

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antioxidante y broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de las hojas de la especie *Chromolaena laevigata* (Lam) R.M. KING & H. Rob. "Chimchis"

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR :

Bach. PÉREZ LUME OLIVIA

Bach. FÉLIX MEDINA PEDRO PABLO

ASESORES:

Dra: HAYDEE CHAVEZ ORELLANA

Mg. ERNESTO TORRES VELIZ

Dr. FELIPE SURCO LAOS

ICA - PERÚ

2014

AGRADECIMIENTO:

A Dios por habernos permitido cumplir nuestros objetivos y a nuestros asesores por su incondicional apoyo quienes nos guiaron con gran profesionalismo y dedicación en todo el desarrollo del presente trabajo; por haber depositado su confianza en nosotros e instruirnos en todo momento hasta culminar la investigación.

DEDICATORIA:

A mis padres y hermanos quienes son ejemplo de lucha y dedicación.

Olivia Perez L.

A mi madre y hermanos quienes me han motivado en todo momento e inculcados los valores imprescindibles para mi desarrollo personal y profesional.

Pedro Pablo Felix M.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
I. MARCO TEÓRICO	9
1.1 <i>Chromolaena laevigata</i> (chimchis)	10
1.2 Composición química del género <i>Chromolaena</i> (Compositae)	12
1.3 Cromatografía de capa fina	18
1.4 Radicales libres	19
1.5 Radicales libres y las enfermedades pulmonares	22
1.6 Antioxidantes.	24
1.7 Métodos para evaluar la actividad antioxidante	29
1.8 Músculo liso bronquial. Broncodilatación – broncoconstricción	30
1.9 Mecanismo de acción de agentes broncodilatadores	31
II. PARTE EXPERIMENTAL	33
2.1 Estudio fitoquímico	34
2.2 Recolección y tratamiento de la muestra vegetal	34
2.3 Obtención del extracto etanólico total	35
2.4 Screening fitoquímico	35
2.5 Métodos de análisis para la identificación de metabolitos secundarios	37
2.6 Obtención de extractos de diferente polaridad	39
2.7 Hidrólisis del extracto acuoso	40
2.8 Cromatografía de capa fina	40
2.9 Ensayo de la actividad antioxidante	41
2.9.1 Método de poder antioxidante de reducción del ion férrico. FRAP	42
2.9.2 Método de Capacidad antioxidante equivalente al trolox . ABTS	42
2.10 Estudio farmacológico	43
2.10.1 Ensayo de la actividad broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad en cadena traqueal aislada de cobayo	43
2.10.2 Pruebas Estadísticas	48

III. RESULTADOS	49
IV. DISCUSIÓN	61
V. CONCLUSIONES	64
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMEN

Las hojas de la especie *Chromolaena laevigata* son empleadas como emplasto por los pobladores del distrito de Toraya, provincia de Aymaraes en el departamento de Apurímac, para tratar el dolor, inflamación y como infusión para tratar enfermedades respiratorias.

El presente trabajo tiene como objetivo, evaluar la actividad antioxidante y broncodilatadora, de los extractos de diferente polaridad de las hojas de la especie *Chromolaena laevigata*.

En el screening fitoquímico se identificaron los metabolitos secundarios: alcaloides, triterpenos, grupos fenólicos libres, catequinas, saponinas y flavonoides.

Así mismo, los extractos de diferente polaridad se sometieron a evaluación antioxidante por el método FRAP. (Poder antioxidante de reducción del ion férrico) y del radical ABTS (Capacidad antioxidante equivalente al trolox).

El extracto más activo fue el extracto acuoso a una concentración de 0.375 mg/mL con una actividad equivalente a 0,718 mM de trolox por el método ABTS.

Para determinar la actividad broncodilatadora se empleó el método *in vitro* en cadena traqueal aislada de cobayos, para ello los extractos de diferente polaridad se prepararon a una concentración de 150mg/mL y 300mg/mL añadiendo 0,1 mL en el baño con el músculo liso contraído previamente con acetilcolina e histamina al 0,1 %. Se utilizó como control positivo adrenalina 1mg/mL.

El extracto acuoso presentó mayor actividad broncodilatadora con porcentaje de relajación de $125.6 \% \pm 3.7$ ($p < 0.05$).

Palabras claves: *Chromolaena laevigata*, actividad antioxidante, FRAP, ABTS, actividad broncodilatadora, screening fitoquímico, flavonoides, alcaloides, catequinas.

SUMMARY

The leaves of the species *Chromolaena laevigata* are used as poultice for the residents of the district Toraya, Aymaraes province in the department of Apurimac, to treat pain, inflammation and as an infusion to treat respiratory diseases.

This study aims to evaluate the antioxidant and bronchodilator activity of the extracts of different polarity of the leaves of the species *Chromolaena laevigata*.

The phytochemical screening secondary metabolites were identified: Alkaloids, triterpenes, free phenolic groups, catechins, flavonoids and saponins.

Similarly, extracts of different polarity antioxidant underwent assessment by FRAP method. (Antioxidant Power reduction of ferric ion) and ABTS radical (trolox equivalent antioxidant capacity).

The extract was the most active aqueous extract at a concentration of 0.375 mg / mL with equivalent activity 0.718 mM trolox by the ABTS method.

To determine the Bronchodilator activity in vitro method was employed in isolated tracheal chain of guinea pigs for this different polarity extracts were prepared at a concentration of 150 mg / mL and 300 mg / mL by adding 0.1 mL in the bath with smooth muscle previously with acetylcholine and histamine 0.1%. Was used as positive control adrenalin 1 mg / mL.

The aqueous extract showed greater bronchodilator activity with relaxation percentage of $125.6\% \pm 3.7$ ($p < 0.05$).

Keywords: *Chromolaena laevigata*, antioxidant activity, FRAP, ABTS, bronchodilator activity, phytochemical screening, flavonoids, alkaloids, catechins.

INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano, necesita del oxígeno para respirar y es éste mismo oxígeno el responsable de la oxidación celular. El que inhalamos sirve mayoritariamente para producir energía para el organismo, pero un pequeño porcentaje del oxígeno produce radicales libres (RL). Estos radicales se forman de manera normal y habitual en el cuerpo al metabolizar el oxígeno¹.

Se ha demostrado que el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como Anión superóxido O_2^- , H_2O_2 (Peróxido de hidrógeno), OH^\cdot (Radical hidroxilo), ROOH Hidroperóxido orgánico y (RNS) como $OONO^-$ Peroxinitrito, conllevan a un estrés oxidativo que se puede definir como una perturbación del equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, con un desplazamiento a favor de los primeros, de modo tal que esta alteración da lugar a cambios en las biomoléculas como lípidos, proteínas, enzimas, ADN y pueden llevar incluso a la muerte celular, causando el origen de nuevas enfermedades o agravando el daño de las ya existentes²

El aumento de radicales libres se puede deber a factores internos como, las mitocondrias, los macrófagos como parte del proceso de fagocitosis y las diferentes enfermedades no controladas o factores externos como ambientales, radiaciones ionizantes, rayos UV, tabaco, radiación gamma, etc³.

Los radicales libres están relacionados con diferentes enfermedades que afectan el corazón, el tracto gastrointestinal, los riñones, el hígado, el sistema nervioso, el sistema respiratorio: cáncer pulmonar, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, como asma, EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) etc³.

Por este motivo, es necesario contrarrestar la proliferación de los radicales libres y conseguir disminuir el daño celular que provocan mediante el estudio y la investigación de antioxidantes que podemos encontrar en los diferentes alimentos y plantas medicinales. Las vitaminas antioxidantes ácido ascórbico, alfa tocoferol, beta caroteno, carotenoides y sobresaliendo los polifenoles en su categoría de flavonoides³ son los antioxidantes que se adquieren a través de la dieta.

Los flavonoides secuestran al radical superóxido (O_2^-) y al radical hidroxilo (OH^\cdot), pueden unirse a los polímeros biológicos, como: enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, como: Fe^{2+} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres⁴.

Las enfermedades obstructivas de las vías respiratorias como asma, EPOC, enfisema pulmonar, síndrome de distress respiratorio en adultos⁵ e insuficiencia respiratoria son de alta prevalencia en el país, que se convierte cada vez más en un azote para la población limitando la actividad cotidiana, frente a esto la investigación científica en plantas medicinales de uso popular nos brindan nuevas alternativas para el tratamiento de estos males.

Las plantas medicinales han formado parte importante de la historia y cultura de los pueblos indígenas. El uso y aplicaciones para el remedio de enfermedades constituyen un conocimiento que se transmite de generación en generación. Actualmente proporciona un arsenal valioso para el desarrollo médico-farmacéutico que lleva a descubrir nuevas drogas que contienen los principios activos usados en terapéutica⁶, sin embargo cabe probar experimentalmente su efectividad y/o descartar un posible efecto placebo.

El género *Chromolaena* es uno de los más importantes de la familia asteraceae siendo éstas muy conocidas por producir lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, compuestos glicosidados⁷, entre otros. Este género se distribuye en Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Paraguay, el Salvador, Trinidad y Tobago, Venezuela y Perú. En nuestro territorio Peruano crece en Cusco, Puno y Apurímac⁸, donde es utilizada en forma de emplastos para tratar el dolor, la inflamación y como infusión para tratar enfermedades respiratorias.

Asimismo se han realizado numerosos estudios de la especie *Chromolaena laevigata* como actividad antibacteriana, identificación de algunos constituyentes químicos de las hojas mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas⁹.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antioxidante y broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad de las hojas de la especie *Chromolaena laevigata*.

I. MARCO TEÓRICO

1.1. *Chromolaena laevigata* (Chimchis)

1.1.1 Etimología y Sinonimia

Chromolaena laevigata proviene etimológicamente del latín *laevigatus* que quiere decir liso y brillante, en referencia a la apariencia de las hojas. También se le conoce como: azotacaballo, Cambará, sanalotodo, salvia y doctorcito⁹. Pertenece a la familia asteraceae (Compositae), la cual es una de las más grandes familias botánicas¹⁰. Esta especie es conocida en nuestro país como *Chimchis*.

1.1.2 Taxonomía

Una muestra de la especie vegetal en estudio fue analizada en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su clasificación taxonómica, la cual fue realizada por la Dra. Haydee Montoya, Según el sistema de clasificación de CRONQUIS (1988):

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GÉNERO: *CHROMOLAENA*

ESPECIE: *CHROMOLAENA LAEVIGATA*(LAM) R.M KING & H. ROB.

NOMBRE VULGAR: “*Chimchis*”

1.1.3 Características Morfológicas

Esta especie es un arbusto perenne, tallo leñoso, cespitoso¹¹ de hasta 2.5 m de altura. Presenta ramas cilíndrica glandulosa, generalmente cubiertas por cera; hojas pecioladas, peciolo de hasta 1.6cm de largo, elíptica, margen aserrada o irregularmente aserrada con 5-19 dientes por lado; haz liso, nítida y glabra; envés glabro u ocasionalmente con pelos sobre la venación.

1.1.4 Habitat

En el Perú crece en Cusco, Apurímac, Puno y en otros países como en Bolivia, Brasil, Colombia, Paraguay, Ecuador y Venezuela⁸. Esta especie crece en suelos arenosos y areno arcillosos.

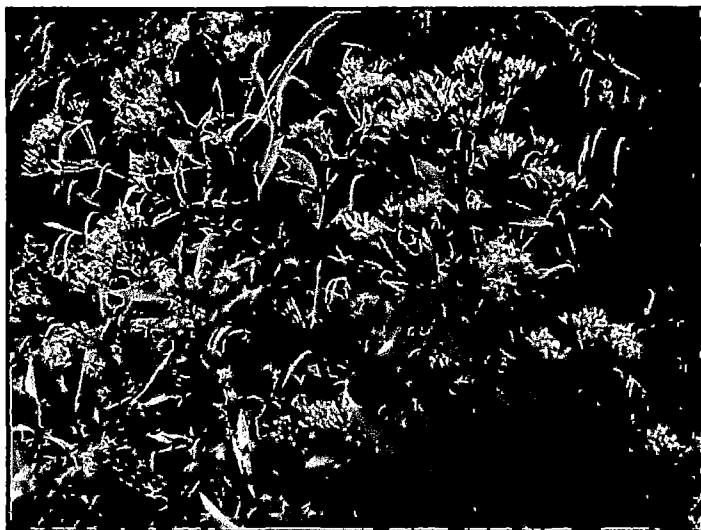


Fig. N° 01: *Chromolaena laevigata* “Chimchis”

1.1.5 Usos Populares

Es una especie que popularmente se usa en forma de emplastos e infusión para el tratamiento de enfermedades infecciosas, así como para aliviar ciertos males y dolencias, desinflamar hinchazones, tumores, dolor de muelas, enfermedades intestinales, enfermedades respiratorias y rasquiña⁹. Cuando se usa como emplastos se soasa 10g de las hojas, se deja enfriar y se coloca directamente sobre la piel inflamada, en el caso se infusión se prepara aproximadamente 10-12g de hojas en un litro de agua, se hierve por 3 minutos, se deja enfriar y se consume.

1.2. Composición química del género *Chromolaena* (Compositae)¹⁰

La familia compositae o asteraceae, es una de las más grandes familias botánicas, los estudios químicos han llevado al descubrimiento de interesantes estructuras químicas, como lactonas sesquiterpénicas, flavonoides y poliacetilenos.

No existen muchos estudios del género *Chromolaena* a nivel mundial, existen reportes de estudios en 18 especies de aproximadamente 130 que conforman el género.

La química del género *Chromolaena* es muy variada. De la mayoría de las especies se han aislado terpenos, entre los que sobresalen sesquiterpenos y triterpenos, sin embargo muchos de ellos no se pueden considerar como metabolitos característicos del género, ya que los primeros están ampliamente distribuidos en muchas familias y los triterpenos aparecen como metabolitos comunes en la familia Compositae, la cual se considera acumuladora de triterpenos.

Los sesquiterpenos de tipo cadineno se han encontrado en nueve especies diferentes de éste género, los cuales pueden considerarse como metabolitos característicos de este género, siendo entre ellos los más frecuentes los furano cadinenos.

A continuación se muestran algunas estructuras químicas de estos compuestos aislados de diferentes especies del género *Chromolaena*.

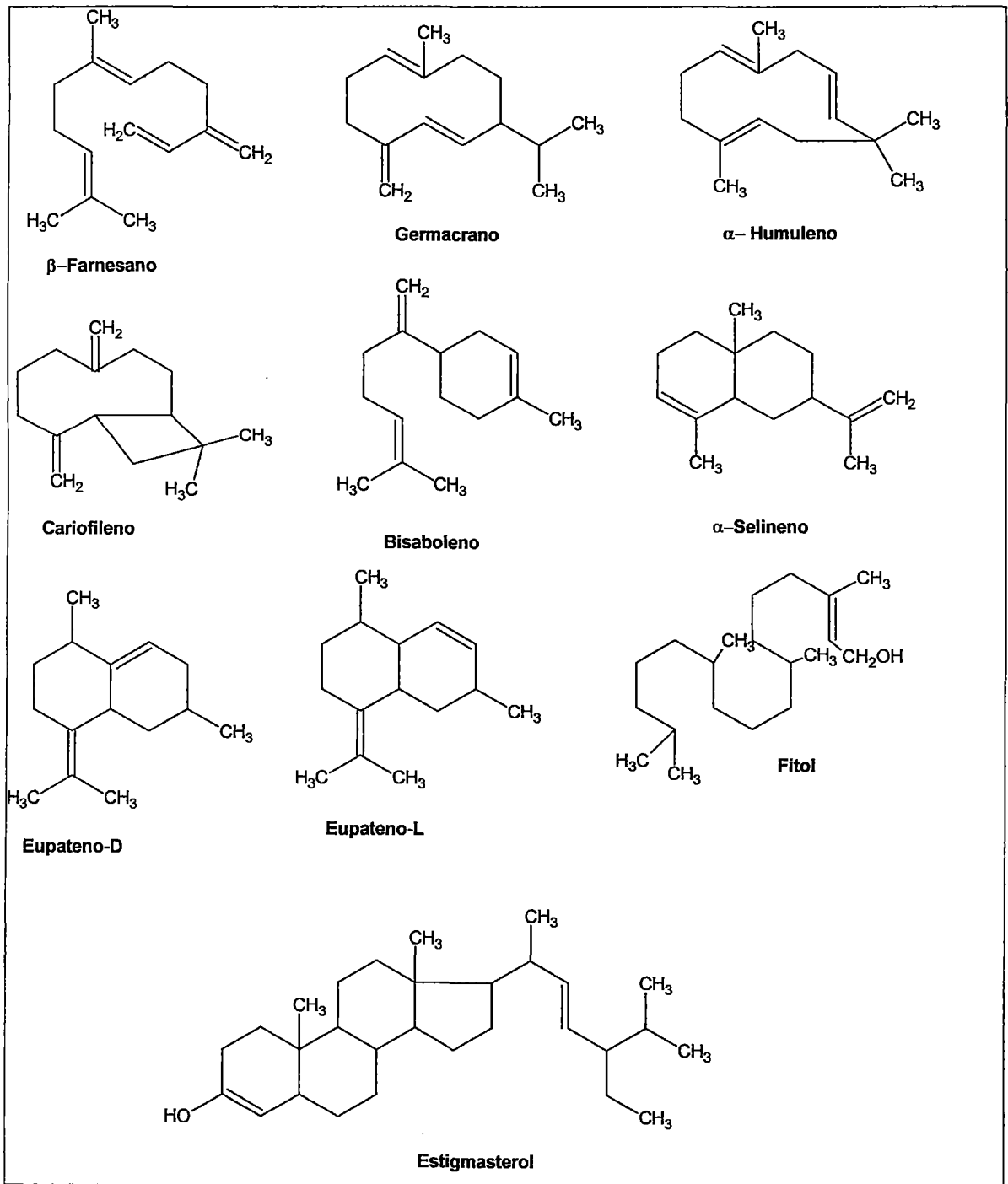


Fig. N° 02. Sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos aislados del género *Chromolaena*¹⁰

En la fig. N° 03 se muestran estructuras de triterpenos muy comunes en la familia compuestas y el género *Chromolaena*.

