



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



Tema:

Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de diferentes extractos de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*) obtenidos mediante secado por aspersión.

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

Autora: Tatiana Anabel Ortiz Pérez

Tutor: MSc. Yunys Pérez Betancourt

Ambato-Ecuador

Marzo-2017

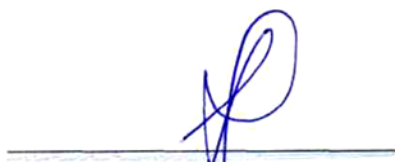
APROBACIÓN DEL TUTOR

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, 15 de febrero de 2017



MSc. Yunys Pérez Betancourt

C.I. 175647274-0

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Tatiana Anabel Ortiz Pérez 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.



Srta. Tatiana Anabel Ortiz Pérez

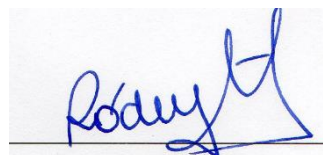
C.I. 1804434791

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, “Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de diferentes extractos de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*) obtenidos mediante secado por aspersión” 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

Por constancia firma



Presidente del Tribunal



Ph. D Orestes López Hernández

C.I 175478486-4



Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

Ambato, 15 de marzo 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.



Srta. Tatiana Anabel Ortiz Pérez

C.I. 1804434791

AUTOR

DEDICATORIA

A Dios

Por regalarme la vida por su amor infinito y por permitir culminar con éxito mi carrera.

A mis padres

A mi madre Genoveba por amor, sus consejos, su apoyo incondicional por siempre adelantarme a seguir adelante

A mi padre Ricardo por siempre ser un ejemplo de perseverancia y empuje para salir de los problemas que se presentan en la vida

A mi familia

A mis hermanos Valeria y Oscar por siempre estar a mi lado y siempre hacerme sonreír a diario

A mi tía Alejandra que siempre estuvo a mi lado apoyándome en toda mi vida estudiantil

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a la Universidad Técnica de Ambato por haberme permitido desarrollarme en ámbito profesional y personal

A la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos por abrirme las puertas de sus laboratorios para la realización de mi parte experimental.

A mi tutor MSc. Yunys Pérez por su paciencia, su tiempo y palabras de ánimo para culminar mi proyecto de investigación.

A todos mis maestros por el apoyo dado de alguna u otra manera para la culminación del proyecto de investigación.

A todos mis amigos que siempre supieron darme palabras de aliento para seguir adelante. Por siempre estar a mi lado apoyándome para culminar mi tesis.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

Portada	I
Aprobación del tutor.....	II
Declaración de autoría del trabajo de titulación	III
Aprobación del tribunal de grado.....	IV
Dedicatoria.....	VI
Agradecimiento.....	VII
Índice de contenidos general	VIII
Índice de tablas.....	XI
Índice de figuras.....	XII
Resumen.....	XIII

TEXTO

CAPITULO I

EL PROBLEMA

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

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Investigativos.....	6
2.1.1 Uso ancestrales de plantas medicinales.....	6
2.1.2. Chuquiragua.....	7
2.1.2.1 Análisis fitoquímico	7
2.1.3. Métodos de obtención de principios activos.....	8
2.1.3.1 Secado por aspersión.	8
2.1.4. Actividades biológicas <i>in vitro</i>	9
2.1.4.1. Actividad Antioxidante	9
2.1.4.2. Actividad Antiinflamatoria.	11
2.1.4.3. Actividad citotóxica frente a células del cáncer de mama.	12
2.2. Hipótesis.	14
2.2.1 Hipótesis Nula	14
2.2.2. Hipótesis Alternativa.....	14
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis.....	15
2.3.1. Variable dependiente.	15
2.3.2. Variable independiente.	15

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y Equipos	16
3.1.1. Material	16
3.1.2. Reactivos	16
3.2. Métodos	17
3.2.1. Materiales Vegetal	17
3.2.2 Secado del material vegetal	17

3.2.3. Obtención de Extractos Acuosa y Etanólicos	18
3.2.4 Concentración del extracto líquido	18
3.2.5. Determinación de sólidos totales (SST)	18
3.2.6. Secado por aspersión (Spray Dryer).	19
3.2.7. Actividad Antioxidante.	19
3.2.8. Actividad Antiinflamatoria.....	19
3.2.9. Actividad Citotóxica.	21
3.2.10. Análisis estadístico	21

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de resultados	22
4.1.1. Análisis fisicoquímico	22
4.1.2. Actividad antiinflamatoria	24
4.1.3. Actividad citotóxica	26
4.1.3. Actividad antioxidante	26
4.2. Verificación de hipótesis.....	31

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	32
5.2. Recomendaciones	32

MATERIAL DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas	34
Anexos	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I Rendimiento de sólidos totales extraídos de los diferentes extractos	22
Tabla II Media y desviación estándar obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante	29
Tabla III Análisis de varianza del extracto acuoso hojas secadas al sol	45
Tabla IV. ANOVA del extracto acuoso hojas secadas a la estufa.....	45
Tabla V Análisis de varianza del extracto agua-etanol 96% secado al sol	45
Tabla VI Análisis estadístico de la variabilidad entre la concentración y tipo de disolvente de los extractos: hidroalcohólico y acuoso hojas secadas al sol.	45
Tabla VII Análisis estadístico de los extractos acuoso hojas secadas al sol y la estufa.	45
Tabla VIII. Análisis de varianza del estándar y el extracto agua etanol hojas secadas al sol.....	46
Tabla IX. Análisis de varianza del extracto acuoso hojas secadas al sol y la aspirina.	46
Tabla X. ANOVA de comparación del estándar y el extracto acuoso hojas secadas a la estufa	46
Tabla XI. Análisis de varianza entre las absorbancias y los tipos de solvente obtenidas mediante el método MTT.....	46
Tabla XII . Análisis estadístico entre las concentraciones con absorbancias obtenidas de los 3 extractos mediante el método de MTT.....	46
Tabla XIII. Análisis estadístico muestras entre la media y la desviación estándar obtenidas de los 2 extractos en la evaluación de la actividad antioxidante.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. Diagrama de columnas, comparación de la actividad antiinflamatoria de los diferentes extractos y el estándar	24
Figura II. Diagrama de columnas, comparación de la actividad antiinflamatoria teniendo como factor de estudio el tipo de secado	25
Figura III. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso hojas secadas al sol. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica	27
Figura IV. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto agua-etanol hojas secadas al sol. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica	27
Figura V. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto etanólico hojas secadas al sol. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica	28
Figura VI. Diagrama de columnas para los disolventes usados para la obtención de los extractos. Efecto del tipo de solvente sobre la actividad citotóxica	29

RESUMEN

La subutilización que existen de las plantas medicinales en el Ecuador ha conllevado a buscar nuevas alternativas para la obtención de principios activos mediante procesos tecnificados y con el empleo de plantas endémicas del Ecuador. El objetivo de la investigación fue la evaluación de los principios activos presentes en los extractos vegetales de Chuquiragua en distintas actividades biológicas *in vitro*. Los extractos se obtuvieron a partir de las hojas y flores mediante un proceso de maceración con 2 tipos de solventes: agua y etanol. El proceso de secado por aspersión de los extractos permitió obtener un polvo compacto. Las actividades biológicas se evaluaron mediante métodos *in vitro*, la actividad antiinflamatoria mediante el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos. La actividad citotóxica se cuantificó mediante un método colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) con líneas celulares de cáncer de mama MFC-7 ATCC. La actividad antioxidante mediante quimioluminiscencia. En las tres actividades biológicas *in vitro* evaluadas el mejor tratamiento fue el extracto hidroalcohólico hojas secadas al sol con los siguientes resultados: actividad antiinflamatoria 92,602% de protección, antioxidante 147409,481 µg ácido gálico/g de muestra y citotóxica con porcentaje de muerte celular del 98,913%. Las hojas y flores de la Chuquiragua presentan actividades biológicas, que mediante procesos de extracción adecuados se podrían obtener principios activos y ser usados en el campo médico con estudios toxicológicos previos.

Palabras claves

Actividades biológicas in vitro, chuquiragua, maceración, plantas medicinales, secado por aspersión.

ABSTRACT

The unsuitable use of medicinal plants in Ecuador has led to the search for new alternatives for reducing these problems such as getting active compounds through technical processes and the use of endemic plants of Ecuador. The aim of the present investigation was to evaluate active compounds showed in the vegetal extracts of Chuquiragua of different *in vitro* biological activities. The extract was obtained from the leaves and flowers through a maceration process with different solvents such as: distilled water and ethanol. Through the spray drying method, a compact powder of different extracts was obtained. The biological activities were evaluated through *in vitro* methods, the anti-inflammatory activity was evaluated using erythrocytes from healthy patients to review the stability of the membrane of giving extract to avoid starting an inflammatory process. The cytotoxic activity was quantified through a colorimetric method of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazololium bromide (MTT) with cellular lines of breast cancer MFC-7, and serial dilutions. In anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic activities, the aqueous ethanol leaves dried in the sun was the best treatment with these results 92,602% of the protection, 147409,481 µg Gallic acid/g sample and 98,913% of inhibition cellular respectively. In conclusion, flowers and leaves of Chuquiragua showed biological activities that through pharmacological processes might have active compounds. These may be used in medical ambit.

Keywords

Chuquiragua, in vitro biological activities, maceration, medicinal plants, spray drying.

.

INTRODUCCIÓN

Los efectos secundarios ocasionados por medicamentos de origen sintético han generado un auge en la utilización de plantas medicinales con principio activos, los cuales pueden ser utilizados para la producción de nuevos medicamentos (Palacios, s. f.)

La fitoterapia consiste en la utilización de principios activos de origen vegetal para la formulación de medicamentos, estos provienen de una determinada planta medicinal, sin embargo, la velocidad de reacción de estos compuestos es lenta por lo que su uso es limitado. Existen un sinnúmero de medicamentos reconocidos que fueron aislados de plantas medicinales que se usan hasta hoy para el tratamiento de enfermedades catastróficas como el cáncer (Villavicencio, Pérez, Mendoza, & Maldonado, 2008).

La cordillera de los Andes es considerada uno de los lugares más multidiversos por la presencia de plantas medicinales con distintas propiedades curativas. Entre las que se encuentra la planta Chuquiragua que crece 2500 metros sobre el nivel del mar (msnm), existiendo en el Ecuador dos especies identificadas *Chuquiragua jussieui* y *arcuata*.

Chuquiragua jussieui presenta propiedades curativas que se usan desde tiempos ancestrales para problemas de salud entre las que se mencionan el uso en infusión para el tratamiento de problemas de la próstata, problemas hepáticos y estomacales por su capacidad diurética (Barrera, 2015). Sin embargo, es necesario realizar investigaciones que fundamenten este conocimiento ancestral, en propiedades que se consideran de gran interés para el ámbito biotecnológico entre las que se puede mencionar las propiedades citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante.

