



**UNAP**



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**TESIS**

**ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA *in vitro* DE CORTEZA DE *Maytenus macrocarpa* (RUIZ & PAV.) Briq. Y HOJAS DE *Justicia spicigera* Schltdl SOBRE ERITROCITOS PLASMÁTICOS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**LESLY FERNANDA RENGIFO LINARI**

**ASESORES:**

**Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES, Mtro.  
Ing. DORA ENITH GARCÍA DE SOTERO, Dra.**

**IQUITOS, PERÚ  
2022**

# ACTA DE SUSTENTACIÓN



Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Escuela Profesional de Facultad de Farmacia y Bioquímica

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N°017-PCGT-FFyB-UNAP-2022/OFICIO N°568-DINV-UNAP-2021

En la ciudad de Iquitos, Distrito de Iquitos, Departamento de Loreto, por vía Zoom de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, a los 04 días del mes de marzo de 2022, a horas 20:00, se dio inicio a la sustentación pública de Tesis titulada "ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA *In vitro* DE CORTEZA DE *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. Y HOJAS DE *Justicia spicigera* Schldtl SOBRE ERITROCITOS PLASMÁTICOS", aprobado con Resolución Decanal N°058-2022-FFyB-UNAP, presentada por la bachiller: Lesly Fernanda Rengifo Linari, para optar el Título Profesional de Química Farmacéutica que otorga la Universidad de acuerdo con Ley y Estatuto.

El jurado calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N°227-2021-FFyB-UNAP, está integrada por:

- |   |            |
|---|------------|
| - Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUÍZ, Mtra.                | Presidente |
| - Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRÍGUEZ, Dra. | Miembro    |
| - Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO.           | Miembro    |


Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: adecuadamente



El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:


La sustentación pública de la tesis ha sido aprobada con la calificación Buena


Estando el bachiller apta para obtener el Título Profesional de Química Farmacéutica.

Siendo las 21:40 se dio por terminado el acto académico

  
Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUÍZ, Mtra.  
Presidente

  
Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRÍGUEZ, Dra.   
Miembro Miembro

  
Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES, Mtro.  
Asesor


  
Ing. DORA ENITH GARCÍA DE SOTERO, Dra.  
Asesora

Carretera Zungarococha – Nina Rumi  
Correo electrónico: farmacia  
San Juan – Loreto – Perú. Celular N°942917936  
www.unapiquitos.edu.perú

UNIVERSIDAD  
**LICENCIADA**  
RESOLUCIÓN N°012-2019-SUNEDU/CD

Lima, 1 de febrero de 2019

## JURADO Y ASESORES




---

Q.F. Brenda Soraya Urday Ruíz, Mtra  
CQFP N° 09575  
Presidenta



---

Q.F. Rosa del Carmen Miluska Vargas Rodríguez, Dra.  
CQFP N° 13391  
Miembro



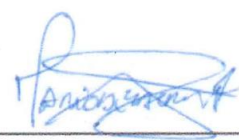
---

Q.F. Wilfredo Oswaldo Gutiérrez Alvarado  
CQFP N° 01399  
Miembro



---

Ing. Dora Enith García de Sotero, Dra  
CIP N° 21090  
Asesora



---

Q.F. Mario Javier De la Cruz Flores, Mtro  
CQFP N° 13374  
Asesor

## **DEDICATORIA**

A mis queridos padres Whamer y Ruth por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ellos, me forjaron con reglas y algunas libertades y me motivaron constantemente para alcanzar mi meta.

A mi abuelita Isabel, hermanos y demás familiares por el apoyo que siempre me brindaron.

A mis asesores ING. Dora Enith García de Sotero, Dra. y Q.F. Mario Javier De la Cruz, Mtro. por haberme brindado la oportunidad de recurrir a sus capacidades y conocimientos científicos; y, haber tenido toda la paciencia del mundo para guiarme duramente en el desarrollo de mi tesis.

***Lesly Fernanda***

## **AGRADECIMIENTO**

A la UNAP, que me dio la bienvenida al mundo como tal, las oportunidades que me ha brindado son incomparables.

A mis maestros, mis compañeros de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por todos los copiosos conocimientos que me han otorgado.

A Dios, al que en todo momento está conmigo, ayudándome a aprender de mis errores y a no cometerlos otra vez. Eres quien guía mi destino de vida. Te lo agradezco padre celestial.

## ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Páginas
<i>ACTA DE SUSTENTACIÓN</i>	<i>ii</i>
<i>JURADO Y ASESORES</i>	<i>iii</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>iv</i>
<i>AGRADECIMIENTO</i>	<i>v</i>
<b>ÍNDICE DEL CONTENIDO</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<i>RESUMEN</i>	<i>ix</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>x</i>
INTRODUCCIÓN	1
<b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
1.1. Antecedentes	3
1.2. Bases teóricas	4
Distribución:	4
Características climáticas	6
1.3. Definición de términos básicos	12
<b>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES</b>	<b>13</b>
2.1. Formulación de hipótesis	13
2.2. Variables y su operacionalización	13
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b>	<b>15</b>
3.1 Tipo y diseño	15
3.2 Diseño muestral	15
3.3. Procedimientos de recolección de datos	16
3.4. Procesamiento y análisis de la información	18
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN</b>	<b>32</b>
ANEXOS	36
Anexo 1. Constancia de certificación de la especie vegetal	36

<b>Anexo 2. Preparación de Buffer fosfato</b>	<b>37</b>
<b>Anexo 3. Tubos de ensayo con muestra problema</b>	<b>37</b>
<b>Anexo 4. Hoja de reporte analítico</b>	<b>38</b>
<b>Anexo 5. Formato Consentimiento informado</b>	<b>39</b>
<b>HOJA DE INFORMACIÓN</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descriptivos de los grupos de estudio – porcentaje de inhibición	<b>24</b>
<b>Tabla 2.</b> Prueba de normalidad de los datos según grupo de estudio – porcentaje de inhibición	<b>24</b>
<b>Tabla 3.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas – porcentaje de inhibición	<b>25</b>
<b>Tabla 4.</b> Análisis de varianza de grupos de estudio - porcentaje de inhibición	<b>25</b>
<b>Tabla 5.</b> Comparaciones múltiples entre los grupos - porcentaje de inhibición	<b>26</b>
<b>Tabla 6.</b> Tabla de subgrupos homogéneos del procedimiento ANOVA de un factor - porcentaje de inhibición	<b>27</b>
<b>Tabla 7.</b> Cálculo $IC_{50}$ a partir de la ecuación obtenida con su respectivo $R^2$	<b>27</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Corteza de <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq	5
<b>Figura 2.</b> Composición de la sangre	7
<b>Figura 3.</b> Molécula normal de hemoglobina (HbA)	8
<b>Figura 4.</b> Porcentajes de estabilidad de la membrana por el extracto de corteza de <i>M. macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	20
<b>Figura 5.</b> Porcentajes de estabilidad de la membrana por el extracto de hojas de <i>Justicia spicigera</i> Schltl “insulina”	21
<b>Figura 6.</b> Porcentajes de estabilidad de la membrana por la hidrocortisona como fármaco de referencia	22
<b>Figura 7.</b> Porcentajes de protección de la membrana de glóbulos rojos entre los grupos de estudio por cada concentración evaluada	23



## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de extracto etanólico de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. "chuchuhuasi" y hojas de *Justicia spicigera* Schltld "insulina" por el método de estabilización de la membrana de glóbulos rojos, en concentraciones de 10, 100, 1000 y 4000 ug/mL de ambos extractos e hidrocortisona (fármaco de referencia) donde se utilizó CINA 0,9% como medio de dilución. Los resultados para *M. macrocarpa* fueron de 25,48% a concentración 10 ug/mL; 40,25% a 100 ug/mL; 62,64% a 1000 ug/mL y 64,46% a 4000 ug/mL; para *J. spicigera* un 20,12% a concentración 10 ug/mL; 33,56% a 100 ug/mL; 52,28% a 1000 ug/mL y 55,22% a 4000 ug/mL; mientras que Hidrocortisona un 29,38% a concentración 10 ug/mL; 44,56% a 100 ug/mL; 74,53% a 1000 ug/mL y 82,65% a 4000 ug/mL. Se encontró diferencias significativas entre los promedios de porcentajes de protección y concentraciones en todos los grupos evaluados. Los valores de  $IC_{50}=325,06$  ug para corteza *M. macrocarpa*, hojas de *J. spicigera* un  $IC_{50}=1201,91$  ug e  $IC_{50}=109,96$  ug para Hidrocortisona, permitieron concluir que esta última es la de mejor actividad antiinflamatoria *in vitro*.