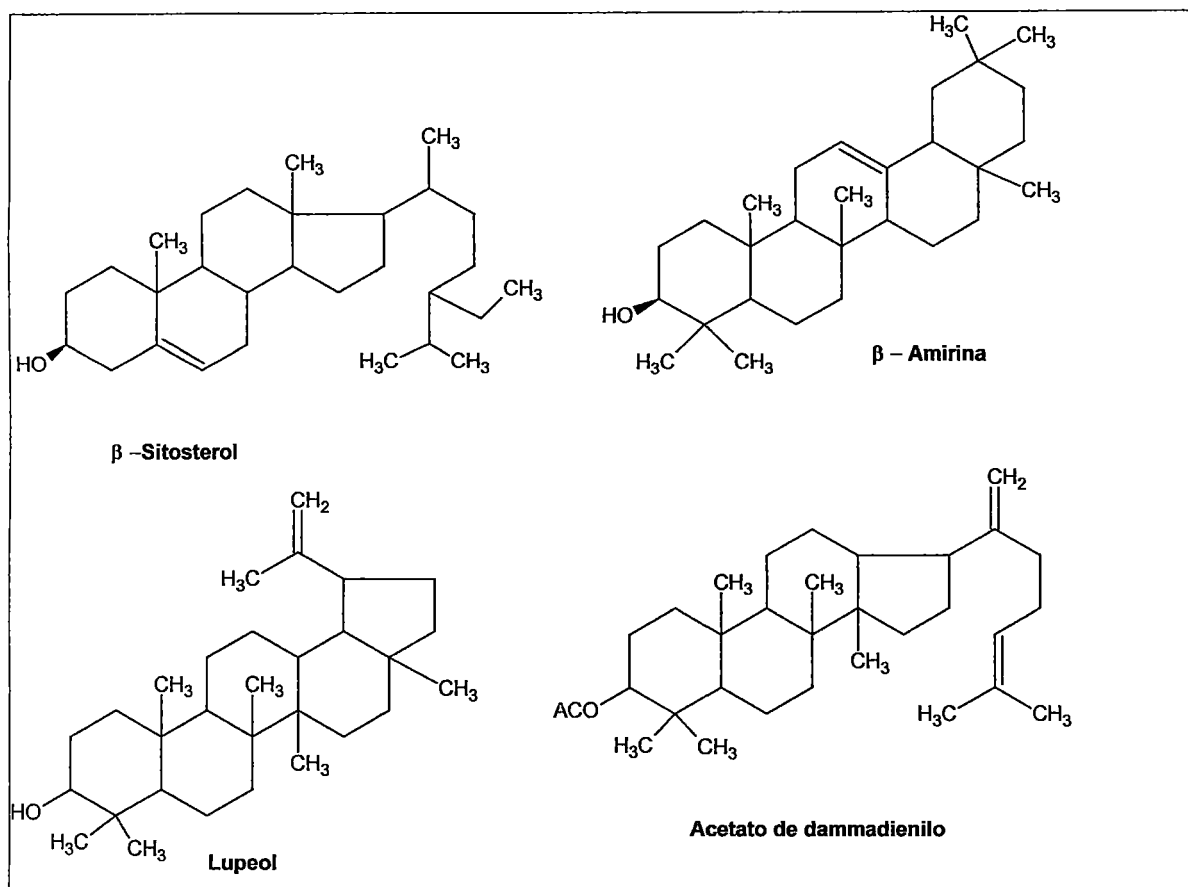


Fig. N° 03. Triterpenos comunes en el género *Chromolaena*¹⁰

Los flavonoides son estructuras ampliamente distribuidas en las plantas, por sus características químicas son importantes marcadores taxonómicos. Se han aislado diversas estructuras de flavonoides, siendo las más frecuentes las estructuras de flavonoles y flavanonas.

Entre las estructuras aisladas del género *Chromolaena* se nota un alto grado de metoxilación, predominando las estructuras de flavanonas, Se observan también estructuras de tipo chalcona.

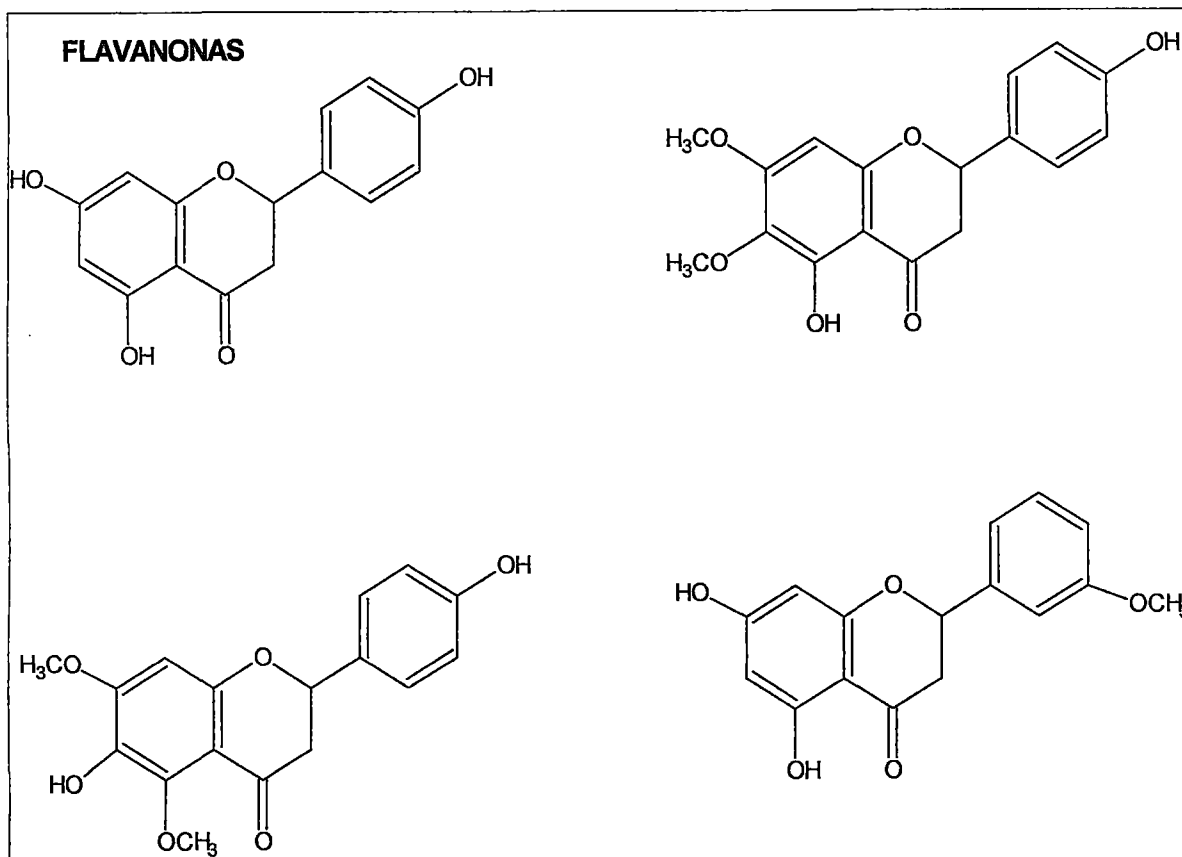
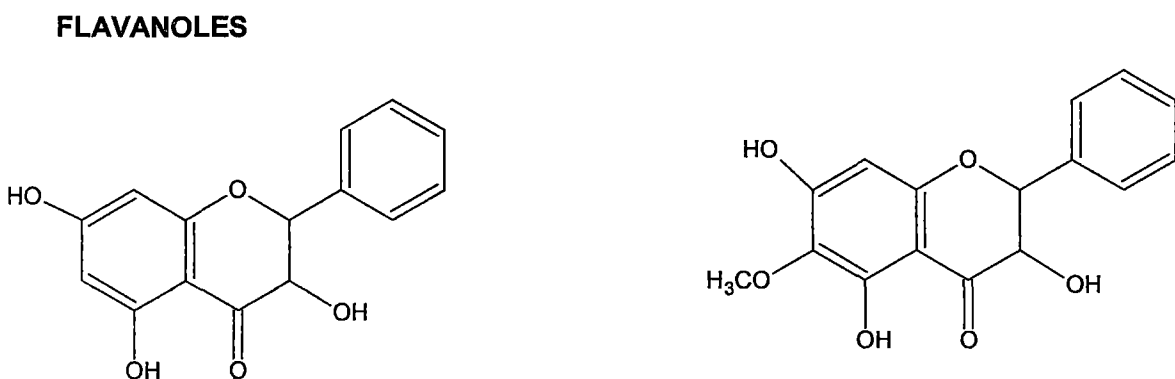


Figura N° 04. Flavanonas aisladas del genero *Chromolaena*¹⁰



FLAVONOLES

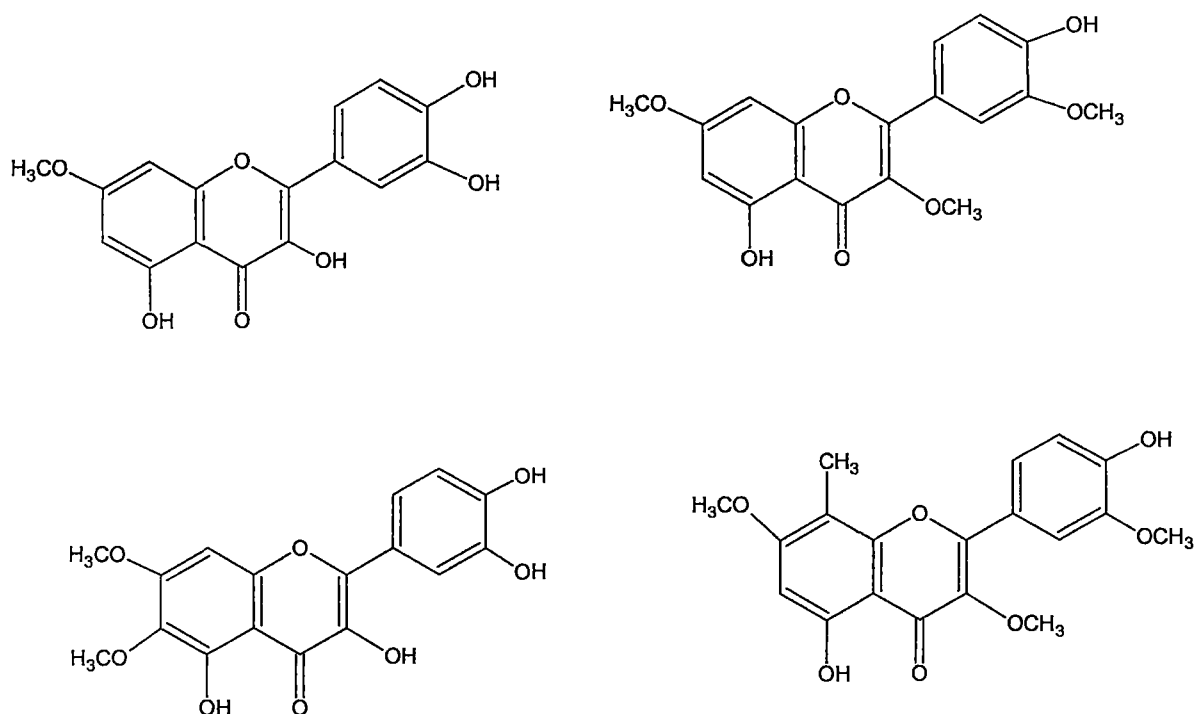


Figura N° 05. Flavanoles aislados del genero *Chromolaena*¹⁰

CHALCONAS

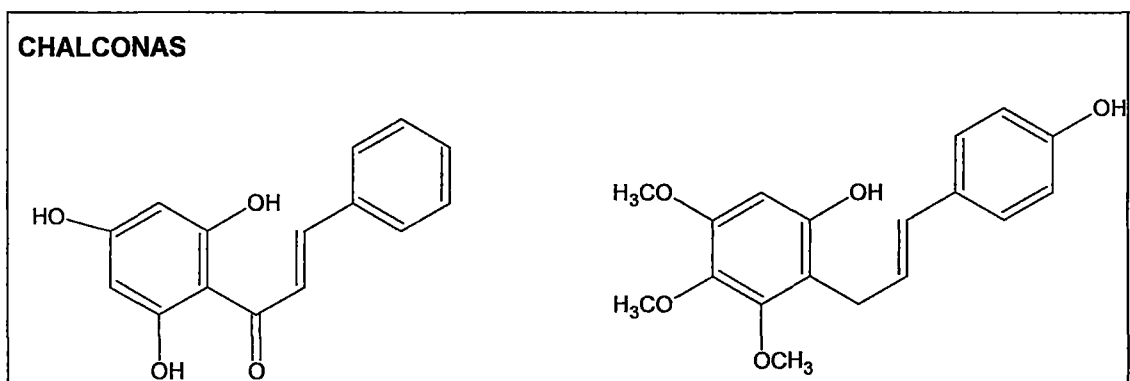


Figura N° 06. Chalconas aisladas del género *Chromolaena*¹⁰

Se han aislado también derivados del ácido cinámico de cuatro especies, pero su presencia es común en otros géneros de la misma familia. Se destaca el bajo número de cumarinas, ya que estas son comunes en géneros afines.

