.sim.ucm.es/27501/1/T35521.pdf>
- Bórdes, R., Martínez, M., García, E., & R., G. (2010). Proceso Inflamatorio.
- Bravo, L. (2014, 16 de Junio). ¿Por qué está prohibido el ajeno? Retrieved 16 de Junio, 2014, from es.scribd.com/doc
- Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Raneletti, F., Natali, P., Brunetti, M., . . . Piantelli, M. (2000). Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth metastatic potencial. *IJC International Journal of Cáncer*. doi: 10.1002/1097-0215(20000815)87:4<595::AID-IJC21>3.0.CO;2-5
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 22, 5-14.
- Carvajal, C., & Quintero, M. (2012). *Caracterización fitoquímica , actividad antimicrobiana y antimicótica de aceite esencia de congona (Peperomia inaequalifolia Ruiz&Pav) Pperaceae*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Quito, Ecuador.
- Casares, A. (2010). *Análisis de Polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación*. Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona- España. Retrieved from https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/10677/PFC_VOL_IV.pdf
- Correa, Q., J, E., & H, Y. (1990). Especies promisoras vegetales de los países del Convenio Andrés Bello. *SECAB Ciencia y Tecnología 17., Tomo V*.
- Cortés, J. (2005). *Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo*. . (Licenciatura en Biología), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, Hidalgo. Retrieved from <https://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/licenciatura/documentos/Actividad%20biologica%20de%20extractos.pdf>

- Cotugno, R., Fortunato, R., Santoro, A., Gallotta, D., Braca, A., De Tommasi, N., & Belisario, M. (2011). Effect of sesquiterpene lactone coronopilin on leukaemia cell population growth, cell type-specific induction of apoptosis and mitotic catastrophe. *PUBLMED, US National Library of Medicine, National Institutes of Health*, 45, 53-65. doi: 10.1111/j.1365-2184.2011.00796.x
- Cruz, P. (2009). *Elaboración y Control de Calidad del Gel Antimicótico de Manzanilla (Matricaria chamomilla), Matico (Aristiguetia glutinosa) y Marco (Ambrosia arborensens) para neo-fármaco.*, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador.
- Chávez, L., Arenas, M., Sada, I., & Lascurain, R. (2009). Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Mycobacterium tuberculosis*. *Instituto Nacional de Enfermedades RRespiratorias*, 145.
- De Alvear, M. (1992). *Medicina Interna* (Vol. 2). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA y Herbario de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito.
- Díaz, B., Jiménez, M., & Auró, A. (2000). Evaluación del efecto parasiticida de los extractos acuoso y metanólico de *Buddleja cordata* HBK (Tepozán) sobre *Costia necatrix* en tilapia (*Oreochromis* sp). *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Durst, H., & Gokel, W. (2007). *Química Orgánica Experimental* (Vol. I): RVERTÉ S.A.
- Echavarría, B., Franco, A., & Martínez, A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y Determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.*, 16, 126-131.

- Erhart, L., Lankat-Buttgereit, B., Schmidt, H., Wenzel, U., Daniel, H., & Goke, R. (2005). Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase- cascade in colon cancer cells. *PUBLMED, US National Library of Medicine, National Institutes of Health*. doi: 10.1007/s10495-005-1895-y
- Esquivel, B., Ochoa, L., & Rutiaga, O. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16, 180-192.
- Estrada, E. (1985). *Jardín Botánico de plantas medicinales Maximino Martínez*. Universidad Autónoma Chapingo: La Universidad.
- Fernández, A., Arroyo, J., Bonilla, P., Tomás, G., Medina, F., Chenguayén, J., . . . Huamán, O. (2007). *Efecto antiinflamatorio in vitro y seguridad en ratas del extracto acuoso atomizado de la raíz de Krameria lappacea (RATANIA)*. UNMSM, Cinencia e Investigación. Retrieved from file:///D:/documentos/Downloads/4964-17162-1-PB.pdf
- Ferrari, C., Marconi, S., & De Aguirre, J. (2011). *Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder*. Campinas- Brasil: Taylor & Francis.
- García, F. (2013). *Autoensamblaje de moléculas orgánicas: mecanismos y construcción de estructuras supramoleculares de dimensionalidad modulada*. (Doctor), Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/23924/1/T34949.pdf>
- García, M., Quintero, R., & López, A. (2000). *Biotecnología Alimentaria. Limusa*.
- García, P. (2008). *Inflamación*. (102), Universidad Complutense, España. Retrieved from <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>
- García, R. (2016). *Tratamiento para el Párkinson. Asociación Parkinson Madrid*.
- García, V., Crespo, I., Collado, P., Esteller, A., Sánchez, S., Tuñón, M., & González, J. (2007). Actividad antiinflamatoria de flavonoides naturales estructuralmente relacionados. *Redalyc*, 6, 313-314.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients. *Food Res International*, 40, 1107-1121.