La importancia que presentan estas propiedades en los sistemas vivos es que están involucradas en proceso de prevención de enfermedades que hasta el día de hoy tienen

cura o presentan un tratamiento complicado que requiere una inversión económica elevada, por la cual el empleo de principios activos que se originan en la naturaleza podrían ser de gran relevancia para países subdesarrollados en donde el acceso otro tipo de medicamentos es limitado.

La utilización de los extractos de *Chuquiragua jussieui* como fuente de principios activos puede ser una alternativa para el tratamiento de enfermedades, por ende, la investigación tiene por objeto evaluar las actividades biológicas de los diferentes extractos obtenidos a partir de las hojas y flores de Chuquiragua.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de investigación

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *IN VITRO* DE DIFERENTES EXTRACTOS DE CHUQUIRAGUA (*Chuquiragua jussieui*) OBTENIDOS MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN

1.2. Justificación

En la actualidad la mayoría de investigación sobre las diferentes actividades biológicas que presenta los metabolitos secundarios inmersos en las plantas medicinales ha sido de gran aporte para la farmacología. En el Ecuador no existen suficientes estudios sobre las plantas endémicas medicinales que han sido utilizadas desde tiempo ancestrales por sus propiedades y hoy en día están subutilizadas con otros fines, por lo que se considera que este un proyecto es de gran relevancia en el ámbito biotecnológico (Varea et al., 2007).

El consumo prolongado de medicamentos de origen sintéticos afecta a la respuesta inmune de los organismos. Por tal motivo se buscan nuevas alternativas naturales que sean eficaces y eficientes en el tratamiento de estas enfermedades, unas de las posibles opciones pueden ser el uso de diferentes extractos de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*).

Por tal motivo el uso de metabolitos secundarios vegetales para la formulación de medicamentos ofrece, una enorme ventaja con respecto a tratamientos convencionales, debido a que en las plantas los principios activos se encuentran equilibrados por la

presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse entre sí (Jover & García, 2003).

El propósito de la investigación es evaluar actividades biológicas poco estudiadas. El estudio de actividad citotóxica frente células tumorales de esta especie será nuevo en el Ecuador a pesar de tratarse de una planta endémica y de existir evidencia que otra especies del mismo género presente ésta actividad biológica (Mendiondo, Juarez, Zampini, Isla, & Ordoñez, 2011), lo que permitirá ampliar los conocimientos científicos sobre las propiedades curativas de la Chuquiragua y servir como punto de partida para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Los resultados obtenidos podrían servir para posteriores investigaciones que se encuentren enfocadas en la formulación de medicamentos de origen natural en las cuales se utilice como principio activo metabolitos de la planta en estudio, con las cuales se podrá tener beneficios en la salud de las personas y tendría un impacto socio-económico en las comunidades que se dedican a la siembra, recolección y venta de este tipo de planta medicinal.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de diferentes extractos de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*) obtenidos mediante secado por aspersión.

1.3.2. Objetivos específicos

- Obtener diferentes extractos de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*) por medio de secado por aspersión.
- Determinar la influencia que presenta el método de secado del material vegetal en las actividades biológicas de diferentes extractos de Chuquiragua.
- Cuantificar el efecto citotóxico de diferentes extractos Chuquiragua sobre líneas tumorales mediante el método de MTT.

- Determinar la actividad antiinflamatoria de los diferentes extractos de Chuquiragua mediante el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Investigativos.

2.1.1. Usos ancestrales de plantas medicinales.

Ecuador es uno de los países más biodiversos en plantas, las cuales poseen un sinnúmero de propiedades curativas. Las plantas medicinales se emplean desde tiempos ancestrales para disminuir el dolor, aliviar dolencias, combatir ciertas inflamaciones o curar enfermedades que solo se cree que tienen sanación con el uso de plantas milenarias (Madaleno, 2007).

Las ventajas que presenta esta alternativa como tratamiento es su fácil accesibilidad, su costo reducido y los niveles de toxicidad que presenta son relativamente reducidos en comparación con los tratamientos tradicionales que obtienen los fármacos a partir de proceso de síntesis química que involucran una serie de catalizadores (Gallegos, 2016).

El uso de plantas medicinales y fármacos se consideraban ramas diferentes de estudio, sin embargo existen una compatibilidad entre los tratamientos alternativos con los tradicionales que presentan ciertos beneficios en países desarrollados que buscan mejorar las condiciones de vida y en países subdesarrollados en donde el uso de plantas medicinales en algunos casos es la única alternativa de curación para las ciertas dolencias (Arias, 2009). La incorporación de la medicina tradicional a un sistema de salud intercultural es una política de estado que promueve la creación de leyes sobre el empleo de la medicina tradicional y alternativa a beneficio de la salud pública y privada (Gallegos, 2016). Sin embargo, es necesario realizar pruebas fitoquímicas que garantice que el principio activo obtenido a partir de una determinada planta medicinal no cause reacciones adversas y presente un riesgo mínimo para la salud del consumidor (OMS, 2004).

2.1.2. Chuquiragua

La planta de Chuquiragua crece en la cordillera de los Andes a 2500 a 3000 metros sobre el nivel del mar, es una de las plantas más reconocidas por sus propiedades curativas perteneciente a la familia de la *Asteraceae*. Se presenta como un arbusto que mide aproximadamente 1,2 m con ramas consistentes, hojas pequeñas con una terminación en punta que le permite protegerse de ataques de depredadores y con flores muy compactas de color anaranjado (Alessandro, s. f.).

Chuquiragua jussieui presenta propiedades curativas que se usan desde tiempos remotos entre los que se mencionan: ayudar a disminuir la fiebre, facilitar la cicatrización de heridas antiguas y además es diurética (Astudillo, 2003). Se usan comúnmente para problemas estomacales (Ansaloni et al., 2010). Actúa como estimulante del sistema inmunológico y además presenta propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes.

Los extractos obtenidos a partir de la especie *Chuquiragua spinosa* fueron sometidos a un análisis fitoquímico, en donde se demostró la presencia de nueve glucósidos flavonoides, esto compuestos naturales son propios de cada planta y los mismos que pueden estar involucrados en acciones antioxidantes (Landa, Casado, & Calvo, 2009)

2.1.2.1. Análisis fitoquímico

Según Rondón et al., (2015) al realizar un análisis fitoquímico de diferentes plantas medicinales usadas en el Ecuador se muestra que la Chuquiragua presenta una mínima concentraciones alcaloides, el contenido de polifenoles totales es elevado, este tipo de compuestos permiten que presenten propiedades antioxidantes.

En un estudio fitoquímico cualitativo se presenta que la chuquiragua tiene un contenido de flavonoides y saponinas abundantes, mientras que se obtuvo un contenido moderado de esteroides y triterpenoides y finalmente en el análisis de quinonas y antraquinonas este dio negativo (Rondón et al., 2015).

La presencia de flavonoides permite contrarrestar los ataques de radicales superóxido o hidroxilo, además estos compuestos están involucrados en actividades antiinflamatoria y antitrombótica (Martínez-Flores, González-Gallego, Culebras, & Tuñon, 2002).

2.1.3. Métodos de obtención de principios activos

Los procesos de obtención tradicionales de principios activos a partir de plantas presentan ciertos problemas que generan desventajas en el producto final.

Los problemas más evidentes son: el tamaño de las partículas y la inestabilidad por cual las industrias farmacéuticas han incorporado nuevas técnicas para disminuir estos problemas.

Una estas técnicas es el secado por aspersión es una técnica que reduce el número operaciones unitarias requeridas para transformar un líquido en un polvo compacto al estar en contacto con un aire caliente permitiendo reducir el tamaño de partículas, aumentar la estabilidad, la eficacia en la dosificación, liberación controlada y prolongar el tiempo de vida útil.

2.1.3.1. Secado por aspersión.

El proceso de transformación de una solución en un polvo compacto se denomina secado por aspersión, esta técnica es usada en distintas industrias que requieren mejorar las condiciones del producto final.

La industria farmacéutica, emplea esta técnica con el propósito de general partículas huecas cuya función sea de transportar los principios activos permitiendo que éstos sean biodisponibles y más estables (Mondragón, Julia, Barba, & Jarque, 2013).

El proceso involucra una serie de variables que pueden influir en las características de las partículas entre los que se mencionan el contenido de sólidos, la entrada y salida de temperatura, entre otros, por lo cual es necesario contralar dichas variables para que el producto final presente las características deseadas.

El secado por aspersión es un proceso empleado ampliamente en la industria farmacéutica porque permite reducir el número de operaciones unitarias, el tamaño de las partículas del producto final sin afectar al principio activo, además mejora la velocidad de disolución que en ciertos fármacos es escaso (Jain Manu et al., 2012).

Las ventajas que presenta esta técnica, es que al tratarse de un proceso en donde se puede controlar las determinadas variables el producto final es más higienizado y la forma de las partículas son más uniformes (GEA, 2010).

2.1.4. Actividades biológicas *in vitro*.

2.1.4.1. Actividad Antioxidante

2.1.4.1.1. Compuestos antioxidantes

Los fenoles son compuestos del metabolismo secundario importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas, permitiéndoles protegerse de ataques de depredadores y condiciones adversas del ambiente. Se producen mediante la vía del shikimato a partir de las síntesis de fenilalanina (Muñoz, Ramos, Alvarado, & Castañeda, 2007).

Los flavonoides son compuestos que pertenecen al grupo de los polifenoles, presentan propiedades antioxidantes las que les permiten proteger a las células del estrés oxidativo ocasionada por las especies reactivas de oxígeno neutralizando estas especies y evitando la aparición de enfermedades mediante la estimulación del sistema inmune y reducción la sedimentación plaquetaria (Muñoz et al., 2007).

El uso de flavonoides obtenidos a partir de las plantas como tratamiento para enfermedades se considera que tiene una ventaja que es su bajo costo (Gutiérrez, Ortiz, & Mendoza, 2008)

2.1.4.1.2. Mecanismo de protección antioxidante.

A los compuestos antioxidantes se le puede clasificar como primarios cuando actúa impidiendo la liberación de más ERO, en este grupo se encuentran las enzimas. Los antioxidantes secundarios evitan la reacción en cadena mediante la captura de los radicales libres dentro grupo se tiene a las vitaminas E y C entre las más representativa y finalmente los terciarios que actúan reparando células dañadas por el estrés oxidativo dentro de este grupo se tiene a enzimas específicas como la endonucleasa (Del Río Tovar, 2013)

El cuerpo humano responde frente a especies reactivas de oxígeno (ERO) impidiendo el paso de oxígeno hacia las demás células. Los mecanismos que se generan en el interior son tipo homeostático teniendo que ser específicos para lograr combatir con un sinnúmero de radicales libres existentes. Entre los mecanismos más comunes se tiene: moléculas de gran tamaño se agrupan evitan que las especies reactivas reaccionen, enzimas y cosustratos que actúan como compuestos antioxidantes, enzimas productoras de cosustratos antioxidantes, agentes endógenos y exógenos en el caso del primero se trata de compuestos que son atacados por los radicales libres, pero impiden que existan un daño en las macromoléculas y los exógenos provienen de la alimentación y finalmente un conjunto de reparación (Quintanar & Calderón, 2009).