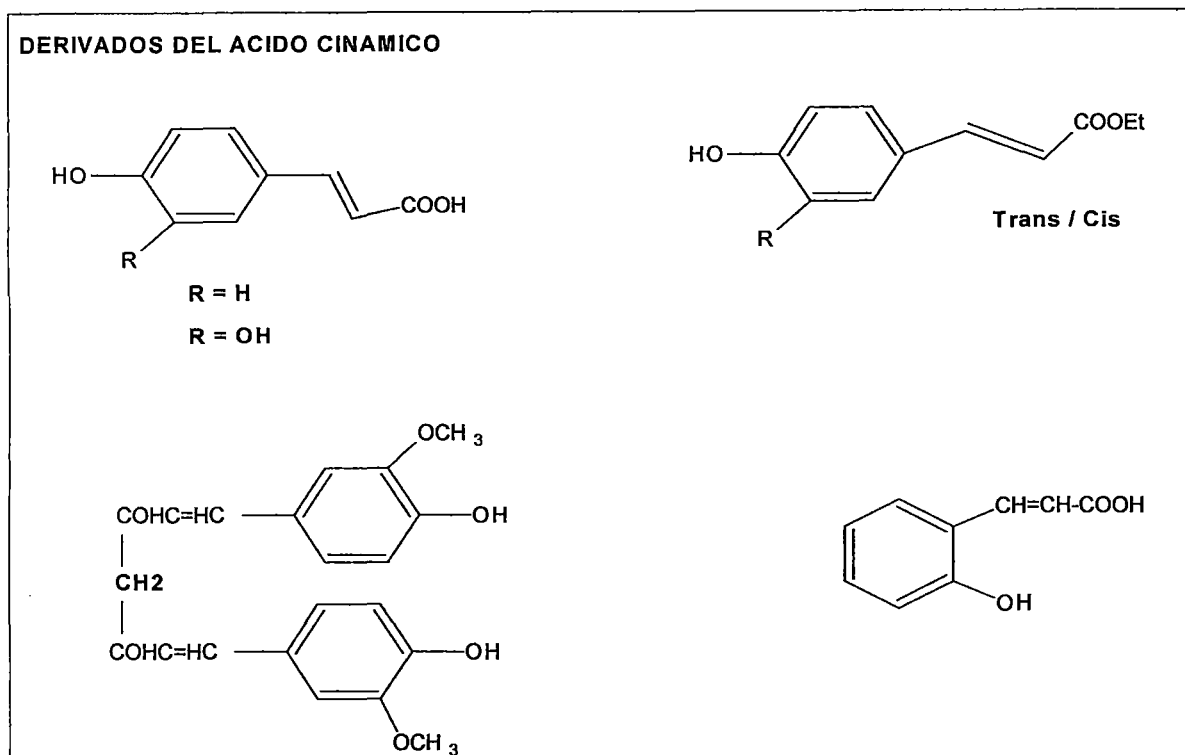


Figura N° 07. Derivados de ácido cinámico aislados del género *Chromolaena*¹⁰

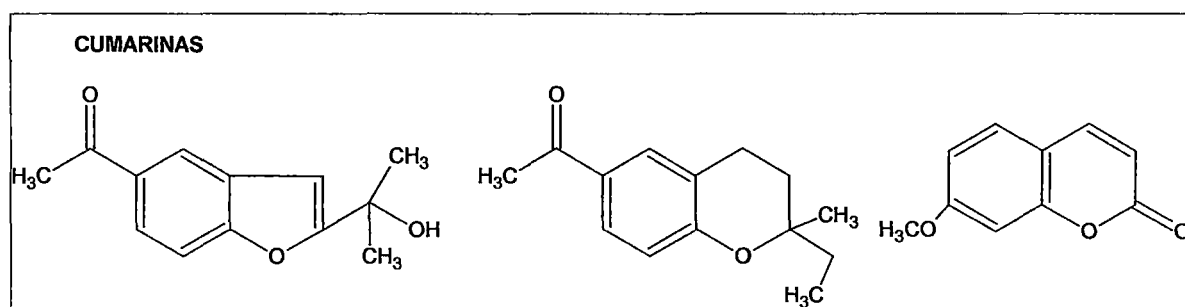


Figura N° 08. Cumarinas aisladas del género *Chromolaena*¹⁰

1.3. Cromatografía de capa fina

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil. En la cromatografía de capa fina, la fase estacionaria es una capa delgada de un soporte sólido granuloso, gel de sílica, alúmina, ácido silícico, celulosa y poliamidas, etc¹¹ que se depositan sobre una placa de Vidrio, aluminio u otro soporte inerte.

La fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con flujo de la fase móvil, por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente¹².

Por cromatografía¹³ de capa fina se pueden encontrar las principales clases de constituyentes químicos, hacer comparaciones de diferentes muestras del material vegetal y detectar adulteraciones. En la evaluación de los productos a base de plantas usados en el desarrollo de suplementos y fármacos modernos es preciso determinar la autenticidad y la cromatografía de capa fina se sigue utilizando eficazmente en todo el mundo para la evaluación de la calidad e identidad de las plantas.

Después de la migración de las muestras en un disolvente idóneo, se puede obtener cierta información preliminar sobre los constituyentes, a partir de los valores de R_f y con la migración con respecto a sustancias de referencia. Los constituyentes separados se pueden detectar por varios métodos. Uno de estos es la observación directa bajo luz diurna si las manchas están coloreadas.

Como alternativa, la placa se puede observar bajo la luz UV (254nm ó 366nm) si están presentes los cromóforos idóneos. Otra posibilidad consiste en rociar la placa con un reactivo de detección (Wagner y Bladt, 1966; Marston et al 1997).

1.3.1. Campo de aplicación de la cromatografía en capa fina en plantas medicinales¹⁴

No siempre se conoce la constitución química de la planta; cuando esto sucede es indispensable realizar su perfil cromatográfico; el extracto, en condiciones definidas de análisis, formará un diseño característico debido a la migración diferencial de sus constituyentes, llamado huella digital (finger print) de la planta. Por consiguiente las plantas de las cuales no se posea ninguna información sobre su constitución química, pueden ser controladas, realizando simplemente cromatografías de un extracto patrón, botánicamente identificado y obtenido de la misma manera que el extracto que va a ser analizado. La migración de las manchas presentes en la muestra y en el patrón aunque no estén identificadas pueden ser compradas a partir del R_f , del tamaño y la coloración.

1.4. Radicales libres

Se consideran Radicales Libres (RL) aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Esto lo hace extraordinariamente reactivo y de vida efímera. Los radicales libres en el cuerpo humano tienen gran capacidad para combinarse inespecíficamente con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos¹⁵.

En 1939, Leonor Michaelis propuso que la oxidación de todas las moléculas orgánicas bivalentes ocurre con la formación de un radical libre intermediario. Demostró la formación de semiquinonas en la oxidación de las benzoquinonas y naftoquinonas.

En 1946, Michaelis describió la reducción univalente secuencial del oxígeno como mecanismo molecular de cuatro pasos de transferencia de un electrón, con formación de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo ($HO\cdot$) como los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y con formación de agua como producto final de la reducción¹⁶.

Todos estos descubrimientos científicos a través de los años ayudan a entender que los radicales libres poseen existencia independiente que reaccionan de diferentes formas y que se pueden producir mediante los siguientes factores:

- Químicos: aumento de metales pesados, xenobióticos, componentes del tabaco.
- Drogas: paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida¹⁷
- Físicos: radiaciones ultravioleta, hiperoxia
- Orgánicos: se forman en los organismos vivos (incluido el cuerpo humano) por el contacto con el oxígeno y actúan alterando las membranas celulares y atacando el material genético de las células, como el ADN.
- y Metabólicos: dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios, traumatismos, fenómenos de isquemia - reperfusión y ejercicios extenuantes¹⁵.

1.4.1. Tipos de radicales libres¹⁶

Dependiendo de cuál sea el átomo central que posee el electrón desapareado, los radicales pueden ser:

- Radicales centrados en el carbono, conviene distinguir, según sea el carbono que porta el electrón desapareado, entre radicales primarios (como el radical metilo $\text{CH}_3\cdot$), radicales secundarios; y radicales terciarios (como el radical trifenilmetilo). Los radicales terciario son más estables que los secundarios, y éstos a su vez son más estables que los primarios.

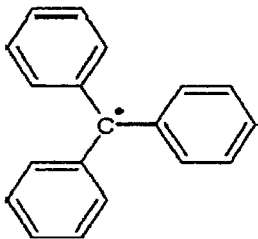
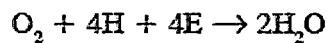
Radical primario	Radical secundario	Radical terciario
$\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}\cdot$	$\text{CH}_3-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2\text{Br}$	
Radical etinilo	radical 2º derivado del 1-bromopropano	Radical trifenilmetilo

Fig. N° 09: Radicales centrados en el carbono¹⁶

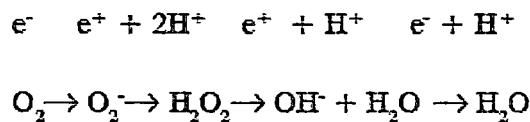
- Radicales centrados en el nitrógeno: como el radical nitrato $\cdot\text{NO}_3$

- Radicales centrados en el oxígeno: como el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$, muy reactivo.
- Radicales centrados en átomo de halógeno: como el radical cloro $\text{Cl}\cdot$
- Radicales centrados en átomo de metal: como el radical $\cdot\text{SnH}_3$

El oxígeno que inhalamos sirve para producir energía para nuestro organismo, sin embargo el metabolismo del oxígeno produce radicales libres, dado que el oxígeno solo puede intervenir en reacciones univalente y aceptar los electrones de uno en uno¹⁵. La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa (citocromo A+a3) de la cadena respiratoria mitocondrial, según la reacción global siguiente:



Por razones anteriores, la reacción se hace en 4 pasos univalentes:



Dónde:

e^- = electrón

H^+ = hidrogeniones

O^{2-} = radical anión superóxido

H_2O_2 = peróxido de hidrógeno

OH^- = radical hidroxilo

H_2O = agua

Estos intermediarios señalados quedan unidos al sitio activo de la citocromo-oxidasa y no difunden al resto de la célula en condiciones normales. En la molécula de O_2 se generan por su reducción parcial las especies reactivas siguientes:

O^{2-} = anión superóxido

OH^\cdot = radical hidroxilo

H_2O_2 = peróxido de hidrógeno

* O_2 = oxígeno singlete

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es estrictamente un RL pero por su capacidad de generar el OH^\cdot en presencia de metales como el hierro, se le incorpora como tal. La sangre, fluido biológico compuesto por eritrocitos, leucocitos y plaquetas como elementos celulares, cumple entre otras funciones la de transportar el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, y es aquí donde este actúa como sustrato en diversas reacciones bioquímicas intracelulares y como resultado se desencadena una gran producción de H_2O_2 y superóxido, entre otras EROS.

Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (EROS) puede acarrear importantes alteraciones funcionales. La aterosclerosis, el envejecimiento y el cáncer por citar algunos ejemplos, son un tercio de la enorme lista de problemas fisiológicos y padecimientos que de alguna manera se asocia con una elevada poza histórica de RL¹⁵.

1.5. Radicales libres y las Enfermedades Pulmonares¹⁸

Durante la ventilación pulmonar se inhalan diversos agentes xenobióticos. Además del ozono (O_3) y de los radicales libres dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot), hidroxilo (HO^\cdot) y óxido nítrico (NO^\cdot) presentes en la fase gaseosa.

Otro de los contaminantes importantes del aire lo constituye el humo del cigarrillo, que contiene muchos oxidantes como: aldehídos, epóxidos, peróxidos, óxidos de nitrógeno, radicales peróxilo (R-COO^\cdot), radicales de carbono (R_3C^\cdot) y de nitrógeno que incluyen principalmente al óxido nítrico (NO^\cdot) con la suficiente vida media para alcanzar el espacio alveolar. Adicionalmente en el individuo fumador se presenta un incremento en la presencia de neutrófilos en el tracto respiratorio inferior, lo cual conduce a la liberación de una cantidad adicional de ERO de origen leucocitario que contribuye al daño celular.

En los casos en que el hierro es liberado en el tejido, puede contribuir al incremento en la presentación de los procesos oxidantes del pulmón porque puede involucrarse en las reacciones de óxido reducción y contribuir a la

formación del radical hidroxilo (HO^\cdot), a partir del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) formado durante la generación del radical anión superóxido (O^{2-}) que, a su vez es producido en respuesta a cerca de los 4,700 compuestos químicos presentes en el humo del cigarrillo.

El daño pulmonar inducido por la inhalación de polvo mineral (asbesto, cuarzos y silicatos diversos), parece ser mediado por radicales libres. Estos agentes pueden afectar, tanto a las células epiteliales, mesoteliales como fibroblastos llevando a producir fibrosis pulmonar (asbestosis). Las fibras de asbesto contienen hierro, el cual estimula la generación del radical hidroxilo. El hierro puede derivar también de la hemoglobina hidrolizada durante las microhemorragias. Las partículas de silicatos (calcio y magnesio) y las fibras de asbesto pueden ser fagocitadas por los macrófagos pulmonares, iniciando un proceso inflamatorio que se acompaña de un incremento en la generación de ERO.

Como consecuencia de la exposición a tóxicos ambientales (oxidantes) se pueden mencionar las siguientes enfermedades pulmonares: el síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva del adulto (SIRPA), las crisis de asma y la fibrosis pulmonar. Durante el SIRPA, se ha demostrado la infiltración y participación de neutrófilos en el proceso, probablemente reclutados por la liberación de quimiocinas, componentes del complemento o endotoxinas provenientes de las células pulmonares en respuesta al insulto molecular en vías aéreas.

En los procesos asmáticos, el grado de reactividad de las vías aéreas a estímulos no específicos, como los alérgenos, agentes químicos, aire frío o ejercicio determinan un proceso inflamatorio crónico, en el que la infiltración por neutrófilos pudiera ser de importancia en las crisis asmáticas. Los neutrófilos producen mediadores que pueden inducir la broncoconstricción, por ejemplo, los casos de prostanoïdes y leucotrienos, así como las ERO. Estos oxidantes pueden tener efectos en varias células blanco del tracto respiratorio y potenciar la inflamación.

La participación de las ERO en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, se relaciona con la acumulación de macrófagos alveolares y neutrófilos, que contribuyen al daño celular del parénquima y a la fibrosis de las paredes alveolares.

El paraquat es un herbicida que presenta una conocida toxicidad pulmonar. En primera instancia daña a las células alveolares de tipo II debido a que presentan una captación selectiva para el paraquat.

Agentes	Mediadores /efecto pulmonar(enfermedad)
<ul style="list-style-type: none"> • Contaminantes del aire Gases (NO₂O₃) • Partículas suspendidas PM₁₀ PM₂₅ PM_{<25} • Ultrafinas <25Nm (carbón negro, hollín) Asbestos, silicatos Humo de cigarrillos Paracuat(herbicida) Bleomicina (agente antineoplásico) 	<p>ERO[*] Lipoperoxidacion, activación de PMN SIRPA, hiperreactividad en asmáticos</p> <p>Inflamación pulmonar, estrés oxidante</p> <p>Activación de macrófagos, Fe²⁺(asbestosis)NO_x Radicales peróxilo y quinonas, estimulan macrófagos. PMN, ERO (EPOC), cáncer.</p> <p>ERO edema, fibrosis pulmonar generación de ERO(fibrosis pulmonar)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • ERO: Especies reactivas del oxígeno; PMN: Leucocitos polimorfonucleares; SIRPA: Síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva del adulto NO_x: Óxidos de nitrógeno; EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. 	

Fig. N° 10: Ejemplos de inductores de daño pulmonar/enfermedad por especies reactivas de oxígeno¹⁸.

1.6. Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos¹⁹ e impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras (Scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos¹⁷.

1.6.1. Tipos de antioxidantes

Entre los antioxidantes endógenos tenemos, superóxido dismutasa, que dismutan el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y su principal función es la protección contra el anión superóxido; Catalasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua²⁰; Glutación peroxidasa, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutación reducido (GSH); Glutación, el cual tiene características antioxidantes ya que el grupo tiol en su porción de cisteína es un agente reductor y puede ser oxidado y ser reducido de forma reversible; Ácido úrico, donde el urato inactiva directamente HO[•], singulete de oxígeno, grupos oxidantes, oxo-hem, formados por la reacción entre peróxidos y hemoglobina, y radicales peroxilo de la lipoperoxidación.

Algunas enzimas necesitan cofactores metálicos como selenio, cobre, zinc y magnesio¹⁵ para poder realizar el mecanismo de protección celular.

Por otra parte el cuerpo humano a través de la cadena alimentaria puede incorporar antioxidantes exógenos como, Vitamina E¹⁸ O α -tocoferol, el cual es efectiva como agente antioxidante convirtiendo O₂, HO[•] y los radicales lipo-peroxilo en moléculas menos reactivas de acuerdo con la reacción que se presenta en la Figura N° 11

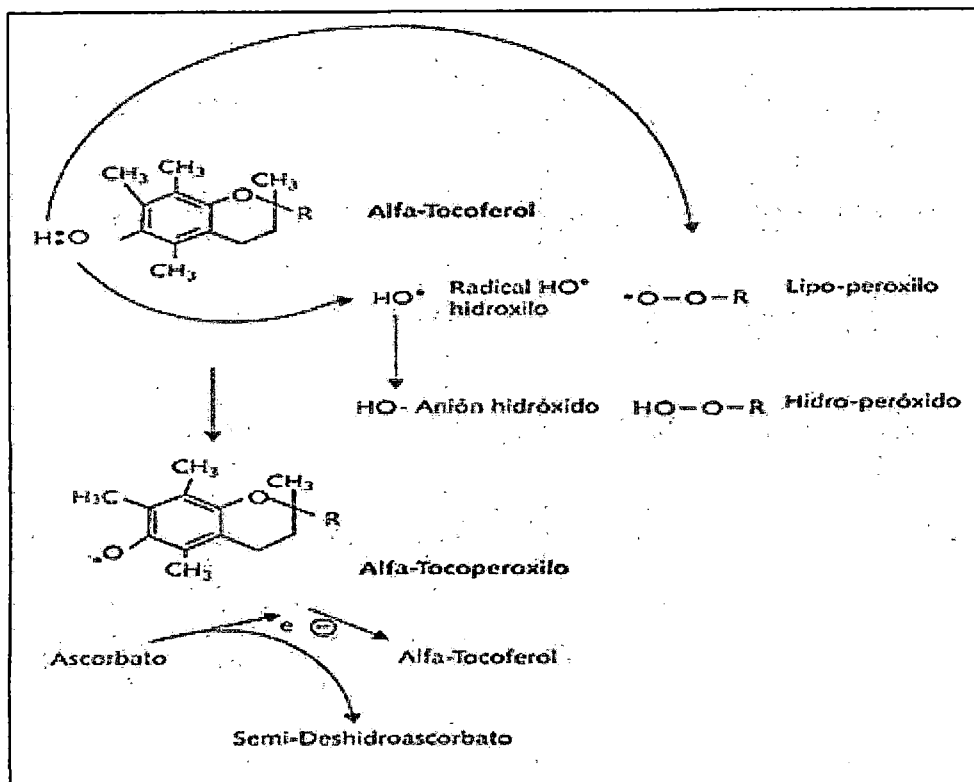


Figura N° 11: Se representa el ataque electrofílico monoeléctrico (un solo electrón) de la valencia que forma el oxhidrilo del alfa tocoferol hacia el radical hidroxil, estabilizando su reactividad al formar el anión hidróxido. La molécula de alfa tocoferol al ceder un electrón se constituye en radical alfa-tocoperóxido, el cual es estabilizado al aceptar un electrón proveniente del ascorbato restituyendo la estructura del alfa-tocoferol. Una reacción similar se lleva a cabo con el radical lipo-peróxido¹⁸.

