



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral para optar al grado de  
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas,  
(Área Ciencias Biológicas), UNLP***

***"Balsa" Ochroma pyramidale (Cav. ex Lam.) Urb.  
(Bombacaceae)***

***Etnobotánica, anatomía, ensayos fitoquímicos y  
actividades biológicas***

---

***Tesista: Ing. Agr. Pablo Cesar Ramos Corrales***

***Directora: Dra. María Adelaida Rosella***

***Año 2016***



*Universidad Nacional de La Plata*  
*Facultad de Ciencias Exactas*

**“Balsa”**  
***Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.**  
**(Bombacaceae)**

**Etnobotánica, anatomía, ensayos fitoquímicos y  
actividades biológicas**

**Tesis para optar al grado de  
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas  
(Area Ciencias Biológicas), UNLP**

**Ingeniero Agrónomo**

**Mg. Pablo César Ramos Corrales**

**Directora de Tesis  
Dra. María Adelaida Rosella**

**Lugar de trabajo:  
LABRAM**

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

**2016**



*"Cuando busco 'balsa' para trabajar, viajo al interior de la selva para encontrarme en la naturaleza y pedirle a la Madre Tierra que me brinde de sus poderes medicinales para curar. Las plantas cultivadas perdieron ese poder curativo gracias a la mano del hombre y la contaminación".*

*"Sanadora" Shuar, 2015*

# Indice

---

	<b>Pag.</b>
<b>Agradecimientos</b>	v
<b>1.- Introducción</b>	1
Fundamentos de la elección del tema	8
<b>2.- Antecedentes</b>	9
2.1.- Antecedentes botánicos, hábitat y distribución geográfica	10
2.2.- Usos comerciales	15
2.3.- Usos medicinales tradicionales	17
2.4.- Antecedentes fitoquímicos	18
2.5.- Antecedentes de técnicas utilizadas en los ensayos fitoquímicos y de actividades biológicas	21
2.5.1.- Cromatografía en capa delgada (CCD) Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	21
2.5.2.- Actividad tripanocida	22
2.5.3.- Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos	24
2.5.4.- Actividad antibacteriana e inhibidora de la producción de biofilm	26
<b>3.- Hipótesis y Objetivos</b>	27
<b>4.- Materiales y Métodos</b>	31
4.1.- Relevamiento etnofarmacobotánico	32
4.1.1.- Area de estudio	32
4.1.2.- Perfil de los entrevistados	34
4.1.2.- Recolección de datos	36
4.1.2.1.- Entrevista	36
4.1.2.2.- Encuesta sobre plantas denominadas como “Balsa”	38
4.1.3. Procesamiento de las entrevistas y encuestas	39
4.2.- Material vegetal	39
4.2.1.- Procedencia	39
4.2.2.- Recolección y acondicionamiento del material vegetal	40
4.3.- Caracteres anatómicos de la hoja	40
4.3.1.- Equipos utilizados	40
4.3.2.- Cortes y tinciones	40
4.3.3.- Diafanización de las hojas	41
4.4.- Ensayos fitoquímicos	42
4.4.1.- Ensayos fitoquímicos orientativos en hojas de <i>O. pyramidale</i>	42
4.4.1.1.- Ensayos orientativos sobre la muestra seca	43



4.4.1.2.- Screening fitoquimico	43
4.4.2.- Perfiles cromatográficos de los extractos de hojas de <i>O. pyramidale</i>	48
4.4.2.1.- Preparación de los extractos	48
4.4.2.2.- Cromatografía en capa delgada (CCD)	48
4.4.2.2.- Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	49
4.5.- Actividades Biologicas	49
4.5.1.- Determinación de la actividad tripanocida	49
4.5.1.1.- Predicción de la actividad	49
4.5.1.2.- Preparación de los extractos	50
4.5.1.3.- Efecto inhibitorio sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	50
4.5.2.- Inhibición de la producción de oxido nítrico en macrófagos	50
4.5.2.1.- Preparación de los extractos	
4.5.2.2.- Determinación de la Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos y ensayo de viabilidad celular	50
4.5.3.- Actividad antibacteriana e inhibidora de la producción de biofilm	53
4.5.3.1.- Preparación de los extractos a ensayar	53
4.5.3.2.- Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento por el método de microdilución en caldo	54
4.5.3.3.- Ensayo de inhibición de la formación de biofilm	54
<b>5.- Resultados y Discusión</b>	<b>56</b>
5.1.- Relevamiento etnofarmacobotánico	57
5.1.1.- Entrevistas a “Sanadores”	57
5.1.1.1.- Entrevistas a sanadores de Puyo	58
5.1.1.2.- Entrevistas a sanadores de Quevedo	60
5.1.2.- Encuesta a No sanadores	60
5.1.2.1.- Encuesta a no sanadores de Puyo	60
5.1.2.2.- Encuesta a no sanadores de Quevedo:	62
5.2.- Caracteres anatómicos de la hojas	66
5.3.- Ensayos fitoquímicos	70
5.3.1.- Pruebas químicas orientativas	70
5.3.2.- Análisis de las cromatografías en capa delgada (CCD) efectuadas a los extractos acuoso y metanólico de <i>O. pyramidale</i>	72
5.3.3.- Análisis de las cromatografías por HPLC-DAD de los extractos acuoso y metanólico de <i>O. pyramidale</i>	73
5.4.- Actividades biologicas	75

5.4.1.- Actividad tripanocida	75
5.4.2.- Inhibición de la producción de oxido nítrico en macrófagos	78
5.4.3.- Actividad antibacteriana e inhibidora de la producción de biofilm	82
<b>6.- Conclusiones</b>	87
Proyección de los resultados obtenidos	91
<b>7.- Resumen</b>	92
<b>8.- Bibliografía</b>	109
<b>9.- Anexos</b>	126
Anexo 1: Figuras y Tablas	127
Anexo 2: Abreviaturas y Símbolos	129
Anexo 3: Presentaciones a Congresos	131

# Agradecimientos

---



## *Agradecimientos*

En primer lugar a Dios, que ha sido mi fortaleza y aliento de vida durante todo este proceso

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas, por permitirme realizar este trabajo.

A la Cátedra de Farmacognosia y al LABRAM por la utilización de sus instalaciones.

A la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de Ecuador, por otorgarme la Beca Doctoral Fase I que me permitió realizar este trabajo.

A mi directora de Tesis y amiga, Dra. María Adelaida Rosella, por brindar sus conocimientos, paciencia y sabiduría en este transcurso de trabajo

A los Dres. Alan Talevi y Carolina Bellera por la aplicación de modelos computacionales y ensayos tripanocidas

Al Dr. Mario Arenas por su ayuda con la actividad antibacteriana

A la Ing. Mg. Marta Colares y los Lic. Silvia Aquila y Cesar Vallejos Salazar por colaborar con la micrográfica

A la Farm. Mg Maria E del Valle por su ayuda con los ensayos fitoquímicos

A la Dra. Marina González y la Lic Silvia Aquila por su ayuda con la determinación de los inhibidores proinflamatorios.

A la Dra. Esperanza Ruiz por la utilización del equipo de HPLC

A la Dra. Alicia Consolini por colaborar con los ensayos de actividad anti espasmódica en el Laboratorio de Farmacología

Un agradecimiento muy especial

A mi madre, quien me dio la vida y durante toda esta ha estado presente en mi diario caminar con su apoyo y amor materno, a mi familia, hermanos y sobrinos quienes con sus mensajes me han animado a seguir delante de inicio a fin

# 1.- Introducción

---

## 1. - Introducción



Las plantas medicinales constituyen un recurso terapéutico usado tradicionalmente por todos los pueblos. La mayoría de la población mundial no utiliza productos de la industria farmacéutica para tratar sus enfermedades sino que recurre a derivados de plantas que el saber popular considera dotados de propiedades curativas (OMS, 1991; Paladini, 1996; Chiriboga, 1997; Ahmad *et al.*, 2008; Escamilla Perez *et al.*, 2016).

Los científicos aprovechan tal saber para buscar productos con potencial terapéutico, tarea que las nuevas tecnologías y avances en el conocimiento del modo de actuar de las medicinas están haciendo cada vez más eficiente. Se puede decir que, desde tiempos inmemoriales, el hombre ha explorado la naturaleza en pos de compuestos químicos útiles. Los productos naturales ofrecen una gran diversidad estructural y las técnicas modernas de separación, determinación estructural, *screening* y síntesis combinatoria han renovado el interés por los productos obtenidos de plantas, como fuentes de nuevas drogas. Asimismo la introducción de drogas vegetales y sus extractos en forma de medicamentos fitoterápicos, nutracéuticos y suplementos dietarios cambia también el mercado de terapias a base de planta (Saklani y Kutty, 2008; Melo Carneiro *et al.*, 2014).

Ya en 1980, el mercado mundial de medicamentos a base de productos naturales había sido estimado en 8.000 millones de dólares (Farnsworth, 1977; Principe, 1989; Wijsekera, 1991). Desde entonces ha crecido a razón del 10% anual estimándose en un valor de 18.000 millones de dólares en 2005, cifra que se incrementó a 32.900 millones en 2013, con una tasa de crecimiento anual del 11% (Mc Williams, 2006; <http://www.intracen.org/>, 2016).

Como se ve, un gran número de plantas usadas en medicina tradicional se han convertido en parte del sistema médico moderno en todo el mundo (Farnsworth y Morris, 1976; Fabricant y Farnsworth, 2001; Sotero Garcia *et al.*, 2016) Sin embargo, su validación y utilización como productos fitofarmacéuticos requiere de mayor investigación básica y

## 1. - *Introducción*

aplicada para poner este recurso al mismo nivel que otros productos farmacéuticos patentados, logrando así satisfacer los requisitos de eficacia, seguridad y calidad que deben caracterizar a todo medicamento.

Entre más de 260.000 especies diferentes de plantas superiores que crecen en nuestro planeta, se calcula que sólo el 10% ha sido química o biológicamente estudiada. Por esta razón es necesario poner de manifiesto que varias sustancias nuevas de actividad biológica comprobable, podrían ser descubiertas, constituyendo una importante contribución, directa o indirecta, a la terapéutica moderna y a las industrias relacionadas. (Newman y Cragg, 2007).

Existe un consenso general en que si la selección de las plantas a estudiar se hace basándose en el uso tradicional, las probabilidades de una investigación exitosa son mucho mayores (Elisabetsky y Wannamacher, 1993; Gomez Alvarez, 2012).



El doble papel que juegan hoy las plantas medicinales, tanto como fuente de salud como de ingresos económicos para agricultores, comerciantes, recolectores y manufactureros de medicinas basadas en plantas, juega un importante rol en los procesos de desarrollo regionales. No obstante, la materia prima requerida no siempre se encuentra disponible. En algunos casos, las plantas con valor medicinal se encuentran en poca cantidad y esto plantea una amenaza tanto para el bienestar humano como para las especies silvestres (Mulliken, 1998; Mejia y Rengifo, 2000; Acero Duarte, 2000).

Ecuador es un país bendecido de varias formas: su interesante topografía, así como también su geografía y su población multicultural. Pero lo más impresionante es su diversidad biológica. Se estima que en el Ecuador existe mayor número de especies, tanto de animales como de plantas, que en cualquier otra parte del mundo.

Gracias al desarrollo de carreteras modernas y otras facilidades de acceso, durante

## 1. - Introducción

los últimos 40 años se ha hecho posible evaluar con certeza la diversidad que existe en el país; pero por otro lado, desgraciadamente debido a esa misma facilidad de las vías de acceso, el país ha sido deforestado severamente (Dodson, 1998).



Ecuador cuenta con una extensión territorial de 256.370 km<sup>2</sup> ocupando el 0.17% de la superficie del planeta, siendo uno de los países más pequeños de América del Sur. Limita con Colombia al norte, con Perú al sur y al este, y con el Océano Pacífico al Oeste. Es el segundo país con mayor diversidad geográfica del mundo, con cuatro regiones bien marcadas (Costa, Sierra, Oriente y Galápagos). La población aproximada es de 15.936.000 de habitantes, de los cuales el 68,6% son urbanos y el 31,4 % rurales (INEC, 2001; CEPAR, 2015)

Los grupos étnicos están constituidos por un 65% de mestizos, 25% de indios, 7% de caucásicos y 3% de origen africano (INEC, 2001). La mayoría de la población local mantiene sus tradiciones ancestrales en lo referente al uso de remedios naturales y los conocimientos etnobotánicos siguen siendo transmitidos en forma oral, de generación en generación (Naranjo y Escaleras, 1995).



El 18% del territorio nacional es parte del Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Existen en total 35 Áreas Protegidas.

A pesar de esta preocupación por proteger los ecosistemas, el país tiene la segunda tasa de deforestación más alta de América del Sur. (250.000 ha/año) (Dodson, 1998; Endara *et al.*, 2007).

Ecuador ha dado origen a uno de los medicamentos más importantes para la humanidad, obtenido de su árbol nacional: la "quina" (*Cinchona* spp.,

## 1. - Introducción

Rubiaceae), uno de cuyos alcaloides, la quinina, fue y es utilizado para la cura del paludismo (Renner, 1993). Otros ejemplos de compuestos igualmente importantes que provienen de plantas nativas, son el curare, obtenido de *Chondodendron spp.* (Menispermaceae) o *Strychnos spp.* (Loganiaceae), a partir de cuyos alcaloides, la tubocurarina y C-toxiferina, que fueron utilizados en cirugías oftálmicas y en el proceso de anestesia, como miorrelajante; se ha obtenido por semisíntesis la dialilnortoxiferina o alcuronio, empleado en las cirugías de larga duración y en la preparación de la intubación traqueal (Bruneton, 2001); y el Modulador Biológico de la Respuesta Inmune (BIRM), obtenido de *Dulcamara (Solanum dulcamara L.)* el cual “modifica la conducta biológica del tumor cancerígeno y eleva las defensas bajas proporcionando una mejor calidad de vida a pacientes con cáncer y SIDA” (Gallardo, 2006).

Los productos no maderables, en donde encajan las plantas medicinales, constituyen un mercado prácticamente nuevo en Ecuador. A consecuencia del agotamiento de los recursos maderables y debido a la preferencia de la población por los productos de origen natural para el cuidado de la salud, se estima que el 10% de todas las pequeñas industrias en Ecuador se basa en diferentes productos forestales no maderables (Wunder, 1994). Se estima que en Ecuador el 80% de la población utiliza unas 500 plantas medicinales para la atención primaria de su salud (Luna Velez, 2015).

En palabras de Ximena Buitrón (1999), en países como el Ecuador:

*“...reconocidos mundialmente por la riqueza de ecosistemas y diversidad biológica, étnica y cultural, con un valor económico real y potencial tanto a nivel local como Internacional, donde generalmente no se poseen recursos ni tecnologías para conservar y mejorar el uso de los recursos de la biodiversidad, es fundamental llevar a la práctica la frase, ahora célebre pero muy poco aplicada, de ‘conservar con gente’ y aceptar y reconocer que un trabajo de esta naturaleza requiere esfuerzos comunes de todos los sectores, así como compromisos y responsabilidades que generen acciones inmediatas a través de acuerdos multilaterales, tomando en cuenta para cualquier estrategia planteada, nuestra realidad socioeconómica y la presión existente en varios niveles con los intereses de la conservación”.*

## *1. - Introducción*

Como especialista redactora intercultural, Lituma (2014) publica un artículo en el Diario El Comercio de Ecuador donde se informa que La Dirección de Salud de la provincia del Azuay tiene un registro de 315 mujeres que atienden con medicina ancestral.

Según el coordinador zonal de la región 6 del Ministerio de Salud, se ha efectuado un proceso de legitimación de las personas que tienen sus conocimientos en medicina ancestral. Asimismo, ese año hubo 56 talleres con los agentes que practican estos saberes. Además, se impulsan ocho redes con 30 personas que manejan ese conocimiento. El objetivo es que trabajen en coordinación con el Ministerio de Salud, a través de un intercambio de saberes. El cantón Sígsig es uno de los sectores donde se impulsa esta red.

Un ejemplo de ello son las hermanas María del Carmen y María Nieves Yare, de la parroquia Ludo. Estas mujeres suelen atender todos los fines de semana en el Subcentro de Salud de este poblado. Ellas son la cuarta generación de una familia que conoce los 'poderes curativos' de plantas y remedios naturales. Por ello, dividen su tiempo en atender en su casa, en Cuenca, y en el Subcentro de Salud de Ludo.

Según los especialistas, es importante que exista un diálogo entre las medicinas convencional y ancestral, porque las dos son complementarias.

El Dr. Daniel Tamba dice que ha trabajado conjuntamente con parteras indígenas y que en el país existen casas de salud interculturales, denominadas Jambí Huasi en idioma kichwa, donde ellas aplican su conocimiento, principalmente en la ciudad de Otavalo, donde el Dr. Tamba es administrador y director de medicina occidental de uno de estos emprendimientos, y la zona de la Amazonía donde su papel es importante (Cisneros Proaño, 2015).

También se indica que hay que diferenciar a los charlatanes de las personas que manejan este tipo de conocimiento ancestral. Con esto coincide Iñamagua, curandera, al señalar que lo que les certifica es su sabiduría y que sus precios son económicos: de U\$D 2 hasta U\$D 20. Iñamagua atiende en el Subcentro de Salud Pumapungo de la ciudad de Cuenca (Fig. 1). Su deseo es que otras compañeras ocupen este espacio y, también, encontrar nuevos sitios.



## 1. - Introducción

En este sentido, preveían abrir un área de salud en el Municipio del cantón Sígsig. En este contexto las prácticas de los saberes ancestrales y de la medicina tradicional -como el parto natural en las casas, el tratamiento con plantas y hierbas- son algunas de las técnicas que el Estado ha venido reconociendo, a través de la Constitución, desde el 13 de septiembre de 1999.



**Fig. 1: Foto: Diario el comercio: Delfa Iñamagua (curandera)**  
Publicado el 22 febrero, 2012 con 1 Comentario

Según la pagina web EcuadorUniversitario.com, en una publicación del año 2012 se indica que después del decreto constitucional de 1999 el Estado designa a La Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) para la creación de una Coordinación de Saberes Ancestrales

La titular en el año 2012, María Rivadeneira, indicó que la misión de esa Coordinación es fortalecer y potenciar la recuperación de los saberes ancestrales en coexistencia con el conocimiento científico, así como fundamentar científicamente la investigación de los saberes ancestrales e incorporarlos a la cultura científica en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida, las culturas y la soberanía para la consecución del Buen Vivir.

Entre las atribuciones y responsabilidades de la Coordinación de Saberes Ancestrales se encuentran las de:

- \* Coordinar con las instancias pertinentes para el cumplimiento de la normativa internacional, regional y andina en el acceso a los saberes ancestrales para garantizar la distribución justa y equitativa por el uso de los saberes ancestrales en investigaciones desarrolladas a partir de los mismos.
- \* Coordinar la generación de mecanismos de diálogo con las instituciones pertinentes y los pueblos y nacionalidades indígenas, afrodescendientes, montubios y mestizos para la difusión e intercambio de saberes ancestrales.
- \* Incorporar los principios recuperados de los saberes ancestrales a la tecnología implementada para el desarrollo del país.

(Ecuador Universitario, 2012)

### **Fundamentos de la elección del tema**

*O. pyramidale*, conocida como "balsa", es una especie maderable que crece silvestre en la selva amazónica y constituye uno de los principales recursos económicos de Ecuador, donde se la cultiva a gran escala. La madera (leño) se utiliza para la construcción de viviendas y embarcaciones, fabricación de numerosos utensilios de uso doméstico y artesanías, entre otros.

Si bien en distintos países latinoamericanos se han citado diversos usos en medicina popular para la "balsa" (ver cap 2: Antecedentes) en Ecuador, donde la "balsa" constituye el principal recurso maderable, no hay registros de su uso en medicina tradicional, salvo el uso veterinario citado por Vargas Tuqueres (2012) referente a que el leño se utiliza para tratar mordeduras de culebras.

Hasta el momento no se ha hecho en este país un relevamiento sobre el uso popular de esta especie, ni tampoco existen datos farmacológicos o toxicológicos que justifiquen su empleo en terapéutica.

El relevamiento etnofarmacobotánico y el estudio anatómico, así como el reconocimiento de grupos fitoquímicos y la determinación de actividades biológicas, que se han desarrollado en el presente trabajo, pueden resultar especialmente valiosos a la

## *1. - Introducción*

hora de validar el uso tradicional de *O. pyramidale*, en el marco de diálogo intercultural, respeto al ambiente, la naturaleza y la vida que preconiza la Coordinación de Saberes Ancestrales a cargo de la SENESCYT de Ecuador. (Ecuador Universitario, 2012)

La investigación desarrollada en el presente trabajo abre la posibilidad de utilizar subproductos de la industria maderera de la región de Quevedo (hojas y corteza) actualmente desaprovechados, que podrían convertirse en una fuente de ingresos y de puestos de trabajo para la población.

## 2.- Antecedentes

---

## 2.1.- ANTECEDENTES BOTÁNICOS, HABITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA



Según el sistema de clasificación de Cronquist (1981) *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. es una especie perteneciente a la familia Bombacaceae del orden Malvales (Avendaño, 1998).

Esta clasificación ha sido utilizada por numerosos autores, tales como Watson (1992) y Metcalfe y Chalk (1957), Fernández Alonso (2003), Santiana *et al.* (2003), Novara (2012), Sánchez Sánchez y Hernández Cepeda (2004), Rodríguez Velásquez *et al.* (2009); Baum y Oginuma, 1994; Baker, 1968 y otros que tratan a Bombacaceae como una familia independiente, estrechamente relacionada con la familia Malvaceae.

Sin embargo, recientes estudios de filogenia muestran que Bombacaceae no es un grupo monofilético. El trabajo del Angiosperm Phylogeny Group III (Stevens, 2016) no considera a Bombacaceae como una familia, incluyéndola dentro de la familia Malvaceae. (Duarte *et al.*, 2007; Hinsley, 2014; The plant list, 2013; Trópicos, 2016; Cheek, 2006; Daviña y Honfi, 2000; Stewart y Hinsley, 2007).

*O. pyramidale* es una especie arbórea originaria de América tropical, desde el

## *2. - Antecedentes*

sudeste de México hasta Bolivia y hacia el este, a través de Venezuela y las Antillas. En condiciones apropiadas, puede crecer desde el nivel del mar hasta altitudes de ca. 1800 m (Mabberley, 1993).

Para su desarrollo, requiere un clima cálido y húmedo y un suelo rico en nutrientes y bien drenado.

El género *Ochroma* tiene una sola especie (Francis, 2016; Ecured, 2016): *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. que fue publicada en *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis, Beihefte 5: 123* en 1920.

Según las bases de datos IOPI, 2016; The Plant List, 2013; Trópicos, 2016; USDA Plant Database, 2016; MOBOT, 2016), posee numerosos sinónimos:

*Bombax angulata* Sessé & Moc.

*Bombax pyramidale* Cav. ex Lam.

*Bombax pyramidatum* Steud.

*Ochroma bicolor* Rowlee

*Ochroma bolivianum* Rowlee

*Ochroma concolor* Rowlee

*Ochroma grandiflorum* Rowlee

*Ochroma lagopus* Sw.

*Ochroma lagopus* var. *bicolor* (Rowlee) Standl. & Steyerl.

*Ochroma lagopus* var. *occigranatense* Cuatrec.

*Ochroma limonense* Rowlee

*Ochroma obtusum* Rowlee

*Ochroma peruvianum* I.M. Johnst.

*Ochroma pyramidale* var. *bicolor* Brizicky

*Ochroma pyramidale* var. *concolor* (Rowlee) R.E. Schult.

*Ochroma tomentosum* Humb. & Bonpl. ex Willd.

## 2. - Antecedentes

*Ochroma tomentosum* var. *ibarrense* Benoist

*Ochroma velutina* Rowlee

*Ochroma velutinum* Rowlee

Sus nombres vernaculares también son numerosos (Castro, 2013; CONABIO, 2016; SIDALC, 2016; Mejía y Rengifo, 2000; Pérez, 1996; Gómez Álvarez, 2012; Standley, 1923; Stanley y Steyemark, 1949; Varón, 1995). En distintas regiones de Latinoamérica, se lo conoce como:

En América Central: balsa, guano, gatillo, algodón, polak; en Brasil: pau de balsa; en Cuba: ceibón botija, ceibón lanero; en Rep. Dominicana: lana, lanero; en Haití: cotton fleura; en Guadalupe: framager mapu; en Colombia: tocumo, palo de lana; en México: balsa, corcho, jonote real, jopi, jibiguy, pomoy, pomay, mo-ma-ah; pata de liebre; en Perú: topa; en Venezuela: lana de tambor.

Los nombres vernaculares por las que se conoce a esta especie en Ecuador se listarán en el capítulo "Resultados y Discusión".

Se lo describe (Castro, 2013; CONABIO, 2016; SIDALC, 2016; Sandi y Flores, 2016; López Camacho *et al.*, 2005; Watson y Dallwitz, 1992, Bärtels, 2000) como un árbol perennifolio de 20-30 m de altura y 50-90 cm de diámetro, con raíces tubulares pequeñas en los troncos grandes (contrafuertes) (Fig. 2). El tronco es liso, y se ramifica a partir de los 10 m de altura. Corteza externa lisa o con lenticelas, de color pardo oscuro o blanco grisáceo. La corteza interna es fibrosa de color amarillento. La copa es amplia, abierta, con ramas gruesas y extendidas. La madera es muy suave y ligera.



Fig 2. Base del tronco (Foto R. Aguilar, <http://sura.ots.ac.cr/>)



## 2. - Antecedentes

Las hojas están dispuestas en forma alterna, son simples, grandes (13 a 24 cm por 15 a 35 cm) redondeadas a ovadas, con base cordada y 3-5 lóbulos en el ápice, de margen entero, haz verde oscuro, glabro y envés verde claro, pubescente, y venación palmada, con 7-9 nervaduras principales y pecíolos largos, color café-rojo. Posee estípulas foliáceas ovadas de hasta 1,5 cm de largo (Fig. 3).



Fig. 3 Hojas y estípulas (Foto R. Aguilar, <http://sura.ots.ac.cr/>)

Las flores son hermafroditas, grandes (10-17 cm largo), solitarias, dispuestas en el extremo de las ramitas sobre pedúnculos de hasta 20 cm de largo (Fig. 4 y 5). De simetría actinomorfa, cáliz rojizo, tubular con 5 sépalos, corola con 5 pétalos amarillo-blanquecinos con bordes rojizos y ovario súpero, pentalocular con numerosos óvulos anátropos.



Fig. 4. Flor (Foto R. Aguilar, <http://sura.ots.ac.cr/>)

## 2. - Antecedentes



Fig. 5. Flor, detalle (Foto: Hugh Wilson, <http://botany.csd.tamu.edu>)

Androceo de estambres numerosos, adelfos, formando una columna lobada en el ápice (Fig. 5).

Los frutos son cápsulas alargadas (15-25 de largo) con 8-10 costillas longitudinales prominentes y dehiscencia loculicida, conteniendo numerosas semillas y fibras que semejan una especie de algodón (Fig. 6).

Las semillas son elongadas y pequeñas (2 a 5 mm de largo por 1-1,5 mm de ancho) con extremos acuminados y muy livianas (Fig. 6).

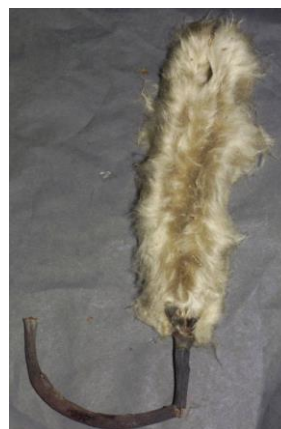


Fig. 6. Fruto y semilla (Foto: Hugh Wilson, <http://botany.csd.tamu.edu>)

## **2.2.- USOS COMERCIALES**

Por ser un árbol de crecimiento rápido que produce una madera de muy baja densidad, liviana y blanda con un grano abierto de mediano a grueso, resulta un recurso maderable susceptible de explotación inmediata.

Su flotabilidad como madera es insuperable. De ahí su nombre, por usarse como elemento constructor de balsas.

Sus características de flotabilidad, aislante acústico y térmico, suavidad y fortaleza hacen que sea muy apreciada para la manufactura de numerosos objetos tales como:

### **Balsas y Salvavidas**

Uso que se remonta a muchos siglos, y que continúa en nuestros días. Thor Heyerdahl usó nueve troncos de "balsa" provenientes de la zona de Quevedo en la construcción de la balsa Kon-tiki en su expedición a la Polinesia que partió desde el Callao, en el Perú (Fig. 7).



Fig. 7. Balsa Kon-Tiki.  
<http://www.todayifoundout.com/>

Tiene consideración de madera dura o noble.

Su densidad oscila entre los 100 a 200 kg/m<sup>3</sup>, con una típica de 140 kg/m<sup>3</sup> (cerca de 1/3 de la densidad de otras maderas más duras). A partir de su madera se han elaborado tanto salvavidas como artículos de navegación, además de esquís acuáticos e incluso viviendas flotantes (Ecured, 2016).

### **Construcción**

En la construcción de viviendas como chapas de interiores, en donde se necesite fortaleza y propiedades aislantes. (Lorenzi, 1992)

### **Modelismo**

Actualmente su madera tiene un amplio uso en arquitectura y aeronáutica por su facilidad de corte y bajo peso, esto lo hace un material muy popular incluso para

## 2. - Antecedentes

fabricación de estructuras a gran escala, desde maquinas aéreas a edificaciones.

### Artesanías

La madera como materia prima es usada para la industria de muebles y artesanías. Tiene mucha importancia en la economía del Ecuador y es una buena opción para dar valor agregado, obtener mejores ingresos económicos y restar la presión hacia los recursos del bosque. Desde una perspectiva sustentable integral a los finqueros, podría ser la alternativa para mejorar la economía de la población que viven en las provincias donde existe esta especie, sea en bosques nativos o plantaciones.

La madera de balsa al poseer una densidad baja, que oscila entre 100 a 200 kg/m<sup>3</sup>, con una típica de 140 kg/m<sup>3</sup> (cerca de 1/3 de la densidad de otras maderas). Esto la convierte en un material popular para trabajos manuales en el mundo. Propiedades que han hecho de la madera de balsa ganarse buena reputación en relación con su bajo peso y baja densidad. A pesar de ser tan liviana es resistente y flexible, haciendo de ésta una madera muy manuable que permite realizar finas terminaciones (Fig. 8).



Fig.8. Escultura de madera balsa realizada por Jeffro Uitto (<http://muycompartible.com>)

Entre estas esta artesanías decorativas y ornamentales, que se comercializan en las tiendas y mercados de la amazonia ecuatoriana, que satisface el interés de turistas nacionales e internacionales por adquirir un recuerdo de su viaje en esta región del Ecuador; convirtiéndose en una alternativa que ayuda limitar el tráfico de animales silvestres y otras maderas más complejas de propagar.