**Palabras clave:** Actividad antiinflamatoria, *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. (chuchuhuasi), *Justicia spicigera* Schltld (insulina).

## ABSTRACT

The objective of this research work was to determine the *in vitro* anti-inflammatory activity of ethanolic extract from the bark of *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. "chuchuhuasi" and *Justicia spicigera* Schltld "insulin" leaves by the method of stabilization of the red blood cell membrane, in dilutions of 10, 100, 1000 and 4000 ug / mL of both extracts and hydrocortisone (reference drug) where it was used NaCl 0.9% as dilution medium. The results for *M. macrocarpa* were 25.48% at a concentration of 10 ug / mL; 40.25% at 100 ug / mL; 62.64% at 1000 ug / mL and 64.46% at 4000 ug / mL; for *J. spicigera* 20.12% at a concentration of 10 ug / mL; 33.56% at 100 ug / mL; 52.28% at 1000 ug / mL and 55.22% at 4000 ug / mL; while Hydrocortisone 29.38% at a concentration of 10 ug / mL; 44.56% at 100 ug / mL; 74.53% at 1000 ug / mL and 82.65% at 4000 ug / mL, significant differences were found between the averages of protection percentages and concentrations in all the groups evaluated. The values of  $IC_{50} = 325.06$  ug for *M. macrocarpa* bark, leaves of *J. spicigera*, an  $IC_{50} = 1201.91$  ug and  $IC_{50} = 109.96$  ug for Hydrocortisone, allowed to conclude that the latter is the one with the best anti-inflammatory activity *in vitro*.

Keywords: Anti-inflammatory activity, *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. (chuchuhuasi), *Justicia spicigera* Schltld (insulin).

## INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los 5 países megadiversos en el mundo, donde aproximadamente 1 400 especies vegetales son utilizadas con fines medicinales. Se conoce que dos terceras partes de la población mundial (4 000 millones de personas), recurren al uso de plantas con fines medicinales (según la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) a fin de resolver sus necesidades de atención primaria de salud (1,2).

En los procesos inflamatorios, se encuentran involucrados diferentes mediadores químicos, las mismas que pueden ser sintetizados por la vía de la ciclooxigenasa COX-1 y COX-2. En la primera, se expresa en forma constitutiva en casi todas las células y la COX-2 necesita ser inducida por estímulos inflamatorios, permitiendo así la producción de mediadores de la inflamación como la PGE2 (3).

Los denominados anti inflamatorios no esteroideos (AINES) que son utilizados en la actualidad, inhiben las actividades de COX-1, COX-2 o ambas enzimas (4). La inhibición de COX-1 lleva al desarrollo de efectos indeseables en el organismo como las gastropatías. Los inhibidores selectivos de COX-2 disminuyen la inflamación y son menos gastrolesivos; sin embargo, el uso prolongado de estos puede generar reacciones adversas indeseables como problemas cardiovasculares (5).

Las enfermedades de origen inflamatorio como: artritis, cáncer, aterosclerosis, obesidad, entre otras más, están consideradas como problemas de salud pública y tienen como origen el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico y, por tanto; la búsqueda de nuevas moléculas anti inflamatorias permitirá desarrollar nuevos medicamentos que puedan ser usados para el tratamiento de dichas enfermedades (6).

El estudio en cuanto a propiedades curativas de gran diversidad de plantas peruanas es aún incipiente, siendo mínimo aún el de las especies vegetales con potencial actividad antiinflamatoria. Es por esa razón, la importancia en el estudio

de *Maytenus macrocarpa* (chuchuhuasi), quien es muy requerida para los preparados alcohólicos, hidroalcohólicos o acuosos por sus bondades energizantes, vigorizantes y sobre todo como desinflamante y analgésico en las enfermedades reumáticas y resfríos. Asimismo, resalta la especie *Justicia spicigera* Schltdl en el tratamiento de diversas afecciones: curación de heridas, golpes y úlceras, enfermedades nerviosas, entre otras más (6).

Por lo tanto, con base en hallazgos realizados en plantas del género *Maytenus* y *Justicia*, es que en la presente investigación se evaluó la actividad anti inflamatoria de los extractos obtenidos de corteza de *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. “chuchuhuasi” y hojas de *J. spicigera* Schltdl “insulina”, como una alternativa potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de procesos inflamatorios agudos y/o crónicos.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

**Jiménez, L. et al.** (2020), indagaron las principales indicaciones, propiedades y formas de uso del chuchuhuasi referidas por diez curanderos de Santa María de Huachipa (Lima-Perú), a través de cuestionario, con participación registrada en videgrabaciones, luego transcritas; datos categorizados mediante pares y definidas por consenso. En sus resultados, las indicaciones más resaltantes fueron para problemas respiratorios (80%) y osteotendinosos; las principales formas farmacéuticas de consumo fueron el macerado, la pomada y la infusión. Concluyeron que presenta propiedades antiinflamatorias y afrodisíacas; y se reportó mareo (7).

**Zevallos Y.** (2020), evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de *Inga edulis* Mart. “guaba” y *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq “chuchuhuasi” por método de DPPH a concentraciones de 0,01; 0,05; 0,10; 0,25 y 0,50 mg/mL, la lectura lo realizó en espectrómetro UV/vis a 517 nm. Sus resultados para hojas de *I. edulis* Mart fueron  $IC_{50}=824,95$  mg y para fruto inmaduro  $IC_{50}=992040,21$  mg; corteza de *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq presentó  $IC_{50}=6613074,35$  mg. Concluyó que las hojas *I. edulis* Mart exhiben una mayor capacidad antioxidante (8).

**Pérez R. et al.** (2018), investigaron el efecto antiinflamatorio del procumbenósido B (PB) de *Justicia spicigera* sobre mediadores proinflamatorios, a partir del uso de macrófagos RAW264.7 estimulados con lipopolisacáridos (LPS) y un modelo de pez cebra para evaluar posibles efectos antiinflamatorios. En sus resultados, PB inhibió fuertemente la secreción de todos los mediadores proinflamatorios y aumentó la producción de IL-10 y el bloqueo de NF- $\kappa$ B; suprimió las especies de oxígeno reactivo y óxido nítrico. Concluyeron que los efectos antiinflamatorios de PB pueden atribuirse a la regulación a la baja de iNOS y COX-2 a través de la supresión de la vía de señalización NF- $\kappa$ B en macrófagos RAW264.7 (9).

**Valdivieso G.** (2016), evaluó el efecto abortivo potencial del extracto acuoso de *M. macrocarpa* “chuchuwasi” a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg sobre embriones

preimplantacionales de ratón de la cepa *Ibina swiss* Rockfeller, a quienes administraron extractos por vía intraperitoneal el primer y cuarto día de gestación, donde usaron el test de Micronucleo (MN) para conocer si el extracto era genotóxico. Concluyó que el extracto acuoso de *M. macrocarpa* no tiene un efecto sobre el desarrollo normal de los embriones (10).

**León A. et al.** (2014), exploraron la actividad analgésica central de hojas de *M. macrocarpa* en ratones, mediante el modelo de retirada de la cola. evaluaron dolor en el roedor, midiendo el promedio del período de latencia dentro de 6 mediciones a intervalos de 30 minutos. Como resultados chuchuhuasi a 1000 mg/kg presentó un basal de 2,781 segundos frente a 4,135 segundos a los 120 minutos; a 1500 mg/kg presentó un basal de 2,467 segundos frente a 4,385 segundos a los 180 minutos. Concluyeron que el efecto analgésico central de las hojas de *M. macrocarpa* no fue significativo a 1000 mg/kg (11).

## 1.2. Bases teóricas

### 1.2.1. Especies en estudio

A) *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq “chuchuhuasi”

#### Identificación taxonómica

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Celastrales
Familia	:	Celastraceae
Género	:	Maytenus
Especie	:	<i>M. macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq (12).

**Distribución:** se distribuye en la región subandina de la hoya del Amazonas en Colombia, Ecuador y Perú. En la frontera colombo – ecuatoriana se distribuye en alturas entre 300 y 400 m.s.n.m. (12).

**Sinonimias:** *Maytenus macrocarpa*, *M. ebenifolia*, *M. terapotensis*, *M. multiflora* (R.&P.) Loesener, *Celastrus macrocarpus* R.&P., *Haenkea macrocarpa* (R&P) Steudel.