La actividad antioxidante de la vitamina E está localizada predominantemente en las membranas celulares y su eficiencia se incrementa en presencia de ascorbato y ácido úrico. Adicionalmente, la vitamina E modula otras funciones en las diversas membranas celulares incluyendo a las del endotelio pulmonar. Entre las funciones asociadas se pueden mencionar: el transporte de 5-hidroxitriptamina (serotonina), la regulación de la producción normal de eicosanoides, y las inhibiciones de la 5-lipo-oxigenasa, migración y quimiotaxis de neutrófilos.

Otro antioxidante exógeno hidrosoluble es la vitamina C disponible en todos los compartimientos del organismo funciona como reductor monoeléctrico de los radicales $O_2^{\cdot -}$ y HO^{\cdot} , modificando su estado redox al formar el radical libre semi-deshidroascorbato, que es subsecuentemente reducido a deshidroascorbato por $O_2^{\cdot -}$ el proceso inverso involucra al glutatión reducido, que a su vez da lugar

Los β -carotenos dietarios se acumulan en la piel y actúan como agentes protectores contra el daño oxidativo inducido por las radiaciones UV-A, a través del quenching del oxígeno singlete¹⁹.

Finalmente, otro antioxidante exógeno importante son los polifenoles en este grupo los más conocidos son los flavonoides los cuales actúan contra el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peróxilo, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores cuya propiedad como antioxidante proviene de su gran reactividad como donantes de electrones e hidrógenos y de la capacidad del radical formado para estabilizar y deslocalizar el electrón desapareado y de su habilidad para quelar iones de metales de transición¹⁹.

1.6.2. Principal mecanismo de acción de los antioxidantes²¹

El mecanismo más conocido, en el caso de los radicales libres es su estabilización a través de la cesión de un el electrón a dichas especies reactivas. Tal mecanismo, definido como SET (Singer electron transfer), permite que el radical libre pierda su condición por paramiento de su electrón desapareado. Una consecuencia para el antioxidante es que como resultado de ceder un electrón, este se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno. Junto al mecanismo SET existe otro que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno (Esto es un electrón con su protón). Tal mecanismo es definido como HAT (Hydrogen atom transfer). En este caso el radical libre también queda estabilizado electrónicamente.

Los antioxidantes cuya acción es promovida a través de mecanismo SET y/o HAT, presentan en su estructura química, como grupos funcionales, hidróxilos fenólicos (Ejemplo, todos los polifenoles y tocoferoles). No obstante, otros antioxidantes, no fenólicos como el glutatión, melatonina y los ácidos ascórbico, dihidro- lipoico y úrico, son también ejemplos de moléculas cuya acción es promovida por mecanismos SET y/o HAT.

Junto a los mecanismos SET y HAT, ciertos antioxidantes pueden actuar también estabilizando especies reactivas a través de un mecanismo que implica la adición directa del radical a su estructura. Ejemplo de este tipo de acción antioxidantes es la promovida por la caroteno como B- caroteno.

1.7. Métodos para evaluar la actividad antioxidante.

1.7.1. Método FRAP^{4,22} (Poder antioxidante de reducción del ion férrico)

Se basa en la capacidad que presentan los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ion férrico a ferroso en medio acuoso ácido. La reacción mide la reducción del 2,4,6,-tripiridil-S-triazina (TPTZ) a un producto coloreado que se determina espectrofotométricamente a 593 nm. La reacción detecta compuestos con potenciales de reducción $< 0,7$ V, tal que este método es útil para un screening de la capacidad para mantener el status redox en células y tejidos. Este método ha sido aplicado a muestras biológicas, principalmente plasma y suero, para conocer la influencia de la ingestión de bebidas como el vino en el estado oxidativo, así como en frutas y verduras. Asimismo, modificaciones de este método han sido utilizados para medir la actividad de flavonoides puro, principalmente flavonoles y flavonas y establecer relaciones estructura actividad. La desventaja de este método es que solo mide la capacidad de reducción del ion férrico, lo cual no es relevante desde el punto de vista fisiológico. La absorción (A593) en el método original se realiza a los 6 minutos, sin embargo esta no se detiene, incrementándose suavemente incluso después de varias horas en algunos polifenoles.

1.7.2. Método ABTS^{4,22} (Capacidad antioxidante equivalente al trolox)

Fue primero diseñado por Rice Evans y Miller (1994), el cual se basa en la capacidad de captación del radical ABTS^{*+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) por parte de un antioxidante. Este radical tiene un espectro de absorción característico con máximos a 414, 645, 734, y 815 nm posee una coloración verde azulada. Químicamente muy estable y es soluble en medio acuoso y etanólico. Los resultados se expresan con relación a la actividad antioxidante del trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E). La desventaja que presenta este método es que el radical utilizado no se encuentra en muestras biológicas, con lo cual no tiene importancia fisiológica.

1.8. Músculo liso. Broncodilatación - Broncoconstricción

1.8.1. Dilatación simpática de los bronquiolos - Broncodilatación

El control directo de los bronquiolos por las fibras nerviosas simpáticas es relativamente débil porque pocas fibras de este tipo penetran hasta las porciones centrales del pulmón. Sin embargo, el árbol bronquial está muy expuesto a la noradrenalina y a la adrenalina que se liberan a la sangre por la estimulación simpática de la médula de las glándulas suprarrenales. Estas dos hormonas (especialmente la adrenalina debido a su mayor estimulación de los receptores β adrenérgicos) producen dilatación del árbol bronquial. La mayoría de los receptores adrenérgicos de las vías aéreas son de tipo β_2 , aunque en los alvéolos también hay receptores β_1 . La estimulación de los receptores β -adrenérgicos de las vías aéreas provoca relajación de la musculatura lisa, inhibición de la liberación de mediadores de las células cebadas e incremento del aclaramiento mucociliar²³.

La adrenalina tiene un efecto terapéutico notorio como antagonista fisiológico de sustancias que originan broncoconstricción.

Los efectos beneficiosos de la adrenalina en el asma se pueden originar también por inhibición de la descarga de mediadores inflamatorios desde los mastocitos inducidos por antígenos²⁴.

1.8.2. Constricción parasimpática de los bronquiolos – Broncoconstricción

Algunas fibras nerviosas parasimpáticas procedentes de los nervios vagos penetran en el parénquima pulmonar, se han encontrado receptores muscarínicos tanto en las vías aéreas grandes como en las pequeñas²⁵.

Estos nervios secretan acetilcolina y cuando son activados producen una constricción leve o moderada de los bronquiolos. Cuando una enfermedad como el asma ya ha producido un cierto grado de constricción bronquiolar, la estimulación nerviosa parasimpática adicional con frecuencia empeora la enfermedad. Cuando ocurre esto la administración de fármacos que bloquean los efectos de la acetilcolina como atropina a veces puede relajar las vías respiratorias lo suficiente para aliviar la obstrucción. A veces los nervios

parasimpáticos también son activados por reflejo que se originan en los pulmones producidos por la irritación de la membrana epitelial de la propia vía respiratoria, iniciada por gases irritantes, polvos, humo de cigarrillos, infección bronquial, dióxido de azufre, algunos de los elementos ácidos del esmog o cuando las arterias pulmonares son ocluidas por microembolos²³. Por lo tanto, los nervios colinérgicos constituyen la vía broncoconstrictora dominante en las vías aéreas.

1.8.3. Acción del algunos autacoides

Dos de las más importantes sustancias que producen constricción bronquiolar son: la histamina y la sustancia de reacción lenta de anafilaxia. Estas dos sustancias se liberan a nivel pulmonar por los mastocitos durante las reacciones alérgicas sobre todo las provocadas por pólenes de aire. Por tanto juegan un papel fundamental en la obstrucción de la vía aérea observada en el asma alérgico, sobre todo la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia.

En el árbol bronquial existen receptores H₁, cuya activación provoca broncoconstricción, pero su participación en la enfermedad broncospástica es muy variada, de ahí el nulo o mínimo efecto broncodilatador que consiguen los antihistamínicos H₁. Si la luz bronquial es ya pequeña por acción de otros factores broncoconstrictores, el aumento o disminución de la actividad H₁ puede tener mayor repercusión; por esta razón, los enfermos asmáticos son muy sensibles a la acción de la histamina²⁶.

1.9. Mecanismo de acción de agentes broncodilatadores

Tenemos los Agonistas Beta-2 adrenérgicos cuyo efecto relajante, igual que otros agentes de este tipo, se atribuye al estímulo del receptor que activa la adenilciclase enzima que cataliza la conversión de trifosfato de adenosina, (ATP) en AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), el aumento de las concentraciones de AMP-c hace descender el calcio intracelular provocando relajación en el músculo liso bronquial. El incremento de las concentraciones del AMP-c, inhibe la liberación celular de los mediadores de hipersensibilidad inmediata, o espasmógenos e inflamatorios de los mastocitos pulmonares

especialmente los producidos por las células cebadas tales como histamina, leucotrienos y prostaglandinas.

Los Antagonistas muscarínicos ejercen su acción inhibiendo los reflejos vágales por la acción antagónica de la acetilcolina. Los anticolinérgicos, previenen el incremento de la concentración intracelular de la guanosina monofosfato cíclica (GMP cíclica) causado por la interacción de la acetilcolina con el receptor muscarínico en el músculo bronquial liso.

Finalmente, dado que la Adenosina ocasiona la contracción del músculo liso de las vías respiratorias y estimula la liberación de histamina, frente a ello los antagonistas del receptor de Adenosina ejerce su acción relajante del músculo liso al incrementar los niveles celulares del AMP cíclico como consecuencia de la capacidad para inhibir la fosfodiesterasa, enzima que degrada la AMP cíclico.

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Estudio fitoquímico.

2.1.1. Materiales, reactivos y equipos

- **Material vegetal:** Hojas de la especie *Chromolaena laevigata* – Chimchis
- **Material de vidrio :** Los necesarios para la realización de la tesis
- **Reactivos :** los necesarios para la identificación de metabolitos secundarios según la marcha fitoquímica
- **Solventes**
 - Etanol 96°
 - Metanol
 - Eter de petróleo
 - Diclorometano
 - Acetato de etilo
 - Agua destilada
- **Equipos**
 - Balanza analítica Sartorius
 - Rotavapor marca HEIDOLPH modelo LABORATORA 4000
- **Otros**
 - Cromatofolios (Merck)

2.2. Recolección y Tratamiento de la muestra vegetal

La especie *Chromolaena laevigata* fue recolectada de forma manual con ayuda de pobladores del lugar en el mes de marzo del 2013 en el distrito de Toraya, provincia de Aymaraes, departamento de Apurímac, región de Apurímac a una altitud de 3151 msnm.

Se seleccionaron las hojas en buen estado, las mismas que fueron secadas a la sombra durante un período de 14 días, al término de secado las hojas fueron sometidas a un proceso de molienda para su posterior almacenamiento en recipientes de vidrio.

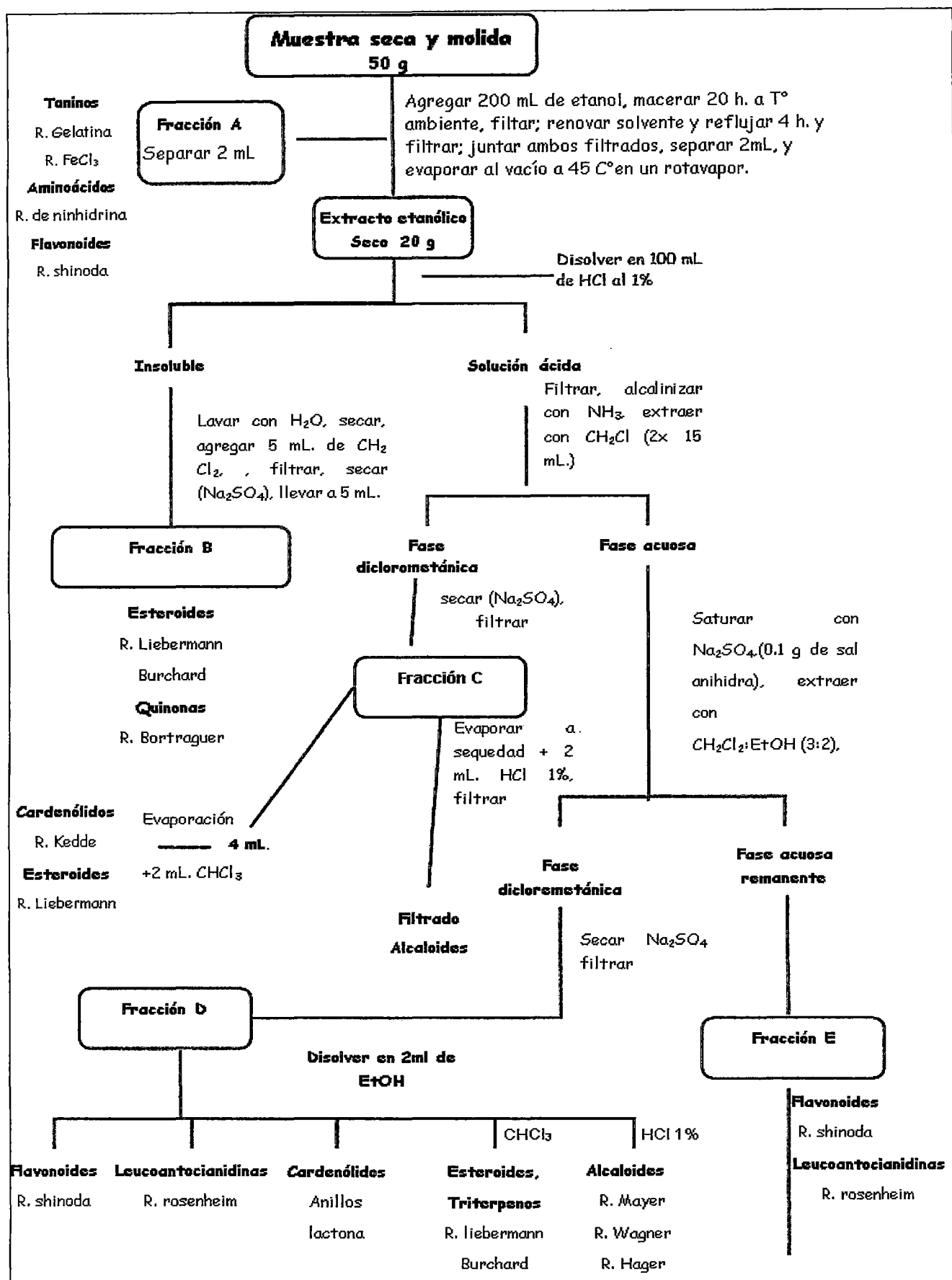
2.3. Obtención del Extracto Etanólico Total

A 500 g de las hojas secas y molidas se le adicionó 1000 mL de etanol de 96°, se reflujo por espacio de 4 horas, al poner en contacto la muestra con el disolvente se logra extraer los principios activos²⁷, al cabo de este tiempo se filtró en caliente, el filtrado se evaporó al vacío a 45°C en un evaporador rotatorio modelo HEIDOLPH LABORATORA 4000. Obteniéndose 150 g de un extracto seco de color verde oscuro. Posteriormente se aplicó el mismo proceso hasta utilizar 1.5 kg de de hojas secas y molidas obteniéndose finalmente 500g de extracto seco.

2.4. Screening fitoquímico²⁸

50 g de la muestra seca y molida, se maceraron en 200 mL de etanol de 96°, por espacio de 20 horas a temperatura ambiente, se filtra, se renueva el disolvente y se refluja por espacio de 4 horas, se filtra en caliente, Ambos filtrados se reúnen y se separan 2 mL que constituyen la fracción A, el resto se evaporó al vacío a 45°C, en un evaporador rotatorio, Obteniéndose 20g de un extracto seco de color verde oscuro.