Chuquiragua lessing pertenece a la familia de la Asteraceae. Mediante un análisis fisicoquímico realizado a esta planta se evidenció la presencia de flavonoides, triterpenos, este tipo de compuestos podrían ser responsables de las propiedades antioxidante, por cual el resultado obtenido fue relativamente alto siendo de 86,4 % en la muestra usada en el ensayo (Ramírez, Bonilla, Suarez, Choquesillo, & Castro, 2014).

Se ha demostrado que el extracto acuoso de *Chuquiragua jussieu* tiene una elevada actividad antioxidante en presencia de un tensoactivo SDS (dodecilsulfato sódico), siendo CI50 64, 89 y CI90 89,96 (Alberto Dueñas, Alcivar, Olazábal, & Cortés, 2014).

2.1.4.1.2. Métodos para la determinación de la actividad oxidante

Los métodos para la determinación de la actividad antioxidante difieren del sustrato oxidable ya sea químico o biológico, pueden ser de dos tipos: los que se basan en la transferencia de átomos de hidrógeno y en transferencia de electrones. En el primer caso se basa en reacciones que involucra velocidad de reacción mientras que en la transferencia de electrones se basa en reacciones redox en donde el oxidante indica el final de la reacción (Del Río Tovar, 2013).

2.1.4.2. Actividad Antiinflamatoria.

2.1.4.2.1. Membrana de los eritrocitos.

Los eritrocitos son células anucleadas bicóncavas sin orgánulos por lo cual se considera un modelo celular simple para la evaluación de determinadas actividades biológicas, cuya membrana celular se encuentra compuesta principalmente por fosfolípidos, proteínas y un citoesqueleto cumpliendo funciones de transporte activo y pasivo por lo cual puede ser considerada como modelo de las membranas plasmáticas en general.

La constante exposición de la membrana a estrés oxidativo puede causar un desequilibrio en la liberación de radicales libres lo que puede causar problemas endógenos que se evidencia con la liberación de enzimas que afectan de distintas formas entre las que se mencionan la presencia de patologías cardiovascular, aterosclerosis (Enciso, 2013).

2.1.4.2.2. Proceso inflamatorio

El proceso inflamatorio inicia como una respuesta del sistema inmune a factores exógenos que pueden ser de tipo físicos, químicos o biológicos los cuales causan daños en células o tejidos vascularizados (García, 2008).

La respuesta al proceso inflamatorio puede ser de tres tipos celular, de los tejidos y sistémica. La de tipo celular es específica actúan sobre el ciclo celular permitiendo la reparación de células o apoptosis celular. La tisular ocurre en cuatro fases en la primera las terminaciones nerviosas son estimuladas, en la segunda fase las células con daños provocan la liberación de enzimas, en la tercera fase se produce la respuesta inmune innata mediante la colaboración de microorganismos y enzimas que se liberan

en la etapa dos y finalmente los leucocitos interfieren el proceso inflamatorio mediante las señales dadas anteriormente. La respuesta a nivel del organismo se presenta mediante signos como fiebre, los procesos metabólicos de ciertos órganos son afectados. Este se produce mediante mediadores que liberan prostaglandinas (García, 2008).

2.1.4.2.2. Mecanismo de la estabilización de la membrana de los eritrocitos

La membrana de los eritrocitos es semejante a la membrana lisosomal por lo cual la estabilización de esta membrana permite reducir la respuesta antiinflamatoria y por ende la liberación de constituyentes de los lisosomas como proteasas que puede provocar inflamación en el tejido afectado y un daño adicional en las células liberadas (Kumar, Bhat, Kumar, Bohra, & Sheela, 2011).

La presencia de compuestos antioxidantes en las plantas y frutas puede reducir el estrés oxidativo de las células de los eritrocitos permitiendo que se mantenga intacta la forma de los eritrocitos.

Según Ugartondo (2009), entre los ensayos más utilizadas para determinar el porcentaje de protección de la membrana de los eritrocitos en presencia sustancias que generan radicales libres se usa el método que consiste en la oxidación de la hemoglobina en donde se verifica si los agentes oxidantes como: detergentes, tensoactivos, calor, producen alteraciones en la membrana midiendo este resultado a través espectroscopia 540 nm obteniendo como resultado la capacidad que tienen el agente oxidante o antioxidante para ingresar al interior de la célula.

2.1.4.3. Actividad citotóxica frente a células del cáncer de mama.

2.1.4.3.1. Uso de plantas

La evaluación de las propiedades citotóxicas de las plantas se remonta a 1950 lo que ha permitido tener hasta el día de hoy grandes avances en este como el descubrimiento de alcaloides que ha permitido el tratamiento de este tipo de enfermedades entre las que se mencionan la planta vinca de Madagascar de la cual se obtuvo vinblastina y vincristina que son empleadas en el tratamiento de leucemia, para el cáncer de seno,

cerebro y ovarios se usan taxol que es un alcaloide que se obtuvo a partir de tejo que es tipo de conífera perenne (Villavicencio et al., 2008).

En referencia al género Chuquiragua se muestran que en un estudio realizado en una especie desconocida de chuquiragua mostró actividad citotóxica, mediante la presencia de un flavonoide denominado quercetina glicosido, este tipo de compuesto protege al genoma de ADN dañado el mismo que puede inducir a ciertos factores carcinógenos (Mendiondo et al., 2011). En análisis *in vivo* usando animales de experimentación y la quercetina como agente protector, se mostró que es tipo de compuesto detiene el proceso proliferativo de células cancerígenas (Merck S. A., s. f.).

2.1.4.3.2. Cáncer de mama.

El cáncer de mama se presenta cuando células sanas del tejido mamario inician un proceso de proliferación descontrolado de células las que se convierten en tumores. Existen distintos factores que estimulan la aparición de esta enfermedad entre los que se mencionan factores exógenos y endógenos.

Factores exógenos como la exposición a estrógenos, el lugar de origen y consumo de drogas psicotrópicas, entre los factores endógenos se pueden mencionar el inicio de ciclos menstruales en edades tempranas, obesidad y personas de edades avanzadas entre los más representativos (Society European for Medical Oncology, s. f.).

El proceso de propagación del cáncer de mama se da a través del sistema linfático, las células cancerosas ingresar al ganglio linfático e inician el proceso de proliferación. Entre mayor sea el número de células encontradas en los ganglios se aumentan la posibilidad de metástasis en otros órganos (Society American Cancer, 2008).

2.1.4.3.2.1. Líneas celulares del cáncer de mama.

Las líneas celulares cancerígenas presentan características poco comunes en comparación con células normales como el crecimiento sin adherirse a ninguna superficie a pesar que la relación entre la masa y el volumen de la superficie sea mayor al normal (Martinez & Navarro, 2003).

La línea tumoral MFC-7 comúnmente se usa como modelo para el cáncer mama ductal debido a la similitud que presentan entre las células del lumen de los conductos mamarios, este tipo de línea celular se obtuvo de una mujer de origen europeo a partir de una acumulación de líquido en la región pleural y con metástasis, este tipo de línea celular es positivo para receptores hormonales pero negativo para factor de crecimiento epidérmico humano (Rivera, 2013).

2.1.4.3.3. Mecanismo por el cual un compuesto produce la muerte a una célula tumoral

Los mecanismos que han desarrollado las células para evitar la proliferación celular de aquella que tienen tendencia a convertirse en tumores son de dos tipos: la apoptosis celular y senescencia celular (Pardo & Delgado, 2003).

La apoptosis celular se basa en proceso bioquímico que engloban a células dañadas y provocan su muerte sin destruir la membrana, siendo un proceso que no causa inflamación. Este proceso involucra una serie de etapas que deben ser controlados para garantizar la supervivencia de las células que no presentan problemas (Lizarre, 2007).

La senescencia celular genera procesos que impiden el crecimiento de células que tienen tendencia a convertirse en malignas. Las células a las cuales se evitan el desarrollo son aquellas que presentan problemas en los telómeros, en la compactación de la cromatina y el ADN (Pardo & Delgado, 2003).

2.2. Hipótesis.

2.2.1. Hipótesis Nula

El tipo de secado del material vegetal (estufa y acción del sol) y tipo de solvente (acuoso, 50:50, etanólico) no influyen en las actividades biológicas *in vitro*.

2.2.2. Hipótesis Alternativa

El tipo de secado del material vegetal (estufa y acción del sol) y tipo de solvente (acuoso, 50:50, etanólico) influyen en las actividades biológicas *in vitro*.

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1. Variable dependiente

Actividades biológicas (antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica).

2.3.2. Variable independiente

El tipo de secado del material vegetal (estufa y acción del sol) y tipo de disolvente (acuoso, 50:50, etanólico).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y Equipos

3.1.1. Material

Vasos de precipitación de 1000 ml (PYREX $\pm 0,05$ ml), probetas graduadas de 500, 250, 10 ml (Boro 3.3 $\pm 0,05$ ml), balones de aforo de 25 ml ($\pm 0,01$ ml), balones de aforo de 1000, 500 ml (Boro, $\pm 0,05$ ml), micropipeta de 20- 200 μ L (OHAUS $\pm 1,6$ μ L), micropipeta de 100-1000 μ L (OHAUS ± 8 μ L), puntas para micropipetas, tubos de tapa rosca, tubos plásticos de centrifuga, tubos eppendorf, frascos ámbar de 1000 ml, embudo, mortero y pistilo de porcelana, lienzo, gradillas, jeringuillas de 5 ml.

3.1.2. Equipos

Secador de bandejas (Gander MTN), plancha de calentamiento con agitación (CORNING, PC-4200), licuadora (OSTER), balanza de humedad (CITIZEN CY 720), balanza analítica (OHASUS, Modelo PA214), rotaevaporador (ELEYA, OSB -2100), micro Spray Dryer (Buchi B 191), microcentrifuga (SPECTRAFUGE 24D), vórtex (Vórtex) espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000), centrifuga (Hettich Zentrifugen).