Un buen ejemplo es el procesamiento de la balsa que se da en una iniciativa particular que se desarrolla en la ciudad de El Puyo, denominada "La Casa de la Balsa". Los diseños que mayor acogida tienen en el mercado artesanal son las figuras de aves de la Amazonía: loros, tucanes y papagayos, también los peces, serpientes,

## *2. - Antecedentes*

águilas, búhos, frutas, fruteros, palillos, aretes y llaveros. El tamaño de las piezas varía de acuerdo a la figura (existen figuras desde 3 cm hasta 2 metros de alto). En esta experiencia de utilización de la balsa en Ecuador hábiles artesanos trabajan la balsa, cuyo proceso se sistematiza en esta experiencia con el afán de difundir la opción hacia otros interesados (Francis, 2016).

### **Lana**

El "karok" o "lana" que acompaña a las semillas, se usa para rellenar almohadas, cojines, en tapicería (Acero Duarte, 2005).

### **Corteza**

La corteza viva es una buena fibra de amarre para la construcción y para asegurar paquetes. (Acero Duarte, 2005)

## **2.3.- USOS MEDICINALES TRADICIONALES**

En diversos países de Latinoamérica, se han registrados distintos usos de la medicina tradicional para la "balsa".

Así, en Bolivia (Moretti *et al.*, 1990) el agua donde se ha triturado la medula se emplea en forma de enemas contra la fiebre intestinal.

En República Dominicana, Cordero (1978) cita el uso de distintas partes de la planta, tales como cataplasmas hechas con las hojas como antidiarreico, infusión de las flores como expectorante, infusiones de corteza como emolientes y diuréticos y para tratar forúnculos, la corteza interna como emético.

En Costa Rica (Castro, 2013), la decocción de la corteza se administra como febrífugo, la raíz para tratar cólicos y diarreas y las cataplasmas de las hojas con aceite de castor, para aliviar dolores reumáticos, el jugo de los frutos se usa como expectorante y las infusiones de flores y corteza como eméticos. En Colombia, Pérez-Arbelaez (1956) y Cárdenas *et al.* (2000) citan un uso veterinario para las infusiones de corteza, para expulsar la placenta en las vacas luego del parto.

Sin embargo, en Ecuador, país donde la "balsa" constituye el principal recurso maderable, no hay registros de su uso en medicina tradicional, salvo el uso veterinario

## 2. - Antecedentes

citado por Vargas Tuqueres (2012) referente a que el leño se utiliza para tratar picaduras de culebras.

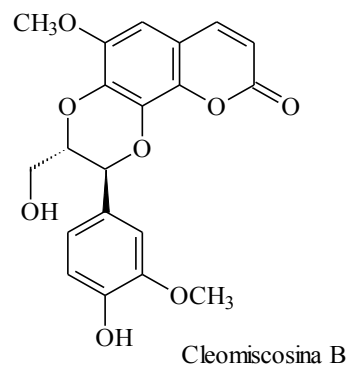
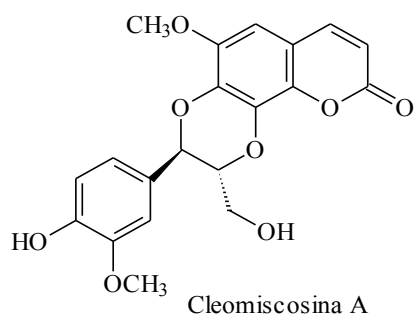
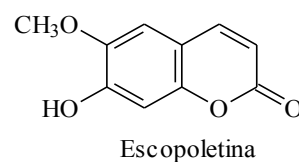
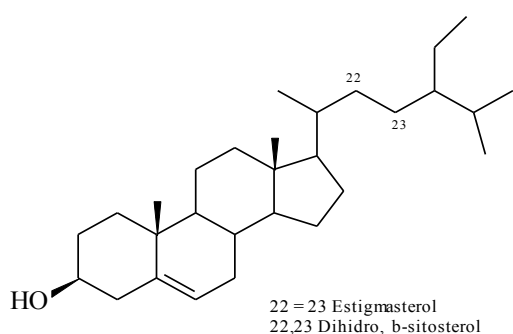
La recopilación de la información sobre los usos tradicionales que se le dan a *O. pyramidale* en una región de Ecuador y las posibles razones de la falta de difusión de ese conocimiento son parte del trabajo desarrollado en esta tesis.

### 2.4.- ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS

Los principales estudios químicos sobre los compuestos presentes en *O. pyramidale* fueron realizados sobre la corteza y el leño de plantas cultivadas en Brasil, entre los años 1995 y 1998.

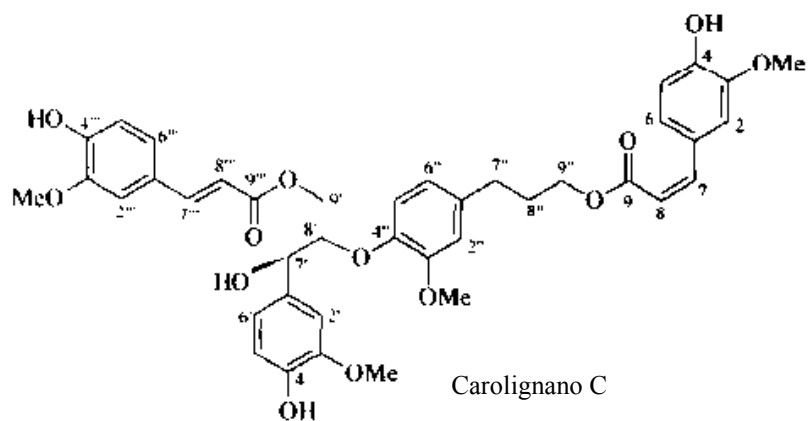
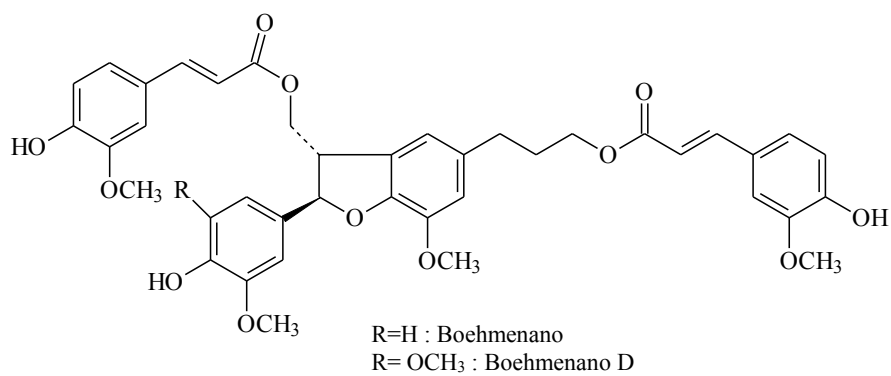
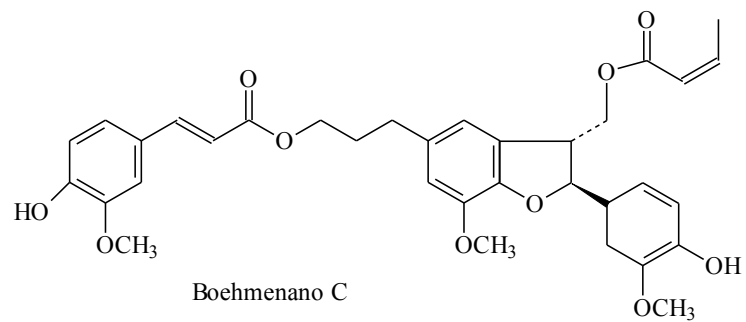
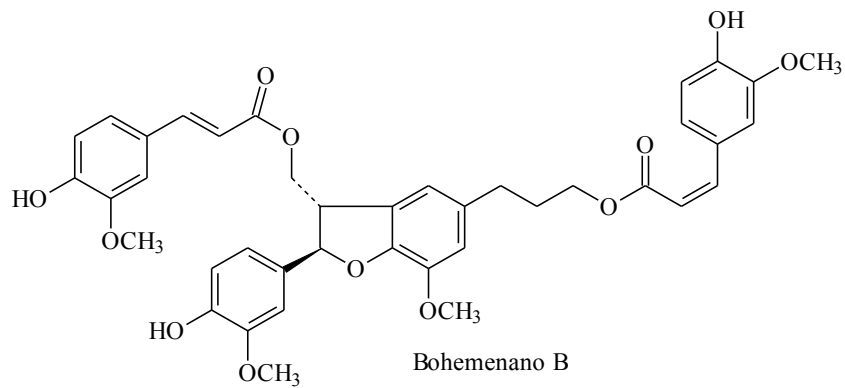
Del leño fueron aislados (Fonseca da Paula *et al.*, 1995) una mezcla de ácidos grasos constituida por ácidos esteárico, palmítico, oleico, linoleico, linolénico.

Los mismos autores reportaron la presencia de esteroides:  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol y las cumarinas escopoletina, cleomiscosina A y cleomiscosina B



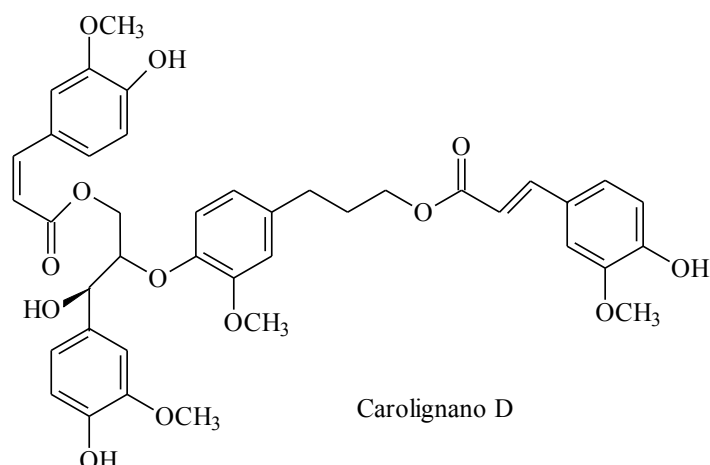
## 2. - Antecedentes

Esta misma autora aísla a partir de la corteza, nueve lignanos denominados bohemenanos B-D y carolignanos A-F (Fonseca da Paula *et al.*, 1996)



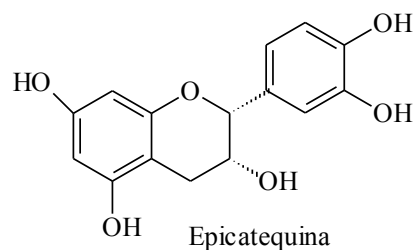
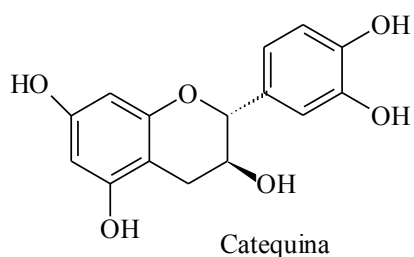
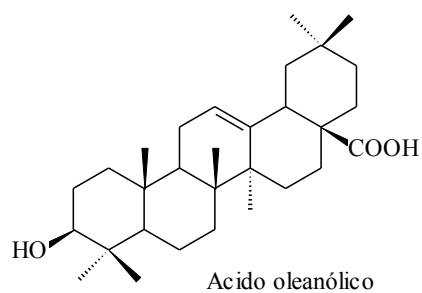
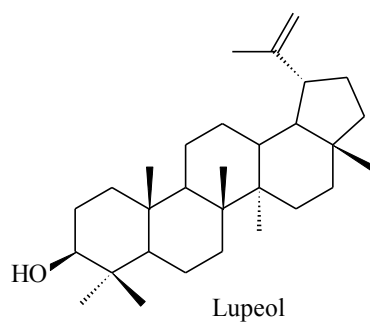


## 2. - Antecedentes



En el año 1998, Fonseca da Paula *et al.* (1998 y 1999) reportan el aislamiento a partir de la corteza de ácidos grasos y triglicéridos, además de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, daucosterol, 3-O-glucósido del estigmasterol y un poliol: el manitol.

En las hojas de *O. pyramidale* cultivada en México, se ha determinado la presencia de lupeol, ácido oleanólico, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, catequina, epicatequina y la C-glucoflavona vitexina (Vázquez *et al.*, 2001).



## **2.5.- ANTECEDENTES DE TECNICAS UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS FITOQUIMICOS Y DE ACTIVIDADES BIOLOGICAS**

Además de los métodos usuales referentes a la obtención de parámetros micrográficos (Sass, 1958; Berlyn y Miksche, 1976; D'Ambrogio, 1986; Carpano *et al.*; 1994) y la detección de distintos grupos fitoquímicos en el material vegetal analizado (Domínguez, 1973), en el curso del presente trabajo se recurrió al empleo de distintos métodos y técnicas recomendados por la bibliografía especializada:

### **2.5.1.- Cromatografía en capa delgada (CCD) Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

Estas técnicas cromatográficas están incluidas en las principales Farmacopeas del mundo, incluyendo la Farmacopea Argentina y Latinoamericanas, Farmacopea de Estados Unidos, Farmacopea China, Farmacopea Europea, recomendaciones de la OMS sobre el análisis de plantas medicinales y medicamentos herbarios (Ankli *et al.*, 2008; Bandaranayake, 2006).

Tanto La CCD como la CLAR proveen valiosa información a la hora de establecer la identidad de una planta o sus extractos, pudiendo obtenerse información cuali y cuantitativa sobre la presencia o ausencia de distintos metabolitos secundarios (Bandaranayake, 2006).

Estas técnicas son ampliamente utilizadas tanto para el análisis cualitativo de compuestos orgánicos como para el aislamiento de componentes individuales a partir de mezclas multicomponentes, análisis cuantitativo y aislamiento a escala preparativa. La preparación de las muestras es más simple y pueden ser analizadas varias muestras y estándares en forma simultánea sin interferencias (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008; Skalicka *et al.*, 2008). Entre sus ventajas se cuenta la gran diversidad de sistemas que pueden utilizarse.

Los perfiles cromatográficos, tanto por CCD como por CLAR, tienen una gran importancia en el análisis de mezclas complejas, como es el caso de los extractos vegetales, permitiendo distinguir entre distintas clases químicas (Zeng y Teng, 2007). Son adecuados para el control de la identidad y pureza de las drogas vegetales, así como para detectar posibles adulteraciones y sustituciones. También pueden ser

## *2. - Antecedentes*

utilizados para analizar mezclas de drogas y preparaciones fitoquímicas (Wagner y Bladt, 1996).

Tal como se describe en “Materiales y métodos”, los extractos metanólico y acuoso (decocción) de las hojas de *O. pyramidale* fueron cromatografiados por CCD contra testigos en distintos sistemas de solventes que se seleccionaron de acuerdo a los grupos fitoquímicos que se esperen encontrar en ellos.

De modo similar se procedió para efectuar la CLAR de estos mismos extractos. La elección de las condiciones óptimas para llevar a cabo las cromatografías se realizó recurriendo a la bibliografía especializada (Cseke *et al.*, 2006)

### **2.5.2.- Actividad tripanocida**

La enfermedad de Chagas, o Chagas - Mazza, en honor a sus descubridores en Brasil y Argentina, es una parasitosis endémica de América Latina que afecta a unas 8 millones de personas en nuestro continente. Se extiende especialmente por toda Latinoamérica y se la asocia con la pobreza y deficientes condiciones de vida (viviendas precarias, falta de educación, malas condiciones sanitarias) (MSAL, 2016).

Es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, siendo la principal vía de transmisión la picadura de un insecto hematófago: la vinchuca, *Triatoma infestans*, que actúa como vector. También existe la transmisión madre a hijo durante el embarazo, o a través de transfusiones de sangre o transplantes (MSAL, 2016).

El ciclo biológico del parásito presenta tres formas (Fig. 11): una forma no flagelada: amastigote y dos formas flageladas: el epimastigote, que prolifera en el intestino del insecto vector y el tripomastigote, responsable de la infección del huésped (hombre u otros mamíferos como perros).

La fase crónica de la enfermedad se caracteriza principalmente por cardiopatía severa que se manifiesta como una cardiomegalia; también pueden presentarse megaesófago, megacolon y problemas neurológicos (Bellera, 2014; Haberland *et al.*, 2013; Rodriques Coura y de Castro, 2002). La tripanosomiasis es una de las enfermedades "huérfanas" u "olvidadas" (Rodríguez Coura y Albajar 2010; WHO, 2013).

## 2. - Antecedentes

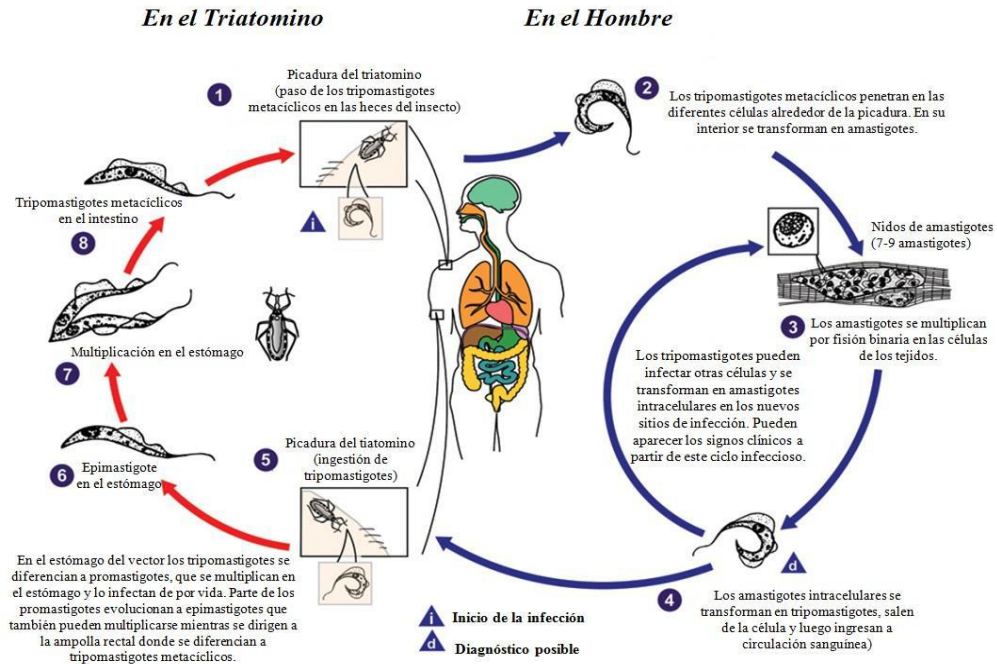
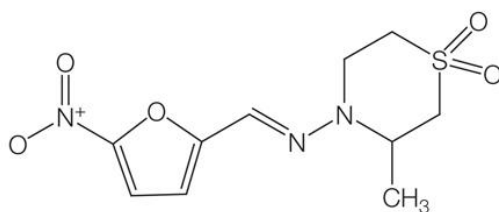
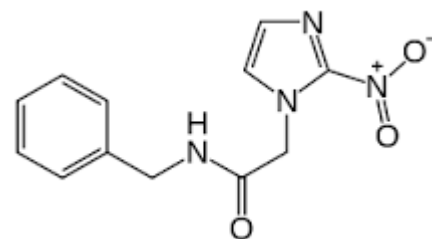


Fig. 9. Ciclo biológico del *T. cruzi* (tomado de Bellera, 2014)

Las grandes compañías farmacéuticas no hallan rentable invertir tiempo y recursos en el desarrollo de fármacos para atender esta enfermedad, y al momento sólo existen dos fármacos que se utilizan: nifurtimox y beznidazol (Bellera, 2014) que si bien son útiles, pueden generar resistencia en algunas cepas del parásito y además tienen numerosos efectos adversos y secundarios tales como cólicos, vómito, anorexia, dermatopatías alérgicas, insomnio, linfadenopatías y dolor muscular, depresión de la médula espinal, trombocitopenia y agranulocitosis, polineuropatía, parestesia y polineuritis de nervios periféricos, que hacen que el paciente tienda a abandonar el tratamiento (Bellera, 2014; Parker y Sethi, 2011; Viotti *et al.*, 2009).



Nifurtimox



Benznidazol

## *2. - Antecedentes*

De allí que las plantas se constituyen en una buena alternativa para la obtención de nuevos principios activos, con menos efectos colaterales, que puedan combatir al parásito y aliviar los síntomas de la enfermedad (Tenorio, 2006; Espinoza *et al.*, 2009; Valencia *et al.*, 2011).

### **2.5.3.- Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos**

#### **Oxido nítrico e inflamación**

La inflamación es una reacción de tipo protectora que surge en respuesta a irritación alérgica o química, heridas o infecciones; se caracteriza por dolor, calor, rubor, hinchazón que resultan de la vasodilatación que produce incremento del aporte de sangre y aumento de los espacios intercelulares que permite el movimiento de leucocitos, proteínas y fluidos a las zonas inflamadas (Iwalewa *et al.*, 2007).

La respuesta inflamatoria también está asociada a varias enfermedades como aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad de Crhon, asma, (Barreiro *et al.*, 2010), artritis gotosa (Dalbeth y Haskard, 2005), etc.

En el proceso inflamatorio se produce la acumulación en el sitio afectado de varios factores solubles que intervienen en el reclutamiento de leucocitos, activación de células residentes (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos tisulares y mastocitos) así como de células reclutadas (monocitos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos). Estos factores son responsables de efectos sistémicos tales como fiebre, caquexia, hipotensión, síntesis de proteínas de la fase aguda de la inflamación, leucocitosis, etc. (Feghali y Wright, 1997).

El óxido nítrico constituye uno de los mediadores proinflamatorios (Fermor *et al.*, 2007) que está vinculado a una gran variedad de efectos biológicos relacionados con su papel fisiológico, como la homeostasis vascular y neurotransmisión; o actuando como mediador proinflamatorio, como en la defensa contra agentes infecciosos (Walker *et al.*, 1997) como ocurre en el shock séptico e inflamación (Yang *et al.*, 2009).

El descubrimiento de la participación del óxido nítrico en las respuestas defensivas e inmunes se remonta a los trabajos de Stuehr y Marletta con macrófagos murinos, quienes constataron la producción de nitritos y nitratos en respuesta a la presencia de lipolisacáridos bacterianos y probaron que un compuesto con la reactividad del óxido nítrico era el intermediario en el proceso; luego Hibbs *et al.*

## 2. - Antecedentes

demonstraron que este gas era la molécula efectora de la actividad bactericida mediada por macrófagos (Korhonen *et al.*, 2005).

El óxido nítrico es sintetizado por enzimas denominadas Óxido Nítrico Sintetas (ONS) a través de una reacción de oxidación que involucra a 5 electrones y que produce como intermediario a  $N_G$ -hidroxi-L-arginina; los sustratos para esta reacción son el aminoácido arginina, oxígeno molecular, nicotinamida y adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) y los cofactores que se requieren son tetrahidrobiopteridina, (BH<sub>4</sub>) dinucleótido de adenina y flavina (FAD) y el mononucleótido de flavina (FMN) (Govers y Rabelink, 2001).

Existen tres isoformas diferentes de Oxido Nítrico Sintetas:

- La Oxido Nítrico Sintasa Neuronal o Tipo I (Neuronal Oxide Nitric Synthase o nNOS): se expresa de forma constitutiva y predominantemente en el Sistema Nervioso Central y Sistema Nervioso Periférico, su activación es dependiente del aumento de los niveles de Calcio citosólico.
- Oxido Nítrico Sintasa Inducible o Tipo II (Inducible Oxide Nitric Synthase o iNOS): No se detecta su expresión en la mayoría de células y sólo se sintetiza tras estímulos por productos microbianos como Lipopolisacáridos, RNA de doble cadena (dsRNA) o por citocinas proinflamatorias como Interleucina-1(IL-1), Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interferón  $\gamma$ .
- Oxido Nítrico Sintasa Endotelial o Tipo III (Endothelial Oxide Nitric Synthase o eNOS): se expresa de forma constitutiva y principalmente por las células endoteliales; su activación también es dependiente del aumento de los niveles de calcio citosólico (Beck *et al.*, 2004).

A nivel molecular las acciones del NO pueden dividirse en tres categorías:

- Regulación de la actividad de enzimas que tiene como grupos prostéticos a metales de transición como Fe, Cu y Zn y que pueden reaccionar directamente con el NO.

## 2. - Antecedentes

- El NO puede reaccionar con grupos tiol de las cisteínas de proteínas en una reacción conocida como N-nitrosilación y por la cual puede modificar sus actividades.
- El anión superóxido puede reaccionar muy rápidamente con el NO y de esta manera generar el radical peroxinitrito (ONOO-) que es un agente nitrante y poderoso oxidante que puede reaccionar con múltiples blancos celulares (Beck *et al.*, 2004).

Dado el papel relevante que desempeña el óxido nítrico en enfermedades con alta prevalencia como osteoartritis y artritis reumatoide ha existido considerable interés en desarrollar inhibidores de la producción de óxido nítrico (Fermor *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2007).

En la medicina tradicional existen plantas que han sido muy utilizadas para combatir la inflamación; un sitial preponderante lo tiene el Sauce (*Salix sp.*). Ya Hipócrates en el siglo V A.C. describió el efecto calmante de una sustancia amarga obtenida del sauce blanco (*Salix alba* L.). Celsus en el año 30 AC quien mencionó el uso de extractos de las hojas de esta planta para aliviar los síntomas de la inflamación que él describió como rubor, calor, dolor y tumor (Silver Highfield y Kemper, 1999).

Otras plantas con varios siglos de uso como antiinflamatorio son el álamo (*Populus spp.*), y la llamada “reina de los prados” (*Filipendula sp.*, antes *Spiraea sp.*) que comparten con el sauce uno de los metabolitos a los que se le atribuyó el efecto terapéutico: el ácido salicílico (Vane y Botting, 1987).

Muchas investigaciones se han realizado sobre plantas con actividad antiinflamatoria y de los principios activos responsables de esta acción, dentro de los que destacan la curcumina (*Curcuma longa*), el partenólido (*Tanacetum parthenium*), el 1,8-cineol (*Eucalyptus sp.*), las pseudopterosinas (*Pseudopterogorgia elisabethae*), (Gaofeng Yuan *et al.*, 2006), flavonoides (Pham-Huy *et al.*, 2008), etc.

### 2.5.4.- Actividad antibacteriana e inhibidora de la producción de biofilm

*O. pyramidale* es utilizada por los habitantes de pueblos originarios de Ecuador, con diversos propósitos medicinales, algunos de los cuales (tratamiento de



## 2. - Antecedentes

enfermedades venéreas, heridas, problemas renales) estarían relacionados con la actividad antibacteriana que tendrían sus extractos.

A fin de evaluar esta supuesta actividad, se ensayaron los posibles efectos antibacterianos de extractos de hojas y corteza de *O. pyramidale*, determinándose los porcentajes de inhibición del crecimiento e inhibición de la formación de biofilm, que producen frente a *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativo).

*S. aureus*, bacteria Gram positiva, es una de las causas mas frecuentes de infecciones hospitalarias, especialmente en las unidades de terapia intensiva, e infecciones de dispositivos medicos permanentes en los que juega un importante papel la formación de biofilm (Otto, 2008)

*P. aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista, Gram negativa, responsable de infecciones agudas y crónicas. Mas allá de su resistencia natural, su capacidad de formar biofilm conspira contra la efectividad de los sistemas de defensa del huésped y la antibioterapia (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

El biofilm es una comunidad compleja de bacterias embutidas en una matriz auto producida, que se adhiere a una superficie inerte, como la de un material de uso hospitalario, o de un organismo vivo. De este modo, los microorganismos son más resistentes a la acción de los antibióticos y al sistema inmunológico de las células planctónicas (Socolsky *et al.*, 2010; Lister y Horswill, 2014)

Las células adheridas que inician la formación del biofilm sobre una superficie están rodeadas por pequeñas cantidades de exopolisacárido. Este material polimérico está compuesto por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Davies *et al.* (1998) han demostrado que en *P. aeruginosa* los genes responsables de la producción de alginatos comienza a regularse después de los 15 min del primer contacto celular con la superficie.

Según diversos autores (Busscher *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1998; Stoodley *et al.*, 2002; Allison *et al.*, 1998; Characklis, 1981) la formación de un biofilm tiene básicamente cinco etapas (Fig. 12):

## 2. - Antecedentes

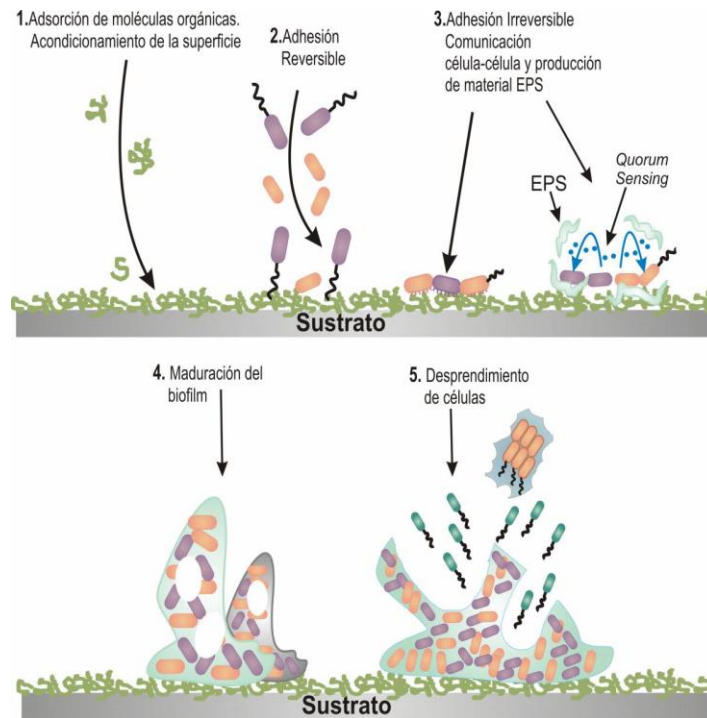


Fig. 10. Esquema representando las etapas presentes durante el desarrollo de un biofilm sobre un sustrato (tomado de Davies *et al.*, 1998)

- 1) Acondicionamiento de la superficie
- 2) Adhesión reversible
- 3) Adhesión irreversible
- 4) Maduración del biofilm
- 5) Desprendimiento de bacterias

Por lo tanto, los estudios sobre los efectos de los compuestos naturales en la producción de biofilm por bacterias patógenas, particularmente *S. aureus* y *P. aeruginosa*, son importantes para el descubrimiento de nuevas sustancias para controlar la patogenicidad microbiana.

## 3.- Hipótesis y Objetivos

---

### 3. -Hipótesis y Objetivos

Si bien en las dos regiones estudiadas se asocia el término "balsa" con *O. pyramidale*, solamente en la región del Puyo, próxima a la Amazonía ecuatoriana, se le reconocen a las hojas y corteza de esta especie usos medicinales, siendo utilizada por los sanadores Shuar y Cofanes de la región para tratar diversas dolencias. En tanto que en la región de Quevedo, donde existen extensas plantaciones de *O. pyramidale*, no se le asigna a esta especie ningún valor medicinal.

Las dolencias mas comúnmente tratadas con hojas y corteza de "balsa" están asociadas con diversos procesos inflamatorios, infecciosos y parasitarios y son descritas como "para cuando tenga una inflamación", "para las enfermedades venéreas", "para las heridas", "para problemas del riñón", "para el estreñimiento y parásitos del ganado vacuno".