El extracto seco se disuelve en 100 mL de ácido clorhídrico al 1%, se obtienen dos fases una soluble y otra insoluble. La fase insoluble se alcaliniza con hidróxido de amonio al 25% se continua la extracción según el fluxograma N° 01. Obteniéndose las fracciones: B, C, D y E. La identificación se realiza mediante reacciones de coloración y / o precipitación.



Fluxograma N°01: Marcha fitoquímica de *Chromolaena laevigata* "Chinchis"

2.5. Métodos de análisis para la identificación de metabolitos secundarios²⁸.

Separadas las fracciones se procedió a realizar sobre estas, reacciones de coloración o precipitación para identificar grupos funcionales y metabolitos secundarios el cual se desarrolló de la siguiente manera:

➤ **FRACCIÓN A**

– **Detección de Taninos:**

Reacción de Gelatina - Sal.- Se vierte 0.5 mL de extracto sobre 1 mL de solución de Cloruro de sodio 5%, gelatina 1% y gelatina - sal, la precipitación con este último reactivo o con ambos el 1° y 2° es indicativo de la presencia de taninos, si solamente ocurre con el 1°, podría ser un falso positivo.

Reacción de Cloruro Férrico.- En un tubo de ensayo se colocó 0.5 mL, de la **Fracción A** y se le agregó una gota de solución acuosa de Cloruro férrico 1%.

La reacción es positiva cuando aparecen colores azul - negro verdoso.

– **Detección de Aminoácidos:**

Reacción de Ninhidrina.- Sobre tiras de papel de filtro se coloca con una pipeta capilar:

a) Una gota de Fracción A + una gota del reactivo Ninhidrina al 2%.

b) Blanco: Solución etanólica de Ninhidrina al 2%.

c) Testigo: Una gota de solución de metionina 5%.

Luego del secado a temperatura ambiente las tiras de papel se colocan en la estufa a 110 – 120 °C hasta la aparición de un color en el blanco. Se compara con la mancha azul violácea de la solución testigo.

La reacción es positiva si el papel de la muestra presenta un color azul violáceo.

– **Detección de Flavonoides:**

Reacción de Shinoda.- En una placa se vertieron 3 gotas de la Fracción A, 5 limaduras de Magnesio y 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado. La reacción es positiva cuando aparecen tonos de color rojo, anaranjado y violeta.

➤ **FRACCIÓN B**

– **Detección de Triterpenoides y/o Esteroides:**

Reacción de Liebermann Burchard.- Sobre 1 mL de la Fracción se vertieron 5 gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético/ácido sulfúrico (50:1)

La reacción es positiva si aparecen colores verde, azul verdoso.

– **Detección de Antraquinonas:**

Reacción de Bornträger.- Sobre el resto de la Fracción B se agregan 5mL de Hidróxido de sodio al 5% y se agita suavemente.

La reacción es positiva si la fase acuosa toma un color rojo.

➤ **FRACCIÓN C**

– **Detección de Esteroides y/o Triterpenoides:**

Reacción de Liebermann Burchard (descrita anteriormente)

– **Detección de Alcaloides:**

El resto de la Fracción C se evapora a sequedad y luego se agrega 2 mL de ácido clorhídrico al 1%, filtrar. Se realizan por separado las reacciones de precipitación, de Dragendorff, Mayer, Wagner. La reacción es positiva si aparece un precipitado.

- Reactivo de Wagner: Solución de yodo - yoduro de potasio. Reacción positiva si el precipitado es de color marrón.
- Reactivo de Mayer: Mercurio tetrayoduro de potasio. Reacción positiva si el precipitado es de color blanco o crema.
- Reactivo de Dragendorff: Tetrayoduro bismuto de potasio. La reacción es positiva si el precipitado es de color anaranjado.

FRACCIÓN D

Se evaporó a sequedad y luego se agregó 2.5 mL de etanol, efectuándose las siguientes reacciones.

– **Detección de Flavonoides:** Reacción de Shinoda.

– **Detección de Leucoantocianidinas y catequinas:**

Reacción de Rosenheim.- A 0.2 mL de la Fracción D se agregó 0.1 mL de ácido clorhídrico concentrado, se calienta durante 10 minutos a 100°C. Enfriar, luego se adiciona 2 mL de agua y 0.4 mL de alcohol amílico, agitar y observar el color en la fase amílica.

La reacción se considera positiva si aparece un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro.

Si es rojo indica presencia de antocianidinas. Si es marrón indica presencia de catequinas.

- **Detección de Esteroides y/o Triterpenoides:** Reacción de Liebermann Burchard.
- **Detección de Alcaloides:** Reacción de Mayer, Dragendorff y Wagner. (descrita anteriormente).

FRACCIÓN F

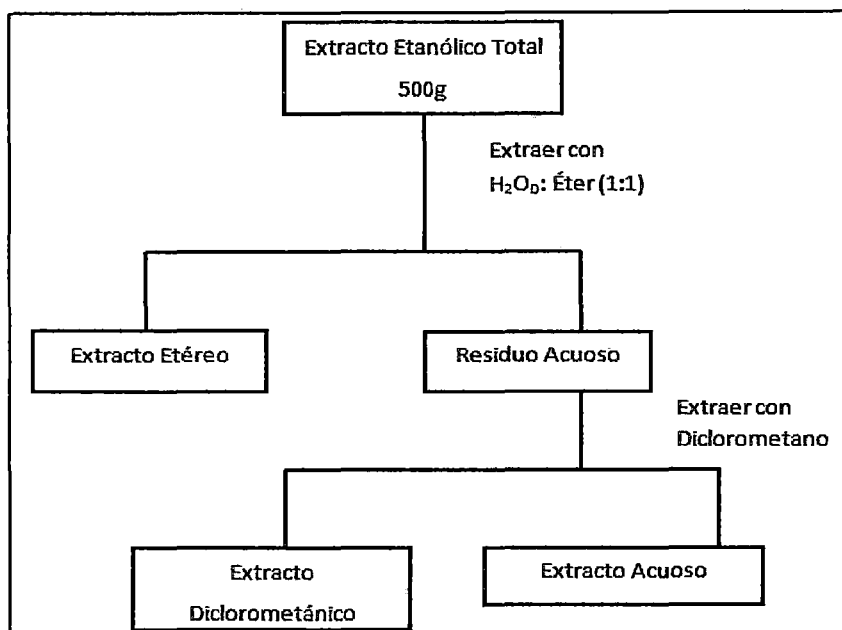
A 1 g de droga seca, se agregó 20 mL de agua destilada, luego se hirvió durante 15'. Se Filtró en caliente y se completó a volumen (10 mL). Finalmente se enfrió, esto constituye la fracción F.

- **Detección de Saponinas:**
Prueba de espuma.- En dos tubos de ensayo se agitan 2.5 mL de extracto por un minuto. Dejar reposar 15 minutos y observar la formación de espuma. Se considera negativa la reacción si la altura de la espuma es menor de 5 mm.

2.6. Obtención de los extractos de diferente polaridad

500 g del extracto etanólico seco, se disolvió en una mezcla de éter de petróleo: agua destilada (1:1), hasta disolución mediante agitación, luego se filtró y la solución se trasvasó a una pera de bromo donde se realizó una extracción sucesiva líquido - líquido hasta agotamiento con los solventes de diferente polaridad, éter de petróleo, diclorometano y H₂O destilada. Finalmente se obtuvo los extractos etéreo, diclorometánico y acuoso los cuales se llevaron a concentrar a un evaporador rotatorio. Tal como se muestra en el Fluxograma N° 2.

Sobre estos extractos se realizaron reacciones de identificación, mediante reacciones de coloración y / o precipitación.



Fluxograma N° 02: Método para la obtención de los extractos de diferente polaridad de *Chromolaena laevigata* “Chinchis”.

2.7. Hidrólisis del extracto acuoso

El extracto acuoso seco fue disuelto en HCl al 1% y reflujaado por espacio de 4 horas, se enfrió a temperatura ambiente y luego se refrigeró a 4°C por espacio de 24 horas, al cabo de este tiempo se obtuvo un precipitado de color verde amarillento, fue separado por filtración. 1 mg de este extracto se disolvió en etanol y se realizó la reacción de shinoda.

2.8. Cromatografía de capa fina

El extracto etanólico total y los extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de las hojas de la especie *Chromolaena laevigata*, fueron sometidos a cromatografía de capa fina.

Para el desarrollo de esta técnica se procedió de la siguiente forma: se cortó las placas de sílica gel (7x7cm), siendo esta la fase estacionaria, en la cual con ayuda de un capilar sembramos de dos a tres veces el extracto etanólico total y los extractos etéreo y diclorometano a una distancia de 1cm del extremo inferior de la

placa, dejando secar entre aplicación y aplicación; luego colocamos la placa con las muestras en estudio en un recipiente cerrado, poniendo en contacto el extremo inferior de la placa con el eluyente éter : acetato de etilo(6:4), procurando evitar el contacto directo de éste con la muestra; de la misma forma se procedió con los extractos acuoso y acuoso hidrolizado con el sistema diclorometano: metanol (9:1). El eluyente asciende por la placa gracias al efecto de capilaridad ejercido entre las finas partículas. A medida que el eluyente se desplaza pasa por el punto de aplicación de la muestra, la disuelve y lo arrastra por la placa. Concluida la elución se retiró la placa, se dejó secar unos minutos, para finalmente identificar las posiciones de los metabolitos secundarios, utilizando una lámpara U.V a un rango de 254 y 360 nm, lo que nos permitió hallar los R_f de cada componente.

2.9. Ensayo de la Actividad Antioxidante

Los ensayos de la actividad antioxidante por el método FRAP Y ABTS se realizaron en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” de ICA.

- **Muestra en estudio:** Los extractos etéreo, diclorometánico, acuoso y el extracto acuoso hidrolizado se sometieron a evaluación de la actividad antioxidante por el método de FRAP y ABTS
- **Material de vidrio:** Los necesarios para la realización de la tesis
- **Equipos:** Espectrofotómetro UV-VIS UNICO
- **Reactivos FRAP**
 - Tampón acetato (pH= 3,6)
 - HCL
 - Tricloruro Férrico($FeCl_3 \cdot 6 H_2O$)
 - Reactivo 2,3,6,- tripiridil – s – triazina (TPTZ)
- **Reactivos ABTS**
 - ABTS (2,2 –azino –bis (3 –etilbenzotiazolin – 6 – sulfônico)
 - Persulfato de potasio
 - Agua ultrapura
 - Fosfato de pH 7.1

2.9.1. Actividad Antioxidante Método FRAP^{4,22}

Se preparó el reactivo de trabajo, que consiste en una mezcla de tampón acetato 300 mM (pH= 3.6), TPTZ 10 mM en HCL 40 mM y tricloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) 20 mM en una proporción 10:1:1(v:v:v), una vez preparado se añadió 3 mL de reactivo en una cubeta, y se midió la absorbancia (blanco) a 593 nm. Posteriormente se agregó 100 μL de las soluciones de los extractos y se agitó en un vortex durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó la lectura de absorbancia nuevamente a 593 nm, al cual se le restó el valor del blanco. Cada muestra se ensayó en varias concentraciones, todas las muestras se ensayaron por triplicado.

Los resultados se expresaron en relación al trolox. Para ello se realizó una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 1.00 a 0.03 mM y se procedió igual que las muestras.

2.9.2. Actividad Antioxidante Método ABTS^{4,22}

En este método, la generación, del radical ABTS se produce por medio químico mediante la adición de Persulfato de potasio antes de la adición de la muestra, lo que evita que los componentes de la misma pueda reaccionar con el reactivo, otra ventaja es que se trabaja a pH fisiológico (pH = 7,1), a una temperatura de 37 °C simulando las condiciones fisiológicas.

Para comenzar el análisis es necesario preparar el reactivo de trabajo el cual debe tener una concentración de ABTS de 30 μM y se procede de la siguiente manera: Se pesaron 0,504 g de la sal amónica cristalizada de ABTS y se disolvió en 5 mL de agua ultrapura, se tomó 6,7 mg de Persulfato de potasio se adicionaron a la solución anterior y se agitó por espacio de media hora envuelta en papel de aluminio protegido de la luz. Pasado este tiempo se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL se enrasó con agua ultrapura y se dejó en reposo protegido de la luz de 12 a 18 horas.

Se tomó una alícuota de 1mL al cual se adicionó 70 mL de un tampón fosfato de Ph 7.1 y se midió la absorbancia a 734nm la absorbancia debe estar entre 0.68 +- 0.2. Para la medida de la actividad antioxidante se tomaron 2mL de radical

ABTS en una cubeta y se midió su absorbancia a 734 nm con el equipo termostatzado a 37 °C, posteriormente se añadió 50 µL de la muestra problema (la cual estuvo en baño maria a 37°C), que se mezcló durante 10 segundos en un vortex, después de 4 minutos de incubación se medió la absorbancia nuevamente a 734 nm. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Para evaluar los resultados se definió el valor TEAC como la concentración de Trolox que tiene la misma actividad antioxidante que una concentración 1 mM de la sustancia en estudio. Para ello se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox frente a las diferentes variaciones de absorbancia del radical.

2.10. Estudio farmacológico

- **Muestra en estudio:** Los extractos etéreo, diclorometánico, acuoso y el extracto acuoso hidrolizado se sometieron a evaluación de la actividad broncodilatadora por el método de la Cadena Traqueal Aislada de Cobayos
- **Animal de experimentación:** Cobayos del INS
- **Material de vidrio:** Los necesarios para realizar la tesis.
- **Equipos:** Baño de órganos aislados, marca PANLAB – LE 13206
- **Líquido Nutricio:** Solución de Krebs

2.10.1. Ensayo de la Actividad Broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad en cadena traqueal aislado de cobayo²⁹

Se emplearon 60 cobayos machos de 400 gramos a los que se les extrajo la tráquea, una vez retirada fueron colocadas en un recipiente con líquido nutriente a 37 C° y aireada con una mezcla de oxígeno (95%), dióxido de carbono (5 %). El líquido nutriente fue la solución de Krebs.

Un segmento de tráquea se aisló, luego fue fraccionado en anillos, 5 de ellos se unieron con ayuda de hilo estéril para formar una cadena traqueal (ver figura N° 13), luego se transfirió a un equipo de baño de órganos aislados, marca PANLAB – LE 13206, en donde un extremo de la cadena se unió a un pasador fijo del equipo y el otro extremo a una palanca de escritura sobre un tambor

ahumado. La cadena traqueal está contenido en un vaso que contiene 25 mL de solución de Krebs manteniendo las condiciones señaladas.

Luego de estabilizar la cadena traqueal se procedió de la siguiente manera: Se preparó cada extracto en estudio a concentraciones de 150 mg/mL y 300 mg/mL, por ello se formó 20 grupos de trabajo, entre los cuales se encuentra el control positivo (Adrenalina 1mg/1mL) y el Control negativo (vehículo). (Ver fluxograma N° 3).

Para inducir la contracción del músculo liso se agregó sobre la solución de Krebs 0,1 mL de Acetilcolina 0,1 % después de 3 a 4 segundos se apreció la contracción, la que se consideró como el 100%, después de estabilizar la contracción se procedió a probar cada uno de los extractos en estudio por separado, para hallar el porcentaje de relajación (Ver fórmula), así como los controles, positivo y negativo, lavando el músculo liso con solución de krebs para cada uno de las pruebas. Después de cada prueba se midió la contracción y relajación en mm.

Posteriormente, se provocó la contracción del músculo liso agregando sobre la solución de Krebs 0,1 mL de Histamina al 0,1 %, y se procedió de la misma forma.

Cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron en porcentajes de actividad broncodilatadora y se comprobó su efecto mediante análisis estadístico con respecto al control positivo.