**Nombres comunes:** chuchuhuasi, chuchuhuasha, chuchuguaza, chuchuhasca

**Hábitat:** la familia de las Celastráceas comprende alrededor de 800 especies, en tanto el género *Maytenus* está representado por 200 especies distribuidas en ambos hemisferios. Florece desde mediados de agosto hasta mediados de febrero; fructifica desde finales de septiembre hasta finales de marzo; presenta buena capacidad de rebrote; la regeneración natural es infrecuente en bosque primario y en bosque intervenido (13).

**Descripción botánica:** árbol caracterizado por presentar una altura entre 12-25 metros; tronco de 60 cm de diámetro con corteza de color rojizo y bien ramificado en su parte media superior. Fuste irregular. Copa abierta, ramificación densa, decurrente. Corteza (0.3-0.5 cm) externa café oscuro; corteza interna crema. Madera muy dura, pero “lechosa” (14).



Figura 1. Corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq

Fuente: Golden, Map (2005)

### **Etnofarmacología**

**Raíz:** el polvo de la raíz macerado en alcohol o aguardiente de caña se emplea como emenagogo y antirreumático. Por vía externa le atribuyen propiedades anticancerígenas, antiinfecciosas y antiulcerosas en piel (16).

**Hojas:** en cocimiento como antifebrífugas, los nativos las emplean para curar erupciones cutáneas. Mascándolas, son usadas para aliviar el dolor de estómago. En la medicina popular de Argentina son utilizadas como sialagogas, antiasmáticas y antisépticas (17). Preparando un té y bañándose con el tres

veces al día por nueve días, se usa para limpiar el interior del organismo de un recién nacido (18).

Corteza: el cocimiento se toma una copita en ayunas para tratar el reumatismo, disentería, artritis y como reconstituyente. Para las hemorroides, se hacen baños de asiento; para las afecciones de las mamas (una taza de corteza rallada cocinada en 200 mL de agua) el líquido se aplica en los pezones con grietas. La corteza cuando se machaca en agua y se bebe el zumo por 15 días, se usa para el tratamiento del cáncer (18). Para resfríos y bronquios, se raspan 200 g de corteza y se hierven en dos litros de agua por una hora, se cuela el líquido resultante y se coloca en una botella agregando un cuarto de litro de aguardiente, se deja macerar durante 10 días y se toma una cucharada en las mañanas por 15 días (19).

### **Características climáticas**

- Clima: tropical con abundante intensidad solar, temperaturas entre 22 y 27° C, precipitación pluvial entre 1000 a 3400 mm anuales.
- Suelo: crece en suelos arenosos, más que en francos y arcillosos.

Biotopo de poblaciones naturales: habita en áreas no inundables (suelos de altura), inundables anualmente o sólo en creciente alta, alejada o cerca de los cuerpos de agua, purmas y bosques primarios, con intensidad lumínica de intermedia a sombreada. Es resistente a la inundación.

B) *J. spicigera* Schltdl “insulina”

### **Identificación taxonómica**

Reino : Plantae  
División : Magnoliophyta  
Clase : Magnoliopsida  
Orden : Lamiales Bromhead.  
Familia : Acanthaceae Juss.  
Género : *Justicia*  
Especie : *J. spicigera* Schltdl (20)



**Sinonimias:** *Jacobinia spicigera* Schlec., *J. scarlatina* Blake, *Justicia atramentaria* Benth., *J. mohintli* Hemsley, *Sericographis mohintli* Nees (20).

**Descripción botánica:** planta nativa de México y Sudamérica que crece en clima cálido a templado (20).

**Usos tradicionales:** la decocción, la infusión y la tintura de sus hojas son usadas en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como anemia, gastritis, diarrea, disentería, bronquitis, anti inflamatorio, influenza, enfermedades de la piel y varios tipos de cáncer, especialmente cervicouterino y leucemia (20).

### 1.2.2. La sangre

Tiene la capacidad de coagular, asimismo está compuesta de plasma, en donde se encuentran células suspendidas muy especializadas, tales como:(21)

- a. Glóbulos rojos (eritrocitos)
- b. Plaquetas.
- c. Glóbulos blancos (leucocitos)

Sin excepción, todas las células sanguíneas se desarrollan de células tallo o células precursoras que se producen principalmente en la médula ósea. El plasma contiene sustancias químicas, proteínas, numerosas sustancias metabólicas y factores de coagulación (21).

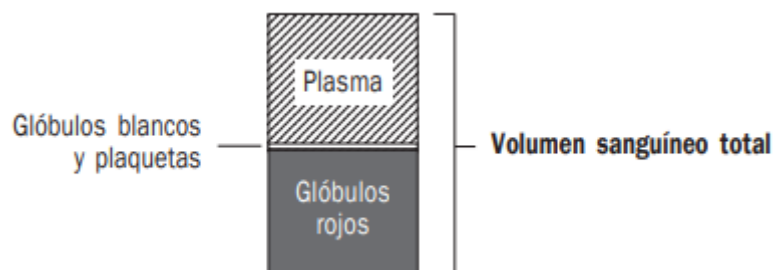


Figura 2. Composición de la sangre

### 1.2.3. Glóbulos rojos

Los eritrocitos o también llamados glóbulos rojos, son producidos en la médula ósea bajo el control de la hormona renal eritropoyetina. Después de su ingreso

al torrente sanguíneo, los glóbulos rojos presentan vida media de 120 días aproximados antes de ser retirados por el sistema retículo endotelial. Los glóbulos rojos son las células más numerosas en la sangre y ocupan aproximadamente el 45% del volumen sanguíneo total (21).

Los glóbulos rojos contienen pigmento rico en hierro (hemoglobina) cuya función primordial o primaria es de almacenar y/o transportar oxígeno. La hemoglobina está formada por cuatro subunidades y cada una de ellas está compuesta de un anillo férrico y rodeado de una cadena peptídica (Figura 3).

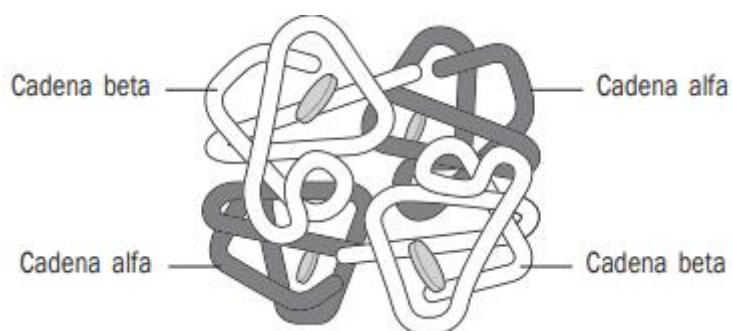


Figura 3. Molécula normal de hemoglobina (HbA)

En la hemoglobina normal de un adulto (HbA), dos de estas cadenas son del tipo alfa y dos son beta. Cada subunidad, puede unirse de manera reversible con una molécula de oxígeno. Cada molécula de hemoglobina puede combinarse con un máximo de cuatro moléculas de oxígeno. La hemoglobina, se mide en (g/dl) o (g/100 ml) de sangre. En adultos del sexo masculino el nivel es de 14 g/dl y en mujeres de 13 g/dl (21).

#### **1.2.4. Actividad antiinflamatoria**

Es la capacidad que pueden presentar ciertas especies vegetales de disminuir inflamación; y, esta en los últimos años despertó un gran interés científico en el área farmacológica, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos naturales de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios (21).

### 1.2.5. Métodos para medición de actividad antiinflamatoria *in vitro*

#### a) Desnaturalización de proteínas

La mezcla de reacción (5 mL) consiste en 0,2 mL de albúmina de huevo (de huevo de gallina fresco); 2,8 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 6,4) y 2 mL de concentraciones variables de las muestras, de modo que las concentraciones finales se convierten en 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 ug/mL. Un volumen similar de agua bidestilada sirve como control. A continuación, las mezclas se incuban a  $37 \pm 2$  °C por 15 minutos y después se calienta a 70 °C durante cinco minutos. Después se deja enfriar, se mide su absorbancia a 660 nm, mediante el uso del vehículo como blanco. Se utiliza Diclofenaco sódico, en las concentraciones de (78,125; 156,25; 312,50; 625,00; 1,250; 2,500 ug/mL) como fármaco de referencia y tratados de manera similar para la determinación de la absorbancia (22). El porcentaje de inhibición de desnaturalización de la proteína se calcula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times \frac{[Vt - Vc]}{Vt}$$

Donde: Vt = absorbancia de la muestra, Vc = absorbancia del control.