Surgen así una serie de preguntas relacionadas con las observaciones realizadas:

- 1) ¿A que especies llaman "balsa" en Puyo?
- 2) ¿Todas las especies llamadas "balsa" en Puyo se usan como medicinales?
- 3) ¿Que usos, medicinales o no, se le reconocen a las especies denominadas "balsa" en Puyo?
- 4) ¿A que especies llaman "balsa" en Quevedo?
- 5) ¿Que usos, medicinales o no, se le reconocen a las especies denominadas "balsa" en Quevedo?
- 6) ¿Porque los conocimientos sobre usos medicinales de *O. pyramidale* que poseen en el Oriente (Puyo), son ignorados por los sanadores de la Costa (Quevedo)?
- 7) ¿Porque los sanadores de Puyo utilizan hojas y corteza "para la inflamación"?
- 8) ¿Porque los sanadores de Puyo usan emplastos de las hojas para las "heridas"?
- 9) ¿Porque los sanadores de Puyo usan la corteza "para el riñón"?
- 10) ¿Porque las "hojas y savia de la corteza", mezcladas con agua, se usan "para problemas de estreñimiento y parásitos del ganado"?

Estas preguntas conducen a la formulación de las siguientes hipótesis:

#### Hipótesis

- 1.- De los habitantes de dos regiones ecuatorianas pertenecientes a la Amazonía u Oriente y a la Costa, sólo los de la región de Puyo (Amazonía) utilizan *O. pyramidale* con fines medicinales debido a la falta de difusión de los saberes ancestrales.
- 2.- Las hojas y corteza de *O. pyramidale* son utilizadas tradicionalmente por sanadores de las etnias Shuar y Cofanes para el tratamiento de una serie de dolencias descritas como: "para cuando tenga una inflamación", "para las enfermedades venéreas", "para las heridas", "para problemas del riñón", "para el estreñimiento y parásitos del ganado vacuno", por lo que es esperable que alguno de los extractos obtenidos o los compuestos presentes en *O. pyramidale* presenten actividades biológicas relacionadas con la inhibición de mediadores pro-inflamatorios y/o acción antibacteriana, antiparasitaria, antifúngica, citotóxica o antiespasmódica.

Las hipótesis planteadas se desarrollarán cubriendo los siguientes objetivos:

#### Objetivo general

Contribuir a la revalorización de la flora medicinal latinoamericana.

#### Objetivos específicos

- \* Efectuar un relevamiento de las especies conocidas como "balsa" en las regiones ecuatorianas de Puyo (Amazonía) y Quevedo (Costa).
- \* Establecer los usos registrados para *O. pyramidale* en las regiones ecuatorianas de Puyo (Amazonía) y Quevedo (Costa), analizando las diferencias existentes entre ambas regiones y sus posibles causas.
- \* Establecer parámetros micrográficos de las hojas de *O. pyramidale* que puedan contribuir a una eventual identificación de las mismas.
- \* Establecer cuáles son los grupos fitoquímicos presentes en extractos de hojas de *O. pyramidale* recolectadas en el área de estudio.

### *3. -Hipótesis y Objetivos*

- \* Identificar los flavonoides presentes en hojas de *O. pyramidale* recolectadas en el área de estudio.
  
- \* Evaluar distintas actividades biológicas relacionadas con los usos medicinales tradicionales de la hoja y corteza de *O. pyramidale*.
  
- \* Establecer perfiles cromatográficos (CCD y CLAR) para los extractos obtenidos, que contribuyan a la determinación de la genuinidad de las drogas vegetales seleccionadas, o su adulteración, con miras a un eventual control de calidad y monografía farmacopeica.
  
- \* Contribuir con el desarrollo de programas nacionales e internacionales para implementar el cultivo de plantas autóctonas y su explotación controlada cuando estas se transformaren en materia prima de extracción de productos naturales, evitando la depredación de la flora silvestre.
  
- \* Constituir grupos interdisciplinarios en el estudio de las plantas medicinales latinoamericanas de uso tradicional.

## 4.- Materiales y Métodos

---

## 4.1.- RELEVAMIENTO ETNOFARMACOBOTÁNICO.

### 4.1.1.- Área de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en dos ciudades de la República del Ecuador, Quevedo y Puyo, entre los años 2013 y 2016.

Se recopiló información sobre la identidad, el uso popular y tradicional y las partes utilizadas de las plantas denominadas "balsa", en los cantones de Puyo, región de la Amazonia Ecuatoriana donde aun se conserva el uso tradicional de estas plantas; y Quevedo, región de la Costa Ecuatoriana, zona agrícola-forestal donde existen cultivos tecnificados a gran escala de *O. pyramidale*. (Fig. 9)



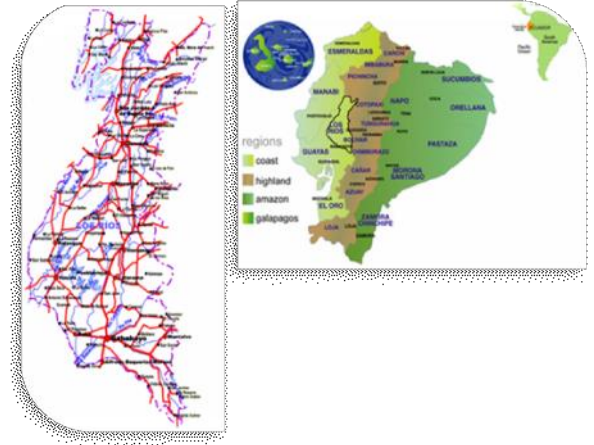
Fig. 11. Ubicación de las áreas en estudio

(Tomado de <http://www.ecuadornoticias.com/search/label/MAPA%20ECUADOR?updated-max=2012-07-22T23:06:00-07:00&max-results=8&start=24&by-date=false>)



#### 4. -Materiales y Métodos

a) **Ciudad Quevedo:** cabecera del Cantón del mismo nombre, está situada en la región de la Costa sobre el Océano Pacífico, al oeste de la Cordillera de Los Andes. Se encuentra a 74 msm, entre los últimos pliegues andinos y las llanuras de la costa, ubicada al 1° 20' 30" de Latitud Sur y los 79° 28' 30" de Longitud occidental, dentro de una zona subtropical, en el centro de la región litoral.



Es la principal Cabecera Cantonal de la provincia de Los Ríos, catalogada como la quinta ciudad en importancia del Ecuador. Con una población aproximada de 300.000 habitantes, presenta un clima tropical húmedo, con una temperatura media de 24°C.

El tipo de suelo predominante es derivado de las cenizas volcánicas, lo que le asegura una buena fertilidad y alta retención de humedad.



Quevedo es considerada el centro comercial, aportando al país divisas provenientes de la exportación de sus productos agrícolas, tales como banana, café, cacao, palo de balsa, caucho, palma africana, frutales, soja y maíz, entre otros. (Municipalidad de Quevedo, 2010).

b) **Ciudad Puyo:** cabecera del cantón del mismo nombre, ocupa una posición central en la Región Amazónica del Ecuador o región del Oriente, próxima a la selva ecuatoriana. Su nombre deriva del lenguaje kichwa ("Puyu") y significa neblina o nublado, haciendo referencia a las características húmedas de la zona.

Situada a 490 msm, a una latitud de 0° 59' -1" S y a una longitud de 77° 49' 0" O, se encuentra en los flancos externos de la cordillera oriental de Los Andes.

## 4. -Materiales y Métodos

Es una ciudad pequeña, de 33 000 habitantes, que en los últimos años ha aumentado notablemente su oferta turística, especialmente en las actividades ecológicas y de aventura.

Tiene una gran riqueza hidrológica en sus alrededores: el río Puyo corre al este de la ciudad y el río Pambay cruza los barrios del norte, desembocando en el río Puyo a la altura del mirador del paseo turístico.

Posee un clima tropical monzónico con precipitaciones constantes a lo largo del año, por lo que no hay una estación seca bien definida. Las temperaturas oscilan entre 15°C y 32°C. La temperatura promedio anual es de 20°C.

Por estar situada en la zona ecuatorial, tiene solamente dos estaciones, siendo el calor constante en el clima local. No existen los días fríos durante el invierno. Tiene un invierno lluvioso, pero el verano ofrece un clima muy diferente. A pesar de que julio y agosto son los meses más secos, se mantienen algunos períodos de aguaceros. Los días soleados y el buen tiempo son usuales y las temperaturas son más elevadas.



### 4.1.2.- Perfil de los entrevistados

La información fue recolectada mediante entrevistas y encuestas anónimas semi-estructuradas entre hombres y mujeres, de dos grupos poblacionales: público en general y curanderos o sanadores integrantes de los pueblos originarios Shuar y Cofanes (Ramos *et al.*, 2011). A partir de los datos recogidos en las entrevistas se pudo elaborar una lista de especies conocidas con el nombre vernáculo "balsa" o el término equivalente en el idioma kichwa de la sierra, sus usos artesanales, sus aplicaciones terapéuticas, las partes utilizadas, formas de preparación y administración. (Ramos *et al.*, 2011; Reyes, 2013).

Se entrevistaron un total de 210 personas entre hombres y mujeres. Todos eran personas adultas, con una edad promedio de entre 35 y 60 años de edad, habitantes del área en estudio (zonas rurales y una zona urbana de las ciudades de Quevedo y

#### 4. -Materiales y Métodos

Puyo); de condición económica baja a media, con un nivel de instrucción diverso (desde nivel primario hasta universitario) y un amplio espectro en lo que se refiere a su ocupación o situación laboral: amas de casa, técnicos, agricultores, vendedores ambulantes, profesionales, enfermeras, etc.

El total de entrevistados se dividió en dos grupos:

##### **Grupo 1: Sanadores:**

En la ciudad de Quevedo fueron cinco entrevistadas, en su totalidad mujeres.

En la ciudad del Puyo fueron también cinco los entrevistados, cuatro mujeres y un hombre, pertenecientes a las etnias Cofanes y Shuar. Esta última, es conocida también como Jíbaros, aunque este término es considerado despectivo y altamente ofensivo por los Shuar.

Todos los entrevistados se dedican a la actividad de “sanar” con plantas, desarrollando su actividad en el área en estudio, lo que los convierte en referentes respecto a los hábitos medicinales del resto de la población relevada, pudiéndose así obtener información acerca de los



<http://gruposetnicosute2013.blogspot.com.ar/>

conocimientos y prácticas en el uso tradicional de plantas medicinales.

Todos ellos obtuvieron sus conocimientos por transmisión oral de sus mayores (tatarabuela, bisabuela, abuela, madre) y también buscaron capacitación en el área de la Fitomedicina, a través de cursos, charlas, capacitaciones del Ministerio de Salud, concurrencia a Centros de capacitación profesional, organizados por el Estado ecuatoriano, a través del Ministerio de Salud o por empresas farmacéuticas privadas, por lo que tenían ciertos conocimientos técnicos.



A Cofan shaman. Photo: Thomas Muller

### **Grupo 2: Habitantes no sanadores:**

Constituido por cien entrevistados por cada zona de estudio, que no se dedicaban a la actividad de “sanar”. Estas personas fueron contactadas en cualquier parte de la zona de estudio, tanto rural como urbana, de Quevedo o del Puyo.

### **4.1.2.- Recolección de datos**

#### **4.1.2.1.- Entrevista**

Para el **grupo 1 (sanadores)**, se implementó la técnica de observación directa y entrevista confidencial (Fernández, 2005; Tamayo, 2007; Morales Lizarazo, 2010) en la modalidad presencial, con consentimiento informado, aplicando el método de asociación de ideas donde fluían preguntas a medida que la conversación progresaba (Arruda Camargo, 1998).

Se indagó solamente sobre las plantas que ellos denominaban como "balsa" o sinonimias de este nombre.

Los entrevistados, sobre todo los de la región del Puyo, hicieron especial hincapié en la reserva de sus identidades y datos personales, por la estrecha cercanía que poseían con las comunidades aborígenes del lugar, por lo cual no permitieron al entrevistador utilizar grabadores, videograbadores o tomar fotografías de las entrevistas. Los instrumentos empleados para la recolección de datos consistieron entonces en las observaciones y las notas manuscritas que podía tomar el entrevistador.

Los datos recogidos fueron organizados para su posterior análisis, aplicando la técnica de Alban (1985) modificada. En esta técnica no se toman los nombres vulgares

#### *4. -Materiales y Métodos*

de las plantas en el idioma nativo, sino que se los traduce y se realiza una serie de preguntas disparadoras al inicio de la toma de datos.

Se tomaron algunas preguntas de dicha técnica y se agregaron otras a fin de adaptarla al área de estudio.

##### **Entrevista original**

###### **Datos del entorno**

- 1.-Lugar.
- 2.-Fecha.
- 3.-Situación en que se realizó la entrevista.

###### **Referencias del informante**

- 1.-Nombre.
- 2.-Edad.
- 3.-Estado civil
- 4.-Hijos.
- 5.-Nacido en.
- 6.-Residente en.
- 7.-Con quien/es vive.
- 8.-Tipo de actividad (del jefe de familia y del entrevistado)  
Jefe de familia: Entrevistado/a:
  - 8.1-Permanente:
  - 8.2-Temporaria:
- 9.-Escolaridad.
- 10.- Creencias religiosas
- 11.-Viajes o estadías en otras zonas.
  - 11.1.- Propósito
  - 11.2.-Frecuencia y duración:
- 12.-Genealogía familiar (referente a la actividad de sanar)
- 13.-Plantas y tratamientos más comunes que utiliza o a las que hace referencia.

Planta o producto medicinal citados	Modo de uso y enfermedad que se trata
-------------------------------------	---------------------------------------

##### **Entrevista adaptada a las áreas en estudio**

###### **Datos del entorno**

- 1.-Lugar.
- 2.-Fecha.
- 3.-Situación en que se realizó la entrevista

###### **Referencias del informante**

- 11.-Viajes o estadías en otras zonas.
  - 11.1.- Propósito
  - 11.2.-Frecuencia y duración:

12.-Genealogía familiar (referente a la actividad de sanar)

13.-Plantas y tratamientos más comunes que utiliza o a las que hace referencia.

¿Que planta o producto medicinal denomina como "balsa"?	Indique su modo de uso y/o enfermedad que trata con "balsa"
---	---

#### 4.1.2.2.- Encuesta sobre plantas denominadas como "balsa"

Para el **grupo 2 (no sanadores)**, los datos se recolectaron según la modalidad presencial, mediante una encuesta de carácter confidencial, es decir, una serie de preguntas predeterminadas o prescriptas, donde el encuestador va tomando nota de las respuestas del interlocutor (Fernández, 2005; Tamayo, 2007; Morales Lizarazo, 2010).

Para aquellos datos obvios o que pudieran suponer crear una situación incómoda para el encuestado (v.g. su situación económica, sexo) se recurrió a la técnica de observación directa, sin intervención (Morales Lizarazo, 2010). Como en el caso de los sanadores, los encuestados mantuvieron en reserva la mayoría de sus datos personales, especialmente los de la ciudad de Puyo.

Los interlocutores no sanadores sólo fueron indagados respecto a las plantas denominadas como "balsa", obtenidas de la información del grupo de los "Sanadores". Los instrumentos empleados fueron observación de ejemplares y cuestionario predeterminado. (Morales Lizarazo, 2010).

#### Encuesta sobre "balsa"

1. Edad y sexo %
2. Nivel de educación (¿qué estudia?) primaria, bachillerato, tecnicatura, profesionales universitarios
3. Evaluación del nivel económico y social (este ítem no fue una pregunta directa sino que fue observado por el entrevistador)
4. ¿Conoce a la planta denominada "balsa"? ¿Puede describirla o señalarla en una fotografía o mostrarme un ejemplar de la misma?
5. ¿Para qué dolencias la utiliza?
6. Modo de uso
  - 6.1. Preparación previa

### 6.2. Aplicación

7. ¿Que otros usos de la "balsa" conoce?

7. ¿Cómo supo sus propiedades medicinales? o ¿quién se lo recomendó? (amigos, parientes, "sanadores", vendedores de plantas medicinales)

### 4.1.3. Procesamiento de las entrevistas y encuestas

A partir de los datos recogidos en las entrevistas en ambas localidades de estudio, se pudo elaborar una lista de plantas denominadas como "balsa", con todos los nombres populares o sinónimos que se le dan en uno o varios idiomas nativos o extranjeros y su porcentaje de popularidad entre los entrevistados.

Los datos botánicos (familia, género, especie) correspondientes a los nombres vulgares de las especies citadas, se obtuvieron mediante la observación de ejemplares de la reserva "Parque Etnobotánico Omaere" -un emprendimiento privado destinado a la conservación de especies utilizadas por las culturas Shuar y Waorani- y rastreo bibliográfico (Valverde, 1998; Valencia *et al.*, 2000; de la Torre *et al.*, 2000; Patzelt, 2008; Zuloaga y Morrone, 1999; Zuloaga *et al.*, 2008).

Basado en el listado elaborado previamente, se confeccionó un segundo cuadro donde se consignó para las plantas conocidas como "balsa", los datos sobre las partes de la planta consideradas útiles, y sus diversos usos: fabricación de utensilios, combustible, forestal, construcción de viviendas, construcción de medios de transporte y usos medicinales.

## 4.2.- MATERIAL VEGETAL

### 4.2.1.- Procedencia

Las hojas de *O. pyramidale* fueron recolectadas el 15/01/2013 y el 20/01/15 en haciendas productoras de "balsa" del cantón de Quevedo perteneciente a la provincia de Los Ríos en Ecuador.

El material vegetal recolectado fue clasificado por personal de la empresa Plantabal S.A.

#### **4.2.2.- Recolección y almacenamiento del material vegetal**

Se trabajó con los dos tipos de hojas que presenta la especie:

Hojas apicales: son las hojas más jóvenes, situadas en el ápice de las ramas

Hojas basales: cercanas a la base de la rama, de aspecto más redondeado.

El material vegetal así obtenido, fue acondicionado y trasladado hasta Argentina, a la Cátedra de Farmacobotánica de la Fac. de Ciencias Exactas, UNLP, donde fue secado a 40º C, molido y conservado en recipientes de cierre perfecto y al abrigo de la luz. Parte del material vegetal se reservó para efectuar las observaciones microscópicas, preservándolo, según se requiriera, en líquido FAA (formol- alcohol etílico 96º - ácido acético glacial- agua destilada 50:25:250:175) (D'Ambrogio, 1986).

### **4.3.- CARACTERES ANATÓMICOS DE LA HOJA**

#### **4.3.1.- Equipos utilizados**

Las observaciones se efectuaron con microscopio estereoscópico Iroscope YZ-6 y un microscopio óptico (MO) Olympus CH.

#### **4.3.2.- Cortes y tinciones**

Se efectuaron cortes transversos de hojas apicales y basales de *O. pyramidale*.

Para los cortes se utilizó un micrótopo de Ranvier.

Los preparados obtenidos se trataron siguiendo el protocolo de Sass (1958) y fueron observados sin coloración o bien se colorearon según la técnica de coloración con safranina (Berlyn y Miksche, 1976; D'Ambrogio, 1986).

Las etapas seguidas fueron:

- Se usó material vegetal fresco
- Se efectuaron cortes transversales de la lámina, zona media del pecíolo y a nivel de la nervadura central.
- Fueron seleccionados los mejores cortes previamente identificados en un microscopio óptico.
- Se diafanizaron los cortes con hipoclorito de sodio al 50%,
- A continuación se lavó el material vegetal hasta ausencia de álcalis.



- Se hizo una primera tinción con una solución de safranina a saturación en alcohol de 80°, durante dos minutos.
- Luego se pasó por alcohol de 96°
- Se vuelven a pasar los preparados dos veces más en alcohol de 100°.
- Finalmente se pasó por Xilol y se montó con bálsamo sintético (Biopur).

### 4.3.3.- Diafanización de las hojas

#### Diafanización 1

El diafanizado es el proceso por el cual una muestra vegetal se hace diáfana o transparente, mediante técnicas que igualan los índices de refracción de la luz del interior del órgano con el medio que lo contiene.

Basándonos en este concepto, las hojas de *O. pyramidale* fueron sometidas a este proceso según la técnica de Carpano *et al.* (1994) de acuerdo al siguiente protocolo:

- (1) Las hojas se cortaron previamente en trozos de 0,5 cm a 1 cm
- (2) El material vegetal se colocó en un vaso precipitado con alcohol de 70°, calentándolo a baño de María durante 5 minutos.
- (3) Se agregó igual volumen de hidróxido de sodio al 5%, llevando a baño de María entre 1 o 2 minutos.
- (4) Se lava con agua destilada varias veces hasta eliminar el álcali.
- (5) Terminado este procedimiento, el material vegetal se conservó en ácido láctico al 1%.

#### Diafanización 2

Según la técnica descrita por D'Ambrogio (1986) se prepararon las hojas para una técnica de diafanización con hidrato de cloral, empleando el material vegetal desecado, de acuerdo a la siguiente secuencia:

- (1) El material se sumergió en alcohol 96° y se llevó a ebullición durante 10 min (eliminación de la clorofila)
- (2) Se colocó en una mezcla de alcohol 96°: hidróxido de sodio al 5% (2:1) manteniéndolo en ebullición 2-3 min (eliminación de taninos, resinas, etc.)

- (3) Las hojas se lavaron con abundante agua caliente hasta eliminar los restos de alcohol e hidróxido completando con pasajes por agua destilada
- (4) El material fue sumergido en una solución de hipoclorito de sodio al 50% hasta su Diafanización, la cual se produjo entre 5 y 30 min
- (5) Se realizaron lavados de 3 min cada uno con agua destilada para eliminar el remanente de hipoclorito de sodio
- (6) Las hojas se colocaron en la solución de hidrato de cloral (5 g en 2 ml de agua) durante 5- 10 min para quitar la opacidad (transparentado)
- (7) Se realizó la coloración con safranina en alcohol 80°

#### 4.4.- ENSAYOS FITOQUÍMICOS

El trabajo comenzó con la recolección de las hojas de *O. pyramidale* cultivada en la zona de Quevedo. Para las mismas se establecieron distintos parámetros micrográficos y se realizó un screening fitoquímico sobre el extracto metanólico a fin de confirmar o descartar la presencia en las hojas de la planta cultivada en Quevedo, de distintos grupos fitoquímicos citados en la bibliografía para plantas de otras regiones tropicales, como México (Vázquez *et al.*, 2001)

##### Material vegetal.

Las hojas de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urban. se recolectaron en los meses de diciembre a enero, entre los años 2013 a 2015 en el cantón de Quevedo, Ecuador.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio y se secaron bajo sombra a temperatura ambiente. Las hojas secas se molieron utilizando un molino de cuchillas, conservándose en recipientes de cierre perfecto.

##### 4.4.1.- Ensayos fitoquímicos orientativos en hojas de *O. pyramidale*

A fin de confirmar la presencia de determinados grupos fitoquímicos en las hojas de *O. pyramidale* recolectadas de plantas cultivadas en Quevedo, Ecuador, se procedió a realizar los siguientes ensayos:

### 4.4.1.1.- Ensayos orientativos sobre la muestra seca:

#### Identificación de Saponinas y Mucílagos

Las saponinas se investigaron en un extracto acuoso poniendo en evidencia su capacidad afrógena.

A la muestra (0,5 g) se le agregó agua destilada (8 ml) y se calentó a baño María durante 20 min. Se filtró en caliente.

Una alícuota del filtrado se transfirió a un tubo de hemólisis. Se tapó y se agitó manualmente durante 15 s. La formación de una capa de espuma indicaría la presencia de saponinas.

La presencia de mucílagos se caracteriza en base a la insolubilidad de estas sustancias en alcohol, que se evidencia al añadir etanol absoluto al extracto acuso que los contenga.

A otra alícuota del filtrado acuoso se le agregó gota a gota etanol absoluto. La formación de un precipitado sería presuntivo de la presencia de gomas o mucílagos (Korwar *et al.*, 2010; FA VI Ed, 1978).

Además de este ensayo, se realizó una reacción histoquímica consistente en tratar el preparado de hoja en vista superficial con una solución diluida de azul de metileno, con el cual algunos mucílagos adquieren una coloración azul (Evans, 2009).

#### Identificación de heterósidos cianogenéticos

A la muestra (0,5 g) colocada en un erlenmeyer se le agrega agua destilada en cantidad suficiente para embeberla. En la boca del erlenmeyer se suspende un papel Grignard humedecido con una solución de carbonato de sodio 10% (papel picro-sódico). Se calienta suavemente, evitando la excesiva producción de vapor de agua. El viraje de color del papel, del amarillo al rojo, indica la presencia de heterósidos cianogenéticos.

### 4.4.1.2.- Screening fitoquímico

Las hojas secas y molidas de *O. pyramidale* (5g) se extrajeron por reflujo con metanol (50 ml) durante 2 h.

#### 4. -Materiales y Métodos

Luego de la extracción se filtró en caliente por vacío. Se reservó 1 ml (fracción A) y el resto del extracto metanólico se evaporó a sequedad *in vacuo* a menos de 40°C.

El residuo se retomó con ácido clorhídrico 1% (5 ml x 3), calentando suavemente y filtrando el precipitado obtenido en caliente al vacío.

El precipitado se redisolvió con cloroformo (5 ml). La solución obtenida se filtró, recogiendo el filtrado en un tubo de ensayo, donde se desecó con sulfato de sodio anhidro (fracción B).

La fase acuosa ácida se alcalinizó con hidróxido de amonio (1 ml), hasta viraje del papel de tornasol.

La fase acuosa alcalina se extrajo en embudo de decantación con cloroformo (10 ml x 3).

Las porciones clorofórmicas reunidas se desecaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a un volumen final de 2ml en evaporador rotatorio a menos de 40°C (fracción C).

El residuo de la fase acuosa alcalina se desecó con sulfato de sodio anhidro (3 g), se filtró y se extrajo en ampolla de decantación con una mezcla cloroformo/etanol 3:2 (3 ml x 3).

Las fases orgánicas reunidas se desecaron con sulfato de sodio anhidro y se filtraron (fracción D).

El residuo de la fase acuosa se identificó como fracción E. (Fig. 10)  
(Harborne, 1973)

En cada una de las fracciones obtenidas es posible encontrar los siguientes grupos fitoquímicos:

#### 4. - Materiales y Métodos

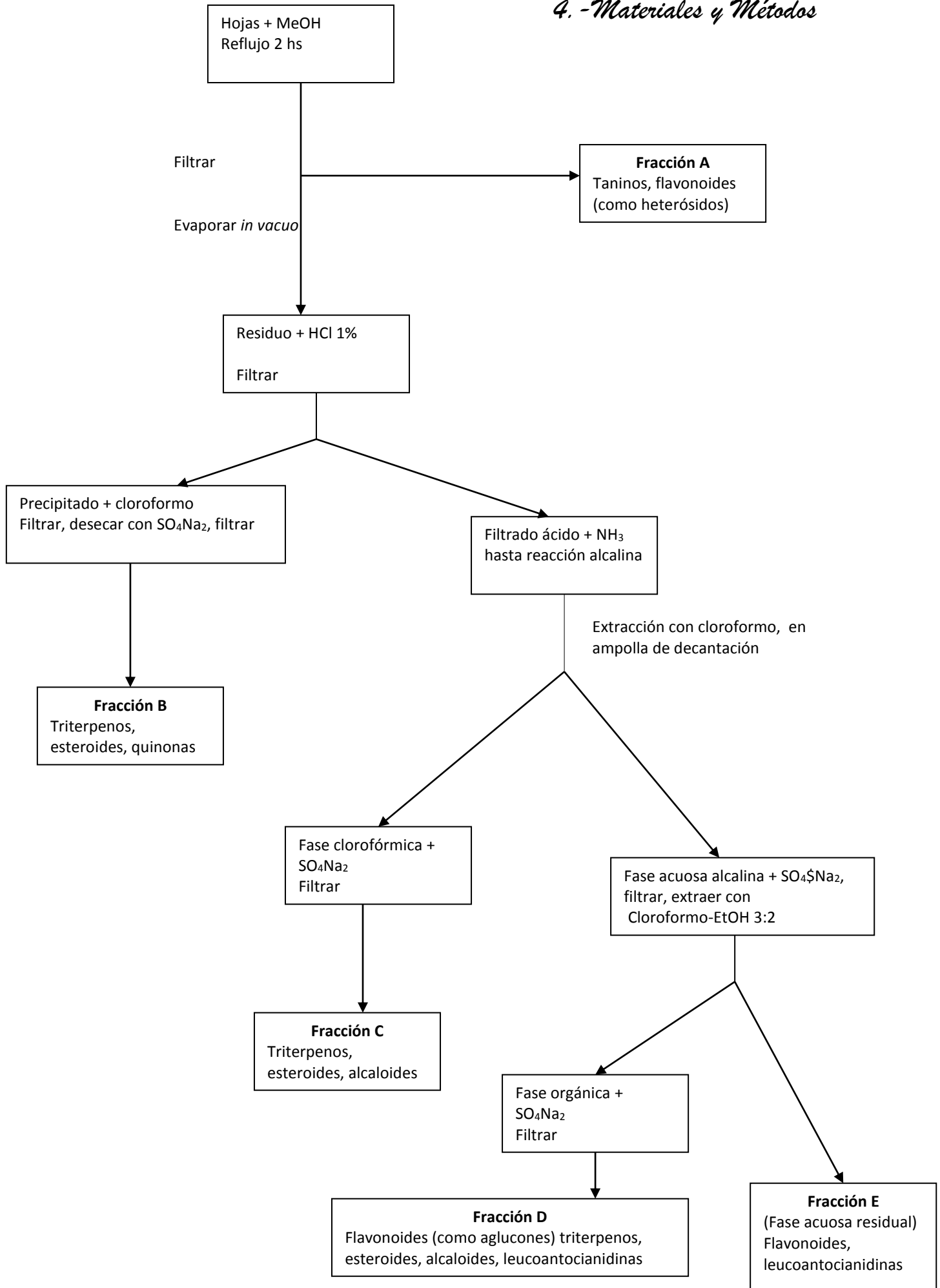


Fig. 12 Screening fitoquímico

Fracción A:

- ❖ Identificación de Taninos
- ❖ Identificación de Flavonoides

Fracción B:

- ❖ Identificación de Compuestos triterpénicos y/o esteroides
- ❖ Identificación de Quinonas

Fracción C:

- ❖ Identificación de Compuestos triterpénicos y/o esteroides
- ❖ Identificación de Alcaloides

Fracción D:

- ❖ Identificación de Flavonoides
- ❖ Identificación de Compuestos triterpénicos y/o esteroides
- ❖ Identificación de Alcaloides
- ❖ Identificación de Leucoantocianidinas

Fracción E:

- ❖ Identificación de Flavonoides
- ❖ Identificación de Leucoantocianidinas

Estos grupos fitoquímicos se ponen de manifiesto realizando los siguientes ensayos:

#### ***Ensayo para taninos y fenoles***

La reacción para identificarlos se realizó añadiendo a 5 ml de los extractos señalados 3 gotas de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  al 10% y observando el cambio de coloración producido. (Domínguez, 1973). La reacción es positiva si se observa la aparición de una coloración amarilla, verde o azul.