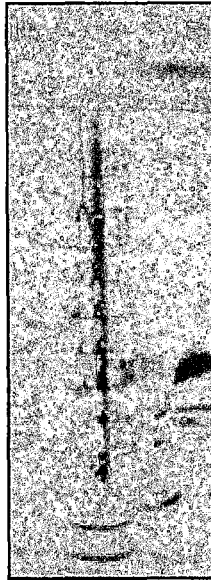


Figura N° 13: Cadena traqueal de cobayo

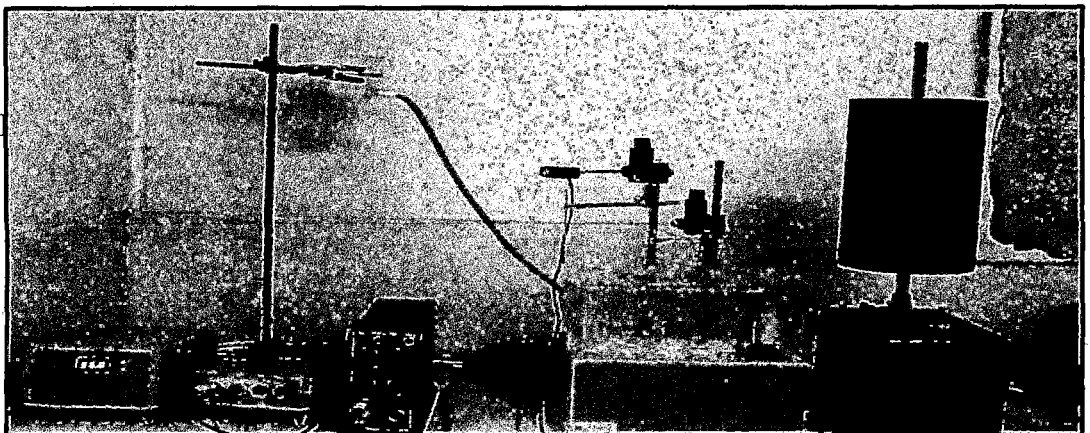
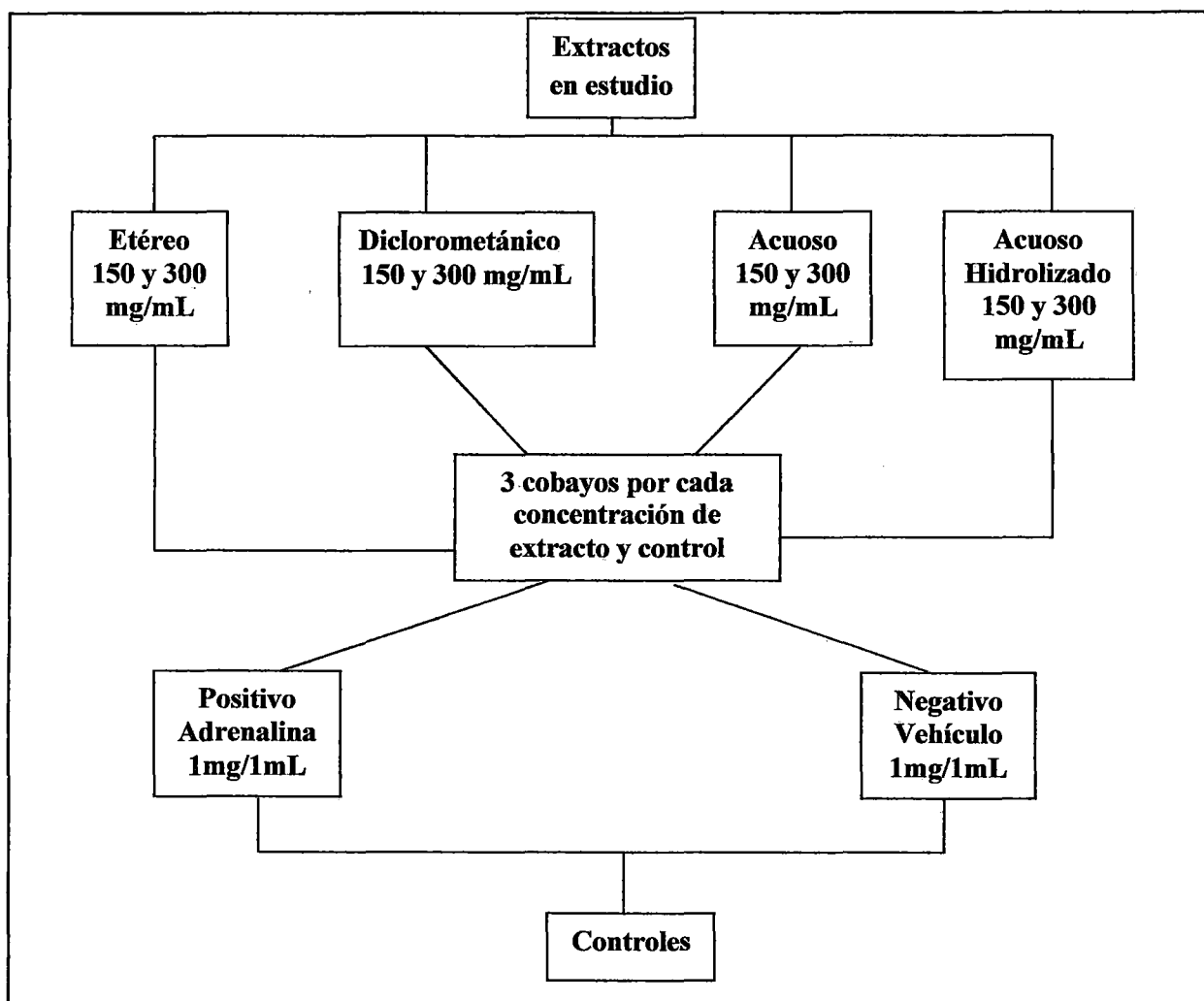


Figura N° 14: Equipo de baño de órganos marca PANLAB – LE 13206 del laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.



Fluxograma N° 3. Representación de los grupos de trabajos y sus concentraciones para el ensayo de la actividad broncodilatadora.

Fórmula para hallar el porcentaje de relajación

$$\% \text{ de relajación} = \frac{\bar{X}MLR \times 100}{\bar{X}MLC}$$

Donde:

$\bar{X}MLR$ = Promedio de músculo liso Relajado (mm)

$\bar{X}MLC$ = Promedio de músculo liso contraído (mm)

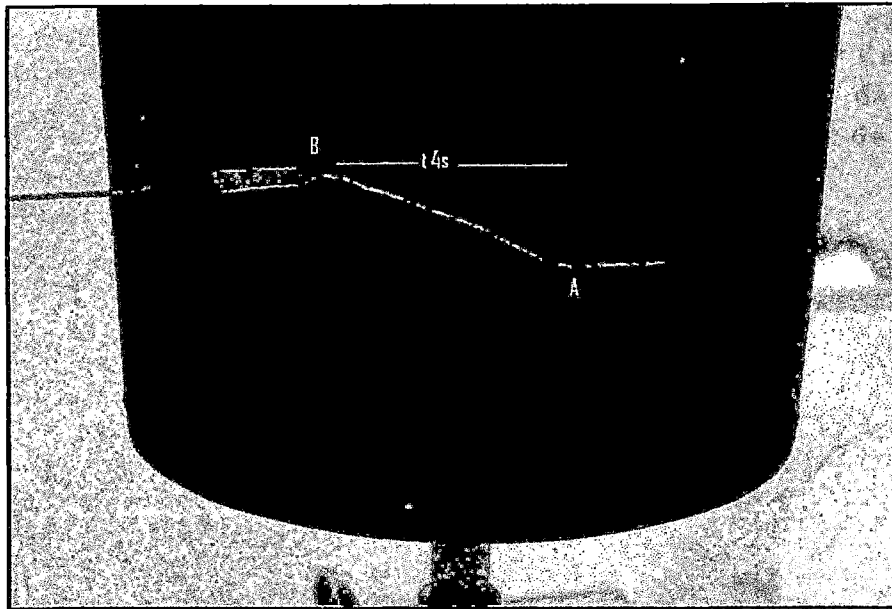


Figura N° 15: Ejemplo de contracción inducida por acetilcolina en el músculo liso de tráquea aislada de cobayo. A: Estado basal del músculo liso; B: Contracción máxima ejercida por la acetilcolina después de 4 segundos.

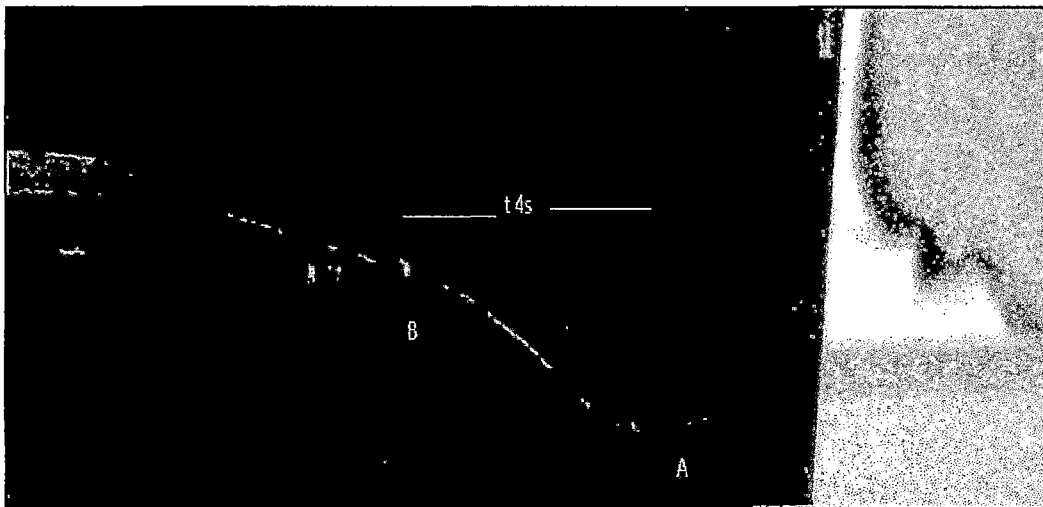


Figura N° 16: Ejemplo de contracción inducida por histamina en el músculo liso de tráquea aislada de cobayo. A: Estado basal del músculo liso; B: Contracción máxima ejercida por la histamina después de 4 segundos.

2.10.2. Pruebas Estadísticas.

Los datos se expresaron como porcentaje de relajación \pm Desviación Estándar, y se analizaron para establecer diferencia entre los grupos por el test de Kruskal Wallis y como post test se utilizó el test de Dunn. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad v. 6.0 for Windows.

III. RESULTADOS

Cuadro N° 01. Metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de las hojas de *Chromolaena laevigata*

FRACCIÓN	METABOLITO	RESULTADOS
A	Taninos	-
	Grupos Fenólicos Libres	+
	Flavonoides	+
	Aminoácidos	+
B	Triterpenos y/o esteroides	+
	Antroquinonas	-
C	Triterpenos y/o esteroides	+
	Alcaloides	+
D	Flavonoides	+
	Leucoantocianidinas	-
	Catequinas	+
	Alcaloides	+
E	Triterpenos y/o esteroides	+
	Flavonoides	+
	Leucoantocianidinas	-
	Catequinas	+
F	Saponinas	+

(+) = presencia, (-) = ausencia

Cuadro N° 02. Metabolitos secundarios identificados en los extractos de diferente polaridad de las hojas de *Chromolaena laevigata*

METABOLITOS	EXTRACTOS			
	ETEREO	DICLOROMETANICO	ACUOSO	Pp del Hidrolizado
Taninos	-	-	-	
Grupos fenólicos libres	+	+	+	
Flavonoides	+	+	+	+
Triterpenos y/o Esteroides	+	+	-	
Antraquinonas	-	-	-	
Alcaloides	-	+	+	
Leucoantocianidinas	-	-	-	
Catequinas	-	+	+	
Aminoácidos	-	+	+	

(+) = presencia, (-) = ausencia

Cuadro N° 03. Valores de Rf de de los compuestos identificados por CCF en los extractos de diferente polaridad de las hojas de *Chromolaena laevigata*

Metabolitos	Extracto Etereo	Extracto Dicloro	Extracto Etanólico Total	Extracto Acuoso	Pp del hidrolizado
M ₁	0.20	0.07	0.07	0.31	0.24
M ₂	0.49	0.06	0.19	0.35	0.52
M ₃	0.59	0.19	0.33	0.47	0.58
M ₄		0.27	0.43	0.52	0.76
M ₅		0.31	0.46		
M ₆		0.44			
M ₇		0.66			

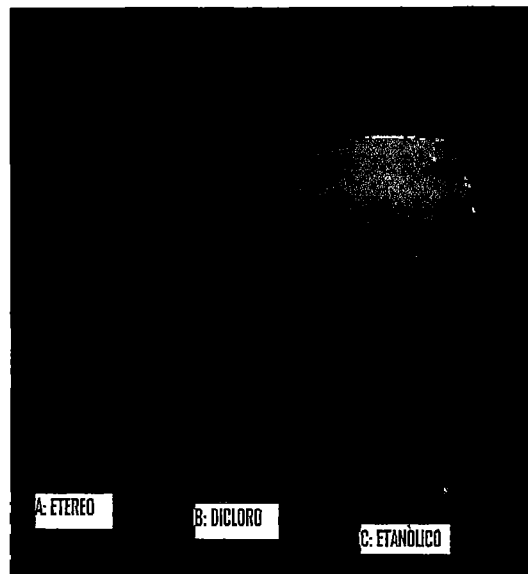
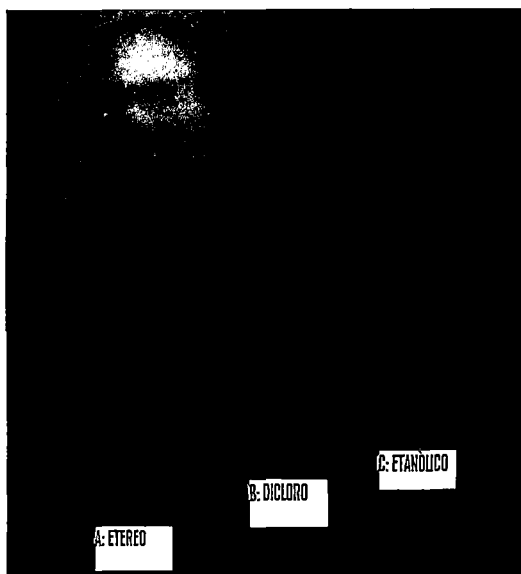


Figura N° 17. Los extractos indicados están sembrados por duplicado y se logra ver separaciones a un rango UV de 360nm (Izquierda) y a un rango de 254nm (Derecha). Se utilizó el sistema 6:4 (éter: acetato).

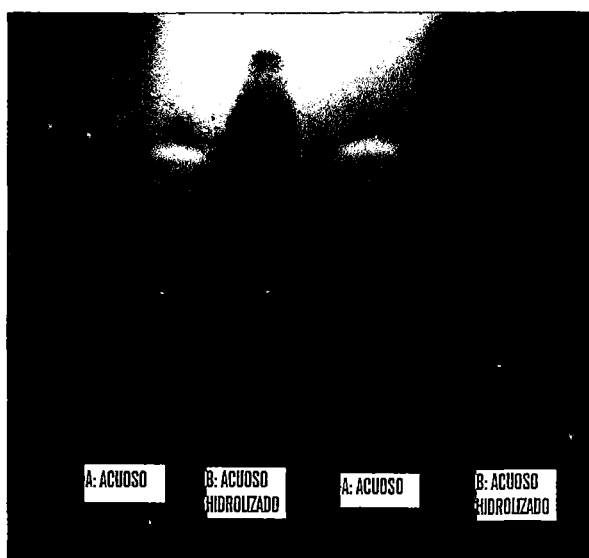
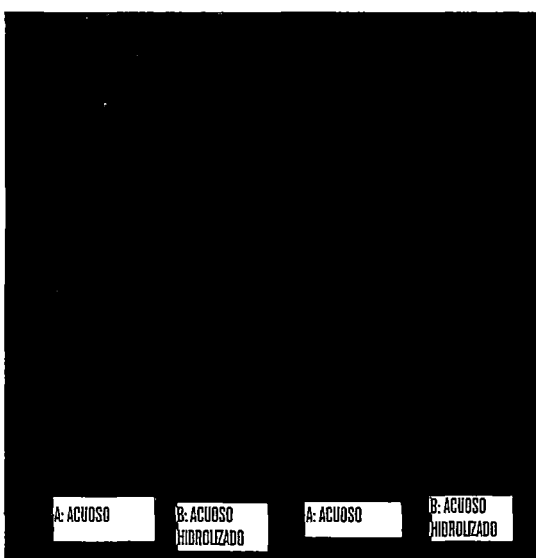


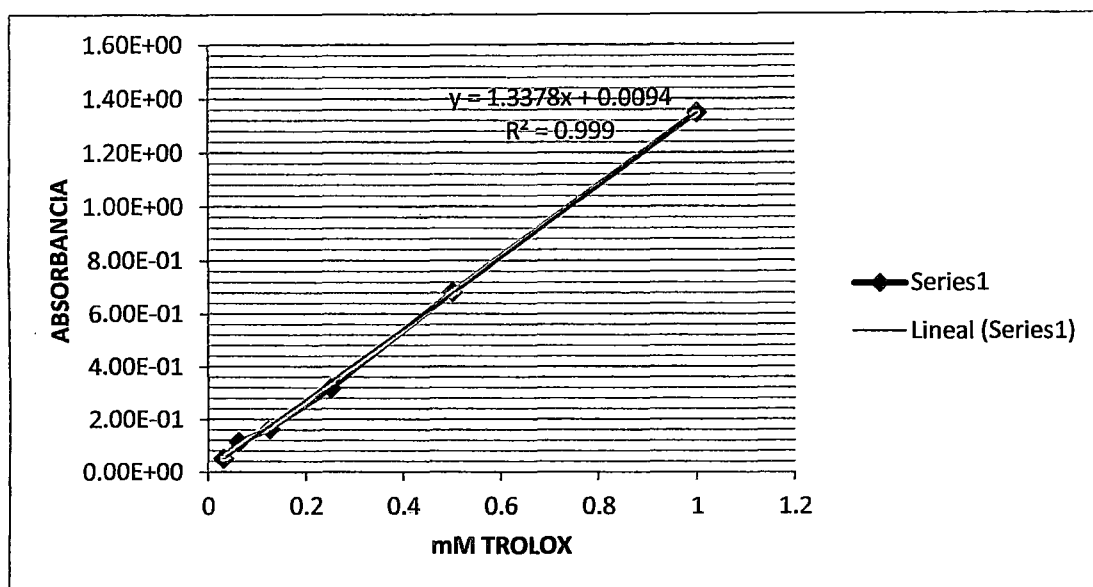
Figura N° 18. Se muestran los extractos sembrados por duplicado y se logra ver separaciones a un rango UV de 360nm (Izquierda) y a un rango de 254nm (Derecha). Se utilizó el sistema 9:1 (Dicloro: Metanol).