La concentración del extracto para 50% de inhibición (IC<sub>50</sub>) se determina por la curva de dosis-respuesta.

#### b) Estabilización de la membrana de glóbulos rojos de sangre humana

La mezcla a ensayar contiene 0,5 mL del extracto etanólico de las especies a investigar a diferentes concentraciones, con 1 mL de Buffer fosfato (0,15 M pH=7,4), 2 mL de solución hiposalina (0,36%) y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos. Se puede usar hidrocortisona como fármaco de referencia en la evaluación de actividad. A otro tubo se agrega 2 mL de solución hiposalina, con 1 mL de Buffer fosfato (0,15M pH=7,4) y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos, el cual debe ser considerado como el estándar. Todos los tubos se incuban a temperatura ambiente por 10 min y son centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. La hemoglobina contenida en la solución sobrenadante debe ser valorada en el espectrofotómetro a 540 nm.

- c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en macrófagos diferenciados de monocitos THP-1 y estimulados con lipopolisacárido (LPS).

#### Actividad antiinflamatoria en monocitos THP-1

Cultivo celular y tratamientos: se cultiva en suspensión utilizando como medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado con un 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S, v/v) y un 10 % de suero fetal bovino (SFB, v/v) inactivado por calor. Los monocitos se diferencian y polarizan clásicamente en macrófagos M1 por incubación con PMA (100 nmol/L) durante 4 días. Las células THP-1 estimuladas con PMA (denominadas macrófagos derivados de THP-1) se exponen al medio RPMI (suplementado con un 1 % de SFB, v/v) durante 24 H y después se tratan con los extractos de las especies (acuosos y/o etanólicos) a concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu$ g/mL en medio RPMI (1 % de SFB, v/v) durante 24 H (23).

Ensayo de viabilidad celular: se determina en macrófagos derivados de monocitos THP-1 tratados con los extractos (etanólicos y/o acuosos) mediante el ensayo de MTT. Para ello se diferencian  $5 \times 10^4$  monocitos THP-1 en macrófagos con PMA (100 nM) durante 4 días. Luego, los macrófagos se incuban a 37 ° C con los extractos a concentraciones finales de 10, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu$ g/mL durante 24 H. Seguidamente se añaden 100  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) en cada pocillo y se incuban las células a 37 °C durante 3 H. Las células viables reducen el MTT a cristales de formazán por efecto de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Para detectar y cuantificar el formazán, se hace a una longitud de onda de 540 nm.

#### Extracción de mRNA y análisis mediante qPCR-RT

Los niveles de mRNA de los genes específicos se determinan usando un sistema de PCR en tiempo real. El mRNA total se extrae de los

macrófagos derivados de THP-1 usando el reactivo Trisure (Bioline, a Meridiam Life Science Company) según las instrucciones del fabricante. La calidad del mRNA se mide con la relación  $A_{260}/A_{280}$  determinada en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Madrid, España).

Se somete 1 mg de mRNA a transcripción inversa para obtener el cDNA de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit de síntesis de cDNA (BIO-RAD). Por cada reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) se mezclan 10 ng de cDNA de molde con Master Mix Brilliant SYBR Green QPCR, los oligonucleótidos de los genes que codifican el TNF- $\alpha$ , la IL-6 y la IL-1 $\beta$ , y el gen de la hipoxantina-fosforribosil-transferasa (HPRT) usado como gen constitutivo. Las reacciones de amplificación se realizan por triplicado. La cuantificación de los cambios de expresión del mRNA de los genes en estudio se calcula usando el método estándar. Los resultados de la expresión génica se normalizan con el gen de referencia (HPRT).

Cuantificación de biomarcadores de la inflamación: las concentraciones de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) en los sobrenadantes del cultivo celular se cuantifican con el kit comercial (Diaclone<sup>®</sup>) del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de citoquinas se expresa en pg/mL y se calcula a partir de las curvas de calibración de la dilución en serie de estándares recombinantes humanos en cada ensayo (23).

### **1.3. Definición de términos básicos**

Inflamación: básicamente se define como un cambio del equilibrio morfológico en un área específica de un tejido, causada por diferentes agentes: físicos, químicos o biológicos (24).

Respuesta inflamatoria: es una reacción crítica protectora a la irritación, lesión o infección, caracterizada por enrojecimiento, calor, hinchazón, pérdida de la función y dolor (25).

Antiinflamatorio: medicamento usado en la prevención o disminución de la inflamación de los tejidos. Los medicamentos actúan inhibiendo la biosíntesis de sus agentes mediadores: eicosanoides o derivados del ácido araquidónico (26).

## CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1. Formulación de hipótesis

La corteza de *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. y hojas de *J. spicigera* Schlttdl presentan actividad antiinflamatoria *in vitro* sobre eritrocitos plasmáticos.

### 2.2. Variables y su operacionalización

Variable independiente

Extracto etanólico de especies vegetales: solución obtenida a partir de materia vegetal deshidratada, mediante maceración o percolación en contacto con alcohol etílico, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico (26).

Indicador: dosis de extractos 10 ug/mL, 100 ug/mL, 1000 ug/mL y 4000 ug/mL.

Variable dependiente

Actividad antiinflamatoria *in vitro*: ensayo donde se puede evaluar la actividad antiinflamatorio de un tratamiento, en términos de concentraciones inhibitorias (IC<sub>50</sub>) (26).

Indicador: porcentaje de inhibición antiinflamatoria, IC<sub>50</sub>.

## OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable independiente	Definición operacional	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de medición	Medio de verificación
Extracto etanólico de corteza de <i>M. macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq. y hojas de <i>J. spicigera</i> Schltldl	Producto con diversos compuestos químicos, obtenido por maceración, filtrado, evaporado (solvente) y llevado hasta sequedad, la misma que es evaluada experimentalmente.	Cuantitativa	Dosis de extractos: 10 ug/mL 100 mg/mL 1000 ug/mL 4000 ug/mL	Razón	Hoja de reporte analítico
Variable dependiente	Definición operacional	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de medición	Medio de verificación
Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> .	Ensayo empleado para determinar el potencial antiinflamatorio que presentan los extractos de las especies vegetales, con la finalidad de conocer la concentración que producirá un porcentaje de inhibición antiinflamatoria satisfactoria e IC <sub>50</sub> ; y así visualizar la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal.	Cuantitativa.	% de inhibición antiinflamatoria  IC <sub>50</sub>	Razón	Hoja de reporte analítico



## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1 Tipo y diseño

**Tipo de estudio:** experimental: debido a que la intervención fue a propósito de la investigación y al mismo tiempo cumplió con la asignación aleatoria de un grupo control.

**Diseño:** cuantitativo, porque se recopiló y analizó los datos obtenidos de distintas fuentes con intervención del investigador, se controló deliberadamente las variables para delimitar relaciones entre ellas a fin de medir los resultados de manera concluyente. El área de estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicada en calle Pevas 5ta cuadra de la ciudad de Iquitos, capital del Departamento de Loreto.

### 3.2 Diseño muestral

**Población:** estuvo constituida por corteza de *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. “chuchuhuasi” y hojas *J. spicigera* Schltidl “insulina”.

**Muestra:** dos (02) kg de hojas y corteza.

**Muestreo o selección de la muestra:** fueron colectadas por conveniencia en la comunidad de Zungarococha (3°49'13"S 73°19'42"O) y el Distrito de Tamshiyacu (198°S 4°0'6" S 73°9'38" O).

**Criterios de selección:** criterios de inclusión fueron corteza en buen estado, sin contaminantes; hojas enteras, frescas y grandes, sin contaminantes (hongos u otros). Criterios de exclusión: hojas pequeñas, resacas; corteza contaminada (hongos u otros).

### **3.3. Procedimientos de recolección de datos**

#### **A. Obtención del material botánico**

Colecta de especies vegetales: con ayuda de tijeras podadoras, se cortó suficiente cantidad de hojas y corteza. Las muestras colectadas se depositaron en sobres de manila debidamente rotulados hasta su llegada al laboratorio.

Preparación y limpieza de muestras vegetales: una vez que las muestras del material vegetal llegaron al laboratorio, se limpiaron las hojas y se cortaron las cortezas en pequeños fragmentos. Al mismo tiempo se realizó una selección de hojas y corteza en buen estado de cada una de las especies vegetales para la elaboración de exsicatas y su posterior identificación y certificación.

Certificación de la especie vegetal: el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de Amazonia Peruana – UNAP certificó la especie vegetal y entregó una constancia con su respectivo código de identificación.