#### ***Ensayos para flavonoides***

La identificación de flavonoides se realizó mediante la reacción de Shinoda y reacciones de toque sobre papel con soluciones etanólicas de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ ,  $\text{Cl}_3\text{Al}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{KOH}$ .

#### **a) Reacción de Shinoda:**

A una alícuota (0,5 ml) de la fracción A y de la fracción D, se agregó granallas de magnesio y ácido clorhídrico 37% (0,2 ml). Luego de enfriar, se agregó alcohol amílico (0,2 ml) y se diluyó con agua destilada a 2 ml. La reacción es positiva si se observa la

formación de una coloración roja en la fase orgánica indicando la presencia de flavonoides (Domínguez, 1973).

##### **b) Reacciones de toque sobre papel**

Se sembraron alícuotas (1 ml) de la fracción A y de la fracción D sobre una tira de papel de filtro, se dejó secar y luego se adicionó una gota de soluciones metanólicas de los siguientes reactivos: cloruro férrico 1%, ácido bórico 1%, cloruro de aluminio 1% e hidróxido de potasio 1%

Las reacciones son positivas si se observa al visible la aparición de una coloración amarilla, verde-grisácea o azul-negra para el cloruro férrico, mientras que para los demás reactivos debería observarse fluorescencia al UV 366 nm (Domínguez, 1973).

##### ***Ensayo para esteroides***

A una alícuota (0,2 ml) de la fracción B, se le agregó reactivo de Liebermann-Burchard (0,2 ml). La reacción es positiva si se observa la aparición de una coloración verde indicando la presencia de esteroides.

##### ***Ensayo para antraquinonas (Aglucos y heterosidos)***

Se realiza aplicando la reacción de Börntraeger (Domínguez, 1973). A una alícuota (0,5 ml) de la fracción B se le agregó hidróxido de sodio 5% (3 ml). La reacción es positiva si luego de agitar se observa la aparición de una coloración roja en la fase acuosa.

##### ***Ensayo para alcaloides***

Se basa en la reacción de precipitación que se produce entre los alcaloides y las sales de metales pesados, especialmente los ioduros. Se utilizó uno de los reactivos generales de alcaloides: el reactivo de Dragendorff (Iodo bismutito de potasio) (Domínguez, 1973).

Se colocaron unas gotas de la fracción C en un portaobjetos y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente. Sobre este residuo se dejaron caer unas gotas del reactivo de Dragendorff. La reacción es positiva si se observa la aparición de un precipitado color naranja.

### **Ensayo para Leucoantocianidinas**

Se realiza mediante la reacción de Rosenheim (Domínguez, 1973). Se basa en la coloración que adquieren las leucoantocianidinas en medio ácido, luego de formarse flobafenos, compuestos de baja polaridad. El agregado de alcohol isoamílico cumple la función de solubilizar y concentrar estos compuestos poco polares, mejorando así la visualización de la reacción.

Se tomó una alícuota (0,2ml) de la fracción E y se agregó ácido clorhídrico 37% (2ml). Se calentó a baño María durante 10 min. Luego de enfriar, se agregó alcohol amílico. La reacción es positiva si se observa la aparición de una coloración roja en la fase orgánica.

### **4.4.2.- Perfiles cromatográficos de los extractos de hojas de *O. pyramidale***

#### **4.4.2.1.- Preparación de los extractos**

Extracto metanólico: 1 g de hojas secas y pulverizadas se extrajeron por maceración con MeOH p.a. durante 48 hs con agitación frecuente. El filtrado fue evaporado a presión reducida en un evaporador Heidolph 2000 a temperatura menor a 40° C hasta un volumen final de 10 ml. Alícuotas del extracto metanólico fueron utilizadas para realizar las cromatografías en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Extracto acuoso: 5 g de hojas secas y pulverizadas de *O. pyramidale* fueron extraídas por infusión con 100 ml de agua destilada. El filtrado fue liofilizado. Alícuotas del liofilizado fueron utilizadas para realizar las CCD.

#### **4.4.2.2.- Cromatografía en capa delgada (CCD)**

##### **Fases estacionarias**

A: Cromatofolios de silicagel 60 GF 254, 0,25 mm, Merck (Alemania)

##### **Fases móviles utilizadas**

Fase móvil 1: EtOAc/AcOH/ForH/H<sub>2</sub>O (100:11:11:26)

Fase móvil 2: EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O (100:13,5:10)



### DetECCIÓN

Los reveladores utilizados en las CCD fueron:

- i- Observación a la luz ultravioleta de 254nm y 366 nm + vapores de NH<sub>3</sub>
- ii- Pulverización con reactivo de productos naturales (éster del ácido 2-amino etil difenil bórico al 1% en metanol) + calor y posterior observación al visible y al UV 366

### Testigos utilizados

Para el análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se utilizaron como sustancias de referencia soluciones metanólicas al 1% de vitexina, isovitexina, luteolina, apigenina y ácido cafeico.

### Soluciones a sembrar:

Extracto metanólico de hojas de *O. pyramidale*

Infusión liofilizada de hojas de *O. pyramidale*

### 4.4.2.3.- Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Fase estacionaria: Columna analítica LiChrocart RP-18,

Fase móvil: isopropanol-tetrahidrofurano-agua (5:15:85) Flujo: (1,0 ml/min).

Volumen de inyección: 10 µl

Detección: UV366 nm.

Sustancias de referencia: vitexina e isovitexina

## 4.5.- ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

### 4.5.1.- Determinación de la actividad tripanocida

#### 4.5.1.1.- Predicción de la actividad

Como una actividad no prevista en el plan de tesis inicial de *O. pyramidale*, se aplicó el programa de modelos computacionales desarrollado en el LIDEB (Fac. de Cs. Exactas, UNLP) para seleccionar plantas medicinales como potenciales tratamientos para la enfermedad de Chagas, a diversos componentes químicos presentes en hojas y corteza de *O. pyramidale*.

Como resultados iniciales alentadores, varios de estos componentes han sido predichos por esos modelos como activos sobre cruzipaina y la permeasa de poliaminas.

A fin de confirmar estas predicciones, se realizaron ensayos de actividad tripanocida sobre extractos de *O. pyramidale*.

##### 4.5.1.2.- Preparación de los extractos

Los ensayos de actividad tripanocida se efectuaron sobre extractos metanólicos de hojas y corteza de *O. pyramidale*.

100 g de la muestra vegetal (hojas o corteza) se extrajeron por maceración durante 48 hs con metanol p.a. El filtrado se evaporó a presión reducida a temperatura inferior a 40°C. Alícuotas de estos extractos fueron empleados para determinar la actividad tripanocida.

##### 4.5.1.3.- Efecto inhibitorio sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Se utilizó el método de seguimiento por densidad óptica (DO) a 600 nm, en placa de 96 pocillos.

Epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* fueron cultivados a 28°C en medio BHT con 20 mg/l de hemina, 20% de suero fetal bovino inactivado y antibióticos (100 µg/ml de estreptomycin y 100 µg/ml de penicilina) (Cazzulo *et al.*, 1985), agregando la concentración del extracto a ensayar correspondiente (0-1000 µg/ml).

El ensayo se inició sembrando a una concentración de  $10^7$  células/ml de un cultivo en fase logarítmica, en un volumen de 200 µl por pozo, de medio sólo o medio más el extracto a testear. Se mide la DO 600 cada 24-48 h durante 10 días.

La proliferación de epimastigotes se realizó diariamente por conteo directo de parásitos en cámara hemocitométrica (cámara de Neubauer), partiendo del mismo cultivo logarítmico.

En este caso se dispusieron  $1 \times 10^6$  parásitos en tubos tipo eppendorf en un volumen final de 1 ml de medio sólo o con la droga a analizar.

Diariamente se tomó una alícuota (10 µl) de los cultivos para conteo en cámara por un período de 10 días. Cada 48 h se repondrá medio fresco sólo o con la droga correspondiente.

A fin de observar el efecto del extracto sobre la proliferación durante períodos prolongados, una vez que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria (cada 7 días) se repicaron mediante dilución a  $10^7$  células/ml adicionando medio fresco con el extracto a ensayar.

Diariamente se tomará una alícuota de los cultivos para conteo en cámara por un período de 10 días.

Cada 48 h se repondrá medio fresco solo o con la droga correspondiente, para asegurar la presencia constante de droga activa. Además, la observación diaria de los epimastigotes permite reconocer anomalías morfológicas y de motilidad que aportan datos sobre el efecto de las drogas.

### **4.5.2.- Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos**

#### **4.5.2.1.- Preparación de los extractos**

Las hojas de *O. pyramidale* (50 g) fueron extraídas en forma sucesiva con hexano, diclorometano y metanol. También se efectuó una extracción acuosa mediante una decocción al 5% P/V.

Los extractos obtenidos fueron evaporados *in vacuo* o liofilizados (decocción). Alícuotas de esos extractos fueron utilizados para los ensayos de viabilidad celular e inhibición de la producción de óxido nítrico, en concentraciones finales de 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g/ml}$  en dimetilsulfóxido (DMSO)

#### **4.5.2.2.- Determinación de la Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos y ensayo de viabilidad celular**

##### **a) Cultivo de la línea celular RAW 264.7**

La línea celular RAW 264.7 es una línea de macrófagos murinos obtenida del líquido ascítico generado por un tumor inducido en ratones macho Balb/C por inyección intraperitoneal del virus de la leucemia Abelson (ATTC, 2012).

El medio base utilizado para el cultivo de estas células es DMEM GlutaMAXTM de 1 g/l glucosa, suplementado con suero fetal bovino (FBS) a una concentración final del 10% y con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina). La atmósfera del incubador está compuesta por 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$  y la

#### 4. -Materiales y Métodos

temperatura es mantenida a 37,0 °C. Las células son crecidas hasta alcanzar subconfluencia y luego utilizadas para los ensayos y/o subcultivadas.

Los subcultivos se hacen cada 2 ó 3 días en frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Para esto, se aspira el medio y se lavan las células con PBS, se añaden 10 ml de medio fresco y las células que crecen adheridas a superficie se desprenden con ayuda de un *scraper* y se homogenizan. Luego se distribuyen a razón de 1:3 en frascos nuevos a los cuales se adicionarán 20 ml de medio fresco.

Para los ensayos, las células ya desprendidas y homogenizadas, según el párrafo anterior, se cuentan en cámara de Newbawer y se siembran según el protocolo de ensayo.

##### **b) Ensayo de viabilidad celular.**

El efecto citotóxico de los extractos sobre los distintos tipos celulares se mide usando el ensayo del 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio (MTT) [Mossmann, 1983], que se basa en la conversión del MTT de color amarillo a formazán de color azul oscuro. Esta reacción está catalizada por succinildeshidrogenasas mitocondriales (Mosmann, 1983).

Se siembran 200 µl de una suspensión de 2×10<sup>5</sup> células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incuban durante 24 h a 37 °C hasta subconfluencia. Luego se reemplaza el medio por 195 µl de DMEM con 0,5% de FBS y las células se tratan con 5 µl de la muestra a distintas concentraciones finales (C.f.), disueltas en el mismo medio, durante 24 h. Se elimina el sobrenadante y se añade a cada pocillo 100 µl de MTT (C.f.: 0.5 mg/ml). Se incuba la placa a 37 °C hasta la aparición de color azul (30-60 min), al menos en los controles. El sobrenadante se elimina y se añaden 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo que disuelve los cristales de formazán. Se mide la absorbancia a 490 nm en un lector de placas.

El cálculo de viabilidad celular se realiza mediante la ecuación siguiente:

$$\%Viabilidad = \frac{Am}{Ac} \times 100$$

Donde  $A_m$  es la media aritmética de la absorbancia de la muestra y  $A_c$  la media aritmética de la absorbancia del control (células sin tratamiento).

### c) Inhibición de la producción de NO (óxido nítrico) en macrófagos RAW 264.7.

Basado en el método descrito por De León *et al.* (2003). Se prepara una curva patrón de nitritos para poder extrapolar las absorbancias que se obtengan con los productos y conocer su concentración.

Se siembran  $2 \times 10^5$  células/200  $\mu$ l por pocillo, en una placa de 96 pocillos y se dejan incubar 24 h hasta subconfluencia. Se elimina el medio y se añaden 195  $\mu$ l de DMEM con 0,5% de FBS a las células blanco y 175  $\mu$ l a las control y tratamientos. Se añaden 5  $\mu$ l de los productos objetos de estudio a las concentraciones finales elegidas para ser ensayadas, o vehículo (control y blanco: DMSO al 1%) y se deja incubar a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 h. La producción de NO se estimula mediante la adición de 20  $\mu$ l de LPS (C.f.: 1  $\mu$ g/ml) sobre las células control y tratamientos. Se toman alícuotas de 100  $\mu$ l del sobrenadante a las 24 h de incubación y se disponen en otra placa de 96 pocillos, añadiendo 100  $\mu$ l del reactivo de Griess.

Para la curva patrón se preparan concentraciones decrecientes desde 80 mM hasta 2,5 mM. Se añaden 100  $\mu$ l de cada disolución por pocillo y 100  $\mu$ l del reactivo de Griess. Se mide la absorbancia en el lector de placas a 540 nm.

Los valores de producción de nitritos se obtienen por interpolación de las absorbancias de los sobrenadantes en la recta de calibración.

### 4.5.3.- Actividad antibacteriana e inhibidora de la producción de biofilm

#### 4.5.3.1.- Preparación de los extractos a ensayar

A partir de 50 g de hojas y corteza de *O. pyramidale* cultivadas en Quevedo, se prepararon extractos por maceración sucesiva, durante 48 h, con diclorometano y metanol. Los solventes orgánicos fueron eliminados por evaporación *in vacuo*. Alícuotas de estos extractos fueron utilizados para los ensayos antibacterianos y de inhibición de formación de biofilm.

### 4.5.3.2.- Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento por el método de microdilución en caldo (Luciardi *et al.*, 2016)

El ensayo se realizó utilizando microplacas estériles de poliestireno de 96 pocillos.

Los extractos de hojas y corteza, en diclorometano y metanol, a concentraciones finales de 100 y 10 ppm en dimetilsulfoxido (DMSO), fueron ensayados contra cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) y *S. aureus* (ATCC 6738) cultivados en medio Luria-Bertani (LB) y Moeller-Hinton (MH), respectivamente.

#### Modus operandi:

Se diluyeron cultivos de una noche de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 6738 hasta alcanzar un DO ( $0,125 \pm 0,02$ ) a 560 nm con sus respectivo medios de cultivo.

El inóculo (190  $\mu$ l) se colocó en cada uno de los 96 pocillos de la placa de microtitulación, reservando en cada placa algunos pocillos para los controles:

- Control de esterilidad (sin inóculo), se preparó utilizando LB estéril
- Control de viabilidad del inóculo (sin extracto), contenían el cultivo diluido (190  $\mu$ L)
- Control del efecto del solvente (la concentración final de DMSO no debe exceder 2,5%), conteniendo 10  $\mu$ l de una solución de DMSO/agua (1:1) en la que la concentración final de DMSO es 2,5%.

Las diluciones en DMSO (10  $\mu$ l) de los extractos diclorometano (hoja y corteza) y metanólico (hoja y corteza) en concentraciones de 10 y 100 ppm, se pipetearon a los pocillos de la placa de microtitulación (5 réplicas).

Los pocillos de control y Las bacterias crecieron en medio LB a 37 °C y el crecimiento se detectó por la turbidez relativa a la de un pocillo sin inóculo (560 nm) usando un lector de placa de microtitulación (Power Wave XS2, Biotek, VT, EE.UU.). El nivel máximo de DMSO a la que se expusieron las células fue de 2,5%.

### 4.5.3.3.- Ensayo de inhibición de la formación de biofilm

Este ensayo se realizó usando el método del cristal violeta (Dalton *et al.*, 1996; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000).

Las bacterias se incubaron durante 24 hs.

Luego de descartar el medio de cultivo, los pocillos fueron lavados con agua

#### 4. -Materiales y Métodos

(x3) y las células unidas coloreadas con 20 µl de una solución acuosa de cristal violeta 0,1 % P/V durante 20 min seguido de un lavado con agua.

El líquido fue descartado de los pocillos y el material remanente fijado al poliestireno conteniendo el biofilm fue lavado con PBS (x3).

El colorante unido al biofilm fue removido de cada pocillo con 180 µl de etanol absoluto, agitando durante 30 min a 37°C.

Se midió la absorbancia a 560 nm, de soluciones etanólicas de cristal violeta utilizando un lector de placas de microtitulación (Power Wave XS2, Biotek, VT, EE.UU.)

La ciprofloxacina, un conocido inhibidor de biofilm, se incorporó en el bioensayo como control positivo, en concentración de 5 µg/ml en las mismas condiciones experimentales empleadas para evaluar los extractos.

A esta concentración, la ciprofloxacina inhibe la formación de biopelículas, pero no modificó significativamente el crecimiento bacteriano (Sandasi *et al.* 2011).

Los ensayos fueron evaluados por quintuplicado.

## 5.- Resultados y Discusión

---



## 5.1.- RELEVAMIENTO ETNOFARMACOBOTÁNICO

El relevamiento se realizó con la participación de personas sanadoras y no sanadoras integrantes de dos comunidades de la Amazonía ecuatoriana (Ciudad de Puyo) y de la región de la Costa (Ciudad de Quevedo).

El análisis de las entrevistas y encuesta realizadas nos brindó un panorama sobre las plantas denominadas "balsa", así como su utilización por los practicantes de la medicina tradicional en los cantones de Quevedo y Puyo

### 5.1.1.- Entrevistas a “Sanadores”

Los sanadores entrevistados fueron en su mayoría mujeres. Mencionaron que sus conocimientos, hasta donde ellas podían recordar, provenían de sus tatarabuelas, que los habían transmitido oralmente a sus bisabuelas, abuelas y éstas a sus madres y por último a ellas. Nótese que en esta transmisión hasta la época actual siempre están involucradas, en forma predominante, las mujeres de la familia. Esto nos llevó a pensar que la transmisión de los conocimientos etnobotánicos a través del tiempo y su utilización ha sido una ocupación predominantemente femenina (Ramos *et al.*, 2011; Reyes, 2013).

Cabe señalar que, a pesar de ser las mujeres las más abiertas a establecer comunicación con extranjeros, resultó sumamente dificultoso, especialmente en la zona del Puyo, conseguir información relativa a plantas medicinales de uso tradicional.

Entre los Shuar y Cofanes existe un fuerte tabú respecto a la transmisión de secretos o conocimientos ancestrales fuera del ámbito de sus tribus. La violación de ese tabú conduce a serias sanciones sociales que implican pérdida de privilegios y pertenencia a la comunidad: invisibilización del individuo, censura pública, expulsión de la tribu, prohibición de asistir a rituales o fiestas. De ahí que no quieran ser identificados como brindando información a extraños.

Existe también un tema económico, ya que la utilización medicinal de estas plantas representa una fuente de ingresos para el sanador, que cobra la "consulta" y medicación de acuerdo a la dolencia tratada, de modo similar a lo que podría hacer un médico occidental.

## 5. - Resultados y Discusión

Dados el arraigo y la gran aceptación que tienen por parte de la comunidad, esta actividad está reconocida por el estado ecuatoriano, que a través del Ministerio de Salud realiza censos de sanadores, con el objeto de capacitarlos a través de cursos de buenas prácticas de preparación de sus medicinas y tener así cierto control sobre sus actividades.

También existen diversas empresas farmacéuticas que imparten cursos a estos sanadores; sin embargo, en estos casos parece primar la necesidad de obtener información de los asistentes a los cursos, por sobre la de lograr su capacitación.

### 5.1.1.1.- Entrevistas a sanadores de Puyo

Las entrevistas realizadas a sanadores de la ciudad del Puyo pertenecientes a las etnias Shuar y Cofanes dieron como resultado la identificación de 10 especies vegetales a las que se les asigna el nombre de "balsa". Un resultado similar se obtuvo en las encuestas a no sanadores.

Las familias más comunes en orden de porcentaje de mención son: Bombacaceae (2), Euforbiaceae (2), Tiliaceae (2), Araliaceae (1), Asteraceae (1), Malvaceae (1) y Apocinaceae (1).

Todos los entrevistados coincidieron en que se les otorga el nombre de "balsa" por las características de su madera, liviana y suave para manipular, así como otros nombres vulgares relacionados a sus cualidades: "Madera balsa", "palo de balsa", "palo bobo", "Nanavi waska" (lenguaje kichwa de la sierra), "balsa real", "balsa blanca", "balsa macho", "balsilla", "Huanbo, sapan" (lenguaje kichwa del oriente), "balsa de perro", "Upiana" (lenguaje kichwa), "balsa jíbara" y "palo suave".

De todas las especies las únicas usadas con fines medicinales fueron *O. pyramidale*, *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. y *Pachira trinitensis* Urb., ésta última utilizada "para el hambre", si bien no se pudo establecer si se hace referencia a usarla sólo para calmar el hambre o bien para complementar o solucionar la deficiencia de algún nutriente en el individuo tratado (aminoácidos, vitaminas, etc.).

Cabe resaltar que *O. pyramidale* fue la única especie que todos los sanadores entrevistados conocía como medicinal, pero no todos quisieron indicar el modo de uso de esta planta, sólo la dolencia que trataban y la parte usada (Tabla 1).

## 5. - Resultados y Discusión

Tabla 1. Especies denominadas "balsa" y sus usos medicinales entre los sanadores de Puyo				% de mención
N.C	N.V	Familia	Parte y Modo de uso medicinal	
<i>Ochroma pyramidale</i>	Balsa Palo de balsa Madera balsa	Bombacaceae	La savia de la corteza mezclada con agua se usa para problemas de estreñimiento y parásitos del ganado vacuno Para combatir inflamaciones generales con Hojas frescas como cataplasma y baños en infusión de manera tópica Problemas del riñón bebiendo la savia de la corteza Contra enfermedades venéreas realizando baños con infusión de raíz	100%*
<i>Tabernaemontana sanaho</i> Ruiz & Pav	Balsa Balsa de perro Upiana (kichwa)	Apocinaceae	Del fruto se extrae un látex que se le da a los perros para mejorar su habilidad de cazar Purificador de la sangre La corteza y hojas son usados como antiparasitario Para dolores estomacales y vómitos La raíz macerada en alcohol se consume para curar gripe y problemas de la garganta	35%
<i>Heliocharpus americanus</i> L.	Balsa Balsa blanca Balsa macho Balsilla Huanbo sapan (kichwa del oriente)	Malvaceae	No le asignan usos medicinales	32%
<i>Trichospermum galeottii</i> (Turcz) Kosterm	Balsa Balsilla	Tiliaceae	No le asignan usos medicinales	25%
<i>Alchornea grandis</i> Benth	Balsa Balsa macho Palo suave	Euphorbiaceae	No le asignan usos medicinales	24%
<i>Croton chocoanus</i> Croizat	Balsa macho	Euphorbiaceae	No le asignan usos medicinales	17%
<i>Pachira trinitensis</i> Urb	Balsa jibara	Bombacaceae	Comestible	15%
<i>Tessaria integrifolia</i> Ruiz & Pav	Balsa Palo Bobo Nanavi waska (kichwa de la sierra)	Asteraceae	No le asignan usos medicinales	15%
<i>Schefflera pentandra</i> Harms	Balsa	Araliaceae	No le asignan usos medicinales	12%
<i>Christiana Africana</i> DC	Balsa Balsa real	Tiliaceae	No le asignan usos medicinales	2%

En cuanto a los usos medicinales tradicionales de esta especie, los mismos están asociados con el tratamiento de procesos inflamatorios, infecciosos o parasitarios y fueron descriptos como "para cuando tenga una inflamación", "para las enfermedades venéreas", "para las heridas", "para problemas del riñón", "para el estreñimiento y parásitos del ganado vacuno" o "para el hambre", siendo el correspondiente al tratamiento de inflamaciones el uso predominante. (Tabla 1)

## 5. - Resultados y Discusión

### 5.1.1.2.- Entrevistas a sanadores de Quevedo

En el caso de las entrevistas realizadas a las 5 referentes de la ciudad de Quevedo, sólo se determinó una especie con el nombre vulgar de "balsa". Esta especie también es conocida como: "palo de balsa", "madera balsa" y "boya". Todos conocían a esta especie pero ninguno conocía usos medicinales para la misma (Tabla 2).

Tabla 2. Especies denominadas "balsa" y sus usos medicinales entre los sanadores de Quevedo				% de mención
N.C	N.V	Familia	Parte y Modo de uso medicinala especie	
<i>Ochroma pyramidale</i>	Balsa Madera balsa Palo de balsa Boya	Bombacaceae	No le asignan usos medicinales	100%*

### 5.1.2.- Encuesta a No sanadores

#### 5.1.2.1.- Encuesta a no sanadores de Puyo

Entre los habitantes "no sanadores" de la ciudad de Puyo, la especie más usada con el nombre de "balsa" es *Ochroma pyramidale*.

Se utiliza la madera para elaborar diversos utensilios (salvavidas, artesanías decorativas, residuos para carbón, fogatas, modelismo, maquetas, embarcaciones marítimas). De 55 menciones que estas personas hicieron sobre usos medicinales de "balsa", el 78,1% correspondió al uso como antiinflamatorio (Tabla 3).

Nuevamente fueron las mujeres las que conocían una mayor cantidad de usos medicinales para *O. pyramidale*, de modo similar a lo expresado por los sanadores: la corteza: la savia mezclada con agua se usa para problemas de estreñimiento del ganado vacuno, además se usa para problemas del riñón dándole de beber la savia al hombre; las hojas, para combatir inflamaciones (hojas frescas como cataplasma y baños en infusión); la raíz, contra enfermedades venéreas (baños con infusiones) y el fruto como algodón para rellenos de almohadas (Tabla 3).

Del total de mujeres no sanadoras encuestadas, ca. 90,3% obtuvieron ese conocimiento a través de sus madres y abuelas. De todas las especies mencionadas se utiliza la madera con distintos propósitos, con excepción de la especie *Christiana africana* DC de la que es usada la planta entera como especie de reforestación para evitar la erosión del suelo (Tabla 4).

## 5. - Resultados y Discusión

Tabla 3. Encuesta de <i>Ochroma pyramidale</i> en la localidad de Puyo a un total de 100 personas no sanadores											
Mujeres (72)					Hombres (28)						
edad	20 - 30		47	65,3 %		edad	20 - 30		19	67,9	
	31 - 40		15	20,8 %			31 - 40		6	21,4	
	41 - 50		7	9,7 %			41 - 50		2	7,1	
	51 ----		3	4,2 %			51 ----		1	3,6	
Estudios					Estudios						
SE	PR	SEC	PRE	POS	SE	PR	SEC	PRE	POS		
0	1	5	66	0	0	2	4	22	0		
0 %	1,4 %	6,9 %	91,7 %	0 %	0 %	7,1 %	14,3 %	78,6 %	0 %		
Con cuál de estos nombres conoce a la <i>Ochroma pyramidale</i> ?											
B	P-B	M-B	Bo	otros	B	P-B	M-B	Bo	otros		
72	21	55	42	0	28	11	17	22	0		
100	29,2	76,4	58,3	0	100	39,3	60,7	78,6	0		
Cuál de estos usos atribuye a la <i>Ochroma pyramidale</i> ?											
transporte					transporte						
marítimas		100 %			marítimas		100 %				
Utensilios					Utensilios						
Salvavidas	Artesanías		Relleno	Aislante	Salvavidas	Artesanías		Relleno	Aislante		
6	72		35	0	0	28		11	0		
8,3	100		48,6	0	0	100		39,3	0		
Construcción					Construcción						
modelismo		Maquetas		Aspas molinos de vientos	modelismo		Maquetas		Aspas molinos de vientos		
2		26		0			5		0		
2,8 %		36,1 %		0 %			17,9 %		0 %		
forestal			combustible		forestal			Combustible			
Erosión	Reforestación		Carbón	fogata	Erosión	Reforestación		Carbón	fogata		
0	3		6	45	5	15		2	0		
0%	4,2%		8,3%	62,5%	17,9%	53,6%		7,1%	0%		
Medicinal					Medicinal						
Antinf	infec	Pro riñón	Enf vene	Est vac	Antinf	infec	Pro riñón	Enf vene	Est vac		
32	4	1	2	0	11	2	0	0	3		
44,4 %	5,6 %	1,4 %	2,8 %	0	39,3 %	7,1 %	0 %	0 %	10,7 %		
De donde obtuvo la información					De donde obtuvo la información						
PA+	AB+	MA	AB	otros	PA	AB	MA	AB	otros		
2	5	16	49	0	0	2	6	20	0		
2,8	6,9	22,2	68,1	0,0	0,0	7,1	21,4	71,4	0,0		

## 5. - Resultados y Discusión

Tabla 4. Especies conocidas como "balsa" y sus distintos usos entre los "no sanadores" de la región de Puyo							
N.C	Parte usada	Utensilios	Combustible	Forestal	Construcción	Transporte	Medicinal
<i>Ochroma pyramidale</i>	Madera, corteza, Hojas, Raíz, Fruto	Salvavidas artesanías decorativas	Residuos para carbón fogatas	Evitar erosión Reforestar	Modelismo	Embarcaciones marítimas	Antiinflamatorio Antimicrobiano Problemas del riñón Contra enfermedades venéreas Estreñimiento vacuno
<i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav.	Madera Fruto Corteza Raíz Hojas				Viviendas		Estimulante canino Depurador de sangre Antiparasitario Dolores estomacales y vómitos
<i>Heliocarpus americanus</i> L.	Madera	Remos Juguetes artesanías decorativas	carbón			Embarcaciones marítimas	
<i>Trichospermum galeottii</i> (Turcz) Kosterm	Madera				viviendas		
<i>Alchornea grandis</i> Benth	Madera				Viviendas Cercas		
<i>Croton chocoanus</i> Croizat	Madera				construcciones		
<i>Pachira trinitensis</i> Urb	Fruto Madera				construcciones		Hambre
<i>Tessaria integrifolia</i> Ruiz & Pav	Madera ramas	Cucharas artesanías decorativas	fogatas		viviendas		
<i>Schefflera pentandra</i> Harms	madera	Cucharas artesanías decorativas					
<i>Christiana Africana</i> DC	Árbol			Reforestación Evitar erosión			

### 5.1.2.2.- Encuesta a no sanadores de Quevedo:

Los "no sanadores" de Quevedo sólo conocían una especie como "balsa": *O. pyramidale* (Tabla 5).

## 5. - Resultados y Discusión

Entre los habitantes no sanadores de Quevedo, ninguno registraba usos medicinales para la "balsa", solo el uso totalmente comercial de plantaciones extensivas de exportación, para la venta de madera en bloques. A escala industrial es usada la madera para maquetería, modelismo, aspas para molinos de viento y aislantes térmicos en diferentes tipos de transportes, en su mayoría aviones. En micro empresas tiene mucho uso comercial para la elaboración de pequeños implementos del hogar como cucharas, lapiceros, artesanías decorativas, salvavidas, embarcaciones marítimas, (Tabla 6) siendo de estas actividades uno de los rubros más importantes de ingreso económico de muchas familias.

Los residuos de este árbol son usados para la elaboración de carbón o para fogatas en hogares de escasos recursos económicos.