3.1.2. Reactivos

Para la obtención de extractos vegetales

Agua destilada, Etanol 99%

Para formulación del microencapsulado

Maltodextrina, Goma Arábica

Para actividades biológicas *in- vitro*

Actividad Antioxidante

Luminol (Western Blotting Luminol Reagent), FeSO₄ (Hierro II sulfato heptahidratado, ERBApharm), H₂O₂ (ACS Reagent Grade, Ricca Chemical), Trolox (ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (Sigma)

Actividad Antiinflamatoria

Sangre de voluntarios sanos que no hayan ingerido por dos semanas ningún tipo de antiinflamatorios, Aspirina (Bayer, Ácido Salicílico 500 mg), Solución tampón fosfato 0,01 M pH 7,4 a 25°C (PBS), Solución Alsever pH 7,0 a 25°C.

Actividad Citotóxica

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 ATCC se obtuvo del tejido mamario de una mujer caucásica de 69 años, es un tipo de tejido no adherente que miden aproximadamente 20-24 micrones sus condiciones de almacenamiento son en nitrógeno líquido, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich).

3.2. Métodos

3.2.1. Materiales Vegetal

Las hojas y flores de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*), se obtuvieron de los Mercados (Mayorista, Modelo) de la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua.

3.2.2. Secado del material vegetal

Aproximadamente 4 kg de material vegetal fueron lavados con agua destilada y dejados secar por 24 horas al ambiente para eliminar la mayor cantidad de agua posible. Se tomaron 2 kg los que fueron colocados en la estufa de bandejas por 24 horas a 60°C. Los 2 kg restantes de material vegetal se secaron de forma natural bajo la acción del sol aproximadamente 8 horas diarias por 30 días. Una vez seco el material vegetal se procedió a triturar con una licuadora (OSTER) hasta obtener un polvo.

3.2.3. Obtención de Extractos Acuosos y Etanólicos

El material vegetal seco y triturado de hojas y flores fueron pesados por separado en una relación 1:15 es decir (67g/1000 ml).

Se usaron 2 disolventes, para la preparación de los diferentes extractos en el caso de los extractos acuosos se usaron agua destilada siendo una solvente de tipo polar, para los extractos etanólicos se usaron etanol un solvente de polaridad más elevada en relación al agua. Se midieron 1000 ml de cada uno de los solventes y se agregaron en un vaso de precipitación en conjunto con los 67 g de material vegetal. Para la preparación de los extractos agua-etanol se usaron 500 ml de agua destilada y 500 ml de etanol (relación 1:1) los cuales se agregaron en un vaso de precipitación con 67 g de material vegetal.

Una vez mezclado el solvente con el material vegetal se los colocó en una plancha de calentamiento con agitación constante a 100°C y 500 rpm, hasta que llegó a su punto de ebullición, posterior a esto se dejó hervir por 30 min. Finalmente se procedió a filtrar de forma manual mediante un lienzo repitiendo el proceso 3 veces.

Las variables de estudio fueron tipo de secado del material vegetal (estufa o bajo acción del sol), tipo de disolvente (etanol, etanol- agua, agua).

3.2.3. Concentración del extracto líquido

Se colocaron en el balón vidrio del rotaevaporador (EYELA, Tokyo) aproximado de 800 ml de los diferentes extractos. Los distintos extractos se calentaron a 74°C con una rotación constante de 500 rpm hasta evidenciar la eliminación de la mayor cantidad posible de disolvente en el caso de los acuosos y los extractos 50:50 hasta alcanzar un volumen 500 ml, mientras que en los extractos etanólicos hasta alcanzar un volumen de 40 ml.

3.2.4. Determinación de sólidos totales (SST)

Los sólidos totales de los extractos fueron determinados mediante un método gravimétrico con el uso de la balanza de humedad (Citizen, USA). Se tomaron 3ml de

cada uno de los extractos y fueron colocados sobre el plato de la balanza de humedad. Una vez terminado el proceso se registró el porcentaje de humedad. El porcentaje de sólidos totales se obtuvo de la diferencia de cien por ciento menos el porcentaje de humedad.

3.2.5. Secado por aspersión (Spray Dryer)

Se determinó la cantidad requerida de maltodextrina mediante una relación al 30% entre la cantidad sólidos solubles totales y el volumen de alimentación. Se calentaron parcialmente los extractos en una plancha de calentamiento con agitación constante y se agregó la maltodextrina. Se acondicionó el equipo de secado por aspersión (Buchi B 191, Suiza), a una temperatura de entrada de 140°C y la temperatura de salida 80°C. El extracto seco obtenido se les sometió a ensayos de actividades biológicas.

3.2.7. Actividad Antioxidante.

La actividad antioxidante de los extractos se determinó por quimioluminiscencia, mediante una reacción sencilla y rápida de transferencia de hidrógeno cuyo iniciador del proceso oxidativo es 2',2'-azobis-2-metilpropionamida (APPH.), la reacción ocurre cuando el luminol interactúa con radicales libres y la emisión de esta reacción ocurre en la región visible del espectro electromagnético siendo fácil de detectar. Se añadieron los extractos a una concentración (2 mg/ml), junto al luminol (0,42mM), FeSO₄ (2,5 mM), H₂O₂ en una relación 1:1 en este orden y se mezclaron. Inmediatamente se midieron la quimioluminiscencia emitida cada 6 s durante 1,5 min a una longitud de onda 490 nm. En el blanco fue la misma solución anterior exceptuando el H₂O₂.

Las absorbancias obtenidas se interpolaron en la curva estándar de ácido gálico, los resultados se obtuvieron µg ácido gálico/g muestra.

3.2.8. Actividad Antiinflamatoria

3.2.8.1. Obtención de la solución de los eritrocitos.

Para la obtención de los eritrocitos se usó la metodología con ciertas modificaciones (Kumar, Bhat, Kumar, Bohra, & Sheela, 2011). Se recolectaron 5ml de sangre humana

de voluntarios sanos que no hayan ingerido ningún analgésico o antiinflamatorio 2 semanas antes del experimento y se mezclaron con igual volumen de una solución anticoagulante, se centrifugó por 5 min a 3000 rpm. Se retiró el sobrenadante las células de los eritrocitos obtenidas fueron lavadas con solución tampón fosfato (PBS) y centrifugaron por 5 min a 3000 rpm, repitiendo el proceso 3 veces más, posterior a ello se preparó una solución al 40% con los glóbulos rojos obtenidos después de los 4 lavados en tampón fosfato (PBS).

3.2.8.2. Determinación del porcentaje de actividad antiinflamatoria

Se determinó el porcentaje de actividad antiinflamatoria mediante el método de estabilización de la membrana de los eritrocitos según la metodología de Rashid et al., (2011), con ciertas modificaciones. Se preparó una solución madre (40 mg/ml) de cada uno de los extractos en tampón fosfato de sodio (PBS) 10mM con pH 7,4 El tampón fosfato se preparó disolviendo en 1000 ml de agua destilada 0,26 g de fosfato diácido de sodio dihidratado, 1,15 g de fosfato ácido de potasio y 9 g de cloruro de sodio. A partir de la solución madre se prepararon 30 ml de solución de los diferentes extractos a concentraciones (1; 1,5; 2 y 2,5 mg/ml) en PBS. Se adicionó en tubo de centrifuga 3 ml de cada una de las soluciones previamente preparadas y 30µl de la solución de eritrocitos (40%) obtenidos, se mezclaron ligeramente y se colocaron en un baño María a 54°C por 20 minutos a esta temperatura se produce la hemólisis de los eritrocitos y los extractos protegen a los eritrocitos de este proceso hemolítico. Luego se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y finalmente el sobrenadante de cada extracto se midió su absorbancia a 540 nm porque la hemoglobina absorbe a esta longitud de onda. Se usó como estándar de referencia a la aspirina (Bayer, Ácido Salicílico 500 mg), con las mismas concentraciones usadas de los extractos y un control al cual se le omitiera la concentración del extracto.

La actividad antiinflamatoria se determinó a través de la siguiente expresión (Shinde, Phadke, Nair, Dikshit, & Saraf, 1998):

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

Donde:

OD₁: ensayo sin calentar, OD₂: ensayo calentando, OD₃: ensayo control calentado

3.2.9. Actividad Citotóxica.

El método de MTT consiste en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol dando lugar a formación de un compuesto denominado formazan de color azul.

Las células MFC-7 fueron incubadas con diferentes tratamientos por 48 horas. Se descartó el medio y se procedió a lavar con PBS 1X con el objeto de eliminar residuos celulares. En 1 ml de PBS se añadió 5 mg de MTT y se mezclaron con 10 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEN). En cada pocillo fueron añadidos 110 µL de la mezcla anterior y se procedieron a incubar por 4 horas a 37°C con 5% de CO₂. Luego de las 4 horas de incubación se evidenció la presencia de formazan. Se eliminaron los cristales de formazan formados y se interrumpió la reacción al agregar 100 µL de docedil sulfato de sodio (SDS)-HCl 0,01%. Una vez detenida la reacción se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ toda la noche. Finalmente, después del proceso de incubación se procedió realizar la lectura 570 nm de los ensayos mediante un espectrofotómetro.

3.2.10. Análisis estadístico

Mediante un programa estadístico, Statgraphics Centurion XVI. I se realizó un análisis de varianza, con una ANOVA simple en donde se comparó cada uno de los factores de estudios: tipo de disolvente (agua destilada, agua destilada-etanol 99% y etanol) tipo de secado (acción de sol y estufa) y concentraciones usadas en cada una de los ensayos *in vitro* y un análisis de variabilidad de datos obtenidos.

En la actividad antiinflamatoria se comparó con un estándar siendo la aspirina (Bayer, 500 mg) y control en el cual se omitió las concentraciones de extracto, mientras en la actividad citotóxica se comparó su efecto de inhibición con la utilización de un blanco (células MFC-7), extracto puro y con diluciones seriadas (1×10^{-1} a 1×10^{-9}).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de resultados

4.1.1. Análisis fisicoquímico

4.1.1.1. Determinación de sólidos solubles totales (SST)

Las hojas y flores de *Chuquiragua jussieui* se sometieron a diferentes factores: partes de la planta, tipo de secado, solvente usado para la extracción. En la tabla I se muestra las concentraciones de sólidos solubles totales.

Tabla I. Rendimiento de sólidos totales extraídos de los diferentes extractos

Tratamientos	Volumen de extracto obtenido (ml)	Concentración de sólidos solubles totales (SST) (% p/v)	Rendimiento de sólidos solubles totales extraídos (SST) (% p/v)
EAFS	350	1,86 ±0,01	9,71±0,03
EAHE	350	3,50 ±0,05	18,28±0,05
AHS	385	1,97±0,01	11,32±0,01
AHE	380	1,78±0,10	10,10±0,04
EHS	350	1,08±0,07	5,64±0,10
EHE	350	7,02±0,06	36,67±0,08

EAHS: etanol-agua flores secadas al sol, EAHE: etanol-agua hojas secadas a la estufa, AHS: acuoso hojas secadas al sol, AHE: hojas secadas a la estufa, EHS: etanólico hojas al sol, EHE: etanólico hojas a la estufa.