Secado y micropulverizado de las muestras vegetales: la muestra limpia se trasladó a un ambiente de secado a temperatura de 40 °C y se utilizó un equipo deshumecedor durante 72 horas. Después del secado de las muestras, se realizó la molienda. El pulverizado se guardó en frascos de color ámbar para su posterior uso en los diferentes ensayos.

#### **B. Obtención de extractos**

Se pesó 7 g de material vegetal, se agregó 100mL de etanol 96°. Después, fue sometida a maceración por un tiempo promedio de 07 días. Posteriormente, se filtró el extracto macerado con ayuda de una bomba al vacío y se concentró con la ayuda del equipo rota vapor a 40° C y a 40 rpm. El extracto obtenido en el rota vapor, se colocó en una estufa a 40°C hasta sequedad y posteriormente refrigerado para su uso en los respectivos ensayos (27).

## **C. Preparación de soluciones**

### c.1) Solución Alsever

Es un anticoagulante que permite conservar los eritrocitos. Es una mezcla de Dextrosa 2%, cloruro de sodio 0,42%, citrato de sodio 0,8% y ácido cítrico 0,05% en csp 100 mL de agua destilada.

### c.2) Glóbulos rojos al 10%

En un tubo de ensayo autoclavado, se colocó 5 mL de solución Alsever; se añadió 5mL de sangre extraída de una persona sana que no haya recibido tratamiento alguno con fármacos, se centrifugó a 3000 rpm por 15 min (3 veces). Con el paquete celular (plasma) se midió y se reconstituyó al 10% v/v con ClNa 0,9% y se almacenó a una temperatura de 2 – 8°C (28).

### c.3) Solución buffer fosfato pH 7,4

Se pesó 2,06985g de fosfato de sodio monohidratado, 2,66985g de fosfato de sodio dihidratado (ambos se disuelven por separado con agua destilada se mezcla ambas soluciones y se afora en una fiola de 100 ml.

### c.4) Solución hiposalina 0,36%

En una fiola de 100 mL, se colocó 30 ml de ClNa 0,9% y se enrazó con 70mL de agua destilada.

### c.5) Solución muestra

En un vial se pesó 10 mg de extracto y se diluyó en 2 mL de agua destilada. De la solución madre, se diluyó a las concentraciones de 4000, 1000, 100 µg/ mL y 10 µg/ mL.

### c.6) Control positivo Hidrocortisona

Se diluyó hidrocortisona de 250 mg en 25 ml de agua destilada (10 mg/ml). De la solución madre, se preparó las soluciones de trabajo en las concentraciones de 4000, 1000, 100, 10 ug/mL.

#### D. Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* sobre eritrocitos plasmáticos

Fundamento: Este modelo permite estimar si el efecto antiinflamatorio de estos extractos podría ser debido a la estabilización de la membrana de los lisosomas, de forma similar a los antiinflamatorios no esteroideos (29).

Preparación del tubo de experimentación: La mezcla a ensayar contuvo 0,5 mL del extracto etanólico de corteza de *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. “chuchuhuasi” y hojas de *J. spicigera* Schltl “insulina” a diferentes concentraciones en varios tubos (por ejemplo: 4000, 1000, 100, 10 ug/mL), con 1mL de Buffer fosfato (0,15 M pH=7,4), 2mL de solución hiposalina (0,36%) y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos. Se utilizó hidrocortisona como fármaco de referencia en la evaluación de actividad. A otro tubo se agregó 2mL de solución hiposalina, con 1 mL de Buffer fosfato (0,15M pH=7,4) y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos, el cual fue el estándar. Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y fueron centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. La hemoglobina contenida en la solución sobrenadante fue valorada en el espectrofotómetro a 540 nm. El porcentaje de estabilidad de la membrana de glóbulos rojos se calculó usando la siguiente expresión:(30).

$$(\%Inh) = \frac{Abs\ control - Abs\ muestra}{Abs\ control} \times 100$$

Instrumento: Hoja de reporte analítico

#### 3.4. Procesamiento y análisis de la información

Los datos obtenidos fueron agrupados, presentados en tablas, se expresaron en valores medios  $\pm$  desviación estándar con sus respectivas pruebas de significancia al 95%. Luego, se aplicó análisis de varianza para conocer si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. Posterior a ello, se aplicó la prueba estadística HSD Tukey para comparaciones múltiples entre los grupos - porcentaje de inhibición.

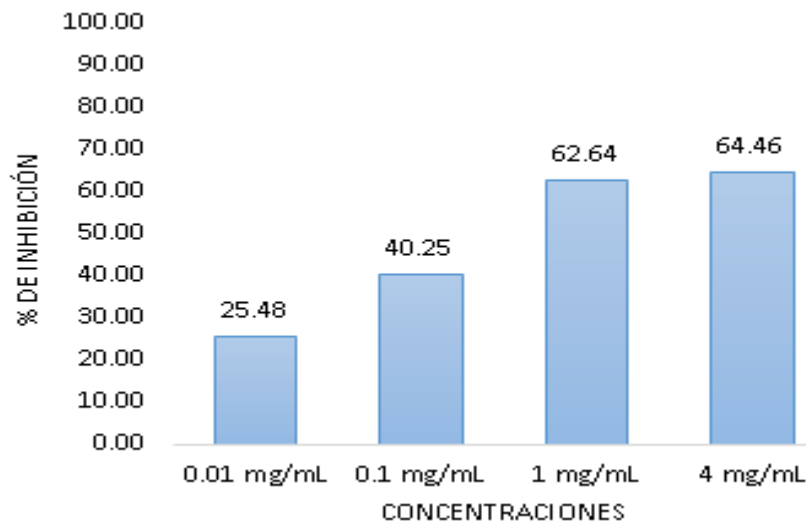
### 3.5. Aspectos éticos

Se tuvo en cuenta la Ley N° 26842 “Ley General de Salud”, que establece que el Estado promueve la investigación científica y tecnológica en el campo de la salud y dispone que la investigación experimental con personas se rija por la legislación especial sobre la materia y los postulados éticos contenidos en la Declaración de Helsinki.

La investigación en salud en donde participan seres humanos como sujetos de investigación es esencial para generar conocimientos para beneficiar a las personas y a la sociedad en su conjunto, mejorando su salud y bienestar. Sin embargo, dicha acción científica debe llevarse a cabo de manera ética; es decir, asegurando la protección de los sujetos de investigación y la integridad científica.

En ese sentido, el Perú cuenta con un componente importante de la investigación que es el Reglamento de Ensayos Clínicos aprobado por Decreto Supremo N° 021-2017-SA. (**TÍTULO III: De los sujetos de investigación** CAPÍTULO II.- Del Consentimiento informado) que regula, entre otros, los aspectos éticos de los ensayos clínicos con productos farmacéuticos y dispositivos médicos. No obstante, es preciso asegurar la gobernanza de toda la investigación en salud con seres humanos (investigación epidemiológica, conductual, observacional, entre otras).

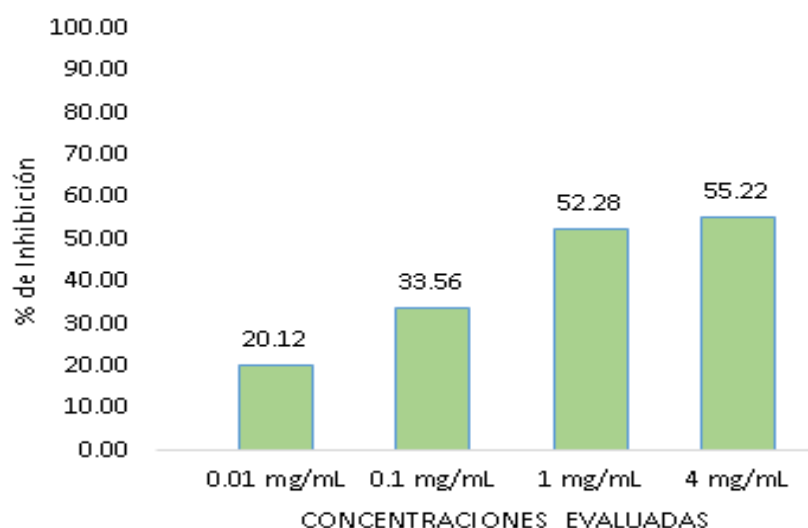
## CAPÍTULO IV: RESULTADOS



Fuente: elaboración propia

**Figura 4.** Porcentajes de estabilidad de la membrana por el extracto de corteza de *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.