Se destacó que los informantes indican que es muy útil para reforestación, mucho más si la deforestación se provocó por algún incendio, ya que la semilla de esta planta es termoresistente, y es la primera en germinar después de un incendio.

**Tabla 5. Especies conocidas como "balsa" y sus distintos usos en la región de Quevedo**

No sanadores		Usos					
N.C	Parte usada	utensilios	combustible	forestal	construcción	transporte	medicinal
<i>Ochroma pyramidale</i>	Madera Árbol Algodón	Salvavidas Artesanías decorativas Rellenos de almohadas Aislante térmico	Residuos para Carbón Fogatas	Exportación madera Reforestación	Modelismo Maquetas Aspas de molinos	Embarcaciones marítimas	-----

## 5. - Resultados y Discusión

Tabla 6. Encuesta de <i>Ochroma pyramidale</i> en la localidad de Quevedo a un total de 100 personas no sanadores											
Mujeres (65)					Hombres (35)						
edad	20 - 30		45	69,2		edad	20 - 30		27	77,1	
	31 - 40		13	20,0			31 - 40		7	20,0	
	41 - 50		7	10,8			41 - 50		0	0,0	
	51 ----		0	0,0			51 ----		1	2,9	
Estudios					Estudios						
SE	PR	SEC	PRE	POS	SE	PR	SEC	PRE	POS		
0	0	6	57	2	0	0	0	31	4		
0,0	0,0	9,2	87,7	3,1	0	0	0	88,6	11,4		
Con cuál de estos nombres conoce a la <i>Ochroma pyramidale</i> ?											
B	P-B	M-B	Bo	otros	B	P-B	M-B	Bo	otros		
65	0	21	55	0	35	2	32	35	0		
100	0	32,3	84,6	0	100	5,7	91,4	100	0		
Cuál de estos usos atribuye a la <i>Ochroma pyramidale</i> ?											
transporte					transporte						
marítimas		100 %			marítimas		100 %				
Utensilios					Utensilios						
Salvavidas	Artesanías	Relleno	Aislante		Salvavidas	Artesanías	Relleno	Aislante			
13	44	23	33		27	35	31	32			
20	67,7	35,4	50,8		77,1	100	88,6	91,4			
Construcción					Construcción						
modelismo	Maquetas	Aspas molinos de vientos			modelismo	Maquetas	Aspas molinos de vientos				
32	45	0			31	32	27				
49,2	69,2	0			88,6	91,4	77,1				
Forestal		Combustible			Forestal		Combustible				
Erosión	Reforestación		Carbón	fogata	Erosión	Reforestación		Carbón	fogata		
21	15		12	0	29	35		27	1		
32,3	23,1		18,5	0	82,9	100		77,1	2,9		
Medicinal					Medicinal						
Antinf	infec	Pro riñón	Enf vene	Est vac	Antinf	infec	Pro riñón	Enf vene	Est vac		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
De dónde obtuvo la información					De dónde obtuvo la información						
PA+	AB+	MA	AB	Otros*	PA+	AB+	MA	AB	Otros*		
11	21	23	43	65	35	25	12	5	35		
16,9	32,3	35,4	66,2	100	100	71,4	34,3	14,3	100		

Analizando los resultados obtenidos durante las entrevistas y encuestas a personas de ambas regiones, es notable la forma en que el conocimiento de los usos medicinales de *O. pyramidale* ha podido ser restringido a su lugar de origen durante cientos de años. De inmediato surge la pregunta de por qué no se han difundido.



## 5. - Resultados y Discusión

Tal vez algunos de los conceptos enunciados por las sanadoras del Puyo durante las entrevistas puedan darnos una pista:

1. "Cuando busco 'balsa' para trabajar, viajo al interior de la selva para encontrarme en la naturaleza y pedirle a la madre tierra que me brinde de sus poderes medicinales para curar, las plantas cultivadas perdieron ese poder curativo gracias a la mano del hombre y la contaminación".
2. "La 'Balsa' es una madera noble, suave para tratar, pero dura para soportar."
3. "Con el tiempo dejo de ser una planta selecta y pasó a ser de comercio, manipulada".
4. "A la balsa ni el fuego la detiene"
5. "El conocimiento se quedó y no pasó la montaña"

Nótese que las frases 2 y 4 hacen referencia a las propiedades de la planta: su facilidad de manejo y su gran resistencia, que la hace apta para su uso en la fabricación de utensilios, embarcaciones, etc., así como su resiliencia en condiciones ambientales extremas.

Las restantes frases expresan la importancia que tienen las costumbres y saberes ancestrales entre los sanadores del Puyo pertenecientes a las etnias Shuar y Cofanes: su confianza en la Madre Tierra como fuente de conocimiento y sanación, el convencimiento de que las plantas medicinales silvestres son las que realmente sirven y que fuera de su entorno natural y expuestas a condiciones contaminantes del entorno (suelo, ambiente, manipulación, banalización debido al cultivo) pierden o disminuyen su poder curativo, la forma de recolección de esta planta, que no se realiza indiscriminadamente, sino respetando su ciclo vital.

No es menor la referencia a la Cordillera de los Andes, barrera física natural que aún hoy en día dificulta la comunicación entre ambas regiones.

En la región de Quevedo, donde predominan los habitantes occidentalizados, *O. pyramidale* es apreciada fundamentalmente por ser una especie maderable, que se cultiva a gran escala y constituye una importante fuente de ingresos para esa región. No le ven sus habitantes valor medicinal alguno.

Esto, sumado al tabú de Shuar y Cofanes a difundir sus conocimientos ancestrales, han contribuido a que *O. pyramidale* haya permanecido oculta como especie medicinal

## 5.2.- CARACTERES ANATOMICOS DE LAS HOJAS

Según Castillo y Trigos (1987), la observación de la disposición de los haces vasculares en un corte de la zona media del pecíolo contribuye a la determinación de las especies de bosques tropicales.

La estructura anatómica del pecíolo es de gran importancia debido a que está constituido por un número invariable de haces, a determinado nivel de corte y para determinado taxón. Asimismo, las estructuras anatómicas y ordenamiento de los haces vasculares son característicos para cada especie. (Metcalf y Chalk, 1957; Castro Olaya, 2002; Azevedo *et al.*, 2011).

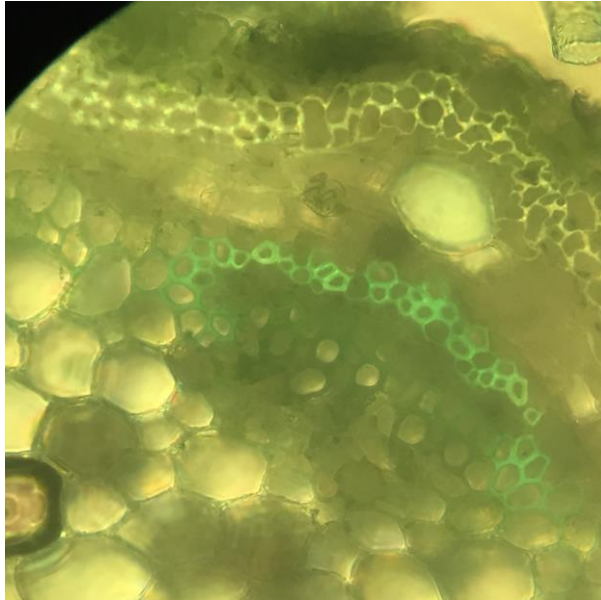
En la Fig. 13 puede apreciarse que esta especie presenta el modelo vascular descrito por Castillo y Trigos (1987) de anillo simple fusionado, con 7 a 9 haces vasculares, uno de mayor tamaño, circundando una médula parenquimática globosa. Se observa además 12 a 17 canales de tipo esquizógeno, tres de ellos en la médula, el resto intercalados con los haces vasculares. Presenta pelos de origen epidérmico.



Fig. 13. *O. pyramidale*: Corte transversal de pecíolo

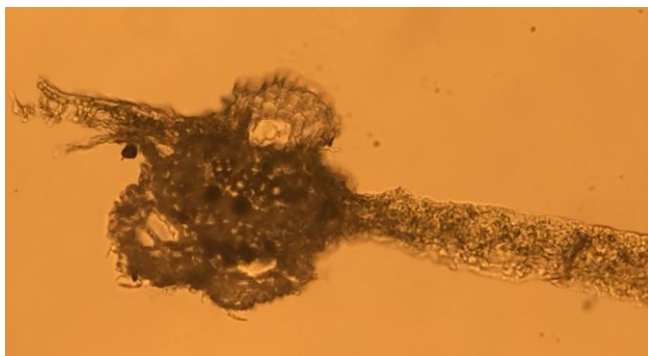
## 5. - Resultados y Discusión

El haz vascular presenta un casquete de fibras (ver Fig. 14) que se observa coloreado de verde esmeralda; también se observan células angulosas (pentagonales y hexagonales) rodeando al haz vascular, protegiendo al floema para que no colapse. Entre los canales y la epidermis, se observa la presencia de colénquima.



**Fig. 14 Detalle del haz vascular**

A nivel de la nervadura central se observan dos canales esquizógenos abaxiales y uno adaxial, con un solo haz vascular de gran tamaño, así como abundante presencia de drusas (Fig. 15).



**Fig. 15. Corte transversal de hoja**

En el corte transversal de hoja se puede observar un mesófilo con estructura dorsiventral, con una capa de parénquima en empalizada hacia la cara superior y dos a tres capas de parénquima esponjoso hacia la inferior. (Fig. 18)

## 5. - *Resultados y Discusión*

En la epidermis superior se aprecia la presencia de células mucilagíferas que actúan como reservorio de mucílago (Fig. 15 y 16).

En la epidermis inferior se aprecia la presencia de estomas elevados (Fig. 17), lo cual constituye una adaptación para climas muy húmedos (Fig. 18).



**Fig. 16.** Corte transversal de la lámina con célula mucilagífera



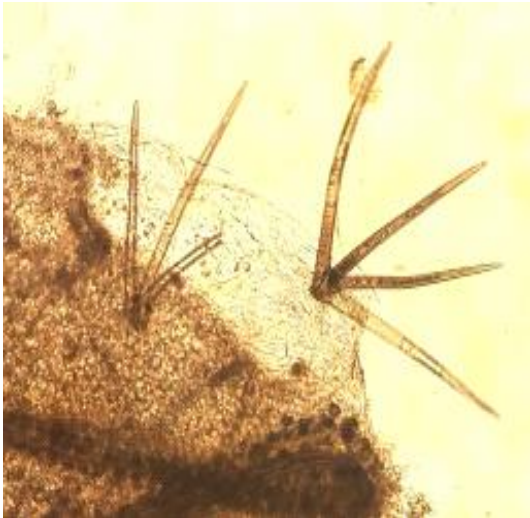
**Fig. 17.** Corte transversal de la lámina con célula mucilagífera



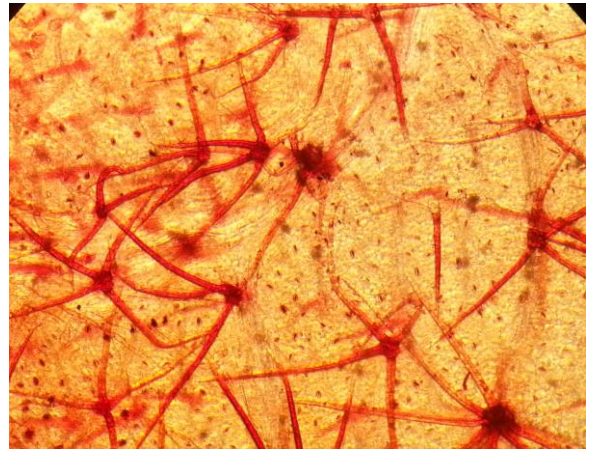
**Fig. 18.** Corte transversal de la lámina con estomas elevados

En vista superficial, en la hoja diafanizada, se puede apreciar en la cara abaxial, la presencia de numerosos pelos e-glandulares unicelulares y estrellados de 4 a 7 células, así como estomas anomocíticos (Fig. 19 y 20)

## 5. - Resultados y Discusión



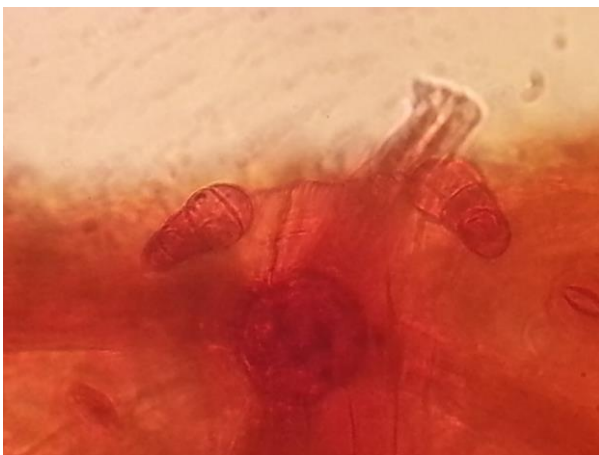
**Fig. 19.** Desgarrado de la lámina con pelos estrellados v estomas



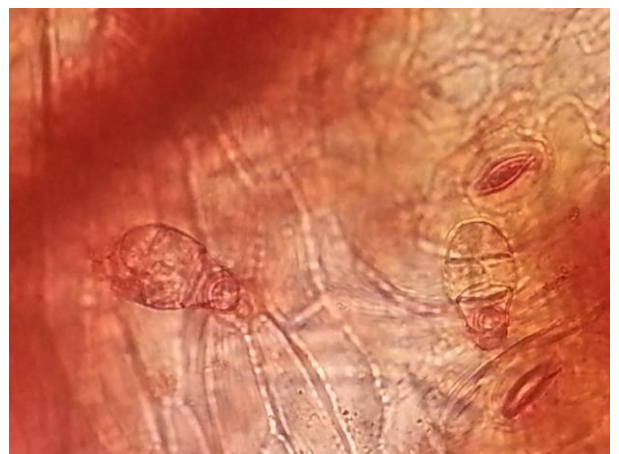
**Fig. 20.** Diafanización de la lámina y coloración con safranina: pelos estrellados v drusas

También se aprecian pelos glandulares de pie unicelular y cabezuela tricelular (Fig. 21 y 22).

Tanto los pelos e-glandulares como los pelos glandulares son mucho más numerosos en las hojas apicales que en las basales.



**Fig. 21.** Diafanización de la lámina y coloración con safranina. Pelos glandulares



**Fig. 22.** Diafanización de la lámina y coloración con safranina. Pelos glandulares v estoma

En el mesófilo de la hoja, se observan numerosas drusas, acompañando a los haces vasculares (Fig. 23 y 24).



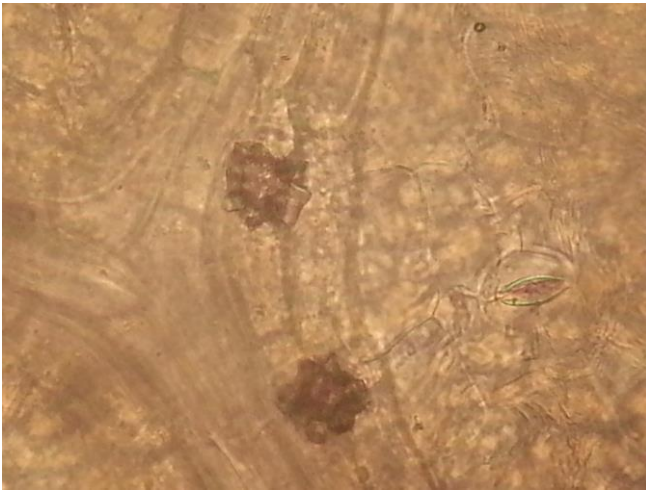


Fig. 23. Diafanización de la lámina. Drusas acompañando al haz vascular



Fig. 24. Diafanización de la lámina. Drusas y pelos e-glandulares

### 5.3.- ENSAYOS FITOQUÍMICOS

#### 5.3.1.- Pruebas químicas orientativas

El resultado del análisis fitoquímico de los extractos de metanol, cloroformo, cloroformo/etanol de las hojas de *Ochroma pyramidale* mostró la presencia de flavonoides, leucoantocianidinas, esteroides, saponinas, taninos y fenoles, así como la ausencia de heterósidos cianogénéticos, antraquinonas y alcaloides (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis fitoquímico de la hoja de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urban.

Compuestos	Fracción	Resultado
Saponinas	Droga cruda	+
Mucílagos	Droga cruda	+
Heterósidos cianogénéticos	Droga cruda	–
Taninos y fenoles	A	+
Flavonoides	A	++
Flavonoides	D	+++
Esteroides	B	++
Antraquinonas	B	–
Alcaloides	C	–
Leucoantocianidinas	E	+++

–: Ausencia, +: Baja concentración, ++: Media concentración, +++: Alta concentración.

## 5. - Resultados y Discusión

Los ensayos realizados, permitieron detectar la presencia de saponinas y mucílagos, no citados anteriormente en la bibliografía.

En la fracción B y acorde con la bibliografía consultada (Vázquez *et al.*, 2001), se obtuvo una reacción positiva para compuestos de tipo esteroide. En ninguna de las fracciones se identificaron compuestos con núcleo quinoide; de igual manera se obtuvieron resultados negativos para los heterósidos cianogenéticos y alcaloides.

Por otra parte, los resultados vistos en los extractos crudos de la hoja de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urban. mostraron una concentración media-alta de flavonoides y de sus derivados.

Para la caracterización de los flavonoides del extracto metanólico (fracción A) y de la mezcla orgánica cloroformo/etanol 3:2 (fracción D) de las hojas de *O. pyramidale* se utilizó la reacción de Shinoda, que fue positiva para ambas fracciones y reacciones a la gota sobre el papel: con cloruro férrico al 1%, que mostraron una coloración azul-negra al espectro visible. Con cloruro de aluminio, la fracción A presentó una leve fluorescencia al espectro U.V. a una longitud de 366 nm; sin embargo con el ácido bórico no evidenció fluorescencia, mientras que la fracción D presentó fluorescencia con ácido bórico, fluorescencia que se vio incrementada en presencia de cloruro de aluminio. Con el hidróxido de potasio se observó una leve coloración amarilla.

Según Domínguez (1973), la coloración azul-negra como consecuencia de la reacción con cloruro férrico 1% indica la relación de tres grupos hidroxilo fenólicos adyacentes.

En la reacción a la gota sobre el papel, el cloruro de aluminio evidenció fluorescencia en las dos fracciones A y D, mientras que el ácido bórico solo en la fracción D.

El ácido bórico forma complejos quelantes con estructuras que poseen un grupo carbonilo y un grupo hidroxilo en posición 5 o en un grupo catecol.

De manera similar reacciona el cloruro de aluminio, formando lacas de color amarillo al visible y fluorescencia amarilla al UV 366 nm.

La diferencia de la intensidad de la fluorescencia de las fracciones A y D, en las cuales los flavonoides están en la forma de heterósidos y aglucón, respectivamente, podría estar indicando que esta última es la forma predominantes en que se encuentran los flavonoides presentes

En la ensayo con el hidróxido de potasio se forma una leve coloración amarilla al espectro visible, debido a la formación de fenatos solubles en álcalis.

Según los resultados de la caracterización de los flavonoides y de acuerdo a la bibliografía consultada (Domínguez, 1973) se puede deducir la presencia, en las fracciones A y D, de flavonoides tipo flavona y/o flavonol. Los mismos fueron confirmados por técnicas de cromatografía en capa fina y por HPLC contra testigos.

### 5.3.2.- Análisis de las cromatografías en capa delgada (CCD) efectuadas a los extractos acuoso y metanólico de *O. pyramidale*

#### Fase móvil 1 (FM1):

Extracto MeOH: se observan 11 bandas, dos de fluorescencia amarillo-limón (Rf 0,62 y 0,73) que se corresponden con los testigos de isovitexina (Isovit) y vitexina (Vit), respectivamente. Se destacan otras dos de intensa fluorescencia amarillo-naranja (Rf 0,55 y 0,65), presumiblemente isovitexina y orientina según datos bibliográficos (Wagner y Bladt, 1996) aunque esto debe ser confirmado (Fig. 25).

Infusión: se destacan dos bandas amarillas de Rf 0,55 y 0,59 (Fig. 25).

#### Fase móvil 2 (FM2):

Extracto MeOH: se observan 11 bandas (Rf 0,08-0,80) de las cuales dos (Rf 0,45 y 0,51) se corresponden con los testigos de isovitexina y vitexina (Fig. 25), destacándose otras dos (Rf 0,08 y 0,15) de fluorescencia amarilla y amarillo-naranja con el reactivo de productos naturales polifenólicos, que por su posición y fluorescencia sugieren la presencia de glicósidos flavonoides derivados, tales como la isoswertisina 2" ramnósido, dato que debe confirmarse.

Infusión (Inf): Se destacan dos bandas de intensa fluorescencia amarilla (Rf 0,062 y 0,09) (Fig. 26).



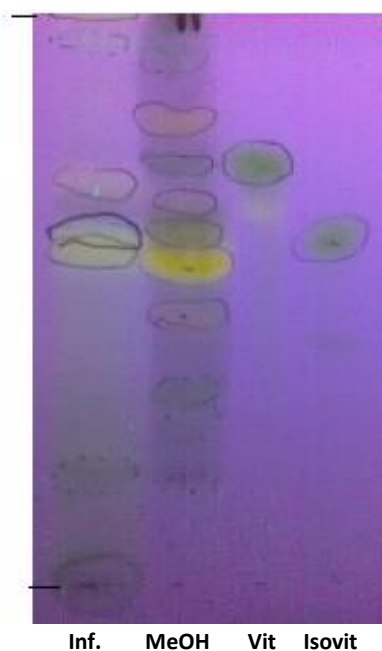


Fig. 25. CCD-FM1: EtOAc/AcOH/ForH/H<sub>2</sub>O (100:11:11:26)

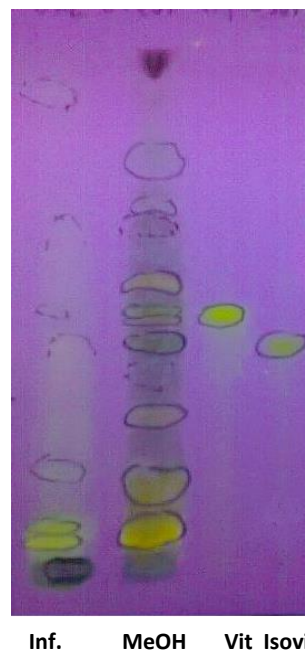


Fig. 26. CCD-FM2: EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O (100:13,5:10)

Los sistemas cromatográficos utilizados, son los recomendados por Wagner y Bladt (1996) para los flavonoides glicosilados. Las cromatografías realizadas contra testigos, además del color y fluorescencia en presencia del reactivo revelador y R<sub>f</sub> de las bandas, permiten apreciar la presencia de las C-glucoflavonas vitexina e isovitexina,

De acuerdo con datos bibliográficos (Wagner y Bladt, 1996) es probable la presencia de isoorientina y orientina, así como de glicósidos flavonoides derivados, tales como la isoswertisina 2" ramnósido, aunque esto debe ser confirmado.

No se observan bandas que se correspondan con las características de color y fluorescencia celeste que Wagner y Bladt describen para ácidos cafeicos o cumarinas en estos sistemas de solventes, por lo que se puede deducir que estos compuestos no están presentes en las hojas de la especie en estudio.

### 5.3.3.- Análisis de las cromatografías por CLAR del extracto metanólico de hojas de *O. pyramidale*

El cromatograma por CLAR muestra dos picos principales (R<sub>t</sub> 10,49 y 15,06 min) concordantes con los testigos de vitexina e isovitexina (Fig. 27).

## 5. - Resultados y Discusión

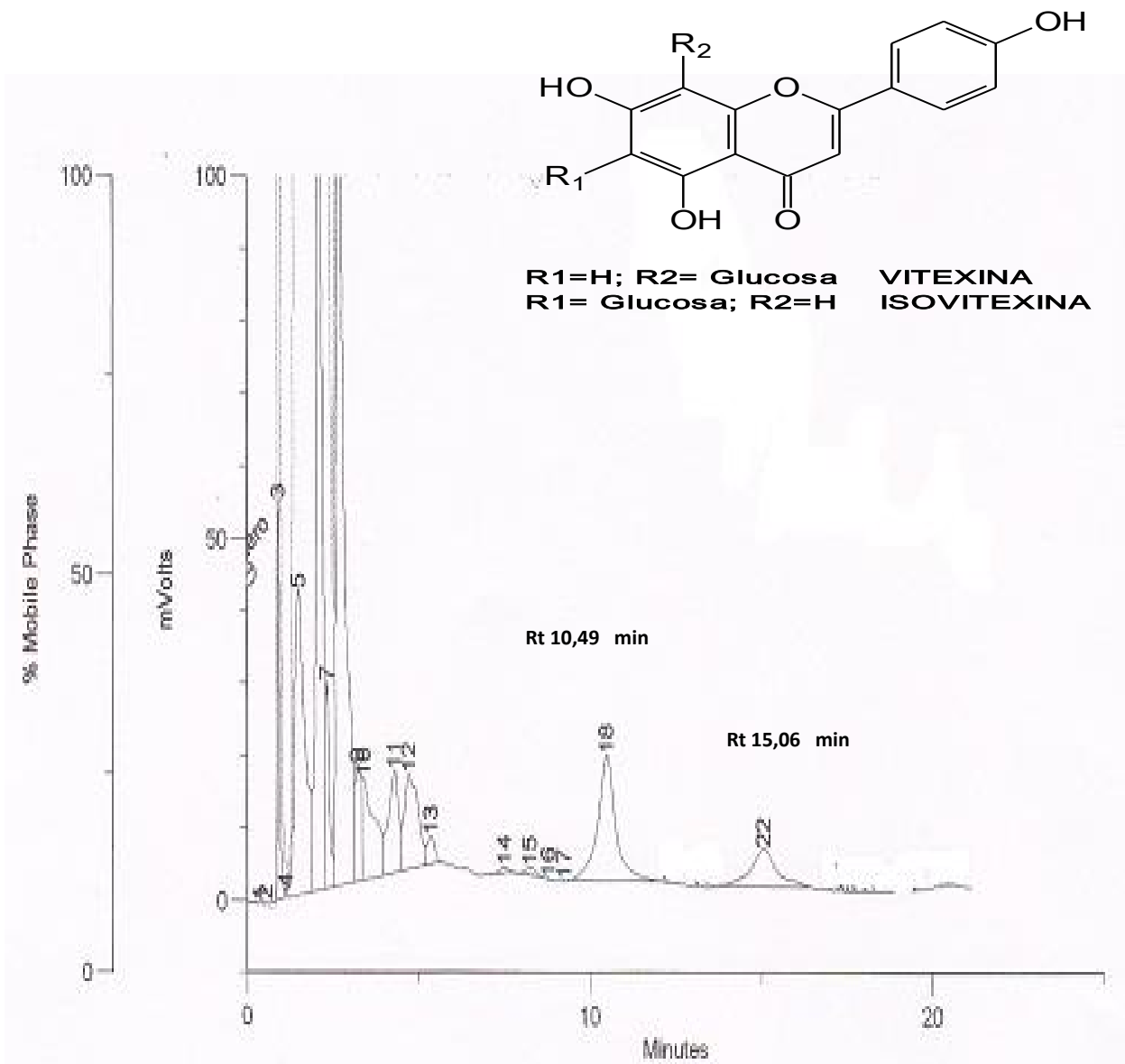


Fig. 27. CLAR del extracto MeOH de hojas de *O. pyramidale*

Además de obtenerse un perfil cromatográfico típico para cada extracto, las CCD y el análisis por CLAR realizados confirman la presencia de los C-glicósidos vitexina e isovitexina en los extractos realizados.

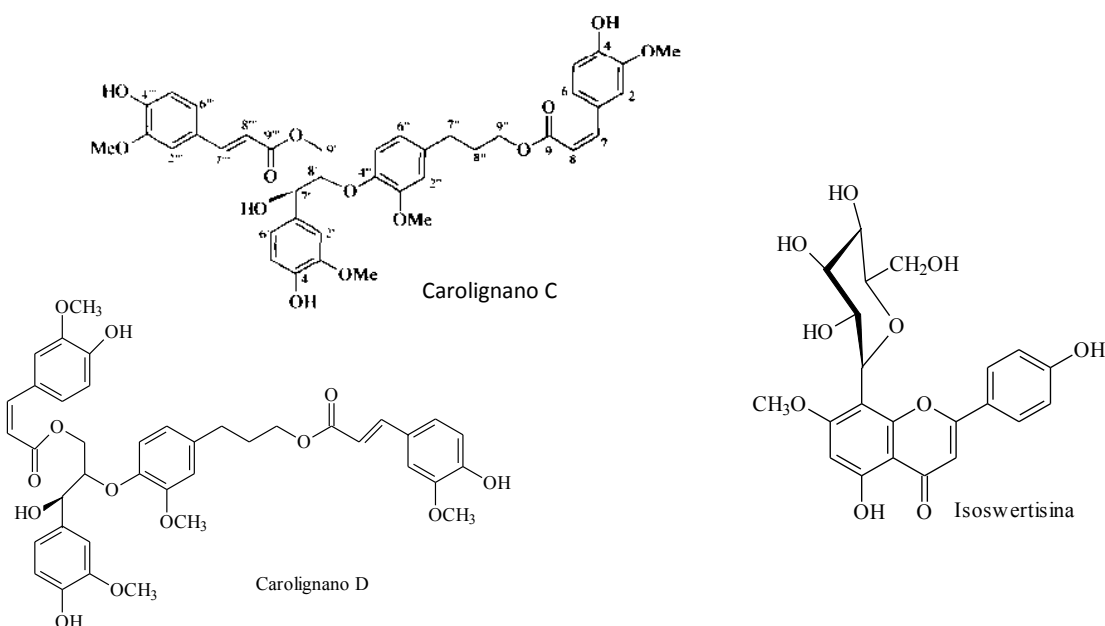
Teniendo en cuenta el uso tradicional de *O.pyramidale* y la posibilidad de que sus extractos puedan integrar alguna formulación fitoterapéutica, la determinación de perfiles cromatográficos contribuiría a un futuro control de calidad. La presencia de flavonas C-glicosiladas, las que poseen diversas propiedades biológicas y

farmacológicas como antihipertensivas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antimicrobianas y antioxidantes, convierte a *O.pyramidale* en una especie promisoría desde el punto de vista de un potencial uso medicinal.

### 5.4.- ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 5.4.1.- Actividad tripanocida

La predicción de la actividad tripanocida, mediante la aplicación del programa de modelos computacionales a componentes presentes en hojas o corteza de *O. pyramidale*, dio como resultado que la mayoría de ellos tendrían esta actividad, especialmente los carolignanos C y D presentes en la corteza y una C-gluco flavona, la isoswertisina (7-O-metil-vitexina) relacionada con la vitexina encontrada en hojas.