- Gómez, H., Gonzalez, K., & Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Voletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(0717-7917), 182-217.
- Gómez, M. (2007). *Evaluación de Alternativas Silvopastoriles utilizando: Yagual (Polylepis racemosa), Qushuar (Buddleja incana) y colle (Buddleja coriacea); en la microcuenca del Rio Chimborazo.*, Escuela Politécnica del Ejército., Santo Domingo de los Colorados – Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2498/1/T-ESPE-IASA%20II-002012.pdf>
- Gupta, M. (1995). 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas.
- Hanahan, D. (2000). The hallmarks of cancer. *PUBLMED, US National Library of Medicine, National Institutes of Health*
- Harbone, J., & Baxter, H. (1999). Handbook of Natural Flavaonoids. 2.
- Hernández, P., Pabón, L., & Rodríguez, M. (2015). Propiedades químicas y biológicas de Arbutus unedo: una planta con potencial medicinal. *Revista Cubana de Farmacia*, 49, 144-155.
- Hinojosa, R., & Moreno, M. (2013). *Evaluación del marco (Ambrosia arborescens) en el tratamiento contra garrapatas (Ixodes ricinus) en cuyes (Cavia cobayo)*. Universidad para el Desarrollo Andino. Retrieved from <http://repositorio.udea.edu.pe/bitstream/handle/123456789/18/Evaluaci%C3%B3n%20del%20marco%20de%20Ambrosia%20arborescens%20en%20el%20tratamiento%20contra%20garrapatas%20de%20Ixodes%20ricinus%20en%20cuyes%20de%20Cavia%20cobayo%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Holben, D. H., & Smith, A. M. (1999). The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(7), 836-843. doi: 10.1016/S0002-8223(99)00198-4
- Ibarra, M., & Paredes, E. (2013). *Eficacia antibacteriana in vitro de Marco (Ambrosia arborescens Mill.) y Paico (Chenopodium ambrosioides L.) en una formulación cosmética.* (Ingeniería en biotecnología de los recursos

- naturales), Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Quito. Retrieved from <http://www.dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6007/1/UPS-QT03776.pdf>
- Irwin, W., Jelic, D., & Antolovic, R. (2008). Biomarkers for Drug Discovery: Important Aspects of in vitro Assay Design for HTS and HCS Bioassays. *Croatica Chemica Acta*, 8.
- Juránek, I., & Bezek, S. (2005). Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species cause or consequence of tissue injury? *PUBLMED, US National Library of Medicine, National Institutes of Health*, 263.
- Kameoka, S., Leavitt, P., Chang, C., & Kuo, K. (1999). Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids, Cancer. *PUBLMED, US National Library of Medicine, National Institutes of Health*, 146-161.
- Kufe, D., Pollock, R., Weichselbaum, R., Bast, R., Gansler, T., Holland, J., & Frei, E. (2003). *Holland-Frei Cancer Medicine* (Sixth ed.): BC Decker.
- Kumar, V., Bhat, Z., Kumar, D., Bohra, P., & Sheela, S. (2011). In vitro antiinflammatory activity of leaf extracts of *Basella alba* Linn. *International Journal of Drug Development and Research*, 176-179.
- Labre, L. (2015). *Estudio de la actividad fotoprotectora de la Buddleja incana, en fototipos de piel iii para la elaboración de un protector solar*. Universidad Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4021/1/56T00542%20U DCTFC.pdf>
- Lahiou, L. (2014). The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 17-31.
- Limón, S., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara, J. (2013). Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos *Universidad Nacional Autónoma de México*, 34.
- López, O., Muñoz, A., Carmona, R., Torres, L., & González, M. (2006). Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión

- de extracto acuoso de *Calendula officinalis* L. *SciELO. Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11.
- Mashamaite, L., Ng'ambi, J., Norris, D., Ndlovu, L., & Mbajjorgu, C. (2009). Relationship between tannin contents and short-term biological responses in male rabbits supplemented with leaves of different acacia tree species grown in Limpopo province of South Africa. *University of Limpopo*, 21.
- Medina, L., García, E., Calderasa, F., González, R., Laredoc, R., Sánchez, G., . . . Rodríguez, J. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *ELSEVIER*, 50, 642-650. doi: <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.038>
- Middleton, E., Kandaswami, J., & Theoharides, T. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *PUBLMED, US National Library of Medicine, National Institutes of Health*, 52, 673-751.
- Monroy, A., Totosaus, A., & García, I. (2005). Extracción de polifenoles de chile ancho y romero a diferentes concentraciones de etanol :agua. *Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec*.
- Muñoz, W., Chavez, W., Pabón, L., Rendón, M., Chaparro, P., & Otálvaro, A. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Revista CENIC, Ciencias Químicas*, 46, 38-46.
- Nakamura, H., Nakamura, K., & Yodoi, J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *PUBLMED, US National Library of Medicine, National Institutes of Health*. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.351
- Naranjo, B. (2010). *Composición del aceite esencial de Ambrosia arborescens y sus propiedades* (P. N. P. Naranjo Ed.). Quito, Ecuador.: .
- Ochoa, M., Claudia, I., Ayala, A., & Alfredo, A. (2011). Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *MIRAGE*.
- Oliveras, S., Fernández, S., Vázquez, A., Lozano, J., Cufi, S., Micol, V., . . . Menéndez, J. (2011). Crude phenolic extracts from extra virgin olive oil circumvent de novo breast cancer resistance to HER1/HER2- targeting

- drugs by inducing GADD45-sensed cellular stress, G2/M arrest and hyperacetylation of Histones H3. *Oncol*, 38, 1533-1547.
- OMS. (2004). Formulario Modelo de la OMS
- Palacios, J. (1997). Plantas Medicinales Nativas de Perú. *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima-Perú.*
- Paladio, S. (2008). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (Vitis vinifera L.)* Universidad Nacional de Cuyo, Argentina. Retrieved from http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/2627/tesispaladino.pdf
- Pérez, K., & Hernández, A. (2014). *Farmacología general. Una guía de estudio*: McGraw-Hil.
- Pincemail, J. (1995). Free radicals and antioxidants in human diseases. In A. E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave & J. L. Pierre (Eds.), *Analysis of Free Radicals in Biological Systems* (pp. 83-98). Basel: Birkhäuser Basel.
- Proestos, C., Boziaris, I., Nychas, J., & Komaitisa, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *ELSEVIER*, 95(4), 664–671. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.049>
- Quideau, S., et al., . (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. . *Angew Chem Int Ed Engl*.
- Rashid, M., Silkder, A., Kaiser, M., Miah, K., Parvez, M., & Hossian, N. (2011). Membrane Stabilizing Activity - A Possible Mechanism Of Action For The Antiinflammatory Activity Of Two Bangladeshi Medicinal Plants: Mesua Nagassarium (Burm.F.) And Kigelia Pinnata (Jack) Dc. *IJPRD 3(3). International Journal Of Pharmaceutical Research and Development (IJPRD)*, 3, 3.
- Reynel, C. (2009). Árboles de los Ecosistemas Forestales Andinos. *Intercooperation Fundación Suiza*.
- Reynel, C., & León, J. (1990). Árboles y arbustos Andinos para agroforestería y conservación de suelos. *Proyecto FAO*, 2, 508.