El rendimiento de solidos solubles totales (SST) extraídos varía de un rango de 5,64 ±0,1 a 36,67 ±0,08 % p/v. El tratamiento EHE presentó el mayor rendimiento de SST extraídos en comparación con los otros ensayos siendo de 36,67 ±0, 08 % (p/v).

Según Ochoa, Marin, Rivero, & Aguilera, (2013) esto se puede deber a que cuando existe mayor concentración del extracto existen un aumento en el porcentaje de SST, este valor demuestra la presencia de sustancias que pueden estar involucradas en actividades biológicas.

Al tratarse de una planta proveniente de los páramos andinos, está expuesta a condiciones ambientales adversas como: temperatura, humedad y excesivas precipitaciones, estos factores pudieron incidir con la concentración final de compuestos fenólicos y afectar a la concentración de sustancias solubles de hojas (Almonacid, 2016).

El extracto en el que se obtuvo mayor rendimiento de SST fue el extracto etanólico hojas secadas a la estufa por lo que se considera que este el mejor tratamiento para extracción de estos compuestos, esto puede deberse a que los compuestos que se encuentran en las hojas de Chuquiragua presenta una polaridad media lo que permite que el proceso de extracción a nivel laboratorio sea favorable. El etanol es un tipo de solvente que presentan la capacidad de formar puentes hidrógenos y ceder protones al igual que agua, sin embargo, presenta un polo lipofílico que ayuda a disolución de moléculas no polares que se encuentran presentes en sustancias orgánicas lo que facilita la extracción de este tipo de compuestos (Dorst & Gokel, 2007). Otra causa de este resultado puede ser el hecho de que este tipo de solvente estabiliza estructuras menos polares como flavonoides y evitan su peroxidación (Alvis, Martínez, & Arrazola, 2012).

Los compuestos fenólicos que pueden estar presente en las hojas de Chuquiragua pueden ser flavonoides este tipo de compuestos presentan una estructura química con un número elevado de grupos hidroxilos o azúcares lo que les permiten que sean solubles en solventes de polaridad media como es el etanol de esta forma aumentan el porcentaje de protección frente a radicales libres y su participación en actividades biológicas (Cartaya & Reynaldo, 2001).

4.1.2. Actividad antiinflamatoria

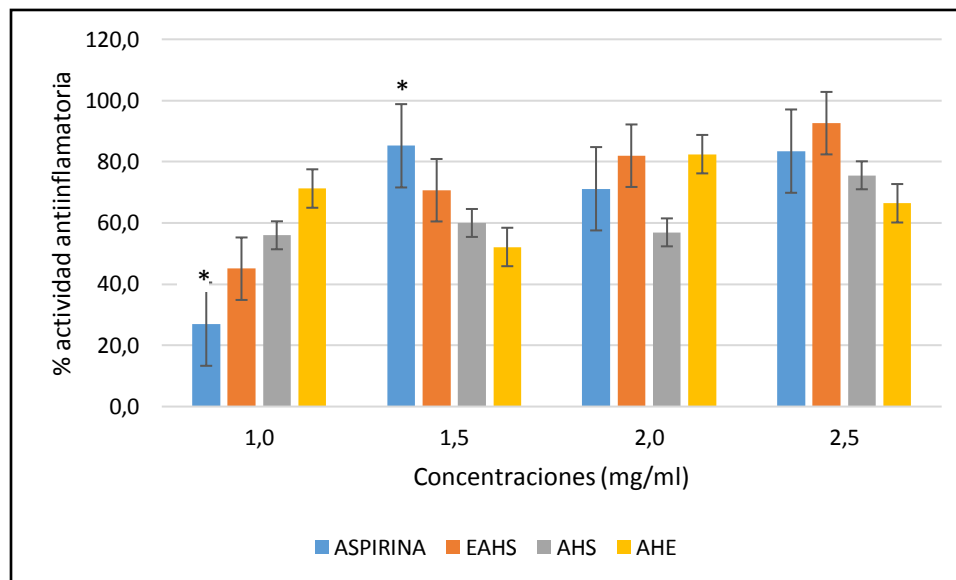


Figura I. Diagrama de columnas, comparación de la actividad antiinflamatoria de los diferentes extractos y el estándar. Análisis de varianza ANOVA un solo factor * valor $P < 0,05$. Nota: EAHE: etanol-agua hojas secadas a la estufa, AHS: acuoso hojas secadas al sol, AHE: acuoso hojas secadas a la estufa.

Al realizar un análisis estadístico comparativo entre los extractos y estándar se obtuvo que para las concentraciones 1 y 1,5 mg/ml existen una diferencia significativa. En las concentraciones restantes 2 y 2,5 mg/ml no existe diferencia significativa entre los extractos y la aspirina.

En comparación con la aspirina usada como estándar, el mejor tratamiento fue el extracto hidroalcohólico hojas secadas al sol con una actividad de 92,602% lo que indica que extracto presentan moléculas de polaridad media. El etanol al ser un solvente de polaridad media aprótico dipolar dona sus electrones los cuales pueden reaccionar con los radicales libres convirtiéndolos en compuestos más estables y deteniendo la peroxidación de los lípidos de la membrana y en conjunto con el otro disolvente que es el agua producen un medio isotónico evitando el estrés oxidativo (Mesa et al., 2015).

Otro factor causante de este resultado podría ser que al mezclar dos solventes con diferentes polaridades como es el caso del agua netamente polar y el etanol de una polaridad media se aumente el rendimiento en la extracción de compuestos bioactivos responsable de la actividad antiinflamatoria como lo indica estudios realizados en extractos de especies agroforestales (Pablón, Vanegas, Rendón, Santos, & Hernandez, 2013)

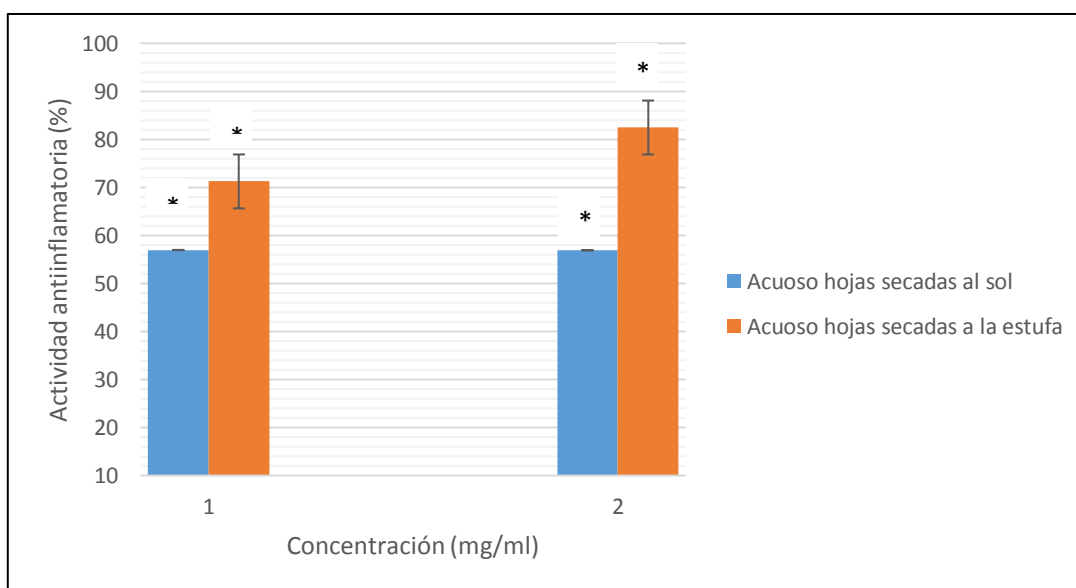


Figura II. Diagrama de columnas, comparación de la actividad antiinflamatoria teniendo como factor de estudio el tipo de secado *valor $P < 0,05$ diferencia significativa análisis de varianza de un solo factor.

El tipo de secado influye significativamente en la actividad antiinflamatoria es lo que indica el valor de $P < 0,05$ teniendo mayor actividad en los extractos acuosos secados a la estufa este puede deberse a que la exposición excesiva a radiación solar UV-B incida en el aumento de especies reactivas de oxígeno por lo cual los compuestos fenólicos posibles responsables de la actividad antiinflamatoria disminuye considerablemente para estabilizar a dichas moléculas (Carrasco, 2009).

4.1.3. Actividad Citotóxica

Para cuantificar la actividad citotóxica se usó un método colorimétrico MTT, en cual se usó células MFC-7, siendo necesario realizar diluciones seriadas desde 1×10^0 que representa el extracto hasta la 1×10^{-9}

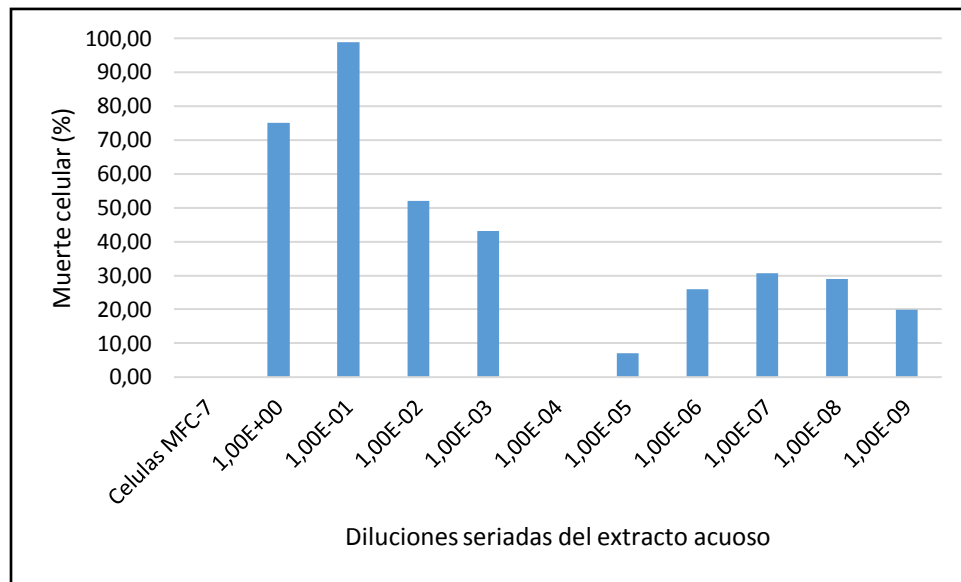


Figura III. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso hojas secadas al sol. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica



Figura IV. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto agua-etanol hojas secadas al sol. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica.