Cuadro N° 04. Valores de lectura de la solución estándar de Trolox a diferentes concentraciones para el método FRAP

Concentración Trolox	Absorbancia Inicial	Absorbancia Final después de 6 min	Absorbancia Corregida
1 mM	0.182	1.538	1.36E+00
	0.211	1.554	1.34E+00
	0.184	1.534	1.35E+00
0.5 mM	0.166	0.849	6.83E-01
	0.187	0.872	6.85E-01
	0.168	0.854	6.86E-01
0.25 mM	0.193	0.514	3.21E-01
	0.200	0.52	3.20E-01
	0.196	0.516	3.20E-01
0.125 mM	0.169	0.338	1.69E-01
	0.188	0.35	1.62E-01
	0.172	0.341	1.69E-01
0.0625 mM	0.186	0.305	1.19E-01
	0.200	0.31	1.10E-01
	0.188	0.308	1.20E-01
0.03125 mM	0.167	0.219	5.20E-02
	0.188	0.239	5.10E-02
	0.199	0.254	5.50E-02

Cuadro N° 05. Curva de calibración de Trolox –Método FRAP

Concentración Trolox Mm	Absorbancia	SD	CV%
0.03125	5.27E-02	0.002081666	3.95
0.0625	1.16E-01	0.005507571	4.73
0.125	1.67E-01	0.004041452	2.42
0.25	3.20E-01	0.00057735	0.18
0.5	6.85E-01	0.001527525	0.22
1	1.35E+00	0.006506407	0.48



Gráfica N° 01: Curva de calibración – Método FRAP

Cuadro N° 06. Resultados de la actividad antioxidante por el Método FRAP en los extractos de diferente polaridad de las hojas de *Chromolaena laevigata*

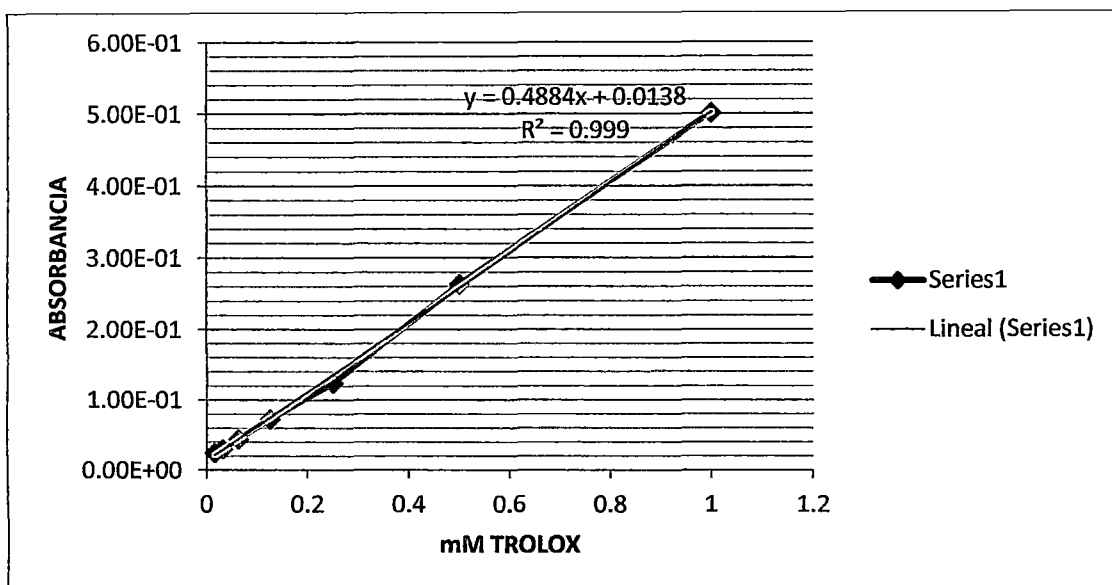
EXTRACTO	Concentración Dilución	Absorbancia Inicial	Absorbancia Final después de 6 min	Abasorbancia corregida	Actividad antioxidante eq Mm Trolox
Acuoso	0.375 mg/mL	0.255	1.060	0.805	0.603
		0.26	1.076	0.816	
		0.270	1.096	0.826	
Acuoso Hidrolizado	0.375 mg/mL	0.241	0.471	0.23	0.155
		0.25	0.467	0.217	
		0.259	0.462	0.203	
Diclorometano	0.75 mg/mL	0.291	0.408	0.117	0.088
		0.28	0.41	0.13	
		0.287	0.421	0.134	
Etéreo	0.75 mg/mL	0.256	0.308	0.052	0.032
		0.265	0.317	0.052	
		0.296	0.348	0.052	

Cuadro N° 07. Valores de lectura de las soluciones estándares de Trolox a diferentes concentraciones para el Método ABTS*

Concentración Trolox	Absorbancia Inicial	Absorbancia Final después de 4 min	Absorbancia Corregida
1 mM	0.892	0.381	5.11E-01
	0.914	0.421	4.93E-01
	0.891	0.388	5.03E-01
0.5 mM	0.914	0.65	2.64E-01
	0.910	0.643	2.67E-01
	0.912	0.65	2.62E-01
0.25 mM	0.878	0.756	1.22E-01
	0.904	0.774	1.30E-01
	0.880	0.758	1.22E-01
0.125 mM	0.913	0.835	7.80E-02
	0.894	0.825	6.90E-02
	0.89	0.816	7.40E-02
0.0625 mM	0.875	0.829	4.60E-02
	0.886	0.842	4.40E-02
	0.877	0.832	4.50E-02
0.03125 mM	0.895	0.861	3.40E-02
	0.886	0.858	2.80E-02
	0.893	0.862	3.10E-02
0.01562 mM	0.864	0.837	2.70E-02
	0.887	0.863	2.40E-02
	0.867	0.842	2.50E-02

Cuadro N° 08. Curva de calibración de Trolox –Método ABTS

Concentración Trolox mM	Absorbancia	SD	CV%
0.01562	2.53E-02	0.001527525	6.03
0.03125	3.10E-02	0.003	6.68
0.0625	4.50E-02	0.001	2.22
0.125	7.37E-02	0.00450925	6.12
0.25	1.25E-01	0.004618802	3.7
0.5	2.64E-01	0.002516611	0.95
1	5.02E-01	0.0090185	1.8



Gráfica N°02: Curva de calibración - Método ABTS

Cuadro N° 09. Resultados de la actividad antioxidante por el Método ABTS en los extractos de diferente polaridad de las hojas de *Chromolaena laevigata*

EXTRACTO	Concentración Dilución	Absorbancia Inicial	Absorbancia Final después de 6 min	Absorbancia Corregida	Actividad antioxidante eq Mm Trolox
Acuoso	0.375mg/mL	0.925	0.569	0.356	0.718
		0.93	0.570	0.36	
		0.937	0.559	0.378	
Acuoso Hidrolizado	0.375 mg/mL	0.932	0.857	0.075	0.112
		0.937	0.875	0.062	
		0.934	0.865	0.069	
Diclorometano	0.75 mg/mL	0.914	0.874	0.04	0.044
		0.901	0.869	0.032	
		0.906	0.872	0.034	
Etéreo	0.75 mg/mL	0.941	0.878	0.063	0.110
		0.928	0.859	0.069	
		0.924	0.853	0.071	

Cuadro N° 10. Resultados de la actividad broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad de las hojas de *Chromolaena laevigata* en tráquea aislada de cobayo al inducir broncoconstricción con Histamina

Grupo Experimental	Concentración	Concentración final en solución de KREBS	n	Porcentaje de relajación Promedio ± D.E.		
Vehiculo			3	0		
Acuoso	150 mg/mL	0.6 mg/mL	3	21.0	± 7.2	
Acuoso	300 mg/mL	1.2 mg/mL	3	37.6	± 9.0	a
Acuoso Hidrolizado	150 mg/mL	0.6 mg/mL	3	11.1	± 1.8	b
Acuoso Hidrolizado	300 mg/mL	1.2 mg/mL	3	22.4	± 3.3	
Diclorometano	150 mg/mL	0.6 mg/mL	3	12.0	± 0.4	b
Diclorometano	300 mg/mL	1.2 mg/mL	3	17.4	± 3.5	
Étereo	150 mg/mL	0.6 mg/mL	3	4.2	± 3.6	b
Étereo	300 mg/mL	1.2 mg/mL	3	16.3	± 3.3	
Adrenalina	1 mg/mL	0.004 mg/mL	3	94.6	± 5.6	a

a posee diferencia significativa con respecto al vehiculo Test de Dunn ($p < 0,05$)

b posee diferencia significativa con respecto al control positivo Test de Dunn ($p < 0,05$)

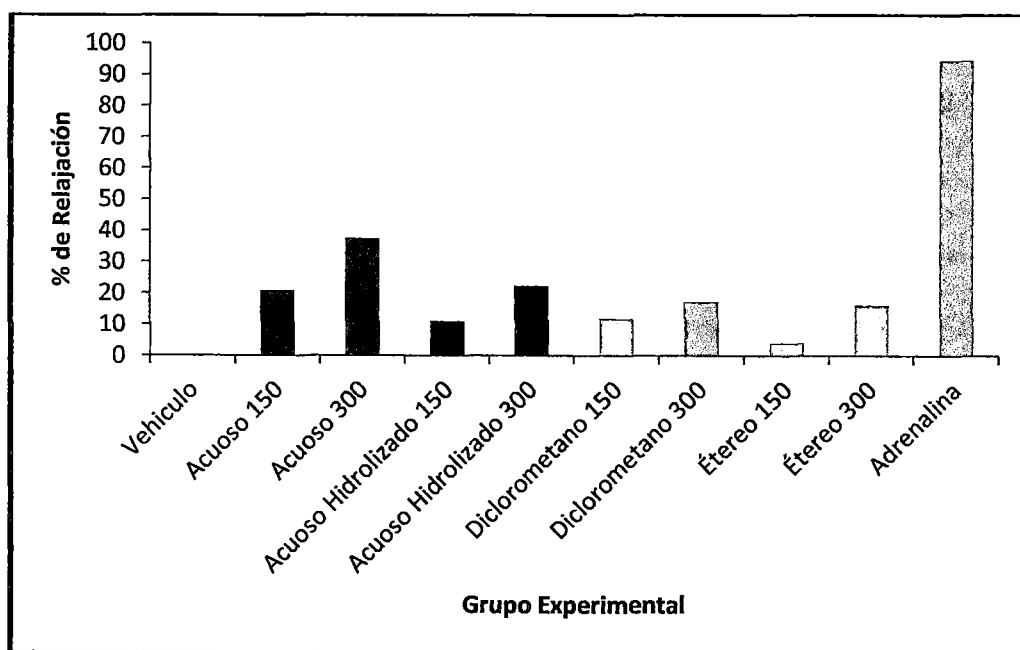


Gráfico N° 03: % De relajación frente a Histamina

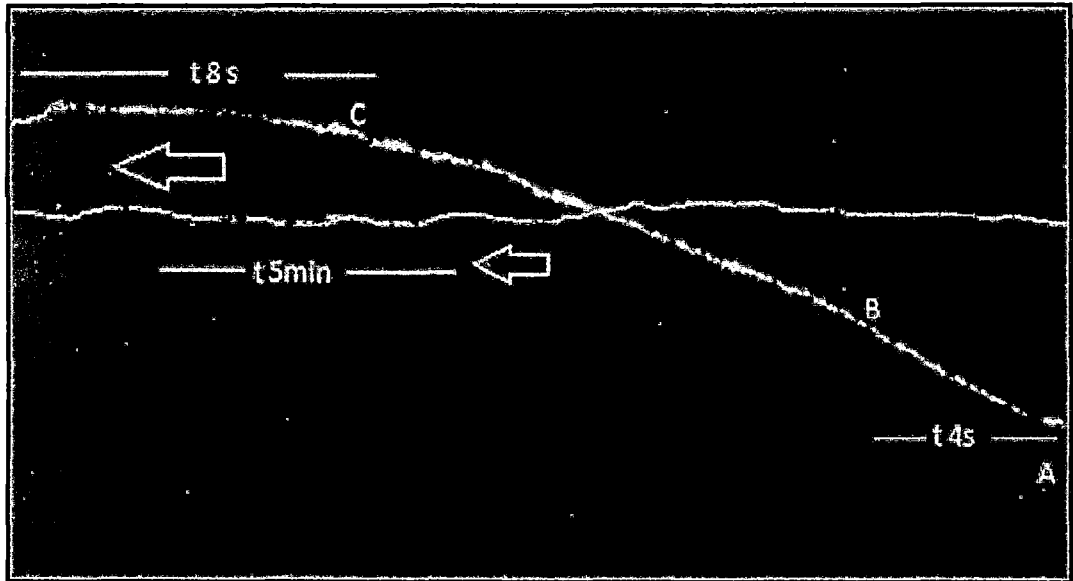


Figura N° 19: Contracción – relajación del músculo liso frente a la Histamina, donde:

- A: Estado basal del músculo liso traqueal.
- B: Contracción ejercida por la Histamina al 01%
- C: Adición del Extracto acuoso 1,2 mg/mL

Cuadro N° 11. Resultados de la actividad broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad de las hojas de *Chromolaena laevigata* en tráquea aislada de cobayo al inducir broncoconstricción con Acetilcolina.