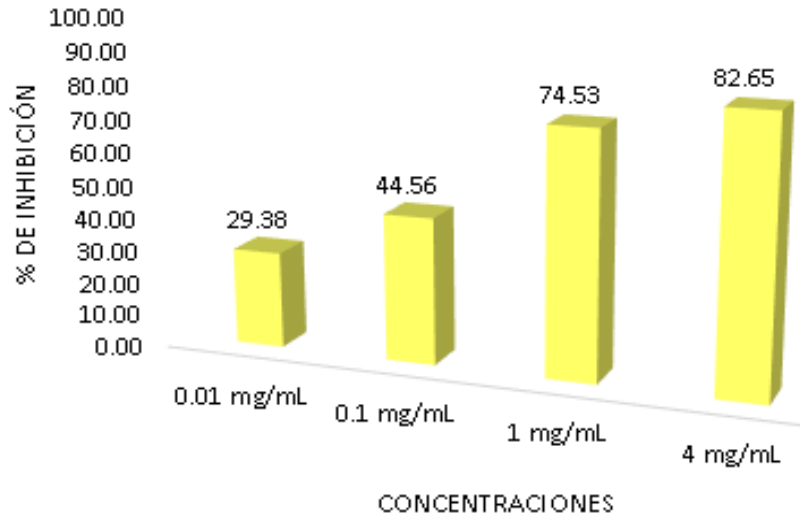
En la figura 4 se observa una relación directa, es decir, a mayor concentración corteza de *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. "chuchuhuasi", presenta mayor % de inhibición.



Fuente: elaboración propia

**Figura 5.** Porcentajes de estabilidad de la membrana por el extracto de hojas de *J. spicigera* Schlttl "insulina"

En la figura 5 se observa una relación directa, es decir, a mayor concentración hojas de *J. spicigera* Schlttl "insulina" presenta mayor % de inhibición.

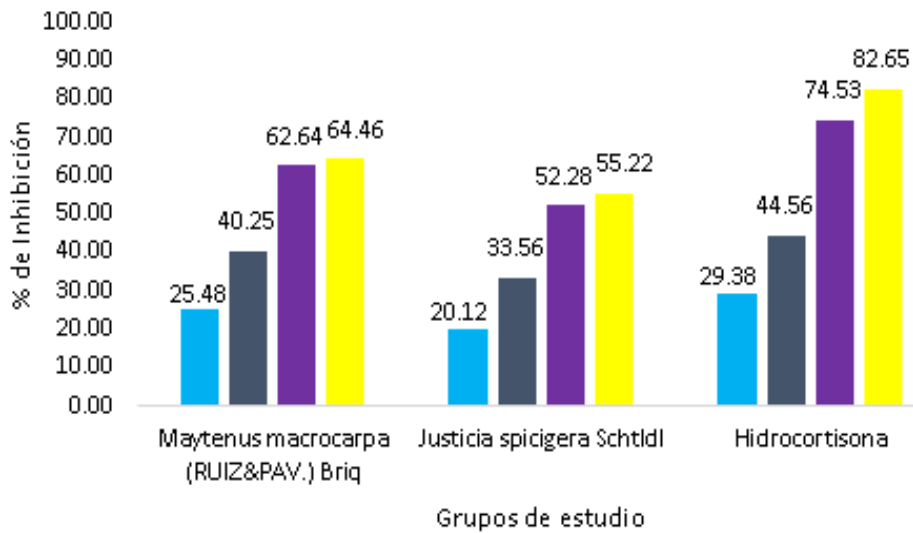


Fuente: elaboración propia

**Figura 6.** Porcentajes de estabilidad de la membrana por la hidrocortisona como fármaco de referencia

En la figura 6, se observa que Hidrocortisona a mayor concentración evaluada, presentó mejor porcentaje de protección de la membrana de glóbulos rojos.





Fuente: elaboración propia

**Figura 7.** Porcentajes de protección de la membrana de glóbulos rojos entre los grupos de estudio por cada concentración evaluada

En la figura 7, Hidrocortisona en todas las concentraciones evaluadas, obtuvo mayor % de inhibición en comparación con corteza de *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. “chuchuhuasi” y hojas de *J. spicigera* Schtdl “insulina”,

**Tabla 1.** Descriptivos de los grupos de estudio – porcentaje de inhibición

Grupos de estudio	N	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
<i>M. macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	4	48,21	18,73	18,41	78,01	25,48	64,46
<i>J. spicigera</i> Schltdl	4	40,30	16,52	14,01	66,58	20,12	55,22
Hidrocortisona	4	57,78	25,04	17,94	97,62	29,38	82,65

Fuente: elaboración propia

Según los resultados de los descriptivos de estudio, se observa para hojas de *J. spicigera* Schltdl un menor % de inhibición de glóbulos rojos y desviación estándar; mientras que Hidrocortisona (fármaco de referencia) obtuvo mayor % de inhibición de glóbulos rojos y desviación estándar.

**Tabla 2.** Prueba de normalidad de los datos según grupo de estudio – porcentaje de inhibición

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
PorcentajeInhibición	0,968	12	0,892

Fuente: elaboración propia

Aplicando el programa SPSS versión 22, se observa que todos los grupos presentan normalidad, luego de comparar el valor de la significancia con el valor de  $\alpha = 0,05$  (5%) aplicando la prueba de Shapiro – Wilk. El análisis de normalidad nos permite realizar pruebas paramétricas.

**Tabla 3.** Prueba de homogeneidad de varianzas – porcentaje de inhibición

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,486	2	9	0,277

Fuente: elaboración propia

En la tabla 3, se muestra los resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas, determinándose que dichas muestras presentan varianzas homogéneas con un valor sig = 0,277.

**Tabla 4.** Análisis de varianza de grupos de estudio - porcentaje de inhibición

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	613,288	2	306,644	0,736	0,506
Dentro de grupos	3751,496	9	416,883		
Total	4364, 784	11			

Fuente: elaboración propia

Aplicando el programa SPSS versión 22, se determinó que sig.=0,506 siendo mayor que  $\alpha=0,05$ . Se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio según el porcentaje de inhibición.

**Tabla 5.** Comparaciones múltiples entre los grupos - porcentaje de inhibición

HSD Tukey

(I) Grupo de estudio	(J) Grupo de estudio	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
<i>M. macrocarpa</i> (Ruiz&Pav.)	<i>J. spicigera</i> Schtldl - hojas	7,91250	14,43664	0,850	-32,3947	48,2197
Briq. - Corteza	Hidrocortisona	-9,57250	14,43664	0,790	-49,8797	30,7347
<i>J. spicigera</i> Schtldl - hojas	<i>M. macrocarpa</i> (Ruiz&Pav.) Briq. - corteza	-7,91250	14,43664	0,850	-48,2197	32,3947
	Hidrocortisona	-17,48500	14,43664	0,476	-57,7922	22,8222
Hidrocortisona	<i>M. macrocarpa</i> (Ruiz&Pav.) Briq. - Corteza	9,57250	14,43664	0,790	-30,7347	49,8797
	<i>J. spicigera</i> Schtldl - hojas	17,48500	14,43664	0,476	-22,8222	57,7922

La prueba HSD Tukey (prueba que se aplica cuando las varianzas de los grupos son homogéneas), encontrándose que el grupo *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. - corteza produce diferente porcentaje de inhibición respecto a *J. spicigera* Schtldl - hojas e Hidrocortisona con valores de sig = 0,850; sig = 0,790 respectivamente; el grupo *J. spicigera* Schtldl - hojas produce diferente porcentaje de inhibición respecto *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. - corteza e Hidrocortisona con valores de sig = 0,850 y sig = 0,476. Asimismo, el grupo Hidrocortisona produce diferente porcentaje de inhibición respecto a *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. - corteza y *J. spicigera* Schtldl - hojas. En conclusión, el producto Hidrocortisona produce porcentaje de inhibición diferente al grupo *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. - corteza y *J. spicigera* Schtldl - hojas.

**Tabla 6.** Tabla de subgrupos homogéneos del procedimiento ANOVA de un factor - porcentaje de inhibición

**HSD Tukey<sup>a</sup>**

Grupos de estudio	N	Subconjunto para alfa =
		0,05
		1
<i>J. spicigera</i> Schtldl – hojas	4	40,30
<i>M. macrocarpa</i> (Ruiz&Pav.) Briq. - corteza	4	48,21
Hidrocortisona	4	57,78
Sig.		0,476

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

En la tabla 6, se observa que, para los grupos de estudio las medias no difieren significativamente (sig.=0,476).