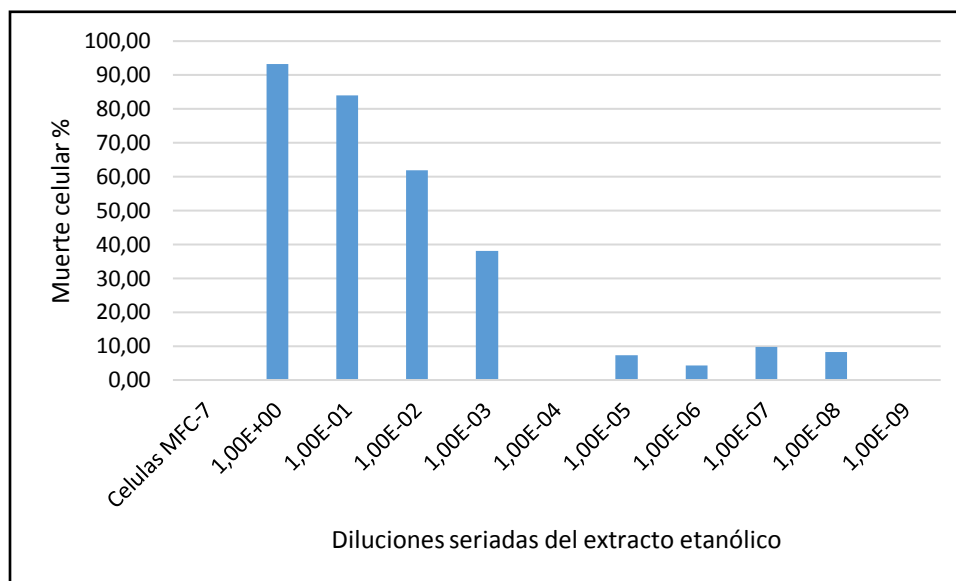


Figura V. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto etanólico hojas secadas al sol. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica

En las figuras III, IV y V se evidencian que los extractos de Chuquiragua provocan la muerte celular de MFC-7, hasta la dilución 10^{-3} , de ahí en adelante se muestra que la viabilidad celular es similar las células MFC-7 sin tratar, lo que indica que el extracto debe encontrarse en concentración que oscilen entre 50 mg/ml para que presenten actividades biológicas. El mejor tratamiento el extracto hidroalcohólico hojas secadas al sol esto se puede deber a que las moléculas que presentan propiedades citotóxicas son de polaridad media pudiendo ser flavonoides (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Los porcentajes de actividad citotóxica calculados a partir de las células MFC-7, presentan que en los 3 extractos en la dilución 10^{-4} no existen muerte celular más bien se evidencia que a esta dilución se existe proliferación celular, lo que puede entender como una respuesta del cuerpo ante sustancias que considera peligrosas para su interior, sin embargo, en las diluciones siguientes existe un porcentaje bajo de apoptosis celular.

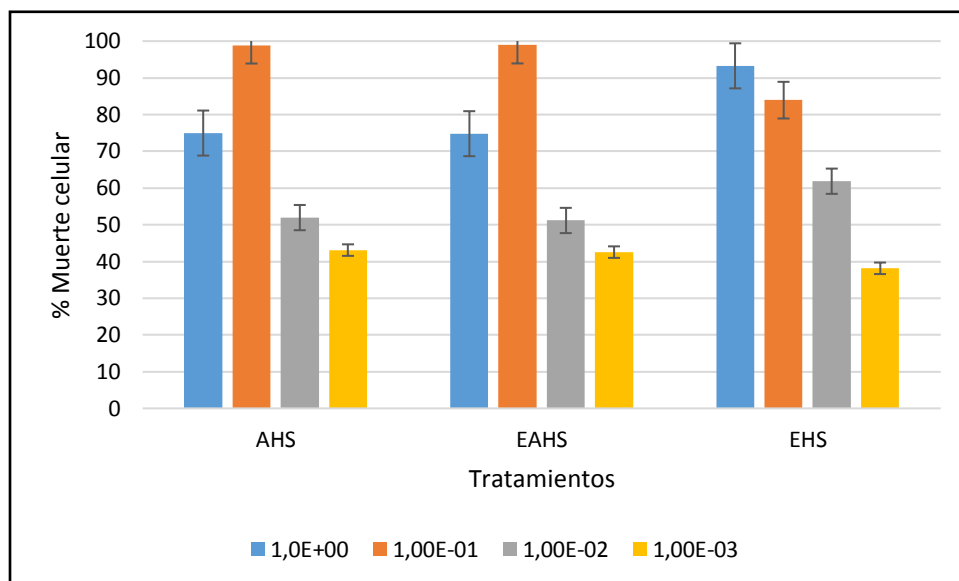


Figura II. Diagrama de columnas para los disolventes usados para la obtención de los extractos. Efecto del tipo de solvente sobre la actividad citotóxica. Nota AHS: acuoso hojas secadas al sol, EAHS: etanol-agua hojas secadas al sol, EHS: etanólico hojas al sol. Análisis de varias muestras no existe diferencia significativa valor $P > 0,05$

En figura VI se muestra que no existe diferencia significativa entre el tipo de disolvente que se usen para evaluar la actividad citotóxica, por cual se considera que los compuestos activos responsables de esta actividad actúan de igual modo en los distintos disolventes siendo uno de netamente polar y el otro de polaridad media.

4.1.4. Actividad antioxidante

En la tabla II se muestra la media y la desviación estandar obtenida de los diferentes extractos en la evaluación de actividad antioxidante.

Tabla II. Media y desviación estandar obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante

Tratamiento	Media (μg de ácido gálico/g muestra)	Desviación estandar
EAFS	82741,779	899,901
EAHE	147409,481	4217,207
AHS*	118397,601	2720,184
AHE*	76319,302	588,659

EAFS: etanol-agua flores sol, EAHE: etanol-agua hojas secadas a la estufa, AHS: acuoso hojas secadas al sol, AHE: acuoso hojas secadas a la estufa. *Valor $P < 0,05$ mediante un análisis estadístico muestral.

Mediante un análisis estadístico muestral se obtuvo que existe una diferencia significativa entre las medias de los dos extractos AHS y AHE, lo que indica que el tipo de secado influyen la actividad antioxidante, una de las causas de este resultado puede ser la exposición del material vegetal a luz UV-B por 30 días incida en el aumento de la concentración de compuestos fenólicos como una respuesta de defensa de la planta (Carrasco, 2009).

En la tabla II se muestra que el extracto etanol-agua hojas secadas al sol presenta mayor actividad antioxidante esto indica que los compuestos que presentan esta actividad tiene una polaridad media, además a media que se aumente la polaridad del solvente del mismo modo lo hace el contenido de fenoles como se evidenció en un estudio realizado a los extractos de *Menta* que presentaron mayor actividad antioxidante en disolventes de polaridad media en comparación con los que se obtuvieron a partir de hexano (Barchan et al., 2014).

Según Rahman et al., (2013) la actividad antioxidante que presentan los extractos vegetales depende del disolvente que se use para su extracción en el caso de los extractos de *Centella asiática* al 50% de etanol se observa mayor actividad antioxidante en comparación con los extractos etanólicos al 100%.

En estudio *in vivo* realizado a los extractos de *Chuquiragua spinosa* estos presentaron un elevado porcentaje de protección contra los radicales libres, sin embargo, el extracto que presentó mayor protección fue el que se obtuvo a partir de 50% de metanol el mismo que produce una inhibición de edema producidos en los ratones de experimentación en 69% en un periodo de 4 horas en relación al extracto en que solo se empleó metanol como disolvente, esto indica que al realizar una extracción que involucra más de un disolvente, esto facilita la extracción de fenoles que se consideran que son los compuestos involucrados en esta actividad biológica. (Casado et al., 2011).

Otro factor que también pueden afectar a la actividad antioxidante es el contenido de fenoles el cual se ven afectados por el tiempo de extracción y relación material vegetal disolvente. El tiempo de extracción y la relación material vegetal-disolvente usados para la obtención de los diferentes extractos fueron de 30 minutos y 67g/1000ml respectivamente. En estudios realizados a extractos de *Chuquiragua jussieui* obtenidos por lixiviación muestra que el tiempo de extracción óptimo es de 45 min y la relación materia vegetal-disolvente más favorable es 1g/10 ml. Lo que indica que estos dos factores pudieron haber afectado a la concentración final de compuestos fenólicos

obtenidos en los cuatro tratamientos (Alex Dueñas, Alcívar, Sacon, Bravo, & Villanueva, 2016).

El extracto agua etanol hojas secadas al sol presentó mayor actividad antiinflamatoria (figura I), actividad citotóxica (figura VI) y actividad antioxidante (tabla II), esto muestra que los compuestos fenólicos responsables de estos procesos son sensibles a temperaturas elevadas como se muestran en un estudio realizado en los residuos de mandarina en que a medida que la temperatura ascendía el contenido de polifenoles descendía (Gaviria, Correa, Mosquera, Niño, & Correa, 2014). Este tipo de metabolitos inhiben la interacción entre fosfolípidos evitando de esta forma su oxidación y por ende permitiendo estabilizar a la membrana de los eritrocitos (Durán, Montero, & Marrugo, 2013).

4.2 Verificación de la hipótesis.

Mediante el análisis de los datos obtenidos en los diferentes ensayos biológicos in vitro.

$H_0 \neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula.

$H_a=0$ Se acepta la hipótesis nula por lo que se considera que los factores influyen en las actividades biológicas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Mediante el proceso de secado por aspersión se obtuvo los diferentes extractos, siendo el mejor tratamiento el extracto etanólico con un porcentaje de extracción de SST de 36,67%.
- Se determinó que el proceso de secado de la materia prima influye sobre la actividad antiinflamatoria, en el caso de los extractos acuosos hojas el mejor tratamiento se obtuvo a partir del material vegetal secado a la estufa con una actividad 82,469% en relación al 56,914% que presentó el extracto acuoso cuyo material vegetal fue secado al sol.
- Se cuantificó la actividad citotóxica de 3 diferentes extractos, evidenciándose que para que exista una actividad citotóxica adecuada frente a las células MFC-7 ATCC de cáncer de mama los extractos deben encontrarse en una concentración de 50mg/ml aproximadamente.
- Se evaluaron los principios activos presentes en los extractos vegetales de Chuquiragua en 3 actividades biológicas mediante modelos *in vitro*: en la actividad antiinflamatoria, citotóxica y antioxidante el mejor tratamiento fue el extracto etanol-agua hojas secadas al sol, con los siguientes resultados: en la actividad antiinflamatoria mostró 92,602% de protección siendo mayor que la del estándar que presentó 83,460 %, en el caso de la actividad citotóxica 98,913% de apoptosis celular, sin embargo desde la dilución 1×10^0 hasta 1×10^{-3} todos los extractos provocan muerte celular. Finalmente en la actividad antioxidante 147409,481 μg de ácido gálico /g de muestra.