Por otro lado, los primeros ensayos referidos al efecto inhibitorio sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, muestran que el extracto metanólico de la corteza de *O. pyramidale* provoca, entre los 4-11 días de cultivo, una disminución de entre el 30-40 % de la proliferación de epimastigotes a una concentración de extracto de 10 a 100  $\mu\text{g/ml}$ , en tanto que para las hojas, fue la decocción la que provocó, entre los 4-6 días, una disminución de entre 30-40 % en la proliferación de epimastigotes a una concentración de extracto de 100  $\mu\text{g/ml}$  (Tablas 8 a 11).

## 5. - Resultados y Discusión

Hasta donde sabemos, no existe en la bibliografía referencias a la aplicación de modelos computacionales para predecir la actividad de los extractos de "balsa", ni hay para las mismas referencias a estudios sobre actividad tripanocida.

Tabla 8. % inhibición crecimiento extracto A (decocción hojas <i>O. pyramidale</i> )						
Ochroma extracto A (acuoso)	Normalizado			Promedios		
	Día 1	Día 4	Día 6	Día 1	Día 4	Día 6
cc (ug/ml)						
0	100	100,0	100,0	10	45,5	66
10	100	80,2	82,8	10	36,5	54,625
100	100	112,6	68,9	10	51,25	45,5
1000	100	60,4	66,3	10	27,5	43,75

Tabla 9. % inhibición crecimiento extracto B (Metanolico hojas <i>O. pyramidale</i> )						
Ochroma Extracto B (MeOH)	Normalizado			Promedios		
	Día 1	Día 4	Día 6	Día 1	Día 4	Día 6
cc (ug/ml)						
0	100	100,0	100,0	10	47,75	45
10	100	129,8	143,9	10	62	64,75
100	100	80,1	161,1	10	38,25	72,5
1000	100	84,3	123,9	10	40,25	55,75

Tabla 10. % inhibición crecimiento extracto C (decocción corteza <i>O. pyramidale</i> )						
Ochroma Extracto C (acuoso)	Normalizado			Promedios		
	Día 1	Día 4	Día 11	Día 1	Día 4	Día 11
cc (ug/ml)						
0	100	100,0	100,0	2	12,80	6,03
10	100	131,3	106,6	2	16,80	6,43
100	100	82,6	111,6	2	10,57	6,73
1000	100	109,4	99,4	2	14,00	6,00

Tabla 11. % inhibición crecimiento extracto D (Metanolico corteza ( <i>O. pyramidale</i> ))								
Ochroma Extracto D (metanolico)	Normalizado				Promedios			
	Día 1	Día 4	Día 11	Día 15	Día 1	Día 4	Día 11	Día 15
cc (ug/ml)								
0	100	100,0	100,0	100,0	2	11,47	3,73	3,73
10	100	94,2	138,4	137,5	2	10,80	5,17	5,13
100	100	110,5	130,4	117,9	2	12,67	4,87	4,40
1000	100	62,2	64,3	74,1	2	7,13	2,40	2,77

Condiciones cultivo: Cultivo inicial:  $10 \times 10^6$  parásitos/ml - BHY 10%

## 5. - Resultados y Discusión

Los modelos computacionales ya desarrollados por los grupos del Dr. Talevi y la Dra. Carrillo son aplicados en el tamizado virtual de las bases de datos DrugBank 3.0 (Knox *et al.*, 2011), Sweetlead (Novick *et al.*, 2013) y NCGC Pharmaceutical Collection (Huang *et al.*, 2011). Estos recursos compilan fármacos aprobados y experimentales de la FDA y otras agencias regulatorias, incluyendo productos naturales. Es interesante destacar que las plantas medicinales suelen incluir en su composición una gran diversidad de sustancias químicas altamente relacionadas entre sí, por lo que al identificar un compuesto activo en una planta determinada es altamente probable que la misma incluya un conjunto de compuestos activos similares desde el punto de vista molecular y –por lo tanto- farmacológico.

Una actividad no prevista en el plan de tesis original, fue la aplicación del programa de modelos computacionales a diversos componentes presentes en la especie *O. pyramidale*.

Como resultados iniciales alentadores, varios de los componentes reportados y compuestos relacionados con estos, han sido predichos como activos sobre cruzipaína y la permeasa de poliaminas por esos modelos, entre ellos los carolignanos C y D de la corteza y una C-glucoflavona derivada de la vitexina: la isoswertisina.

Los resultados de los ensayos para poner de manifiesto el efecto inhibitorio sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* tienen concordancia con los resultados predichos, sobre todo teniendo en cuenta que el ensayo se hizo sobre los extractos crudos. Siguiendo el razonamiento de Valencia *et al.* (2011), Maya *et al.* (2007) y Osorio *et al.* (2007) podrían ser considerados como extractos activos a moderadamente activos.

Sin embargo, y aunque se obtuvieron resultados alentadores, es necesario estimar el  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria 50%) así como ensayar las fracciones y compuestos obtenidos de los extractos citados. También sería importante, para los extractos y/o fracciones con buena actividad contra epimastigotes y baja citotoxicidad, evaluar su actividad sobre tripomastigotes de *T. cruzi* (la forma responsable de la infección en el hombre) y determinar el índice de selectividad (proporción entre la citotoxicidad y la actividad contra el parásito) que recomienda la bibliografía (Valencia *et al.*, 2011).

#### 5.4.2.- Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos

El método ensayado busca poner de manifiesto la capacidad de un extracto o compuesto determinado para inhibir la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7. Es por ello que es de suma importancia utilizar para el ensayo una concentración de extracto que permita la supervivencia de las células, de modo de asegurarnos que la producción de NO realmente fue inhibida por acción del extracto sobre algún mecanismo celular y no porque provocó la muerte de las células.

A fin de elegir la concentración de extracto que asegure la supervivencia de las células, se evaluó el efecto citotóxico de los extractos hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso (decocción) de las hojas de *O. pyramidale*, en concentraciones finales de entre 10 µg/ml a 50 µg/ml, mediante el ensayo del MTT, midiendo la absorbancia del formazan producido a 490 nm (ver Materiales y Métodos).

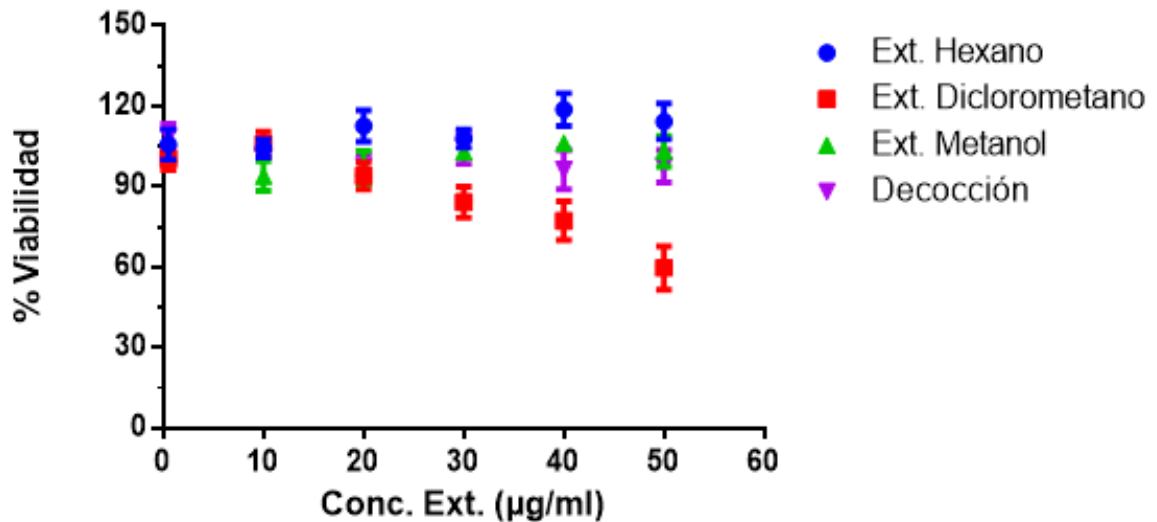
Con los valores de absorbancia obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Viabilidad = \frac{Am}{Ac} \times 100$$

Donde: *Am* es la media aritmética de la absorbancia de la muestra y *Ac* la media aritmética de la absorbancia del control (células sin tratamiento). Los valores obtenidos se graficaron vs. la concentración para cada extracto ensayado.

## 5. - Resultados y Discusión

Fig. 28. % Viabilidad de células RAW frente a extractos de hojas de *O. pyramidale*



Extractos hexano				diclorometano			metanol			acuoso		
Conc.	% Viabilidad	SEM	n	% Viabilidad	SEM	n	% Viabilidad	SEM	n	% Viabilidad	SEM	n
50,000	114,333	6,69162	3	59,750	8,10735	4	103,250	5,79331	4	97,66666	6,06446	3
40,000	118,750	6,08789	4	77,333	7,17247	3	106,3333	2,18581	3	96,33334	7,31057	3
30,000	108,000	3,43996	4	84,250	5,85057	4	103,000	1,47196	4	104,500	5,92311	4
20,000	112,666	5,89726	3	94,000	5,03322	3	97,000	6,33771	4	97,66666	4,70224	3
10,000	104,250	3,32603	4	106,000	4,56435	4	94,000	5,56776	3	101,3333	2,90593	3
0,500	105,750	5,63286	4	100,250	4,00780	4	102,250	2,46221	4	108,6667	4,80740	3

Como surge de la observación de la Fig. 28, para los extractos hexánicos, metanólico y acuoso las células presentan un porcentaje de viabilidad de *ca.* 90-95%, para concentraciones finales de hasta 10 y 50 µg/ml, en tanto que para el extracto diclorometánico, ese mismo porcentaje se da a una concentración final de extracto de hasta 10 y 20 µg/ml.

Para determinar el porcentaje de inhibición de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 se trabajó con las siguientes concentraciones finales de extractos:

Extracto hexánico: 20 y 50 µg/ml (H20 y H50 respectivamente)

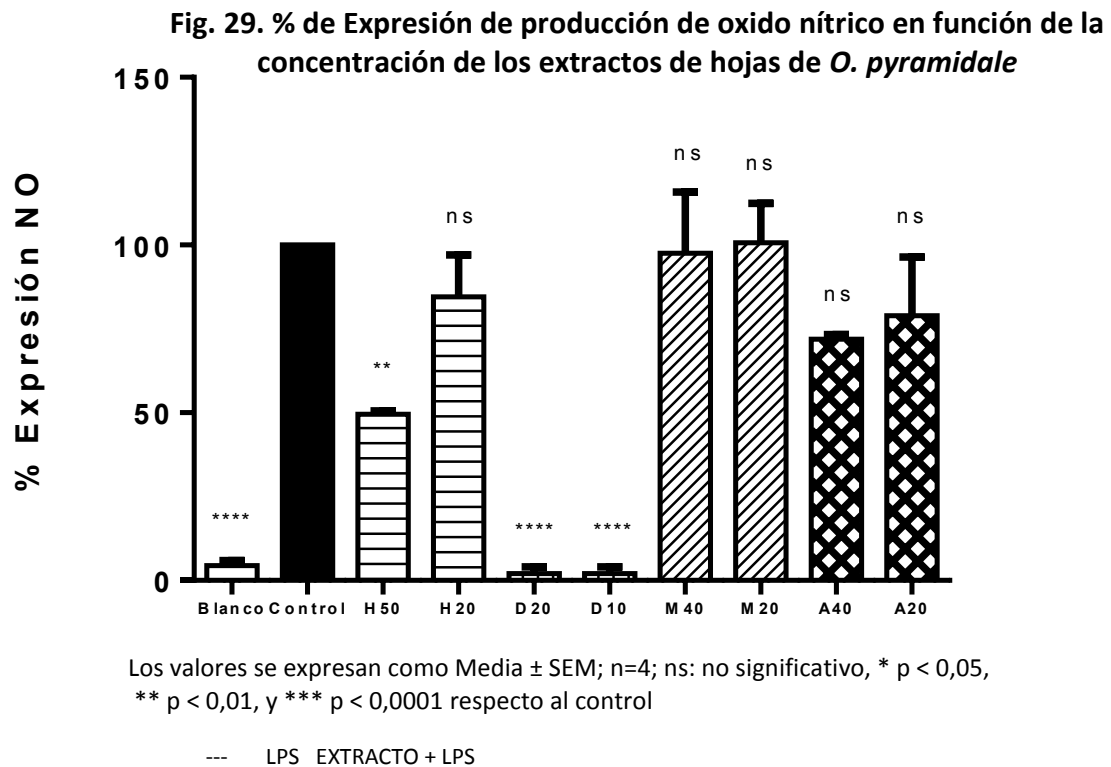
Extracto diclorometánico: 10 y 20 µg/ml (D10 y D20 respectivamente)

Extracto metanólico: 20 y 40 µg/ml (M20 y M40 respectivamente)

## 5. - Resultados y Discusión

Extracto acuoso (decocción): 20 y 40 µg/ml (A20 y A40 respectivamente)

El porcentaje de expresión de la producción de óxido nítrico en función de la concentración final de cada extracto, se muestra en la Fig. 29.



La evaluación de la acción inhibidora sobre la producción de Óxido Nítrico en las células RAW 264,7 muestra que de los cuatro extractos (hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso), el extracto diclorometánico a concentraciones finales de 10 y 20 µg/ml inhibe totalmente la producción de NO, sin afectar visiblemente la viabilidad celular.

De los extractos restantes, el extracto hexánico, a concentración de 50 µg/ml produjo una inhibición de la producción de NO de ca. 40-50% respecto al control sin afectar la viabilidad celular.

Los extractos metanólico y acuoso, y el extracto hexánico a concentraciones menores a 50 µg/ml no producen una inhibición significativa de la producción de NO.



## 5. - Resultados y Discusión

Las citotoxicidad del extracto diclorometánico a las concentraciones de 20  $\mu\text{g/ml}$  puede prestarse para algunas interpretaciones, ya que si bien se puede observar en los resultados una importante disminución en la producción de óxido nítrico, este efecto podría relacionarse con la disminución de la viabilidad celular que empieza a observarse a esta concentración; sin embargo, no es menos cierto que no se podría descartar que dentro de una composición tan compleja como la de un extracto vegetal puedan coexistir metabolitos que generen esta toxicidad junto a metabolitos bioactivos y que los primeros no sean detectados bajo estas condiciones experimentales por afectar a las células, pero quizás sí puedan ponerse de manifiesto aislándolos a través de procesos de fraccionamiento y purificación.

El caso del extracto hexánico es diferente al anterior, ya que produce un buen efecto inhibitor en la producción de NO, a concentraciones de 50  $\mu\text{g/ml}$ , en la cual tampoco se detectan efectos tóxicos en las células. La posibilidad de utilizar concentraciones superiores a 25  $\mu\text{g/ml}$  es un camino válido en la búsqueda de sustancias con esta actividad biológica.

Para los extractos metanólico y acuoso, un primer paso consistiría en determinar el rango de concentraciones mayores a 25  $\mu\text{g/ml}$ , que sin afectar la viabilidad celular permita evaluar su actividad en este modelo de investigación, ya que si nos remitimos simplemente a las concentraciones empleadas en este estudio, la ausencia de respuesta inhibitoria por esta vía de señalización celular vinculada con la inflamación nos indica que este no sería el mecanismo por el que puede actuar la decocción de la planta que -como hemos anotado anteriormente- es la forma en que se la usa en medicina tradicional, teniendo siempre en cuenta varios aspectos:

1) La síntesis de óxido nítrico es sólo uno de los mecanismo que se ponen en marcha en el proceso de la inflamación, y la complejidad de esta respuesta biológica se debe a la gran cantidad de actores que incluyen a prostaglandinas, leucotrienos, histamina, serotonina, proteasas, especies reactivas de oxígeno (además del NO), infiltración celular, etc., por lo que, para generar una evaluación más cercana del verdadero potencial de una sustancia por métodos *in vitro* se debería analizar su actividad frente a varios de estos agentes participantes en la inflamación, así que la evaluación que se ha realizado en este estudio representa sólo una parte de esta primera etapa.

2) Los procesos farmacocinéticos a los que se enfrentan los principios activos en el organismo, ausentes en las evaluaciones *in vitro*, desempeñan papeles fundamentales ya que en muchos casos las reacciones metabólicas que se ejecutan son las que transforman a sustancias inactivas *in vitro* en moléculas con acción farmacológica *in vivo*.

Un aspecto que no se podría descartar hasta identificar a la sustancia (o sustancias) en los extractos hexánico y diclorometánico responsables de la acción biológica investigada, es que ésta se encuentre presente también en la decocción de la planta.

Obviamente el hecho de que su extracción se haya realizado con solventes como hexano o diclorometano nos habla de su lipofilicidad, sin embargo, el tratamiento térmico en la decocción de muchas plantas ha mostrado que es capaz de solubilizar sustancias con baja polaridad, aunque es claro que estarán en bajas proporciones. Las saponinas detectadas durante el screening fitoquímico también podrían actuar como intermediarios en la extracción de estos compuestos lipofílicos con un medio acuoso.

### 5.4.3.- Actividad antibacteriana e inhibidora de la producción de biofilm

Se ensayaron extractos diclorometánico y metanólico de hojas y corteza de *O. pyramidale* a dos concentraciones, para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento y de inhibición del biofilm en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Respecto a la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa*, los mejores resultados se observan para los extractos metanólicos en concentraciones de 100 ppm, inhibiendo un 37,80 % del crecimiento el de corteza, seguido por el extracto de hojas que inhibe el crecimiento en un 35,96 % (Tabla 12).

## 5. - Resultados y Discusión

Tabla 12. Inhibición del Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853										
Extractos	100 ppm				10 ppm				C. CREC	C. INH
	EDc	EMc	EDh	EMh	EDc	EMc	EDh	EMh		
DO 560 nm	0,519	0,32	0,526	0,363	0,488	0,53	0,505	0,438	0,565	0,162
	0,51	0,331	0,515	0,343	0,468	0,496	0,489	0,43	0,519	0,147
	0,474	0,31	0,506	0,317	0,503	0,498	0,442	0,427	0,529	0,169
	0,525	0,319	0,524	0,324	0,463	0,516	0,467	0,403	0,501	0,142
	0,515	0,349	0,523	0,33	0,493	0,537	0,478	0,422	0,505	0,142
Desv Est	0,020	0,015	0,008	0,018	0,017	0,018	0,024	0,013	0,025	0,012
Promedio	0,5086	0,3258	0,5188	0,3354	0,483	0,515	0,4762	0,424	0,5238	0,152
%Inhibición	2,90	<b>37,80</b>	0,95	<b>35,96</b>	7,79	1,60	9,09	<b>19,05</b>	0	70,90

EDc: Extracto Diclorometánico de corteza; EMc: Extracto Metanólico de corteza; EDh: Extracto Diclorometánico de hoja; EMh: Extracto Metanólico de hoja.

Para la inhibición de la formación de biofilm de *P. aeruginosa*, los resultados fueron todavía mejores (Tabla 13) y más parejos, tanto para los extractos metanólicos como diclorometánicos, siendo el más activo, a concentraciones de 100 ppm, el extracto metanólico de hojas (68,65 % de inhibición de formación de biofilm), seguido por el extracto metanólico de corteza (62,24 %) y los extractos diclorometánicos de hoja y corteza, con valores de 54,86 y 52 % de inhibición de formación de biofilm, respectivamente.

Los valores siguen siendo altos y próximos a los ya mencionados, para concentraciones de 10 ppm, en los extractos metanólico de corteza (55,09 %) y diclorometánico de hoja (39,87 %).

## 5. - Resultados y Discusión

**Tabla 13. Inhibición de la Formación de Biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Extractos	100 ppm				10 ppm				C. CREC	C. INH
	EDc	EMc	EDh	EMh	EDc	EMc	EDh	EMh		
DO 560 nm	0,142	0,091	0,163	0,11	0,421	0,16	0,206	0,364	0,371	0,095
	0,172	0,092	0,153	0,118	0,406	0,13	0,19	0,35	0,343	0,068
	0,199	0,218	0,175	0,103	0,401	0,193	0,223	0,352	0,36	0,07
	0,171	0,148	0,148	0,103	0,404	0,13	0,196	0,383	0,34	0,079
	0,155	0,111	0,15	0,114	0,393	0,172	0,236	0,349	0,334	0,102
Desv Est	0,021	0,053	0,011	0,007	0,010	0,027	0,019	0,014	0,015	0,015
Promedio	0,168	0,132	0,158	0,110	0,405	0,157	0,210	0,360	0,350	0,083
%Inhibición	<b>52,00</b>	<b>62,24</b>	<b>54,86</b>	<b>68,65</b>	-15,85	<b>55,09</b>	<b>39,87</b>	-2,86	0	76,31

EDc: Extracto Diclorometánico de corteza; EMc: Extracto Metanólico de corteza; EDh: Extracto Diclorometánico de hoja; EMh: Extracto Metanólico de hoja.

Estos resultados son concordantes con los grupos fitoquímicos encontrados en las muestras ensayadas. En el caso de la corteza, los compuestos de tipo lignano citados en la bibliografía y según nuestras predicciones por modelos computacionales, poseen actividad citotóxica.

En el caso de las hojas, se encontraron flavonoides, y hemos confirmado por CCD y HPLC la presencia de la C-glucoflavona vitexina. Este compuesto ha sido citado en la bibliografía (Das *et al.*, 2016) como inhibidor de la formación de biofilm en *P. aeruginosa*, por lo que esta actividad en el extracto de hojas de *O. pyramidale* podría deberse a la presencia de este componente u otros químicamente relacionados.

En el caso de *S. aureus* (Tabla 14) el porcentaje de inhibición del crecimiento fue mucho menor para todos los extractos ensayados, siendo los que mejores valores dieron a concentración de 100 ppm, el extracto diclorometánico de corteza (14,90 %) y a concentración de 10 ppm, los extractos metanólico de corteza (23,52 %) y diclorometánico de hoja (16,68 %).

## 5. - Resultados y Discusión

**Tabla 14. Inhibición del Crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6738**

Extractos	100 ppm				10 ppm				C. CREC	C. INH
	EDc	EMc	EDh	EMh	EDc	EMc	EDh	EMh		
DO 560 nm	0,91	1,365	1,02	0,936	1,063	0,928	0,822	1,107	1,242	0,34
	0,958	1,397	0,939	0,86	1,065	0,959	0,878	1,113	1,151	0,335
	1,053	1,33	0,953	0,933	1,042	0,879	0,899	1,111	1,129	0,257
	1,063	1,363	1,027	0,927	1,1	0,9	1,153	1,097	1,189	0,378
	0,991	1,369	1,11	1,03	1,044	0,805	1,119	1,14	1,135	0,34
Desv Est	0,064	0,024	0,068	0,061	0,023	0,058	0,151	0,016	0,0470	0,044
Promedio	0,995	1,365	1,010	0,937	1,063	0,894	0,974	1,114	1,169	0,33
%Inhibición	<b>14,90</b>	-16,72	13,63	19,84	9,10	<b>23,52</b>	<b>16,68</b>	4,75	0	71,77

EDc: Extracto Diclorometánico de corteza; EMc: Extracto Metanólico de corteza; EDh: Extracto Diclorometánico de hoja; EMh: Extracto Metanólico de hoja.

Con respecto a la inhibición de la formación de biofilm de *P. aeruginosa*, ninguno de los extractos presentan actividad de inhibición de la formación del biofilm en ninguna de las dosis evaluadas (Tabla 15). Por el contrario, el microorganismo estimula la producción de biofilm para protegerse, por ello los valores expresados son negativos.

**Tabla 15. Inhibición de la Formación de Biofilm de *Staphylococcus aureus* ATCC 6738**

Extractos	100 ppm				10 ppm				C. CREC	C. INH
	EDc	EMc	EDh	EMh	EDc	EMc	EDh	EMh		
DO 560 nm	0,613	0,439	0,609	0,734	0,383	0,422	0,761	0,435	0,354	0,053
	0,535	0,478	0,557	0,786	0,445	0,401	0,716	0,484	0,337	0,06
	0,617	0,449	0,52	0,657	0,477	0,412	0,747	0,439	0,376	0,056
	0,593	0,434	0,547	0,659	0,394	0,554	0,665	0,436	0,351	0,084
	0,713	0,384	0,486	0,652	0,341	0,394	0,709	0,457	0,38	0,069
Desv Est	0,064	0,034	0,046	0,060	0,053	0,066	0,037	0,021	0,018	0,012
Promedio	0,614	0,437	0,544	0,698	0,408	0,437	0,720	0,450	0,360	0,064
%Inhibición	-70,80	-21,47	-51,22	-93,99	-13,46	-21,41	-100,11	-25,2	0	82,09

EDc: Extracto Diclorometánico de corteza; EMc: Extracto Metanólico de corteza; EDh: Extracto Diclorometánico de hoja; EMh: Extracto Metanólico de hoja.

## *5. - Resultados y Discusión*

Ninguno de los extractos vegetales presentan actividad de inhibición del biofilm de *S. aureus* en ninguna de las dosis evaluadas; por el contrario, el microorganismo genera biofilm para defenderse, por ello los valores expresados son negativos.

## 6.- Conclusiones

---

## Conclusiones

- \* *O. pyramidale* es conocida como "balsa" por el 100% de los entrevistados sanadores y no sanadores de Quevedo y Puyo. Todos ellos le reconocen usos como especie maderable, en la construcción y fabricación de embarcaciones y diversos utensilios y artesanías.
- \* Solamente los habitantes de Puyo la utilizan con fines medicinales, para tratar dolencias asociadas a procesos inflamatorios, infecciosos y parasitarios.
- \* Los usos medicinales tradicionales de *O. pyramidale* en la región de Puyo, en la Amazonía ecuatoriana, no se han difundido en la región de Quevedo, en la zona costera, en parte por la barrera natural que supone la cordillera de Los Andes; en parte por ser los habitantes de Quevedo, básicamente de colonos, históricamente más influidos por la cultura hispánica occidental; en parte por las restricciones que las comunidades Shuar y Cofanes imponen a sus miembros contra la difusión de esa información.
- \* Los saberes tradicionales referentes a la utilización de la "balsa" para tratar diversas dolencias son transmitidos oralmente, de generación en generación, principalmente a través de las mujeres de la familia.
- \* Se confirma el modelo vascular descrito por Castillo y Trigos, para la zona media del pecíolo de hojas de *O. pyramidale*, los cual, según estos autores, contribuye a la identificación de esta especie.
- \* Como elementos de diagnóstico adicionales, hasta donde hemos podido comprobar descritos por primera vez en el presente trabajo, se hallaron canales esquizógenos en el pecíolo (zona medular y periférica), células mucilagíferas en la cara abaxial de la hoja, estomas anomocíticos elevados, pelos e-glandulares unicelulares y estrellados 4-7 células, pelos glandulares de pie unicelular y cabezuela tricelular. Estos dos últimos elementos son más abundantes en las hojas apicales.



- \* Los elementos de diagnóstico citados, podrían contribuir al control farmacobotánico de la especie en una eventual monografía farmacopeica.
- \* Los ensayos fitoquímicos preliminares realizados muestran la existencia en hojas de *O. pyramidale* cultivada en el cantón de Quevedo, de distintos grupos fitoquímicos, tales como saponinas, mucílagos, flavonoides y sus derivados, con una estructura probable de tipo flavona o flavonol, presentes en forma de heterósidos y/o aglicones.
- \* La cromatografía en capa delgada y la cromatografía líquida de alta resolución, realizadas contra testigos, permitieron confirmar en el extracto metanólico de hojas de *O. pyramidale* cultivada en Quevedo, Ecuador, la presencia de dos C-glucoflavonas: vitexina e isovitexina, esta última descrita por primera vez para *O. pyramidale*.  
La presencia de flavonas C-glicosiladas, que poseen diversas propiedades biológicas y farmacológicas como antihipertensivas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antimicrobianas y antioxidantes, convierte a *O. pyramidale* en una especie promisoría desde el punto de vista de un potencial uso medicinal.
- \* Los perfiles cromatográficos por CCD y CLAR podrían contribuir a un futuro control de calidad.
- \* Como actividad paralela a la realización de la tesis mencionada, la predicción y eventual confirmación de compuestos activos con efecto tripanocida presentes en la corteza de *O. pyramidale*, abre la puerta al aprovechamiento de un subproducto de la industria maderera de la “balsa”, tanto en la industria farmacéutica de especialidades medicinales, como en productos de herboristería potencialmente aplicables al tratamiento de la enfermedad de Chagas, parasitosis endémica con una alta proporción de afectados en nuestro continente.

## 6. - Conclusiones

Hasta donde sabemos, no existe en la bibliografía referencias a la aplicación de modelos computacionales para predecir la actividad de los extractos de "balsa", ni hay para las mismas referencias a estudios sobre actividad tripanocida.

- \* Se comprueba la inhibición de mediadores inflamatorio (NO) *in vitro*, siendo los extractos diclorometánico (Concentraciones finales: 10 y 20 µg/ml) y hexánico (Concentración final: 50 µg/ml) los únicos que inhibieron la producción de óxido nítrico: ca. 100% y 50% de inhibición, respectivamente, sin mostrar toxicidad para las células.

De acuerdo a estos resultados, podría inferirse que las hojas de *O. pyramidale* no tendrían las propiedades antiinflamatorias que se le atribuyen tradicionalmente, dado que lo que se utiliza es la infusión o la decocción (extractos acuosos) y los compuestos antiinflamatorios se hallarían en los extractos diclorometánico y hexánico. Sin embargo, no debe olvidarse la presencia en las hojas de saponinas, que podrían actuar en forma sinérgica, facilitando la extracción de esos compuestos con solventes más polares.

Hasta donde sabemos, no existe en la bibliografía referencias a estudios sobre la inhibición de mediadores inflamatorios (NO) por extractos de "balsa".

- \* Los resultados obtenidos frente a la inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa*, son concordantes con alguno de los usos tradicionales de las hojas y corteza de *O. pyramidale* relacionados con la actividad antibacteriana (tratamiento de enfermedades venéreas, heridas, problemas renales), que muy probablemente sea debida a la presencia de las C-glucoflavonas vitexina o isovitexina detectadas en los extractos de hojas.
- \* La inhibición de la formación de biofilm de *P. aeruginosa* en valores especialmente relevantes para los extractos de hojas, parece confirmar esa presunción y convierte a las hojas de *O. pyramidale* en fuente de nuevos agentes contra el biofilm bacteriano asociado a patogénesis.

Hasta donde sabemos, no existe en la bibliografía referencias a estudios sobre la actividad antibacteriana o inhibición de la formación de biofilm por extractos de "balsa".

Se confirman así las dos hipótesis planteadas al comienzo de este trabajo

### **Proyección de los resultados obtenidos**

Mas allá de la realización de esta tesis, se pretende continuar con el fraccionamiento de los extractos de hojas y corteza de "balsa", determinando las actividades biológicas de las fracciones y eventuales compuestos aislados de las mismas, especialmente para la actividad tripanocida, por estar ésta relacionada con una de las enfermedades "huérfanas" que recibe escasa atención por parte de la industria farmacéutica y que afecta a una gran cantidad de la población, especialmente los sectores más vulnerables.

Por ultimo, destacar que ésta es sólo una primera etapa para validar el uso tradicional de esta especie como antiinflamatorio. Como ya se dijo, es necesario probar su actividad frente a varios de los agentes participantes en la inflamación, así como realizar ensayos *in vivo*, y también probar las fracciones y eventuales compuestos aislados de esos extractos, por lo que la evaluación que se ha realizado en este estudio representa sólo una parte de esta primera etapa.