Grupo Experimental	Concentración	Concentración final en solución de KREBS	n	Porcentaje de relajación		
				Promedio	± D.E.	
Vehiculo			3	0		
Acuoso 150	150 mg/mL	0.6 mg/mL	3	67.6	± 6.6	a
Acuoso 300	300 mg/mL	1.2 mg/mL	3	125.6	± 3.7	a
Acuoso Hidrolizado 150	150 mg/mL	0.6 mg/mL	3	35.1	± 8.1	
Acuoso Hidrolizado 300	300 mg/mL	1.2 mg/mL	3	50.0	± 3.8	
Diclorometano 150	150 mg/mL	0.6 mg/mL	3	14.7	± 0.6	b
Diclorometano 300	300 mg/mL	1.2 mg/mL	3	23.2	± 3.3	
Étereo 150	150 mg/mL	0.6 mg/mL	3	14.3	± 0.6	b
Étereo 300	300 mg/mL	1.2 mg/mL	3	14.3	± 1.0	b
Adrenalina	1 mg/mL	0.004 mg/mL	3	138.7	± 10.6	a

a posee diferencia significativa con respecto al vehiculo Test de Dunn ($p < 0,05$)

b posee diferencia significativa con respecto al control positivo Test de Dunn ($p < 0,05$)

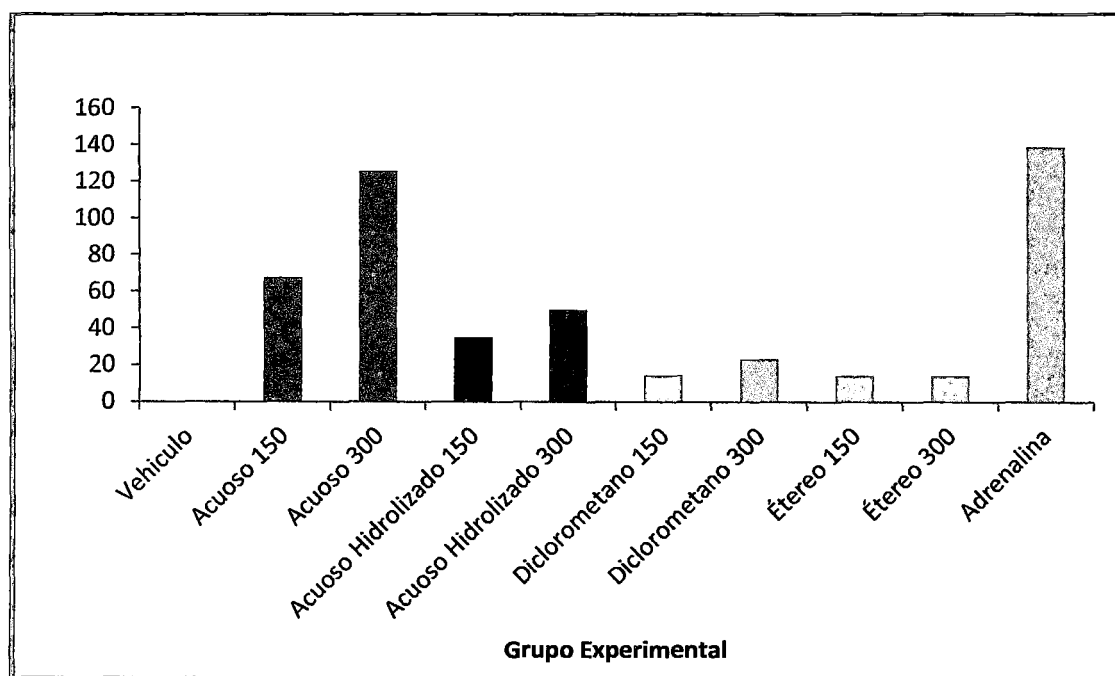


Gráfico N° 04: % De relajación frente a acetilcolina

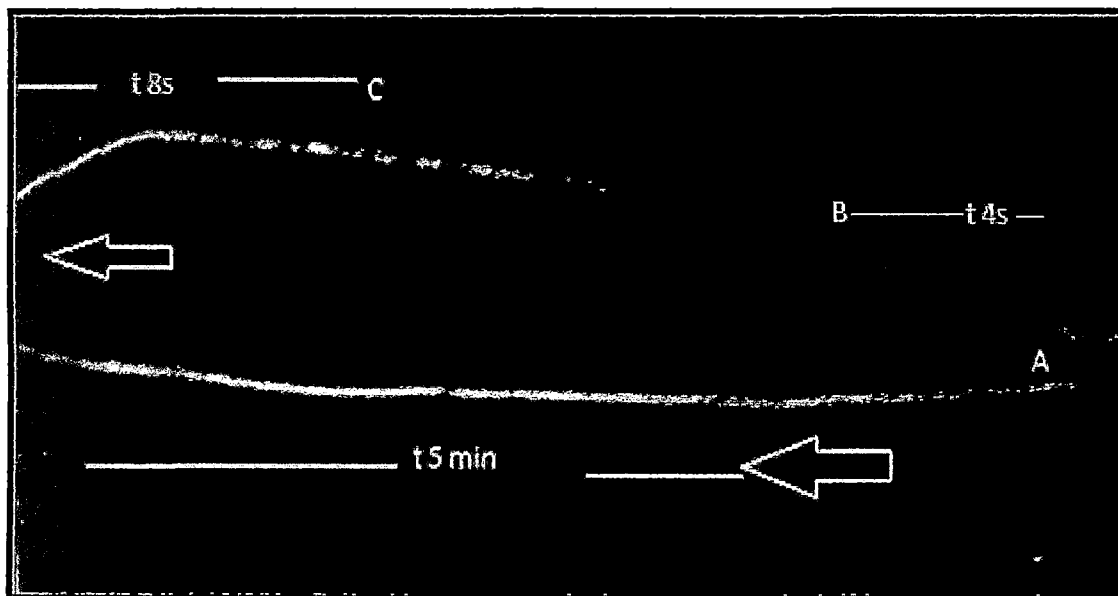


Figura N° 20: Contracción – relajación del músculo liso frente a la Acetilcolina, donde:

- A: Estado basal del músculo liso traqueal.
- B: Contracción ejercida por la Acetilcolina al 01%
- C: Adición de Extracto acuoso 1,2 mg/mL

IV. DISCUSIÓN

Como resultado de la identificación de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico y extractos de diferente polaridad en la especie *Chromolaena laevigata*, se confirmaron la presencia de alcaloides, triterpenos, grupos fenólicos libres, catequinas, saponinas y flavonoides, resaltando que los grupos fenólicos libres y los flavonoides se encuentran en todos los extractos. Estos resultados corroboran los metabolitos encontrados en otros estudios de la misma especie. (Flores et al., 2007⁹; Arias et al., 2012)³⁰

La presencia de flavonoides en extractos lipófilos como éter de petróleo, estaría justificada por el alto grado de metoxilación de estos compuestos y la predominancia de estructuras de tipo flavanona.

Los flavonoides son compuestos a los que se les han atribuido diversas acciones y que tienen características de agentes antioxidantes (Calixto et al., 2003)³¹. Los Flavonoides secuestran al radical superóxido (O_2^-) y al radical hidroxilo (OH^\cdot)^{3,4} e inhiben también los efectos degradativos provocados por el H_2O_2 ³²; así mismo son bien conocidas sus actividades como, dilatadores de las coronarias³³, diurética³⁴, antibacteriana⁷, antimicótica³⁰, antiasmática³² entre otros. Entre las enfermedades pulmonares en que se ha demostrado la participación de EROS, destacan SIRPA, EPOC y Asma, estos oxidantes pueden tener efectos en varias células blanco del tracto respiratorio y potenciar la inflamación¹⁸

En el desarrollo cromatográfico podemos apreciar que los extractos están constituidos por diferentes compuestos (manchas), y que según sus Rf determinados algunos de ellos se distribuyen simultáneamente en más de un extracto.

En el presente estudio se ha demostrado la actividad antioxidante de los extractos de diferente polaridad por el método FRAP, cuyo mecanismo de acción está basado en la transferencia de electrón simple (SET) y por el método ABTS, cuyo mecanismo de acción está basado en la transferencia de electrón Simple (SET) y la transferencia de átomos de hidrogeno (HAT), resultando que los extractos, etéreo, diclorometano, acuoso y acuoso hidrolizado presentaron actividad antioxidante siendo el más activo el extracto acuoso a 0.375 mg/mL con una actividad equivalente a 0,718 mM de trolox por el método ABTS; sin embargo podemos considerar que el mecanismo de acción predominante en los compuestos presentes en los diferentes extractos es el SET, puesto que no existe gran diferencia entre los valores hallados por ambos métodos (acuoso: FRAP

0.608, ABTS 0.718; Hidrolizado: FRAP 0.155, ABTS 0.112; Diclorometano: FRAP 0.088, ABTS 0.044), por otro lado suponemos que la baja actividad antioxidante en los extractos etéreos que presentan grupos flavonoides podrían ser debido a su metilación ya que como es sabido este proceso disminuye la actividad antioxidante (Chen et al., 2002)³⁵

Si bien es cierto no hemos encontrado referencias de estudios de actividad broncodilatadora de esta especie, en la evaluación de la actividad broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad por el método de la cadena traqueal aislada de cobayo, el efecto de broncoconstricción en el músculo liso inducido por acetilcolina 0.1% disminuyó con el extracto acuoso 300mg/mL siendo el más activo con porcentaje de relajación de 125.6 % \pm 3.7 ($p < 0.05$), cuyo valor se asemeja al control positivo Adrenalina 1mg/1mL con 138.7 %; mientras que cuando la broncoconstricción fue con histamina, los valores fueron muy diferenciados, el extracto acuoso 300 mg/mL presentó 37.6 % de relajación frente a la adrenalina cuyo porcentaje de relajación fue 94,6%, esto nos permite asumir que los mecanismos de acción de broncodilatación, frente a constricción inducida por acetilcolina, por los cuales actúan los metabolitos presentes en esta especie y principalmente en el extracto acuoso serían semejantes a la adrenalina. A partir de los resultados obtenidos y de acuerdo al tamizaje fitoquímico, se podría establecer que los metabolitos (grupos fenólicos libres, flavonoides, catequinas) presentes en el extracto acuoso serían los responsables de la actividad antioxidante y broncodilatadora.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio de la especie *Chromolaena laevigata*, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1.- Los extractos de diferente polaridad presentan alcaloides, triterpenos y/o esteroides, grupos fenólicos libres, catequinas y flavonoides. Resaltando que todos los extractos sin excepción presentan flavonoides.

2.- En la CCF se observaron que los diferentes extractos presentan de 3 a 7 compuestos según las fases utilizadas.

3.- Todos los extractos de diferente polaridad presentan actividad antioxidante por el método FRAP y ABTS, siendo más activo el extracto acuoso en ambos métodos.

4.- En el ensayo de la actividad broncodilatadora por el método de la cadena traqueal aislada de cobayo, el extracto acuoso 300mg/mL resultó más activo cuyo porcentaje de relajación fue de $125.6 \% \pm 3.7$ frente a la acetilcolina, el cual se confirma estadísticamente con una diferencia significativa entre los grupos de trabajo ($p < 0.05$).

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estrés Oxidativo [base de datos en internet]. Argentina: Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral; 2009 - [acceso 18 de febrero del 2013]. Estrés Oxidativo; [4página]. Disponible en: <http://www.biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem%20estres%20oxidativo.pdf>
2. Algunas enfermedades asociadas al estrés oxidativo [base de datos en internet]. Huelva: Departamento de Biología Ambiental y Salud Publica; [acceso 18 de febrero del 2013]. Algunas enfermedades asociadas al estrés oxidativo; [3página]. Disponible en: <http://www.uhu.es/francisco.cordoba/asignaturas/postgrado/estres/doc/estres.pdf>
3. Chacaltana P, Vasquez J. Evaluación de la Actividad Antioxidante de los Flavonoides Presentes en las hojas de *Polimnia lehmanii* “Llaretá” [Tesis]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2010.
4. Vega R N. Caracterización de compuestos fenólicos en plantas medicinales tradicionales: *Cheilanthes pruinata* “cuti-cuti”. Evaluación de su actividad antioxidante [Tesis magister]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2013.
5. Céspedes Miranda Ela M, Hernández Lantigua Ingrid, Llopiz Janer Niurka. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. Rev Cubana Invest Bioméd. 1996; 15(2):
6. Osorio E. Aspectos Básicos de Farmacognosia. Medellín: Edison Osorio Durango, Editor; 2009.
7. Flores M, D' Armas H, Estaba A, Méndez B. Identificación de un Flavonoide aislado de las hojas de *Chromolaena laevigata*. Parte I. Ciencia. 2006; 14(2):244-252.
8. Universidad de Panamá Herbario *Chromolaena laevigata* (Lam) R.M. KING & H. Rob. [Homepage en internet]. Panamá: Universidad de Panamá; c2013 - [actualizada 20 de febrero del 2013; consultado 20 de febrero del 2013]. Disponible en: <http://herbario.up.ac.pa/Herbario/herb/vasculares/view/species/545>
9. Flores M, D' Armas H, Herrera H. Identificación de algunos constituyentes químicos de las hojas de *Chromolaena laevigata* mediante cromatografía de gas-espectrometría de masas. Parte II. Ciencia. 2007; 15(3):421-432.
10. Espitia C. Química del Género *Chromolaena* (Compositae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 1994; 19(72):141-145.

11. Martínez A. Valencia G. Jiménez N. Mesa M. Galeando E. Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica. Medellín: Martínez A. Valencia G. Jiménez N. Mesa M. Editor; 2008.
12. Skoog D, Holler F, Nieman T. Principios de análisis Instrumental. 5^{ta} ed. España: Mc Graw Hill; 2001.
13. Hostettmann, Kurt, Gupta Mahabir., Marston Andrew., Ferreyra Queiroz, Emerson. Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos . Secretaria Ejecutiva de la Organización del Convenio Andres Bello (SECAB). 2008- Colombia.
14. Sharapin, Nikolai. Fundamentos de Tecnología de Productos fitoterapeúticos . Secretaria Ejecutiva de la Organización del Convenio Andres Bello (SECAB). 2000- Colombia.
15. Rodríguez J, Menéndez J, López J. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. Rev Cubana Med Milit. 2001; 30(1):36-44.
16. Radical (Química). [Homepage en internet]. Perú: Wikipedia, la enciclopedia libre; c2013 - [actualizada 20 de Febrero del 2013; consultado 10 de Marzo del 2013]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/w/index.php?oldid=72544043>
17. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cub Med Mil. 2002; 31(2): 126-133.
18. Sierra M, Guzmán A, Olivares I, Torres Y, Hicks J. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 2004; 17(2): 135-145.
19. Antioxidante. [Homepage en internet]. Perú: Wikipedia, la enciclopedia libre; c2013 - [actualizada 15 de Abril del 2013; consultado 22 de Abril del 2013]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/w/index.php?oldid=72149729>
20. Montero M. Los Radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. Anales de Facultad de Medicina. UNMSM. 1996; 57(4):
21. Antioxidante Portal antioxidante prime portal de antioxidante, alimento y salud en el mundo de habla hispana [Homepage en internet]. Chile: Instituto de nutrición y tecnología de los alimentos (INTA); c2014 [actualizada 16 febrero 2014; consultado 16 de febrero 2014]. Disponible en: <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes/>

22. García A, Periago M, Vidal M, Cantos E. Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de Uva y Frutas Rojas. *An. Vet.(Murcia)*. 2002; 18: 103-114.
23. Guyton C. A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 11a ed. Madrid: Mc Graw Hill, 2011.
24. Goodman y Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 11a ed. España: Mc Graw Hill; 2011.
25. Reina J, Abad F, Gallego S, Gálvez M. Regulación del tono bronquial en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (epoc): papel de los receptores muscarínicos. *Anales de Medicina Humana*. 2003; 20(4): 201- 205.
26. Flores J. Farmacología Humana. 3a Ed. Barcelona: Masson S.A; 1997
27. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancia medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 2000.
28. Lock O. Investigación fitoquímica – Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Fondo editorial PUCP Lima – Perú; 1994.
29. Perry W. Pharmacological experiments on isolated preparation. Edinburgh and London: E & S Livingstone Ltd; 1968.
30. Arias F. Caracterización físico – química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de una especie Asteraceae (*Chromolaena laevigata*) de la Provincia de Loja [Tesis]. Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2012.
31. Calixto J. B., Otuki M. F., Santos A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. *Planta Med*; 2003.69, 973-983.
32. Pérez G. Flavonoide: Antioxidantes o Prooxidantes. *Rev. Acad. Cubana Invest. Biomed*. 2003; 22(1):48-57.
33. Martínez A. Flavonoides. Medellín: Martínez A. Editor; 2005.
34. Lock O. Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. En: Villar M, Villavicencio O, editores. Manual de Fitoterapia. Lima: Es Salud, Organización Panamericana de la Salud; 2001. p. 41-64.
35. Chen J, Zhu Z, Hu T, Zhu D. Structure activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects. *Acta Pharmacologica*. 2002; 23(7): 667-72.

CERTIFICACION DE APROBACIÓN

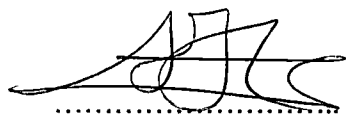
Los asesores: **Dr. Felipe Surco Laos, Dra. Haydee Chávez Orellana, Mg. Ernesto Torres Veliz**, Docentes de las Cátedras de Análisis Instrumental, Química Orgánica y Farmacología respectivamente.

Certificamos:

Haber dirigido el trabajo de investigación para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, titulado: **Actividad antioxidante y Broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de las hojas de la especie *Chromolaena laevigata* (Lam) R.M. KING & H. Rob. "Chimchis".**

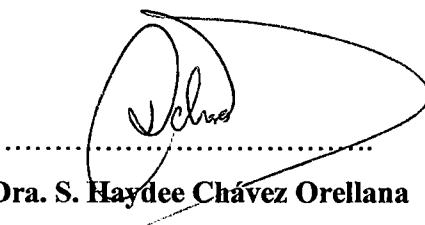
Presentado por los Bachilleres: **PÉREZ LUME OLIVIA y FÉLIX MEDINA PEDRO PABLO**, el mismo que ha sido revisado durante su ejecución, se ajusta a los requisitos legales exigidos por la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por lo tanto autorizamos su presentación.

Ica, 25 de julio del 2014




Dr. Felipe Surco Laos

Asesor de Tesis



Dra. S. Haydee Chávez Orellana

Asesora de Tesis



Mg. Ernesto Torres Veliz

Asesor de Tesis