5.2. Recomendaciones

- Ampliar el análisis de fitoquímico de los extractos de Chuquiragua mediante pruebas cuantitativas que establezca el tipo de compuestos presente en los extractos.
- Efectuar un estudio de actividad antiinflamatoria mediante la evaluación de mediadores de inflamación como IL-6, IL-1 y TNF.
- Evaluar la especificidad de citotoxicidad inducida por *Chuquiragua jussieui*.
- Establecer el mecanismo por cual el extracto induce a la apoptosis.
- Realizar pruebas de toxicidad aguda, subaguda y crónica de los extractos.

MATERIAL DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

- Alessandro, B. (s. f.). Chuquiragua: La Chuquiragua es una especie nativa de los Andes de América del Sur. No es una planta de jardín. El nombre fue escogido por su resistencia y colorido. *17 de enero de 2014*. Recuperado a partir de <http://www.otromundoesposible.net/chuquiragua/>
- Almonacid, G. (2016). *Evaluación de la variación del contenido de polifenoles en alimentos vegetales, en función del método de conservación empleado*. Universidad Nacional de Cuyo. Recuperado a partir de http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/7350/tesis-brom.-almonacid-gastn-federico-2016.pdf
- Alvis, A., Martínez, W., & Arrazola, G. (2012). Obtención de Extractos Hidro-Alcohólicos de Limoncillo (*Cymbopogon citratus*) como Antioxidante Natural. *Revista Scielo*, 23(2). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000200002>
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Peñaherrera, E., Tobar, V., & Witter, P. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1). Recuperado a partir de <http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/viewFile/40/12>
- Arias, B. (2009). Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba... *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(5), 389-401. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611977005>
- Astudillo, A. (2003). Fitoterápicos, antibacterianos antifúngicos. En *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. (pp. 39-50). Recuperado a partir de <https://books.google.es/books?id=xJlsIgyq5fEC&pg=PA42&lpg=PA42&dq=chuquiragua+descripcion&source=bl&ots=8ZJtc3IYyE&sig=ZKO6xD4ayW-kdrwiHRPs9XI7i78&hl=es&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwiejzBoPzRAhWCKyYKHXdCBB0Q6AEIfDAR#v=onepage&q=chuquiragua+descripcion&f=false>
- Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Pagán, R., Laglaoui, A., & *. (2014). The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(11), 399-412.

Recuperado a partir de <https://www.ijcmas.com/vol-3-11/A.Barchan, et al.pdf>

- Barrera, C. (2015). *Evaluación De La Actividad Diurética Del Extracto De Chuquiragua*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado a partir de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4627/1/56T00603UDCTFC.pdf>
- Carrasco, L. (2009). Plantas, Efecto de la radiación ultravioleta-B en las plantas. *IDESIA*, 27(3), 59-76. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292009000300009>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22, 5-14. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/comocitar.oe?id=193215009001>
- Casado, R., Landa, A., García- Mina, J., Marston, A., Hostettman, K., & Calvo, M. (2011). Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of Chuquiraga spinosa. *Pharm Biol.* Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2155400>
- Del Río Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la eco-región cafetera*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Dorst, D., & Gokel, G. (2007). Solubilidad y reactividad. En *Química Orgánica Experimental* (Primera, p. 122). Recuperado a partir de <https://books.google.com.ec/books?id=xiiTfEO1a2gC&pg=PA122&dq=etanol+polaridad&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj2lb-b4KHSAhVBRIYKHExGAdIQ6AEIGjAA#v=onepage&q=etanolpolaridad&f=false>
- Dueñas, A., Alcivar, U., Olazábal, E., & Cortés, R. (2014). Efecto antioxidante de la Chuquiraga jussieu J. F. Gmel en el ensayo de hemólisis. *Scielo*, 18. Recuperado a partir de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432014000200003
- Dueñas, A., Alcívar, U., Sacon, E., Bravo, L., & Villanueva, G. (2016). Determinación de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de Chuquiraga Jussieu J. F. Gmel usando la lixiviación de muestras sólidas. *Tecnología Química*, 36(2). Recuperado a partir de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2224-61852016000200005&script=sci_arttext&tlng=pt
- Durán, M., Montero, P., & Marrugo, Y. (2013). Extractos Metanólicos de Corteza de Guayaba (Psidium Guajava L.) Y Mango (Mangifera Indica L.): Efecto citotóxico, antihemolítico y en La morfología de membrana de eritrocitos. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient*, 16(2). Recuperado a partir de

<http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v16n2/v16n2a06.pdf>

- Enciso, J. (2013). *Evaluación de ácidos grasos y propiedades fisicoquímicas de los aceites crudos de Plukenetia volubilis l. (sacha inchi) de la selva central del Perú y determinación de su actividad antiinflamatoria*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado a partir de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3825/1/Enciso_sj.pdf
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Revista de Investigación UNMSM*, 77(4), 6. Recuperado a partir de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/12647/1458>
- García, P. (2008). Inflamación. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 102(1), 99-159. Recuperado a partir de <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>
- Gaviria, A., Correa, C. E., Mosquera, O. M., Niño, J., & Correa, Y. M. (2014). *Evaluación de las Actividades Antioxidante Y Antitopoisomerasa de Extractos de Plantas de la Ecorregión Cafetera Colombiana*. Recuperado a partir de <file:///C:/Users/Usuario/Desktop/Downloads/383-930-1-SM.pdf>
- GEA. (2010). Improve drug properties and production with spray drying. Recuperado a partir de http://www.gea.com/en/binaries/pharmaceutical-spray-drying-brochure-EN_tcm11-23998.pdf
- Gutiérrez, D., Ortiz, C., & Mendoza, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal (p. 5). Recuperado a partir de http://cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf
- Jain Manu, S., Lohare Ganesh, B., Bari Manoj, M., Chavan Randhir, B., Barhate Shashikant, D., & Shah Chirag, B. (2012). Spray Drying in Pharmaceutical Industry: A Review. *Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, 4(2), 74-79. Recuperado a partir de https://www.researchgate.net/publication/253243897_Spray_Drying_in_Pharmaceutical_Industry_A_Review
- Jover, A., & García, M. J. (2003). *Manual Auxiliar de Farmacia*. (J. M. Pérez, Ed.) (Primera). España. Recuperado a partir de https://books.google.com.ec/books?id=gbh_yJhCRqIC&pg=PA475&lpg=PA475&dq=los+principios+activos+se+encuentran+equilibrados+por+la+presencia+de+sustancias+complementarias+que+van+a+potenciarse+entre+sí.&source=bl&ots=nRY87H1lu8&sig=Braxqz63mG379qaZ_h3Winl7Rn
- Kumar, V., Bhat, Z. ., Kumar, D., Bohra, P., & Sheela, S. (2011). In-vitro anti-

- inflammatory activity of leaf extracts of *Basella Alba* Linn. Var. *Alba*. *Scopus*, 3(2).
- Landa, A., Casado, R., & Calvo, M. (2009). Identification and quantification of flavonoids from *Chuquiraga spinosa* (Asteraceae). *Pharm Biol.* Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19911570>
- Lizarre, M. A. (2007). EL SUICIDIO Y LA MUERTE CELULAR. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 101(2). Recuperado a partir de <http://www.rac.es/ficheros/doc/00553.pdf>
- Madaleno, I. (2007). Etno-farmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 61-95. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/html/171/17104103/>
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271, 274. Recuperado a partir de <file:///C:/Users/Usuario/Desktop/Downloads/3338.pdf>
- Martinez, P., & Navarro, M. (2003). El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Elsevier*, 5(4). Recuperado a partir de <http://www.elsevier.es/es-revista-clinical-translational-oncology-57-articulo-el-cultivo-celular-investigacion-basica-13048321>
- Mendiondo, M., Juarez, B., Zampini, C., Isla, M., & Ordoñez, R. (2011). Bioactivities of *Chuquiraga straminea* sandwith. *Publmed*, 6. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21834234>
- Merck S. A. (s. f.). *La quercetina*. Recuperado a partir de <http://dietcan.net/docs/QUERCETINALabMerck.pdf>
- Mesa, A., Zapata, S., Arana, L., Zapata, I., Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 1-10. Recuperado a partir de http://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/articulo_1_-_792_-_1_-_10.pdf
- Mondragón, R., Julia, E., Barba, A., & Jarque, J. C. (2013). El proceso de secado por atomización: formación de granulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 52, 159. Recuperado a partir de repositori.uji.es/xmlui/bitstream/handle/10234/82688/60841.pdf?sequence=1
- Muñoz, M., Ramos, F., Alvarado, C., & Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales

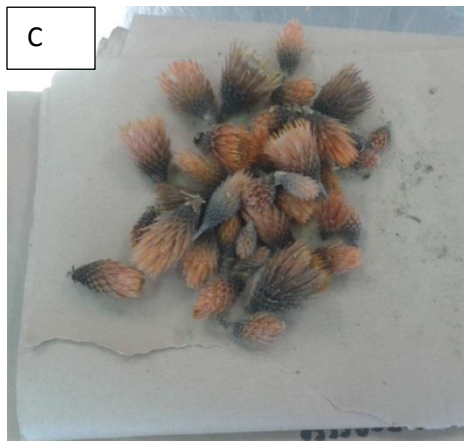
- promisorios. *Revista Scielo Perú*, 73(3). Recuperado a partir de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2007000300003&script=sci_arttext
- Ochoa, A., Marin, J., Rivero, D., & Aguilera, M. (2013). Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(1). Recuperado a partir de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000100007
- OMS. (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Recuperado a partir de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
- Ordoñez, E., León, A., Reátegui, D., & Sandoval, M. (2011). Cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante en hojas, corteza, flores y fruto de dos Variedades de Guayaba (*Psidium guajava* L.). *Investigación y Amazonia*, 1(2), 48-52. Recuperado a partir de http://www.unas.edu.pe/revistas/index.php/revia/article/view/18/pdf_15
- Ortiz García, C. ., Avella, D. M., & Olmos, A. (2008). Cuantificación de Fenoles Totales en *Amaranthus Hybridus*, *Cosmos Bippinnatus* y *Cynodon Dactylon* plantas malezas de Estado de Querétaro. Recuperado a partir de <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-VIII/UAQLocalOrtizGarcia.pdf>
- Pablón, L., Vanegas, J., Rendón, M., Santos, R., & Hernandez, P. (2013). Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de cuatro especies agroforestales de la Orinoquía colombiana. *Rev Cubana Plant Med*, 18(1). Recuperado a partir de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000100008
- Palacios, E. (s. f.). *Economía y planta medicinales*. Recuperado a partir de <file:///C:/Users/Usuario/Desktop/Downloads/DDoc.EconomiaPlantasMedicinales.pdf>
- Pardo, G., & Delgado, R. (2003). Senescencia celular y envejecimiento. *Rev Cubana Invest Bioméd*, 22(3). Recuperado a partir de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000300010
- Quintanar, M., & Calderón, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89-101. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/490/49016098004.pdf>