**Tabla 7.** Cálculo IC<sub>50</sub> a partir de la ecuación obtenida con su respectivo R<sup>2</sup>

Grupos de estudio	Ecuación	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
<i>M. macrocarpa</i>			
(Ruiz & Pav.) Briq. - Corteza	$y = 6,992\ln(x) + 9,5582$	0,9670	<b>325,06 ug</b>
<i>J. spicigera</i> Schtldl			
– Hojas	$y = 6,2042\ln(x) + 6,0019$	0,9783	<b>1201,91 ug</b>
Hidrocortisona	$y = 9,4045\ln(x) + 5,7978$	0,9788	<b>109,96 ug</b>

Fuente: realización propia

La Tabla 7 evidencia que *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. - Corteza mostró un IC<sub>50</sub>=325,06 ug, lo que nos indica que a esta concentración produce inhibición en cuanto a protección de la membrana de glóbulos rojos; en comparación con *J. spicigera* Schtldl – Hojas un IC<sub>50</sub>=1021,91 ug. En cambio, el fármaco de referencia Hidrocortisona obtuvo menor IC<sub>50</sub>=109,96 ug lo que demuestra que es el de mejor actividad antiinflamatoria.

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Existe un aumento considerable en informes, sobre el uso de ensayos de hemólisis de eritrocitos, como una herramienta simple y rápida en la detección de fitofármacos hacia la búsqueda de actividad antiinflamatoria.

En los ensayos de actividad antiinflamatoria *in vitro*, estas se realizan en función a que enzimas lisosomales, se liberan durante procesos inflamatorios; razón por lo que los mecanismos de respuesta inmune conllevan a la estabilización de la membrana lisosomal, la misma que evita la liberación de dichas enzimas desencadenando activación de factores y procesos inflamatorios (31).

Es preciso indicar, que la membrana de los eritrocitos es análoga a la membrana lisosomal; en tanto, evitar la ruptura del mismo se considera como efecto antiinflamatorio *in vitro*, de esta manera aquellas sustancias que inhiben la hemólisis también evitan y/o protegen a la membrana lisosomal; y, en este modelo de estabilidad de la membrana del eritrocito es considerado como efecto tipo antiinflamatorio. En este tipo de modelo, los agentes antiinflamatorios aminoran el porcentaje de hemólisis y por lo tanto aumentan el porcentaje de estabilidad de la membrana, esto significa que a mayor hemólisis existe menor estabilidad de la membrana y, por consiguiente, un menor efecto antiinflamatorio y/o viceversa (31).

Los resultados obtenidos de ambos extractos: *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. – corteza y *J. spicigera* Schltl – hojas, nos indica que modificaron las variables evaluadas similar a agentes antiinflamatorios, como fue el caso de la Hidrocortisona (fármaco de referencia). Por tanto, en la hemólisis inducida con solución salina el extracto etanólico tuvo un efecto similar al antiinflamatorio control, ya que la misma redujo el porcentaje de hemólisis y aumentó el porcentaje de estabilidad de la membrana.

El efecto antiinflamatorio *in vitro* del extracto etanólico de ambas especies estudiadas, probablemente se atribuye a la presencia de flavonoides, alcaloides, y/o saponinas, ya que en diversas plantas estos son considerados compuestos

activos responsables de la actividad antiinflamatoria y esto guarda relación con lo descrito por **Jiménez, L. et al.** (7) quienes concluyeron que chuchuhuasi presenta propiedades antiinflamatorias y afrodisíacas; además concuerda con los resultados de **León A. et al.** (11), donde demostraron el efecto analgésico central de las hojas de *M. macrocarpa* a dosis de 1000 mg/kg según modelo de retirada de la cola en ratas.

Asimismo, se evidencia una relación directa con lo descrito por **Pérez R. et al.** (9), quienes investigaron el efecto antiinflamatorio del procumbenósido B (PB) de *Justicia spicigera* sobre mediadores proinflamatorios, donde la acción antiinflamatoria puede atribuirse a la baja de iNOS y COX-2 a través de la supresión de la vía de señalización NF-κB en macrófagos RAW264.7.

Estos resultados, nos demuestra que el efecto de los extractos puede ser similar en la membrana lisosomal, lo que evita su ruptura y la liberación de mediadores de inflamación (31).

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. – corteza, presenta 25,48% a concentración 10 ug/mL; 40,25% a 100 ug/mL; 62,64% a 1000 ug/mL y 64,46% a 4000 ug/mL respectivamente.
- *J. spicigera* Schltdl – hojas, presenta 20,12% a concentración de 10 ug/mL; 33,56% a 100 ug/mL; 52,28% a 1000 ug/mL y 55,22% a 4000 ug/mL respectivamente.
- Para el fármaco de referencia Hidrocortisona, se observa 49,76% a concentración 10 ug/mL; 52,84% a 100 ug/mL; 74,53% a 1000 ug/mL y 82,65% a 4000 ug/mL todos como porcentajes de protección de la membrana de glóbulos rojos.
- Un  $IC_{50}=325,06$  ug para corteza de *M. macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq., nos indica que a esta concentración produce inhibición en cuanto a protección de la membrana de glóbulos rojos; en comparación con un  $IC_{50}=1021,91$  ug para hojas *J. spicigera* Schltdl. En cambio, el fármaco de referencia Hidrocortisona obtuvo menor  $IC_{50}=109,96$  ug lo que demuestra que es el de mejor actividad antiinflamatoria.



## **CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES**

- El presente trabajo abre las perspectivas para realizar estudios de evaluación de ambas especies en modelos animales, a fin de poder determinar su potencial farmacológico en el tratamiento de la inflamación.
- Es importante la elaboración de ciertas formas farmacéuticas, entre ellas: comprimidos, polvos, jarabes de las 02 especies, a fin de hacer sostenible el consumo de productos naturales, brindando así alternativas terapéuticas para tratar dolor e inflamación.

## CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Brak Egg A. Tratado de Libre Comercio y Biodiversidad en el Perú. [serie en Internet] Perú. [consultada 02 Ago 2020]. Disponible en: <http://bibliotecavirtual.educared.org/index.php/site/default/detalle/id/00000000486/tratado-de-libre-comercio-y-biodiversidad-del-peru>
2. Palacios Lozada E. Economía y plantas medicinales. Facultad de Ciencias Económicas de la UNMSM [serie en internet]. Boletín52. [citado Jun 2004, consultada 02 Ago 2020]. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/consejo/boletin52/Pdf/a04.pdf>
3. Gómez HA, González KN, Medina JD. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales 2011.
4. Molina SC. Farmacología en enfermería: Elsevier; 2007.
5. Ichiyanagu C. Epidemiología de la hemorragia digestiva. Acta Médica Peruana. 2006;23:152-155.
6. Daniell HW. Gastroesophageal reflux disease stimulation of nsaid-associated atrial fibrillation. Archives of Internal Medicine. 2011;171(7):702-710.
7. Jiménez-Grados Lyane, Kolevic-Saraza Niurka, Jara-Huancaya Ursula, Meléndez-Aquino José, Jiménez-Cabezudo Carlos, Salazar-Granara Alberto. Referencia de los usos medicinales del chuchuhuasi (*Maytenus macrocarpa*) por curanderos del distrito de Santa María de Huachipa, Lurigancho, Lima - Perú: un estudio cualitativo. Horiz. Med. [Internet]. 2020 Jul [citado 2021 Dic 13]; 20(3):e1245. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-558X2020000300008&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2020000300008&lng=es). <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2020.v20n3.08>.
8. Zevallos Lazarte Yesenia. Actividad Antioxidante *in vitro* de *Inga edulis* Mart. “guaba” y *Maytenus macrocarpa* (RUIZ & PAV.) Briq. “chuchuhuasi” por DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo). [Tesis de pre grado para optar el título de Químico Farmacéutico] Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (2020). Disponible en: [http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6800/Yesenia\\_Tesis\\_Titulo\\_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6800/Yesenia_Tesis_Titulo_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y) Fecha de acceso: 20 Agosto

2020.