- Robins, R. (2003). Extracción de compuestos fitoquímicos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1761-2104.
- Ruíz, B. (2009). *Propiedades antioxidante de los productos de la reacción de Maillard y su influencia en la absorción de hierro y cobre, relación con la capacidad quelante de los metales*. (Doctoral), Universidad de Granada, Granada. Retrieved from <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/2153/1/17811880.pdf>
- Ruíz, S., Venegas, E., Chávez, M., & Eustaquio, C. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV. Scientia*, 2.
- Santos, L., Ávila, J., Ortega, D., Ojeda, J., J., P., Hernández, L., & López, H. (2012). Verbascoside is not genotoxic in the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test, and its constituent, caffeic acid, decreases the spontaneous mutation rate in the ST cross. *ELSEVIER*, 50(3-4). doi: <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.006>
- Sebaugh, J. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *PUBLMED, US National Library of Medicine, National Institutes of Health*, 128. doi: 10.1002/pst.426
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Vol. I). Colombia: CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *The Physiological Society*, 82(TOC), 291-295. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024
- Skeel, R. (2000). *Quimioterapia del cáncer* (Quinta ed.). España: MARBAN, Librería Editorial.
- Sotta, N. (2000). *Plantas Aromáticas y Medicinales de la Región Arequipa. Akwarella*.
- Tasayco, R., Vasquez, J., Loarte, A., & Palomino, J. (2008). Efecto de la infusión de Quishuar (*Buddleja incana*) y diminaceno en el tratamiento de la papilomatosis oral canina.

- Tomás, F. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10, 41-53.
- Torres, Y. (2011). *Actividad biológica y aplicaciones terapéuticas en Cáncer del compuesto natural PENTAGALOILGLUCOSA*. (Carrera de Bacteriología), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8895/tesis830.pdf?sequence=1>
- Valenzuela, G. (2009). *Diseño de una metodología analítica en hplc para estandarizar un extracto de Buddleja globosa hope, buddlejaceae y evaluación de la cesión del extracto desde un gel dermatológico*. Universidad de Chile, Chile. Retrieved from http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-valenzuela_g/pdfAmont/qf-valenzuela_g.pdf
- Van Erk, M., Roepman, P., Van der Lende, T., Stierum, R., Asrts, J., Van Bladeren, P., & Van Ommen, B. (2005). Integrates assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cell *in vitro Eur. J. Nutr.*, 44, 143-156.
- Velázquez , D., Guyat, M., Manzanares, K., Aguirre, B., & Gelabert , F. (2014). Etnobotánica: Empleo de plantas para uso medicinal *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 2.
- Vera, M. (2008). *Estudio Fitoquímico de una planta de la flora del Ecuador: Ambrosia arborescens*. (Ingeniero en Biotecnología), Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí- Ecuador.
- Vieira, F., Borges, G., Copetti, C., Gonzaga, L., Nunes, E. C., & Fett, R. (2009). Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars. *PUBLMED, US National Library of Medicine, National Institutes of Health*, 59, 101-106.
- Villagomez, R., Gloria, C., Collado, I., Calzado, M., Muñoz, E., Åkesson, B., . . . Duan, R. (2013). Multiple Anticancer Effects of Damsin and Coronopilin Isolated from *Ambrosia arborescens* on Cell Cultures. *International*

Journal of Cancer Research and Treatment. International Institute of Anticancer Research.

Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139-162.

ANEXOS

Anexo I recolección y proceso de secado de las hojas de Marco (A, B, C) y Quishuar (D, E, F)

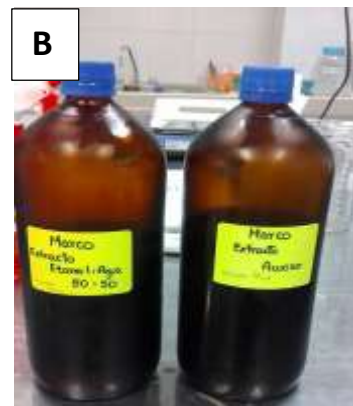


Anexo II Proceso de molido de hojas secas de Marco (A) y Quishuar (B)



Anexo III Obtención de extractos vegetales líquidos de Marco (A, B) y Quishuar (C, D). Evaporación del solvente en el rotaevaporador (E) .Determinación de (SST) de los extractos (F).





Anexo IV Proceso de secado por aspersión (A). Polvos microencapsulado de Marco (B) y Quishuar (C).