- Rahman, M., Hossain, S., Rahaman, A., Fatima, N., Nahar¹, T., & Uddin¹, B. (2013). Antioxidant Activity of *Centella asiatica* (Linn.) Urban: Impact of Extraction Solvent Polarity. *Proquest*, 1(6). Recuperado a partir de <http://search.proquest.com/openview/cbb1b6297894414cc10647b2d4861f78/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1616357>
- Ramírez, E., Bonilla, P., Suarez, S., Choquesillo, F., & Castro, A. (2014). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATORIA E INMUNOMODULADORA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE Chuquiraga lessing «HUAMANPINTA». *Ciencias e investigación*, 17(1). Recuperado a partir de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/viewFile/11116/9991>
- 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. Recuperado a partir de [file:///C:/Users/Usuario/Desktop/Downloads/MEMBRANE STABILIZING ACTIVITY - A POSSIBLE MECHANISM OF ACTION FOR THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF TWO BANGLADESHI MEDICINAL PLANTS_ MESUA NAGASSARIUM.pdf](file:///C:/Users/Usuario/Desktop/Downloads/MEMBRANE%20STABILIZING%20ACTIVITY%20-%20A%20POSSIBLE%20MECHANISM%20OF%20ACTION%20FOR%20THE%20ANTI-INFLAMMATORY%20ACTIVITY%20OF%20TWO%20BANGLADESHI%20MEDICINAL%20PLANTS_MESUA_NAGASSARIUM.pdf)
- Rivera, B. (2013). *Caracterización proteómica de una linea celular humana de cáncer de mama metastático y su homóloga no maligna*. Universidad de la República. Recuperado a partir de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1571/1/uy24-16719.pdf>
- Rondón, M., García, I., Cornejo, X., Rojas, J., & Terán, W. (2015). Phytochemical screening and antioxidant activity of seven medicinal plants species from Ecuador. *Pharmacology Online*, 3, 19-28. Recuperado a partir de http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2015/vol3/PhOL_2015_3_A004_04_08_Rondon_19_28.pdf
- Rugna, A., Ricco, R., Gurni, A., & Wagner, M. (2007). Efectos de la radiación solar sobre la producción de polifenoles en ejemplares femeninos de *Smilax Campestris* Griseb. -Smilacaceae-. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(3). Recuperado a partir de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7495>
- Shinde, U. ., Phadke, A. ., Nair, A. M., Dikshit, V. J., & Saraf, M. N. (1998). Membrane stabilizing activity- a possible mechanism of action for the anti- inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, 70(2), 251-257.

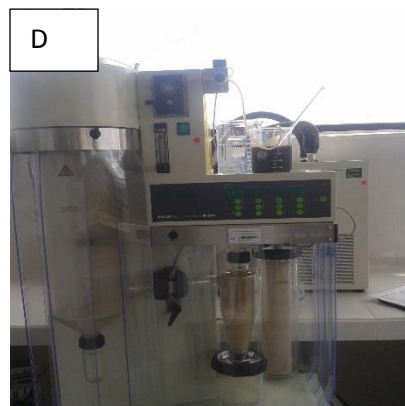
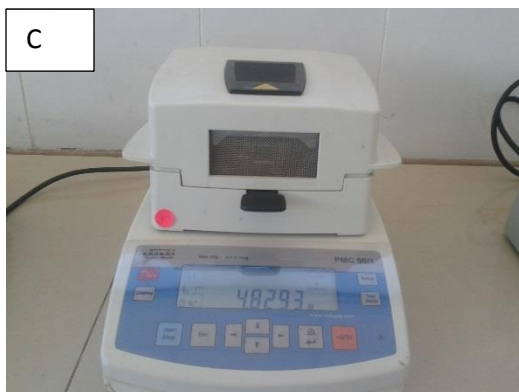
- Society American Cancer. (2008). Cancer de mama. Recuperado a partir de <https://old.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002284-pdf.pdf>
- Society European for Medical Oncology. (s. f.). Cancer de mama. Recuperado a partir de <https://www.esmo.org/content/download/6594/114963/file/ES-Cancer-de-Mama-Guia-para-Pacientes.pdf>
- Susín, C. (2008). *Capacidad Antioxidante de Liver Growth Factor: Estudio In vitro e In vivo en ratas espontáneamente hipertensas*. Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado a partir de https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1787/5429_susin_lara.pdf?sequence=1
- Ugartondo, V. (2009). *Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares*. Universidad de Barcelona. Recuperado a partir de http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41765/5/04.VUC_DISCUSION.pdf
- Varea, A., Suárez, L., Chávez, G., Cordero, M., Alvarez, N., Espinoza, Fernando Fuentes, C., ... Romero, F. (2007). *Los fitofármacos: Un sistema alternativo de atención primaria de salud*. (A. Varea, Ed.) (ABYA-YALA). 2007. Recuperado a partir de <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Chiriboga1997.pdf>
- Villavicencio, M. A., Pérez, B., Mendoza, E., & Maldonado, E. (2008). Citotoxicidad en células hela de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Revista Scielo*, 26. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682008000200007

Anexos

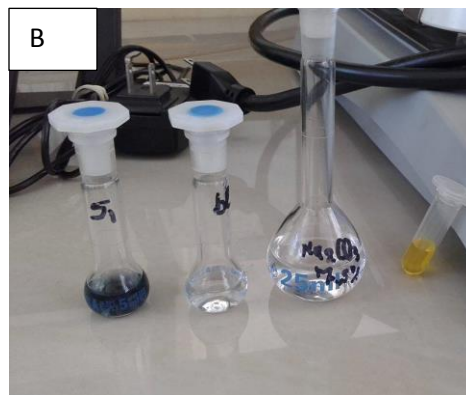
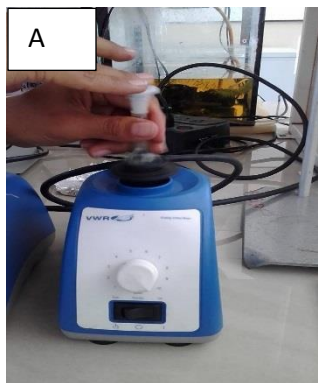
Anexo I. Fotografías de las hojas antes y después del proceso de molienda (A, B), flores antes y después del proceso de molienda (C, D) de Chuquiragua



Anexo II. Fotografías del proceso de la obtención de del polvo compacto de las hojas y flores de Chuquiragua. Proceso de extracción (A), evaporación del solvente (B), determinación de solidos totales (C), secado por aspersión del extracto (D), polvo compacto del extracto (E)



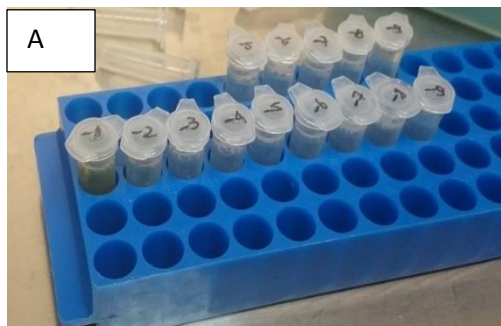
Anexo III. Fotografías cuantificación de fenoles. Vortexización del extracto (A), soluciones usadas para el proceso (B), medición de las absorbancias (C)



Anexo IV. Fotografías de la actividad antiinflamatoria. Solución del estandar (a), ensayos por triplicado de un extracto, medición de la absorbancia (c y d).



Anexo IV. Fotografías de la actividad citotóxica. Diluciones seriadas del extracto (A), 96 pocillos: en la columna 1 se coloca el blanco, en la 2 el extracto y desde la 3 en adelante se realiza diluciones



Anexo V. Análisis estadístico de los diferentes extractos.

Tabla III. Análisis de varianza del extracto acuoso hojas secadas al sol

Fuente	Suma Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0863457	3	0,0287819	14,22	0,0014
Intra grupos	0,0161978	8	0,00202473		
Total (Corr.)	0,102544	11			

Tabla IV. ANOVA del extracto acuoso hojas secadas a la estufa

Fuente	Suma Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,171633	3	0,0572108	27,63	0,0001
Intra grupos	0,0165655	8	0,00207069		
Total (Corr.)	0,188198	11			

Tabla V. Análisis de varianza del extracto agua-etanol 96% secado al sol

Fuente	Suma Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,538369	3	0,179456	19,05	0,0005
Intra grupos	0,0753609	8	0,00942011		
Total (Corr.)	0,61373	11			

Tabla VI. Análisis estadístico de la variabilidad entre la concentración y tipo de disolvente de los extractos: hidroalcohólico y acuoso hojas secadas al sol.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,736932	7	0,105276	18,40	0,0000
Intra grupos	0,091558	16	0,005722		
Total (Corr.)	0,828490	23			

Tabla VII Análisis estadístico de los extractos acuoso hojas secadas al sol y la estufa

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,284299	7	0,0406142	19,83	0,0000
Intra grupos	0,0327633	16	0,00204771		
Total (Corr.)	0,317063	23			

Tabla VIII. Análisis de varianza del estándar y el extracto agua etanol hojas secadas al sol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,41336	7	0,201909	9,69	0,0001
Intra grupos	0,333538	16	0,0208461		
Total (Corr.)	1,7469	23			

Tabla IX. Análisis de varianza del extracto acuoso hojas secadas al sol y la aspirina.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,947587	7	0,13537	7,89	0,0003
Intra grupos	0,274375	16	0,0171484		
Total (Corr.)	1,22196	23			

Tabla X. ANOVA de comparación del estándar y el extracto acuoso hojas secadas a la estufa

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,01151	7	0,144501	8,42	0,0002
Intra grupos	0,274742	16	0,0171714		
Total (Corr.)	1,28625	23			

Tabla XI. Análisis de varianza entre las absorbancias y los tipos de solvente obtenidas mediante el método MTT.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0956525	2	0,0478263	0,26	0,7711
Intra grupos	4,3679	24	0,181996		
Total (Corr.)	4,46356	26			

Tabla XII. Análisis estadístico entre las concentraciones con absorbancias obtenidas de los 3 extractos mediante el método de MTT.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,17983	9	0,464426	27,83	0,0000
Intra grupos	0,28372	17	0,0166894		
Total (Corr.)	4,46356	26			

Tabla II. Análisis estadístico muestras entre la media y la desviación estándar obtenidas de los 2 extractos en la evaluación de la actividad antioxidante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0	0			
Intra grupos	7,3994E6	1	7,3994E6		
Total (Corr.)	7,3994E6	1			