## 7.- Resumen

---

## **“Balsa”**

# ***Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.**

## **(Bombacaceae)**

*O. pyramidale* (Bombacaceae) conocida como "balsa", es una especie maderable que crece silvestre en la selva amazónica y constituye uno de los principales recursos económicos de Ecuador, donde se la cultiva a gran escala.

La madera (leño) se utiliza para la construcción de viviendas y embarcaciones, fabricación de numerosos utensilios de uso doméstico y artesanías, entre otros.

En algunas regiones de Latinoamérica se le asignan también usos medicinales, especialmente a la corteza, hojas y raíces.

Hasta el momento no se ha hecho en Ecuador un relevamiento sobre el uso popular de esta especie, ni existen datos farmacológicos o toxicológicos que justifiquen su empleo en terapéutica.

El relevamiento etnofarmacobotánico y el estudio anatómico, así como el reconocimiento de grupos fitoquímicos y la determinación de actividades biológicas, puede resultar especialmente relevante a la hora de validar el uso tradicional de *O. pyramidale*, recuperando así saberes ancestrales que han llegado hasta nuestros días incompletos o tergiversados, a la vez que abre la posibilidad de utilizar un subproducto de la industria maderera (hojas y corteza) actualmente desaprovechados y que podrían convertirse en una fuente de ingresos y de puestos de trabajo para la población.

A partir de la observación de los usos que se le dan a una planta denominada "balsa" en dos regiones de Ecuador: Quevedo y Puyo, se plantean las siguientes hipótesis:

**1.-** De los habitantes de dos regiones ecuatorianas pertenecientes a la Amazonía u Oriente y a la Costa, solo los de la región de Puyo (Amazonía) utilizan *O. pyramidale* con fines medicinales debido a la falta de difusión de los saberes ancestrales.

**2.-** Las hojas y corteza de *O. pyramidale* son utilizadas tradicionalmente por sanadores de las etnias Shuar y Cofanes para el tratamiento de una serie de dolencias descritas como: "para cuando tenga una inflamación", "para las enfermedades venéreas", "para las heridas", "para problemas del riñón", "para el estreñimiento y parásitos del ganado vacuno", por lo que es esperable que alguno de los extractos obtenidos o los compuestos presentes en *O. pyramidale* presenten actividades biológicas relacionadas con la inhibición de mediadores pro-inflamatorios, antibacteriana, antiparasitaria, antifúngica, citotóxica y/o antiespasmódica.

Las hipótesis planteadas se desarrollaron cubriendo los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Contribuir a la revalorización de la flora medicinal latinoamericana.

### **Objetivos específicos**

- \* Efectuar un relevamiento de las especies conocidas como "balsa" en las regiones ecuatorianas de Puyo (Amazonia) y Quevedo (Costa).
- \* Establecer los usos registrados para *O. pyramidale* en las regiones ecuatorianas de Puyo (Amazonia) y Quevedo (Costa), analizando las diferencias existentes entre ambas regiones y sus posibles causas.
- \* Establecer parámetros micrográficos de las hojas de *O. pyramidale* que puedan contribuir a una eventual identificación de las mismas.
- \* Establecer cuales son los grupos fitoquímicos presentes en extractos de hojas de *O. pyramidale* recolectadas en el área de estudio.
- \* Identificar los flavonoides presentes en hojas de *O. pyramidale* recolectadas en el área de estudio.
- \* Evaluar distintas actividades biológicas relacionadas con los usos medicinales tradicionales de la hoja y corteza de *O. pyramidale*.
- \* Establecer perfiles cromatográficos (CCD y CLAR) para los extractos obtenidos, que contribuyan a la determinación de la genuinidad de las drogas vegetales seleccionadas, o su adulteración, con miras a un eventual control de calidad y monografía farmacopeica.
- \* Contribuir con el desarrollo de programas nacionales e internacionales para implementar el cultivo de plantas autóctonas y su explotación controlada cuando estas se transformaren en materia prima de extracción de productos naturales, evitando la depredación de la flora silvestre.
- \* Constituir grupos interdisciplinarios en el estudio de las plantas medicinales latinoamericanas de uso tradicional.

## Metodología y resultados obtenidos

### Relevamiento etnofarmacobotánico

Para efectuar el relevamiento etnofarmacobotánico, se trabajó en dos áreas de la Republica de Ecuador: Ciudades de Quevedo, ubicada en la zona costera, próxima al Océano Pacífico y Puyo, ubicada en la zona oriental, vecina a la selva amazónica.

El relevamiento se efectuó mediante entrevistas y encuestas a "sanadores" y personas del común "no sanadores". En las encuestas y entrevistas se indagaba acerca del conocimiento que esas personas tenían de las plantas conocidas como "balsa", sus usos comerciales y medicinales.

Se encontró que los sanadores de Puyo, pertenecientes a las etnias Shuar, también conocidos como Jíbaros -término que es considerado ofensivo por esta gente- y Cofanes conocían hasta 10 especies con el nombre de "balsa", entre ellas *O. pyramidale*, que fue la única especie que todos ellos conocían como medicinal. Los entrevistados, en su mayoría mujeres, señalaron que habían obtenido sus conocimientos por transmisión oral a través de las mujeres de su familia (madre, abuela, bisabuela, tatarabuela).

Los usos tradicionales de esta especie, de la cual se utilizan las hojas, corteza y raíz, están asociados con el tratamiento de procesos inflamatorios, infecciosos o parasitarios y fueron descritos como "para cuando tenga una inflamación", "para las enfermedades venéreas", "para las heridas", "para problemas del riñón", "para el estreñimiento y parásitos del ganado vacuno", "para el hambre", siendo el correspondiente al tratamiento de inflamaciones el uso predominante.

Las plantas utilizadas son sólo las silvestres, ya que existe una desconfianza hacia las plantas cultivadas que perderían sus propiedades curativas al estar aisladas de la naturaleza y la Madre Tierra.

Cabe señalar que recabar información entre los "sanadores" de Puyo, supuso grandes dificultades ya que existe un tabú, cuya violación conlleva graves sanciones sociales, respecto a difundir el conocimiento de la medicina tradicional fuera del ámbito de sus comunidades.

Entre los "no sanadores" de Puyo, la *O. pyramidale* es utilizada con diversos propósitos, en la elaboración de distintos utensilios (salvavidas, artesanías decorativas, residuos para carbón, fogatas, modelismo, maquetas, embarcaciones marítimas). La mayoría de estas personas también estaban enterados de sus usos medicinales.

En el caso de los sanadores de Quevedo, la situación es totalmente diferente. Si bien todos ellos conocen como "balsa" a *O. pyramidale*, ninguno conoce usos medicinales para esta especie.

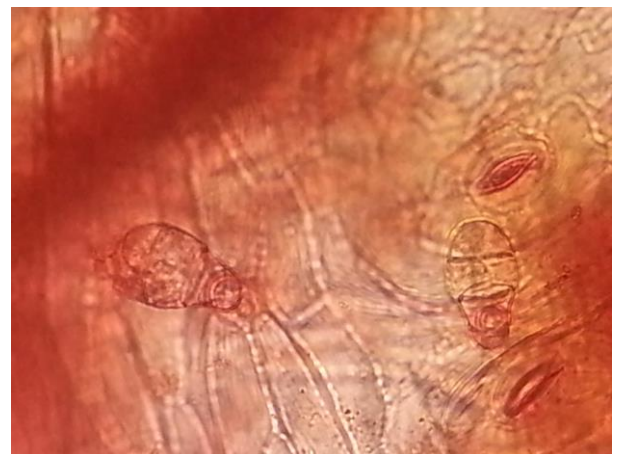
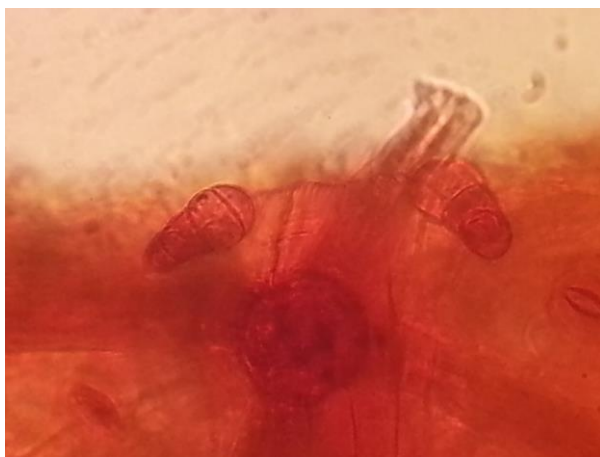
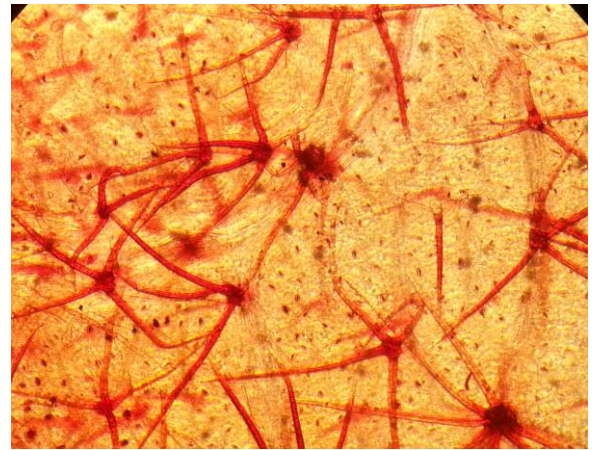
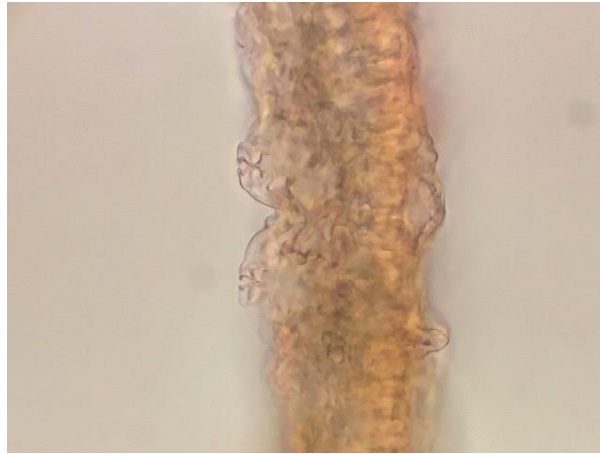
Una situación similar se observa entre los no sanadores, que solo registran usos comerciales para esta especie.

### **Anatomía de las hojas de *O. pyramidale***

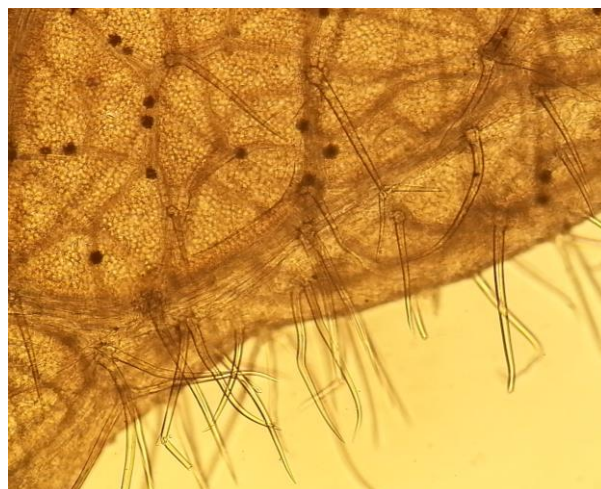
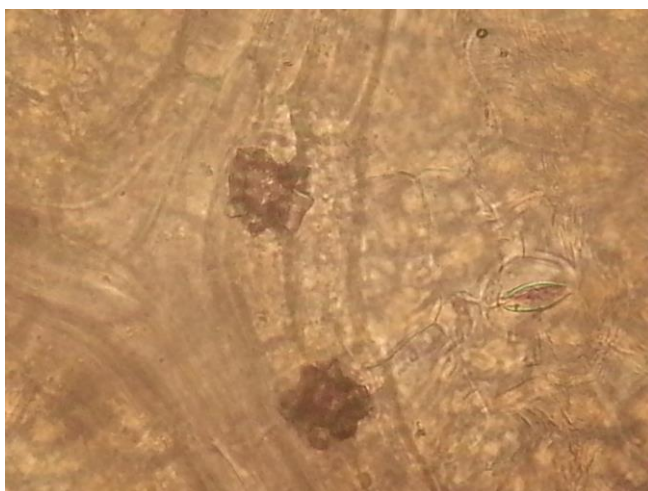
Se efectuó la diafanización, cortes y tinciones de hojas apicales y zona media del pecíolo de *O. pyramidale*, observando luego con microscopio óptico. Tal como se muestra en las figuras, se confirma el modelo vascular descrito por Castillo y Trigoso, para la zona media del pecíolo de hojas de *O. pyramidale*, lo cual, según estos autores, contribuye a la identificación de esta especie.

Como elementos de diagnóstico adicionales, hasta donde hemos podido comprobar descritos por primera vez en el presente trabajo, se hallaron canales esquizógenos en el pecíolo (zona medular y periférica), células mucilagíferas en la cara abaxial de la hoja, estomas anomocíticos elevados, pelos e-glandulares unicelulares y estrellados 4-7 células, pelos glandulares de pie unicelular y cabezuela tricelular.









### Ensayos fitoquímicos

El trabajo comenzó con la recolección de las hojas de *O. pyramidale* cultivada en la zona de Quevedo. Para las mismas se establecieron distintos parámetros micrográficos y se realizó un screening fitoquímico sobre el extracto metanólico a fin de confirmar o descartar la presencia en las hojas de la planta cultivada en Quevedo, de distintos grupos fitoquímicos citados en la bibliografía para plantas de otras regiones tropicales, como México.

El resultado del análisis fitoquímico (screening) del extracto metanólico de las hojas de *Ochroma pyramidale* mostró la presencia de flavonoides, leucoantocianidinas, esteroides, saponinas, taninos y fenoles así como la ausencia de heterósidos cianogénéticos, antraquinonas y alcaloides.

<b>Compuestos</b>	<b>Fracción</b>	<b>Resultado</b>
Saponinas	Droga cruda	+
Heterósidos cianogénéticos	Droga cruda	–
Taninos y fenoles	A	+
Flavonoides	A	++
Flavonoides	D	+++
Esteroides	B	++
Antraquinonas	B	–
Alcaloides	C	–
Leucoantocianidinas	E	+++

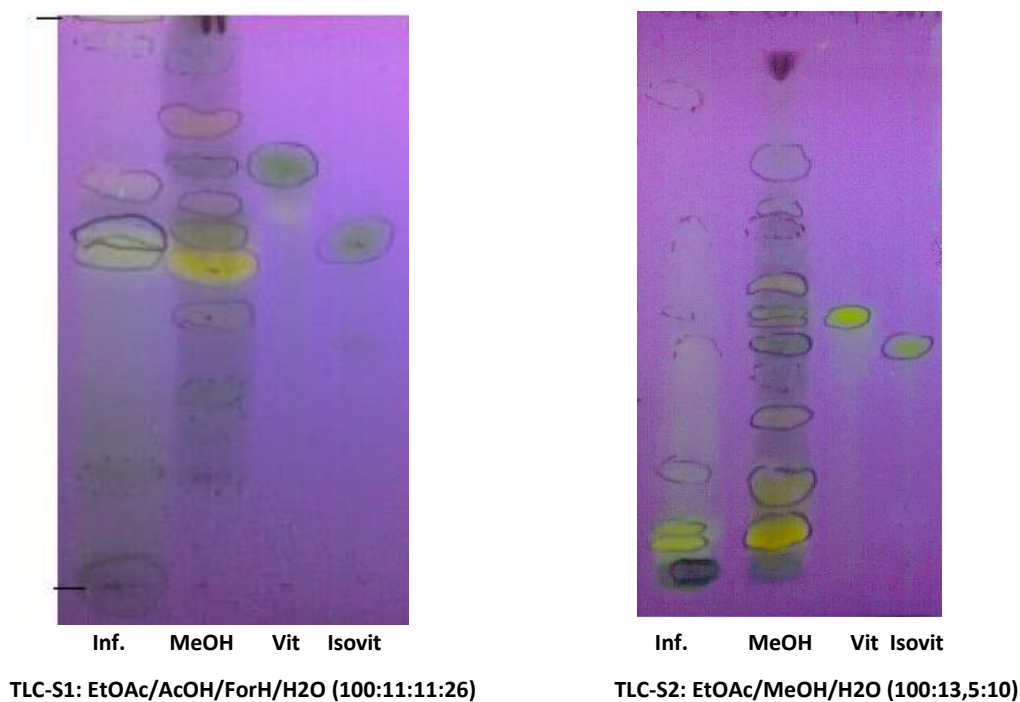
–: Ausencia, +: Baja concentración, ++: Media concentración, +++: Alta concentración.

## 7. - Resumen

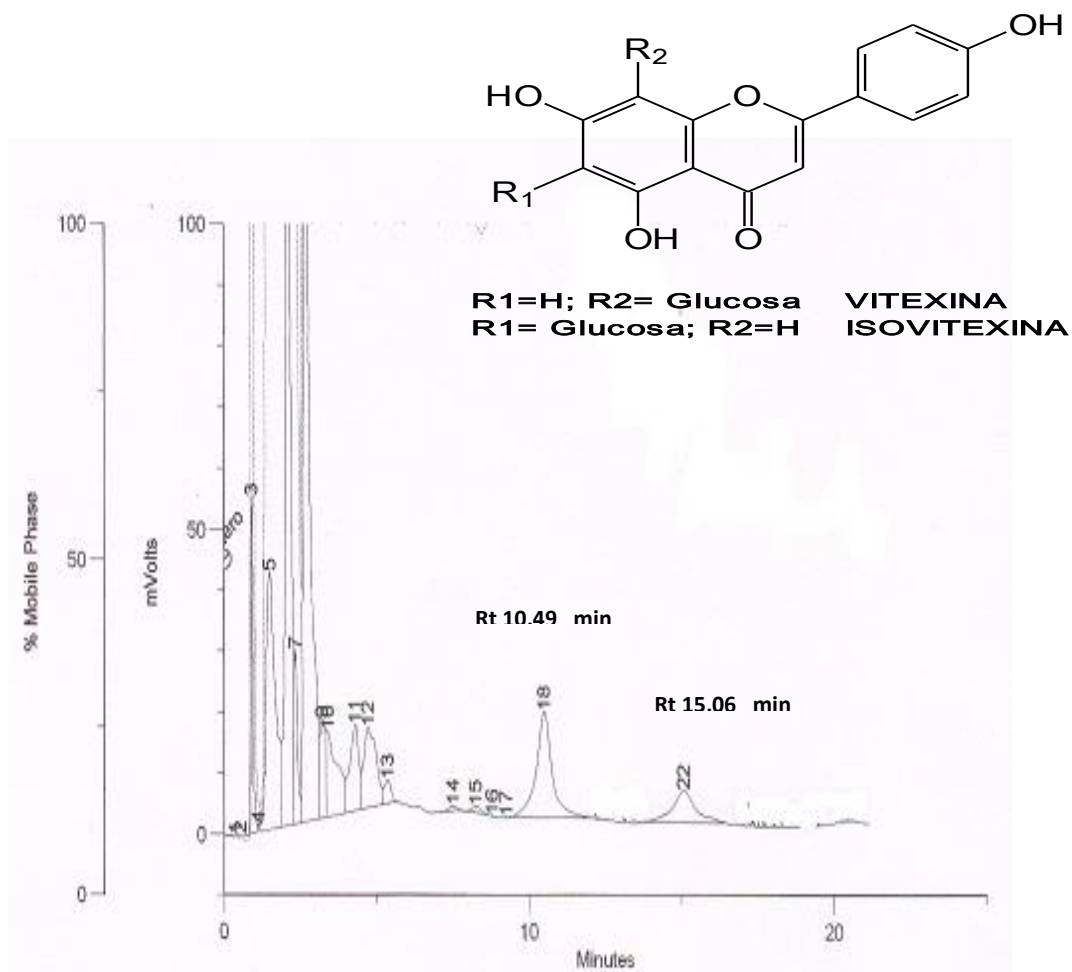
Los extractos metanólico y acuoso (decocción) fueron cromatografiados por CCD en distintos sistemas de solventes, que se seleccionaron de acuerdo al o los grupos fitoquímicos que se esperen encontrar en ellos.

Según los resultados de la caracterización de los flavonoides se puede afirmar que en los dos extractos se encontraron flavonoides de tipo flavona y/o flavonol, de acuerdo con los resultados reportados para *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urban. por Delgado *et al.*, los cuales fueron confirmados por técnicas de cromatografía en capa fina y por HPLC contra testigos.

En los dos sistemas de solventes utilizados se pudieron determinar los perfiles cromatograficos para los extractos acuoso y metanolico de hojas, identificandose además, contra testigos, la presencia de dos C-glucoflavonas: vitexina e isovitexina, esta última citada por primera vez entre los componentes de las hojas de *O. pyramidale*. Se encontraron además otras dos bandas (Rf 0,08 y 0,15) de fluorescencia amarilla y amarillo-naranja con el reactivo de productos naturales polifenolicos, que por su posición y fluorescencia sugieren la presencia de glicosidos flavonoides derivados, tales como la isoswertisin 2" ramnosido, dato que debe confirmarse.



En el cromatograma por CLAR, se aprecia la presencia de dos picos a Rt 10,49 y 15,06 min que se corresponden con los testigos de vitexina e isovitexina respectivamente, confirmándose así los resultados de la CCD.



### Actividades biológicas

Para los extractos de hojas de *O. pyramidale* se ensayaron distintas actividades biológicas relacionadas con los usos medicinales tradicionales. Simultáneamente y a raíz de la predicción computacional de diversas actividades biológicas para los compuestos citados en la bibliografía para hojas, leño y corteza, esos mismos ensayos de actividades biológicas se realizaron para los extractos de corteza.

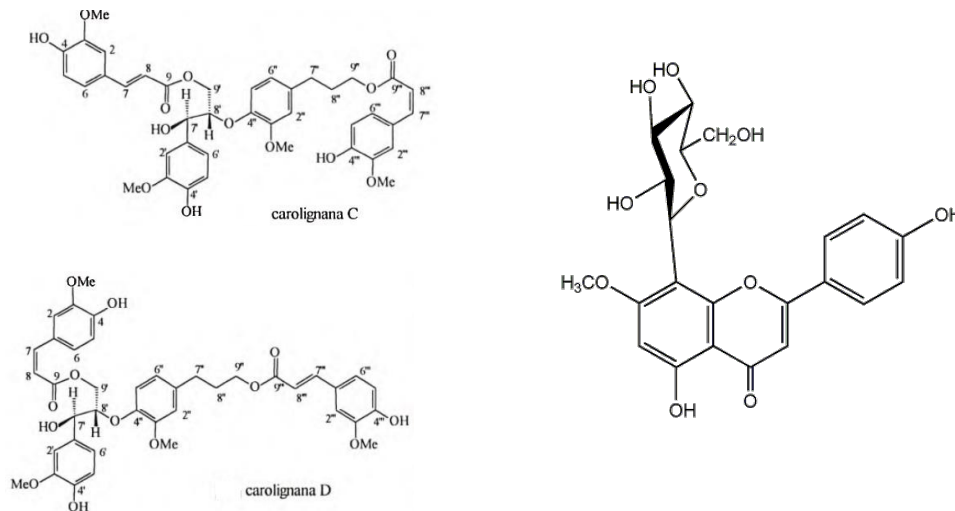
#### 1) Actividad tripanocida

Como una actividad no prevista en el plan de tesis original de *O. pyramidale*, se aplicó el programa de modelos computacionales desarrollado en el LIDEB (Fac. de Cs. Exactas, UNLP) para seleccionar plantas medicinales como potenciales tratamientos para la enfermedad de Chagas, a diversos componentes químicos presentes en hojas y corteza de *O. pyramidale*.

Como resultados iniciales alentadores, varios de estos componentes, como los carolignanos C y D presentes en corteza, o como la 7-O-metil vitexina (isowertisina)

presente en hojas, han sido predichos como activos sobre cruzipaina y la permeasa de poliaminas por esos modelos.

A fin de confirmar estas predicciones, se realizaron ensayos de actividad tripanocida sobre extractos metanolicos de hojas y corteza de *O. pyramidale*.



Por otro lado, los primeros ensayos referidos al efecto inhibitorio sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, muestran que el extracto metanólico de la corteza de *O. pyramidale* provoca entre los 4-11 días de cultivo, una disminución de entre el 30-40 % de la proliferación de epimastigotes a una concentración de extracto de 10 a 100 µg/ml, en tanto que para las hojas, fue la decocción la que provocó, entre los 4-6 días, una disminución de entre 30-40 % en la proliferación de epimastigotes a una concentración de extracto de 100 µg/ml.

Hasta donde sabemos, no existen en la bibliografía referencias a la aplicación de modelos computacionales para predecir la actividad de los extractos de "balsa", ni hay para las mismas referencias a estudios sobre actividad tripanocida.

Sin embargo, y aunque se obtuvieron resultados alentadores, es necesario estimar la  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria 50%) así como ensayar las fracciones y compuestos obtenidos de los extractos citados. También sería importante, para los extractos y/o fracciones con buena actividad contra epimastigotes y baja citotoxicidad, evaluar su actividad sobre tripomastigotes de *T. cruzi* (la forma responsable de la infección en el hombre) y determinar el índice de selectividad (proporción entre la citotoxicidad y la actividad contra el parásito) que recomienda la bibliografía (Valencia *et al.*, 2011).

## 2) Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos

Las hojas de *O. pyramidale* fueron extraídas con hexano, diclorometano, metanol y mediante una decocción (extracto acuoso).

Los extractos obtenidos fueron evaporados *in vacuo* o liofilizados (decocción).

Alícuotas de esos extractos fueron utilizados para los ensayos de viabilidad celular por el método de Mossman (1983) e inhibición de la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7 (método de De Leon *et al.*, 2003), en concentraciones finales de 10, 20, 30, 40 y 50 µg/ml.

El método ensayado busca poner de manifiesto la capacidad de un extracto o compuesto determinado para inhibir la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7. Es por ello que es de suma importancia utilizar para el ensayo una concentración de extracto que permita la supervivencia de las células, de modo de asegurarnos que la producción de NO realmente fue inhibida por acción del extracto sobre algún mecanismo celular y no porque provocó la muerte de las células.

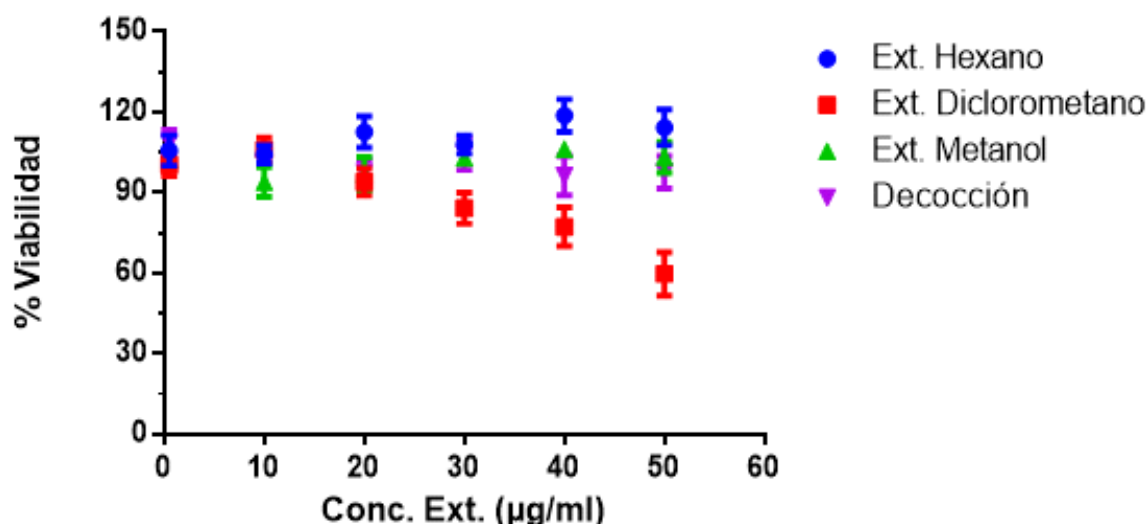
A fin de elegir la concentración de extracto que asegure la supervivencia de las células, se evaluó el efecto citotóxico de los extractos hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso (decocción) de las hojas de *O. pyramidale*, en concentraciones finales de entre 10 µg/ml a 50 µg/ml, mediante el ensayo del MTT, midiendo la absorbancia del formazan producido a 490 nm

Con los valores de absorbancia obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Viabilidad = \frac{Am}{Ac} \times 100$$

Donde: Am es la media aritmética de la absorbancia de la muestra y Ac la media aritmética de la absorbancia del control (células sin tratamiento).

**% Viabilidad de células RAW frente a extractos de hojas de *O. pyramidale***



Extractos hexano				diclorometano				metanol				acuoso			
Conc.	% Viabilidad	SEM	n	% Viabilidad	SEM	n	% Viabilidad	SEM	n	% Viabilidad	SEM	n	% Viabilidad	SEM	n
50,000	114,333	6,69162	3	59,750	8,10735	4	103,250	5,79331	4	97,66666	6,06446	3	97,66666	6,06446	3
40,000	118,750	6,08789	4	77,333	7,17247	3	106,3333	2,18581	3	96,33334	7,31057	3	96,33334	7,31057	3
30,000	108,000	3,43996	4	84,250	5,85057	4	103,000	1,47196	4	104,500	5,92311	4	104,500	5,92311	4
20,000	112,666	5,89726	3	94,000	5,03322	3	97,000	6,33771	4	97,66666	4,70224	3	97,66666	4,70224	3
10,000	104,250	3,32603	4	106,000	4,56435	4	94,000	5,56776	3	101,3333	2,90593	3	101,3333	2,90593	3
0,500	105,750	5,63286	4	100,250	4,00780	4	102,250	2,46221	4	108,6667	4,80740	3	108,6667	4,80740	3

Como surge de la observación del grafico, para los extractos hexánicos, metanólico y acuoso las células presentan un porcentaje de viabilidad de *ca.* 90-95%, para concentraciones finales de hasta 10 y 50 µg/ml, en tanto que para el extracto diclorometánico, ese mismo porcentaje se da a una concentración final de extracto de hasta 10 y 20 µg/ml.