Anexo V Determinación de Polifenoles



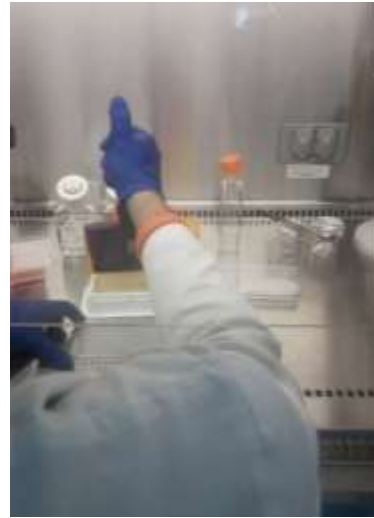
Anexo VI Determinación de la actividad antiinflamatoria de Marco (A) y Quishuar (B)





Anexo VII Determinación de actividad citotóxica de los extractos vegetales de Marco (A) y Quishuar (B)





Anexo VIII Análisis estadístico de los extractos vegetales de Marco mediante en diseño experimental A*B+1

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Réplicas	1.8E-04	2	8.9E-05	0.6357	0.9970
Disolvente	0.09	2	0.04	285.7143	<0.0000
Concenración	7.17	3	2.39	17071.4286	<0.0000
Disol*Concent	3.69	6	0.62	4428.5714	<0.0000
Testgo + Resto	3.05	1	3.05	21785.7143	<0.0000
Error	0.0050	35	0.00014		
Total	14.0053	59			

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.							
Acuoso 2.5	0.00	3	0.01	A						
Etanólico 500	0.00	3	0.01	A						
Etanólico 2.5	0.00	3	0.01	A						
Etanol-Agua 2	0.00	3	0.01	A						
Etanol-Agua 500	0.00	3	0.01	A						
Acuoso 500	0.00	3	0.01	A						
PBS 1.5	0.36	3	0.01		B					
PBS 2.5	0.48	3	0.01			C				
PBS 2	0.69	3	0.01				D			
Etanol-Agua 1.5	0.74	3	0.01				D			
Etanol-Agua 1	0.74	3	0.01				D			
Etanol-Agua 2.5	0.84	3	0.01					E		
Acuoso 2	0.94	3	0.01						F	
PBS 500	1.04	3	0.01							G
Acuoso 1	1.14	3	0.01							H
Etanólico 2	1.16	3	0.01							H
PBS 1	1.17	3	0.01							H
Acuoso 1.5	1.17	3	0.01							H
Etanólico 1	1.19	3	0.01							H
Etanólico 1.5	1.28	3	0.01							I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo IX Análisis estadístico de los extractos vegetales de Quishuar mediante en diseño experimental A*B+1

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Réplicas	2.3E-05	2	1.2E-05	0.1090	0.8909
Disolvente	2.21	2	1.11	10090.91	<0.0000
Concentración	0.32	4	0.08	727.27	<0.0000
Disolv.*Concent.	4.01	8	0.50	9090.91	<0.0000
Testigo + Resto	4.2891	1	4.2891	38991.82	<0.0000
Error	0.0040	35	0.00011		
Total	10.8331	59			

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.						
Etanol-Agua 500	0.00	3	0.01	A					
Etanol-Agua 2.5	0.00	3	0.01	A					
Etanol-Agua 2	0.00	3	0.01	A					
Etanólico 2	0.00	3	0.01	A					
Etanólico 1.5	0.00	3	0.01	A					
Etanólico 1	0.00	3	0.01	A					
Etanólico 2.5	0.00	3	0.01	A					
Acuoso 500	0.00	3	0.01	A					
Etanol-Agua 1	0.00	3	0.01	A					
Etanol-Agua 1.5	0.00	3	0.01	A					
PBS 1.5	0.36	3	0.01		B				
Acuoso 1.5	0.45	3	0.01			C			
PBS 2.5	0.48	3	0.01			C			
Acuoso 2.5	0.57	3	0.01				D		
Acuoso 2	0.62	3	0.01				D		
PBS 2	0.69	3	0.01					E	
PBS 500	1.04	3	0.01						F
Etanólico 500	1.05	3	0.01						F
Acuoso 1	1.05	3	0.01						F
PBS 1	1.17	3	0.01						G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)