9. Perez Gutierrez Rosa Martha, Mota Flores Jose Maria, Neira Gonzalez Adriana Maria. Anti-inflammatory Effect of Procumbenoside B from *Justicia spicigera* on Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages and Zebrafish Model. *Pharmacognosy Research*, Volume 10, Issue 2, April-June, 2018 Disponible en: <https://phcogres.com/sites/default/files/PharmacognRes-10-2-218.pdf> Fecha de acceso: 10 Diciembre 2021.
10. Valdivieso Díaz Gustavo Adolfo. Efecto del extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa* "chuchuahuasi" sobre embriones preimplantacionales de ratón (*Mus musculus*). [Tesis de pre grado para optar el título de Biólogo]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos (2016). Disponible en: [http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/877318/efecto-del-extracto-acuoso-de-maytenus-macrocarpa-chuchuwasi-so\\_jO7nTAF.pdf](http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/877318/efecto-del-extracto-acuoso-de-maytenus-macrocarpa-chuchuwasi-so_jO7nTAF.pdf) Fecha de acceso: 20 Agosto 2020.
11. León Fernández Angélica M, Tupia Céspedes Lourdes L, Turriate Montaldo Yessica, Maraví Rengifo Julio E, Barrientos Herrera Alejandro J, Urbano Farje Orlando J et al. Evaluación de la actividad analgésica central de las hojas de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. (chuchuhuasi). *Rev Cubana Plant Med* [Internet]. 2014 Dic [citado 2021 Mar 29]; 19(4): 349-360. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962014000400007&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000400007&lng=es).
12. Barriga García, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia*. Bogotá: Tercer Mundo.
13. Mostacero, J. (2002). *Taxonomía de las Fanerógamas Útiles de Perú*. Lima, Concytec.
14. Alonso, J. (2004). *Tratado de fitofármacos y nutracéuticos*. Buenos Aires, Argentina: Corpus.
15. Golden Map. (2005). Componentes de formas farmacéuticas semisólidas; Recuperado el 12 de Junio de 2012, de Golden Map: [http://es.goldenmap.com/Maytenus\\_laevis](http://es.goldenmap.com/Maytenus_laevis)
16. De La Torre, L. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Quito, Ecuador: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

17. Bernal H. (1990). Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Bogotá, Colombia: Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello.
18. Estrella, E. &. (1993). Salud y población indígena de la Amazonía del Ecuador. Quito, Ecuador: El Simposio.
19. Pesantes, C. (1999). Plantas medicinales usadas en la medicina popular para el tratamiento del cáncer. Trujillo, Perú. La Unión.
20. *Justicia spicigera* Schltld. Disponible en: <http://legacy.tropicos.org/Name/102673>.
21. Organización Mundial de la Salud. El uso clínico de la sangre en Medicina General Obstetricia Pediatría y Neonatología Cirugía y Anestesia Trauma y Quemaduras [libro en línea]. London, 2001 [consulta 26-04-2021]. ISBN e-book 9243545388
22. Priyanka Chatterjee, Sangita Chandra, Protapaditya Dey, and Sanjib Bhattacharya. Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative *in vitro* study. J Adv Pharm Technol Res. 3(2): 136–138. 2012.
23. Us-Medina Ulil, Millán-Linares Maria del Carmen, Arana-Argaes Víctor Ermilo, Segura-Campos Maira Rubi. Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de extractos de chaya (*Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst). Nutr. Hosp. [Internet]. 2020 Feb [citado 2022 Ene 13]; 37(1): 46-55. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112020000100008&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112020000100008&lng=es). Epub 08-Jun-2020. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.02752>.
24. Almeida ECd, Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. Journal of Venomous Animals and Toxins. 2002;8:191-212.
25. Calixto JB, Otuki MF, Santos ARS. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B). Planta Med. 2003;69(11):973-83.
26. Antiinflamatorio, definicion. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Antiinflamatorio>
27. Gonzáles Villa Ángela Andrea. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos [Trabajo final Tecnología en Alimentos]. Colombia: Universidad

Nacional de Colombia (2014). Disponible en: [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2800/angelaandragon\\_zalezvilla.2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2800/angelaandragon_zalezvilla.2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y) Fecha de acceso: 10 diciembre 2021)

28. Gandhisan R, Thamarachelvan A. Baburaj: Anti-inflammatory action of *Lannea coromandelica* HRBC membrane stabilization. *Fitoterapia*. 1991;62:82–83
29. Jainul MA, Chowdhury A, Al Mamun A, Rahman S, Azam S, Shams K. Human red blood cell membrane stability testing for the estimation of anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Millettia pachycarpa* benth leaves. *Int J Pharm Sci Res*. 2013;4(12):4587–90.
30. Shinde UA, Phadke AS, Nair AM, Mungantiwar AA, Dikshit VJ, Saraf VO. Membrane stabilizing activity—a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*. 1999;70:251–257.
31. Mahendra Kardile, Umesh B. Mahajan Haidarali M. Shaikh C. R. Patil. Membrane stabilization assay for anti-inflammatory activity yields false positive results for samples containing traces of ethanol and methanol. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. (2016) 5(3):493-497

## ANEXOS

### Anexo 1. Constancia de certificación de la especie vegetal

	Centro de Investigación de Recursos Naturales Herbarium Amazonense — AMAZ									
INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005										
<b>CONSTANCIA n.º 24-2020-AMAZ-UNAP</b>										
El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana										
<b>HACE CONSTAR:</b>										
Que, las muestras botánicas presentada por <b>LESLY FERNANDA RENGIFO LINARI</b> , bachiller de la <b>Facultad de Farmacia y Bioquímica</b> de la <b>Universidad Nacional de la Amazonía Peruana</b> pertenece al proyecto de tesis de pre grado titulado " <b>Actividad antiinflamatoria in vitro sobre eritrocitos plasmáticos de corteza de <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz &amp; Pav.) Briq. y hojas de <i>Justicia spicigera</i></b> " que han sido <b>DETERMINADAS</b> en este Centro de Investigación y Enseñanza <b>Herbarium Amazonense-AMAZ</b> del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la <b>UNAP-CIRNA-UNAP</b> como se indica a continuación:										
<table border="1"><thead><tr><th>Nº</th><th>FAMILIA</th><th>ESPECIE</th></tr></thead><tbody><tr><td>01</td><td>CELASTRACEAE</td><td><i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz &amp; Pav.) Briq.</td></tr><tr><td>02</td><td>ACANTHACEAE</td><td><i>Justicia spicigera</i> Schtdl.</td></tr></tbody></table>	Nº	FAMILIA	ESPECIE	01	CELASTRACEAE	<i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	02	ACANTHACEAE	<i>Justicia spicigera</i> Schtdl.	
Nº	FAMILIA	ESPECIE								
01	CELASTRACEAE	<i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.								
02	ACANTHACEAE	<i>Justicia spicigera</i> Schtdl.								
A los veintiocho días del mes de diciembre del dos mil veinte, se expide la presente constancia a la interesada para los fines que se estime conveniente.										
Atentamente,										
 Richard J. Muroy Coordinador Herbarium Amazonense										
										
<hr/>										
Dirección Pucallpa/Naranay – Iquitos Perú Apdo. 456	Página 1 de 1									
										

## Anexo 2. Preparación de Buffer fosfato



## Anexo 3. Tubos de ensayo con muestra problema



Anexo 4. Hoja de reporte analítico

Grupo(s)	Concentraciones (ug/mL)	Longitud de onda $\lambda$	Abs		
			R1	R2	R3
I	10	540 nm			
	100				
	1000				
	4000				
II	10	540 nm			
	100				
	1000				
	4000				
III	10	540 nm			
	100				
	1000				
	4000				

Leyenda: ABS=Absorbancia



## Anexo 5. Formato Consentimiento informado

<b>CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE</b>	ELB_001
	VER. 01 / 2020
	PAG. 1 / 2

### HOJA DE INFORMACIÓN

Este documento sirve para que el donante autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines académicos, para la tesis ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA *in vitro* DE CORTEZA DE *Maytenus macrocarpa* (Ruiz&Pav.) Briq. Y HOJAS DE *Justicia spicigera* Schltldl SOBRE ERITROCITOS PLASMÁTICOS.

La venopunción es la técnica por lo cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se lo realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia.

En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son:

- Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese.
- Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), lo que comúnmente se denomina “morado”, el mismo que se resolverá sin tratamiento a cabo de algunos días.
- Riesgo leve de infección.
- En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.
- La cantidad total de sangre que se extraiga estará a criterio de cada docente responsable, el cual guiará la práctica de laboratorio.

<b>CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE</b>	ELB_001
	VER. 01 / 2020
	PAG. 2 / 2

**Certificado de consentimiento**

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

Fecha: .....de..... 20.....

Investigador responsable: .....

Nombre del donante: .....

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre.

Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. **Firmo este consentimiento**, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. **AUTORIZO** a la persona encargada la toma de la muestra.

Firma del donante

Firma del Investigador

.....

.....