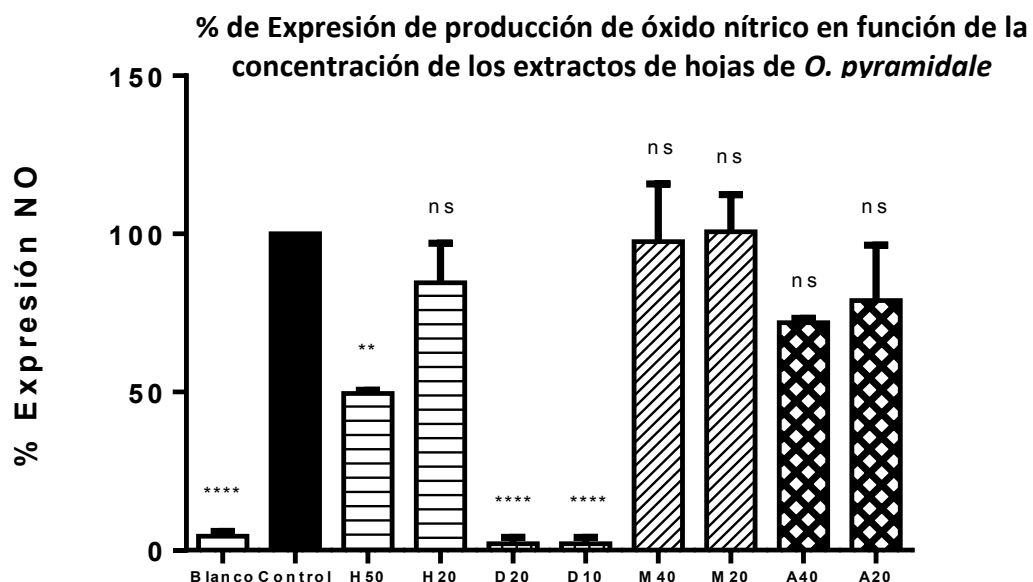
Para determinar el porcentaje de inhibición de la producción de NO (óxido nítrico) en macrófagos RAW 264.7 se trabajó con las siguientes concentraciones finales de extractos:

Extracto hexánico: 20 y 50 µg/ml (H20 y H50 respectivamente)

Extracto diclorometánico: 10 y 20 µg/ml (D10 y D20 respectivamente)

Extracto metanólico: 20 y 40 µg/ml (M20 y M40 respectivamente)

Extracto acuoso (decocción): 20 y 40 µg/ml (A20 y A40 respectivamente)



Los valores se expresan como Media  $\pm$  SEM; n=4; ns: no significativo, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, y \*\*\* p < 0,0001 respecto al control

--- LPS EXTRACTO + LPS

La evaluación de la acción inhibitoria sobre la producción de óxido nítrico en las células RAW 264,7 muestra que de los cuatro extractos (hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso), el extracto diclorometánico a concentraciones finales de 10 y 20 µg/ml inhibe totalmente la producción de NO, sin afectar visiblemente la viabilidad celular.

De los extractos restantes, el extracto hexánico a concentración de 50 µg/ml produjo una inhibición de la producción de NO de *ca.* 40-50% respecto al control sin afectar la viabilidad celular.

Los extractos metanólico y acuoso, y el extracto hexánico a concentraciones menores a 50 µg/ml no producen una inhibición significativa de la producción de NO. Hasta donde sabemos, no existe en la bibliografía referencias a estudios sobre la actividad inhibidora de extractos de "balsa" sobre la producción de NO.

### Actividad antibacteriana e inhibidora de la producción de biofilm

Se ensayaron extractos diclorometánico y metanoólico de hojas y corteza de *O. pyramidale* a dos concentraciones, para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento y de inhibición del biofilm en *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Respecto a la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa*, los mejores resultados se observan para los extractos metanolicos en concentraciones de 100 ppm, inhibiendo un 37,80 % del crecimiento el de corteza, seguido por el extracto de hojas que inhibe el crecimiento en un 35,96 %.

Inhibición del Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853										
Extractos	100 ppm				10 ppm				C. CREC	C. INH
	EDc	EMc	EDh	EMh	EDc	EMc	EDh	EMh		
DO 560 nm	0,519	0,32	0,526	0,363	0,488	0,53	0,505	0,438	0,565	0,162
	0,51	0,331	0,515	0,343	0,468	0,496	0,489	0,43	0,519	0,147
	0,474	0,31	0,506	0,317	0,503	0,498	0,442	0,427	0,529	0,169
	0,525	0,319	0,524	0,324	0,463	0,516	0,467	0,403	0,501	0,142
	0,515	0,349	0,523	0,33	0,493	0,537	0,478	0,422	0,505	0,142
Desv Est	0,020	0,015	0,008	0,018	0,017	0,018	0,024	0,013	0,025	0,012
Promedio	0,5086	0,3258	0,5188	0,3354	0,483	0,515	0,4762	0,424	0,5238	0,152
%Inhibición	2,90	<b>37,80</b>	0,95	<b>35,96</b>	7,79	1,60	9,09	<b>19,05</b>	0	70,90

Para la inhibición de la formación de biofilm de *P. aeruginosa*, los resultados fueron todavía mejores y mas parejos, tanto para los extractos metanolicos como diclorometanicos, siendo el mas activo, a concentraciones de 100 ppm, el extracto metanolicos de hojas (68,65 % de inhibición de formación de biofilm), seguido por el extracto metanolicos de corteza (62,24 % ) y los extractos diclorometanicos de hoja y corteza, con valores de 54,86 y 52 % de inhibición de formación de biofilm respectivamente.

## 7. - Resumen

Los valores siguen siendo altos y próximos a los ya mencionados, para concentraciones de 10 ppm, en los extractos metanolico de corteza (55,09%) y diclorometanico de hoja (39,87 %).

Inhibición de la Formación de Biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853										
Extractos	100 ppm				10 ppm				C. CREC	C. INH
	EDc	EMc	EDh	EMh	EDc	EMc	EDh	EMh		
DO 560 nm	0,142	0,091	0,163	0,11	0,421	0,16	0,206	0,364	0,371	0,095
	0,172	0,092	0,153	0,118	0,406	0,13	0,19	0,35	0,343	0,068
	0,199	0,218	0,175	0,103	0,401	0,193	0,223	0,352	0,36	0,07
	0,171	0,148	0,148	0,103	0,404	0,13	0,196	0,383	0,34	0,079
Desv Est	0,155	0,111	0,15	0,114	0,393	0,172	0,236	0,349	0,334	0,102
	0,021	0,053	0,011	0,007	0,010	0,027	0,019	0,014	0,015	0,015
Promedio	0,168	0,132	0,158	0,110	0,405	0,157	0,210	0,360	0,350	0,083
%Inhibición	<b>52,00</b>	<b>62,24</b>	<b>54,86</b>	<b>68,65</b>	-15,85	<b>55,09</b>	<b>39,87</b>	-2,86	0	76,31

Estos resultados son concordantes con los grupos fitoquímicos encontrados en las muestras ensayadas. En el caso de la corteza, los compuestos de tipo lignano citados en la bibliografía, y según nuestras predicciones por modelos computacionales, poseen actividad citotóxica.

En el caso de las hojas, se encontraron flavonoides, y hemos confirmado por CCD y HPLC la presencia de la C-glucoflavona vitexina.

Este compuesto ha sido citado en la bibliografía (Das *et al.*, 2016) como inhibidor de la formación de biofilm en *P. aeruginosa*, por lo que esta actividad en el extracto de hojas de *O. pyramidale* podría deberse a la presencia de este componente u otros químicamente relacionados

En el caso de *S. aureus* el porcentaje de inhibición del crecimiento fue mucho menor para todos los extractos ensayados, siendo los que mejores valores dieron a concentración de 100 ppm, el extracto diclorometánico de corteza (14,90 %) y a concentración de 10 ppm, los extractos metanólico de corteza (23,52 %) y diclorometánico de hojas (16,68 %).



Inhibición del Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6738										
Extractos	100 ppm				10 ppm				C. CREC	C. INH
	EDc	EMc	EDh	EMh	EDc	EMc	EDh	EMh		
DO 560 nm	0,91	1,365	1,02	0,936	1,063	0,928	0,822	1,107	1,242	0,34
	0,958	1,397	0,939	0,86	1,065	0,959	0,878	1,113	1,151	0,335
	1,053	1,33	0,953	0,933	1,042	0,879	0,899	1,111	1,129	0,257
	1,063	1,363	1,027	0,927	1,1	0,9	1,153	1,097	1,189	0,378
	0,991	1,369	1,11	1,03	1,044	0,805	1,119	1,14	1,135	0,34
Desv Est	0,064	0,024	0,068	0,061	0,023	0,058	0,151	0,016	0,0470	0,044
Promedio	0,995	1,365	1,010	0,937	1,063	0,894	0,974	1,114	1,169	0,33
%Inhibición	<b>14,90</b>	-16,72	13,63	19,84	9,10	<b>23,52</b>	<b>16,68</b>	4,75	0	71,77

Con respecto a la inhibición de la formación de biofilm de *P. aeruginosa*, ninguno de los extractos presentan actividad de inhibición de la formación del biofilm en ninguna de las dosis evaluadas. Por el contrario, el microorganismo estimula la producción de biofilm para protegerse, por ello los valores expresados son negativos.

Inhibición de la Formación de Biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6738										
Extractos	100 ppm				10 ppm				C. CREC	C. INH
	EDc	EMc	EDh	EMh	EDc	EMc	EDh	EMh		
DO 560 nm	0,613	0,439	0,609	0,734	0,383	0,422	0,761	0,435	0,354	0,053
	0,535	0,478	0,557	0,786	0,445	0,401	0,716	0,484	0,337	0,06
	0,617	0,449	0,52	0,657	0,477	0,412	0,747	0,439	0,376	0,056
	0,593	0,434	0,547	0,659	0,394	0,554	0,665	0,436	0,351	0,084
	0,713	0,384	0,486	0,652	0,341	0,394	0,709	0,457	0,38	0,069
Desv Est	0,064	0,034	0,046	0,060	0,053	0,066	0,037	0,021	0,018	0,012
Promedio	0,614	0,437	0,544	0,698	0,408	0,437	0,720	0,450	0,360	0,064
%Inhibición	-70,80	-21,47	-51,22	-93,99	-13,46	-21,41	-100,11	-25,2	0	82,09

Ninguno de los extractos vegetales presenta actividad de inhibición del biofilm de *S. aureus* en ninguna de las dosis evaluadas. Por el contrario, el microorganismo estimula el biofilm para defenderse, por ello los valores expresados son negativos. Hasta donde sabemos, no existe en la bibliografía referencias a estudios sobre la actividad antibacteriana e inhibidora de biofilm de los extractos de "balsa".

## Conclusiones

- \* *O. pyramidale* es conocida como "Balsa" por el 100 % de los entrevistados sanadores y no sanadores de Quevedo y Puyo. Todos ellos le reconocen usos como especie maderable, en la construcción y fabricación de embarcaciones y diversos utensilios y artesanías.
- \* Solamente los habitantes de Puyo la utilizan con fines medicinales, para tratar dolencias asociadas a procesos inflamatorios, infecciosos y parasitarios.
- \* Los usos medicinales tradicionales de *O. pyramidale* en la región de Puyo, en la Amazonía ecuatoriana, no se han difundido en la región de Quevedo, en la zona costera, en parte por la barrera natural que supone la cordillera de Los Andes; en parte por ser los habitantes de Quevedo, básicamente de colonos, históricamente más influidos por la cultura hispánica occidental; en parte por las restricciones que las comunidades Shuar y Cofanes imponen a sus miembros contra la difusión de esa información.
- \* Los saberes tradicionales referentes a la utilización de la "balsa" para tratar diversas dolencias son transmitidos oralmente, de generación en generación, principalmente a través de las mujeres de la familia
- \* Se confirma el modelo vascular descrito por Castillo y Trigos, para la zona media del pecíolo de hojas de *O. pyramidale*, lo cual, según estos autores, contribuye a la identificación de esta especie.
- \* Como elementos de diagnóstico adicionales, hasta donde hemos podido comprobar descriptos por primera vez en el presente trabajo, se hallaron canales esquizógenos en el pecíolo (zona medular y periférica), células mucilagíferas en la cara abaxial de la hoja, estomas anomocíticos elevados, pelos e-glandulares unicelulares y estrellados 4-7 células, pelos glandulares de pie unicelular y cabezuela tricelular. Estos dos últimos elementos son más abundantes en las hojas apicales.
- \* Los elementos de diagnóstico citados, podrían contribuir al control farmacobotánico de la especie en una eventual monografía farmacopeica.
- \* Los ensayos fitoquímicos preliminares realizados muestran la existencia en hojas de *O. pyramidale* cultivada en el cantón de Quevedo la presencia de distintos grupos fitoquímicos, tales como saponinas, mucílagos y flavonoides y sus derivados, con una estructura probable de tipo flavona o flavonol, presentes en forma de heterósidos y/o aglucones.
- \* La cromatografía en capa delgada y la cromatografía líquida de alta resolución, realizadas contra testigos, permitieron confirmar la presencia en el extracto metanólico de hojas de *O. pyramidale* cultivada en Quevedo, Ecuador, la presencia de dos C-glucoflavonas: vitexina e isovitexina, esta última descrita por primera vez para *O. pyramidale*. La presencia de flavonas C-glicosiladas, que poseen diversas propiedades biológicas y farmacológicas como antihipertensivas, antiinflamatorias, antiespasmódicas,

antimicrobianas y antioxidantes, convierte a *O. pyramidale* en una especie promisorio desde el punto de vista de un potencial uso medicinal.

- \* Los perfiles cromatográficos por CCD y CLAR podrían contribuir a un futuro control de calidad.
- \* La predicción y eventual confirmación de compuestos activos con efecto tripanocida presentes en la corteza y hojas de *O. pyramidale*, abre la puerta al aprovechamiento de un subproducto de la industria maderera de la "balsa", tanto en la industria farmacéutica de especialidades medicinales, como en productos de herboristería potencialmente aplicables al tratamiento de la enfermedad de Chagas, parasitosis endémica con una alta proporción de afectados en nuestro continente. Hasta donde sabemos, no existe en la bibliografía referencias a la aplicación de modelos computacionales para predecir la actividad de los extractos de "balsa", ni hay para las mismas referencias a estudios sobre actividad tripanocida.
- \* Se comprueba la inhibición de mediadores inflamatorio (NO) *in vitro*, siendo los extractos diclorometanico (Cf: 20µg/ml) y hexánico (Cf: 50 µg/ml) los únicos que inhibieron la producción de oxido nítrico: ca. 100% y 50% de inhibición respectivamente, sin mostrar toxicidad para las células.  
De acuerdo a estos resultados, podría inferirse que las hojas de *O. pyramidale* no tendrían las propiedades antiinflamatorias que se le atribuyen tradicionalmente, dado que lo que se utiliza es la infusión o la decocción (extractos acuosos) y los compuestos antiinflamatorios se hallarían en los extractos diclorometanico y hexánico. Sin embargo, no debe olvidarse la presencia en las hojas de saponinas, que podrían actuar en forma sinérgica, facilitando la extracción de esos compuestos con solventes mas polares.
- \* Los resultados obtenidos frente a la inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa*, son concordantes con alguno de los usos tradicionales de las hojas y corteza de *O. pyramidale* relacionados con la actividad antibacteriana (tratamiento de enfermedades venéreas, heridas, problemas renales), que muy probablemente sea debida a la presencia de la C-glucoflavona vitexina detectada en los extractos de hojas.
- \* La inhibición de la formación de biofilm de *P. aeruginosa* en valores especialmente relevantes para los extractos de hojas, parece confirmar esa presunción y convierte a las hojas de *O. pyramidale* en fuente de nuevos agentes antibiofilm contra el biofilm bacteriano asociado a patogénesis.

Se confirman así las dos hipótesis planteadas al comienzo de este trabajo.

## Proyección de los resultados obtenidos

Más allá de la realización de esta tesis, se pretende continuar con el fraccionamiento de los extractos de hojas y corteza de "balsa", determinando las actividades biológicas de las fracciones y eventuales compuestos aislados de las mismas, especialmente para la actividad tripanocida, por estar ésta relacionada con una de las enfermedades "huérfanas" que recibe escasa atención por parte de la industria farmacéutica y que afecta a una gran cantidad de la población, especialmente los sectores más vulnerables.

Por último, destacar que esta es solo una primera etapa para validar el uso tradicional de esta especie como antiinflamatorio. Como ya se dijo, es necesario probar su actividad frente a varios de los agentes participantes en la inflamación, así como realizar ensayos *in vivo*, y también probar las fracciones y eventuales compuestos aislados de esos extractos, por lo que la evaluación que se ha realizado en este estudio representa solo una parte de esta primera etapa.

## 8.- Bibliografía

---

## 8. - Bibliografía

- ACERO DUARTE, L. (2005). Plantas Útiles de la Cuenca del Orinoco. Editorial BP Exploration Company. Bogota - Colombia.
- ACERO DUARTE, L. (2000). Árboles, Gentes y Costumbres. Universidad Distrital Francisco José Caldas y Plaza & Janes Editores. Bogotá - Colombia.
- AHMAD R, Srivastava SP, Maurya R, Rajendran SM, Arya KR, Srivastava AK. (2008) Mild antihyperglycaemic activity in *Eclipta alba*, *Berberis aristata*, *Betula utilis*, *Cedrus deodara*, *Myristica fragrans* and *Terminalia chebula*. *Indian J Sci Technol* 2008 ; 1(5) : 1-6.
- ALBÁN J.A. (1985) Un registro de datos etnobotánicos. *Boletín de Lima*, (7) 39: 93–96.
- ALLISON, D. G., Ruiz, B., San Jose, C., Jaspe, A., y Gilbert, P. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms, *FEMS Microbiol Lett* 167, 179-184
- ANKLI, Anita, Valeria Widmer, and Eike Reich (2006) Medicines and Dietary Supplements Produced from Plants. En: *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*. Edited by Iqbal Ahmad, Farrukh Aqil, and Mohammad Owais, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- ANON, J. (1998). Las hierbas, para el agüita de vieja, FIMA. En ECUADOR, Terra incógnita. *Revista Ecológica*. Vol. 1 (1):3 Quito.
- APG III (2009) En: Stevens, P. F. (2001 onwards). *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 13, Aug. 2016. <http://www.mobot.org/MOBOT7research/APweb/>
- ARRUDA CAMARGO, M.T. (1998). Plantas medicinais e de rituais afro-brasileiros II: Estudo etnofarmacobotanico. Ícone editora. São Paulo, Brasil
- AVENDAÑO, R.S., (1998). Bombacaceae. *Flora de Veracruz*, 107. Instituto de Ecología, AC; Xalapa, Ver.
- AZEVEDO DOS SANTOS VIANA, C.; Orelli Paiva, A.; da Veiga Jardim, C.; Naves da Silva Rios, M.; Soares da Rocha, NM; Rangel Pinage, G.; Silva Arimoro, OA; Sukanuma, E.; Dourado Guerra, C.; Milanez Alvez, M.; Floriano Pastore, J. (2011) *Plantas da Amazônia: 450 especies de uso geral*. Ed. Universidade de Brasilia. Brasilia, DF
- BAKER, H.G.; Baker, L, (1968). Chromosome numbers in the Bombacaceae. *Bol. Gaz. (Crawfordsville)* 129: 294296.

- BANDARANAYAKE, WM (2006). "Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs Modern Phytomedicine" En: Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs. Edited by Iqbal Ahmad, Farrukh Aqil, and Mohammad Owais. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- BARREIRO OLGA, Pilar Martín, Roberto Gonzalez-Amaro, Francisco Sanchez-Madrid. (2010). Molecular cues guiding inflammatory responses Cardiovascular Research 86,
- BÄRTELS, A. (2002). Plantas Tropicales, Ornamentales y Útiles. Guía de Identificación. TROPENPFLANZEN!. Berlín - Alemania..
- BAUM, D.A.; K. Oginuma, (1994). A review of chromosome numbers in Bombacaceae with new counts for Adansonia. Taxon 43 (1): 11- 20.
- BECK, E.; R. Heim; J. Hansen. 2004. "Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signal triggering frost hardening and dehardening". J. Biosci., 29:449-459.
- BELLERA, C. (2014). Búsqueda racional de nuevos fármacos antichagásicos inhibidores de la cruzipaina. Tesis Doctoral, Fac. de Cs. Exactas, UNLP
- BERLYN, P; Miksche, G. (1976). Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State University Press: 18 –129 p
- BUITRÓN, X. (1999) Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales. Situación actual y aspectos importantes para su conservación. Informe de la Red Traffic, Pag. 3. Ed. TRAFFIC International, Cambridge (United Kingdom)
- BRUNETON J. (2001). Plantas Medicinales. Fitoquímica y Farmacognosia. Zaragoza: Editorial Acribia.
- BUSSCHER, H. J., Cowan, M. M., y Van Der Mei, H. C. (1992). On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion, FEMS Microbial Rev 8, 199-209
- CANIAGO, I.; SIEBERT, S. (1998). Medicinal Plants Ecology, Knowledge and Conservation in Kalimantan, Indonesian Economic Botany 52(3):229-250

## 8. - Bibliografía

- CÁRDENAS, L.; POLITIS, M (2000). Especies Vegetales usadas por los Nukak Orientales. Territorio, Movilidad, Etnobotánica y Manejo del bosque de los Nukak Orientales. SINCHI. Bogotá – Colombia.
- CARPANO, S. M., Spegazzini, E. D., Nájera, M. T., (1994). Nueva técnica de eliminación de cutina de órganos foliares. *Rojasiana* 2: 9-12.
- CASTILLO, A.G.Z.; Trigos, J.A.R. (1987). Modelos vasculares del pecíolo de Bombacaceas del Dantas como una posibilidad auxiliar de identificación. *Revista Forestal del Perú* 14 (1): 65-89
- CASTRO, E. (2013) Flórmula Digital de la Estación Biológica La Selva OET.  
<http://sura.ots.ac.cr/florula4/>
- CASTRO OLAYA, J.R. 2002. Anatomía de *Ochroma lagopus* (Balsa) en diferentes edades y períodos seco y lluvioso y el efecto de agentes externos. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- CAZZULO J.J., Franke de Cazzulo B.M., Engel J.C., Cannata J.J. (1985). End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 16, 329-343.
- CEPAR (2015): Proyecciones de Población 2015. INEC, Ecuador
- CHARACKLIS, W. G. (1981). Bioengineering report: Fouling biofilm development: A process analysis, *Biotechnology and Bioengineering* 23, 1923-1960
- CHEEK, MARTIN. (2006). The validation of two new family names in Malvales: Durionaceae and Brownlowiaceae. *Kew Bulletin* 61(3): 443.
- CHIRIBOGA, J., (1997) CAPITULO 11: Los fitofarmacos: un sistema alternativo de atención primaria de la salud.  
En: Anamaría Varea, Luis Suárez, Gina Chávez, Miguel Cordero, Nelson Alvarez, Fernando Espinoza Fuentes, César Paz y Miño, Pablo Carrión Eguiguren, Joseph Henry Vogel, Elizabeth Bravo, Luda Vásquez, [imena Chiriboga, Fanny Pocaterra, Roberto Beltrán Zambrano y Fausto López Rodríguez, Fernando Romero (1997) BIODIVERSIDAD, BIOPROSPECCION y BIOSEGURIDAD. Ed. Abya-Yala. Proyecto FPPP-FAO. Quito, Ecuador



## *8. - Bibliografía*

- CISNEROS PROAÑO, MD., (2015). En Jambi Huasi se practican la medicina ancestral y occidental. El Telégrafo 26 julio de 2015. Link: [www.eltelegrafo.com.ec](http://www.eltelegrafo.com.ec)
- CONABIO (2016) pag 66-68.  
[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/15-bomba6m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/15-bomba6m.pdf)
- CORDERO, A.B (1978). Manual de medicina doméstica. Republica Dominicana: Taller, 1978. 490p.
- CRESPO J. Y VILA. D. (2014). Saberes y conocimientos ancestrales, tradicionales y populares: El buen conocer y el diálogo de saberes dentro del Proyecto Buen Conocer – Flok Society. Revista Buen Conocer. ID: 5,2 v 2. ID. Quito- Ecuador
- CRONQUIST, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Ed. Columbia University Press. USA
- CSEKE LELAND J., Setzer, WN; Vogler, B; Kirakosyan, A; Kaufman, P. (2006) Traditional, Analytical, and Preparative Separations of Natural Products Cap. 8: 2006.
- DALBETH N., D. O. Haskard (2005) Mechanisms of inflammation in gout. Rheumatology 44:1090–1096
- DALTON, H. M., Goodman, A. E., y Marshall, K. C. (1996) Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 17, 228-234
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, Ana. (1986). Manual de técnicas de histología vegetal. Ed. Hemisferio Sur. ISBN 9789505043606
- DAS MC, Sandhu P, Gupta P, Rudrapaul P, De UC, Tribedi P, Akhter Y, Bhattacharjee S. (2016). Attenuation of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin Sci Rep. 22; 6:23347.
- DAVIES, D. G., Parsek, M. R., J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., y Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, Science 280, 295-298
- DAVIÑA Y HONFI, (2000). Los cromosomas de algunas especies leñosas. BONPLANDIA 10 (1-4): 169-173.

## 8. - Bibliografía

- DE LA TORRE, L.; Navarrete, H.; Muriel, M.; Macia, MJ; Balslev, H. (eds.) (2008) Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus. Quito, Ecuador.
- DE LEÓN EJ, Alcaraz MJ, Domínguez JN, Charris J, Terencio MC (2003). 1-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-3-(3-(2-chloroquinolinyl))-2-propen-1-one, a chalcone derivate with analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties *Inflamm Res*; 52: 246-257
- DODSON, C. 1998- En Valverde, F.M. 1998. Plantas Útiles del Litoral Ecuatoriano, Ministerio de Medio Ambiente/ECORAE/EcoCiencia.guayaquil
- DOMINGUEZ, X. A. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa S. A., México, D. F
- DUARTE, M.C., Esteves, G.L. y Semir, J. (2007). Bombacaceae In: Melhem, T.S., Wanderley, M.G.L., Martins, S.E., Jung-Mendaçolli, S.L., Shepherd, G.J., Kirizawa, M. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 5, pp: 21-38.  
Parte integrante da Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, vol. 5. ISBN 978-85-7523-056-5 (online)
- ECUADOR UNIVERSITARIO (2012), La SENESCYT cuenta con una Coordinación de Saberes Ancestrales. Retomado 10/06/2016. Disponible online: <http://ecuadoruniversitario.com/de-instituciones-del-estado/senescyt/la-senescyt-cuenta-con-una-coordinacion-de-saberes-ancestrales/>
- ECURED 2016. [https://www.ecured.cu/Balsa\\_\(Ochroma\\_pyramidale\)#cite\\_note-3](https://www.ecured.cu/Balsa_(Ochroma_pyramidale)#cite_note-3)
- ELIZABETSKY, E., Wannamacher, L. (1993), The status of ethnopharmacology in Brazil. *J. of Ethnopharmacology*, 38: 137-143
- ENDARA Lorena, Susana León-Yáñez & Norris Williams. (2007) Patterns of endemism of the orchids of Ecuador: Conservation perspectives and priorities. Presented at: Second Scientific Andean Orchid Conference, Loja, Ecuador (Spanish). Disponible en [http://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/Cores\\_Brasil.pdf](http://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/Cores_Brasil.pdf) (Recuperado 01/07/16)
- ESCAMILLA PÉREZ, Blanca E.; Moreno Casasola, P.; Pérez Utrera, E.; Utrera Urea, E.; Tronco López, C., Tronco López, B.; Tronco Morales, G. y Grupo Mujeres del Vivero de El Piñonal. (2016). Plantas medicinales de la Matamba y el Piñonal. Ed. D.R. Instituto de Ecología A. C. (INECOL), Mexico. ISBN 978-607-7579-44-1
- ESPINOZA B, et al. (2009). Estudios preliminares de los extractos de especies de Cassia

- y evaluación de la actividad antiparasitaria BIOFARBO 17 (1) 54-58. Bolivia.
- EVANS, William Charles (2009). Trease and Evans' Pharmacognosy, 16th Edition. Ed. Saunders Ltd Elsevier, USA
- FABRICANT, D.S.; Farnsworth, N.R. (2001) The Value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* 109 (Supl 1): 69–75.
- FARMACOPEA Nacional Argentina. (1978) AdmnistaANMAT VI ed,
- FARNSWORTH, N.; Bingel, A.S. (1977) en New natural products and plant drugs with pharmacological, biological ot therapeutical activity. H. Wagner y P. Woll (Eds.). Spring Verlag. New York. Pp1-22
- FARNSWORTH, N.R. y Morris, R.W. (1976). Higher Plants: the sleeping giants for drug development. *American J. of Pharmacy*, 148: 46-52
- FEGHALI CAROL A., Timothy M. Wright. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* 2: 12-26 174–182
- FERMOR, B; SE Christensen, I Youn, JM Cernanec, CM Davies, JB Weinberg. (2007). Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. *ECells and Materials* 13: 5 6 – 6 5
- FERNÁNDEZ Alonso, JL. (2003) Bombacaceae neotropicae novae vel minus cognitae VI. Novedades en los géneros *Cavanillesia*, *Eeriotheca*, *Matisia* y *Pachira*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 22 (102): 25-38
- FERNÁNDEZ, L; (2005) ¿Cuáles son las técnicas de recolección de información? Ficha número 3. Octubre Butlletí LaRecerca. Disponible online en: <http://www.ub.edu/ice/recerca/pdf/ficha3-cast.pdf> (Recuperado 02/06/10)
- FONSECA DA PAULA, Vanderlucia; Barbosa, LCA; Howarth, OW; Cash QB; Vieira, IJ. (1995) Lignans from *Ochroma lagopus* Swartz. *Tetrahedron* 51(45): 12453-12462.
- FONSECA DA PAULA, Vanderlucia; Barbosa, LCA; Demuner, AJ. (1996) Constituentes quimicos de *Ochroma lagopus* Swartz. *Quimica Nova* 19 (3): 225-229
- FONSECA DA PAULA, Vanderlucia; Barbosa, LCA; Pilo-Veloso, D.; Demuner, AJ.; Howarth, OW. (1998) Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus* swartz (Bombacaceae) Eclét. Quím. .23: 45-57.
- FONSECA DE PAULA, VANDERLUCIA (1999) Estudo quimico de *Ochroma lagopus* Swartz e síntesis de amidas derivadas da piperina, com avaliacao de suas respectivas atividades inseticida. Tesis Doctoral Universidade Federal de MInas Gerais, Belo

Horizonte, Brasil

FRANCIS, JK. (2016) *Ochroma pyramidale* Cav. Balsa: Bioecología de Árboles Nativos y Exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales.  
<http://www.rngr.net/publications/arboles-de-puerto-rico>

GALLARDO, L. (2006). El negocio del VIH/SIDA Patentes farmacéuticas ¿para qué y para quién? Ed. Abya-Yala. Quito, Ecuador. ISBN-13: 978-9978-84-424-3

GÓMEZ-ÁLVAREZ, R. (2012). "Plantas medicinales de una aldea del estado de Tabasco, México". Revista Fitotecnia Mexicana, 35, 43-49

GOVERS ROLAND, Ton J. Rabelink (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase Am J Physiol Renal Physiol 280:F193-F206

HABERLAND A., Saravia S.G., Wallukat G., Ziebig R., Schimke I. (2013). Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. Clin Chem Lab Med. 51, 271-294.

HARBORNE J.B., (1973) Phytochemical methods, A Guide to Modern Techniques of plant analysis, Chapman and Hall, London, Ltd, 1973,49-188.

HINSLEY, S. (2014). Malvaceae Info. En: <http://www.malvaceae.info/>

HUANG, R., Southall N, Wang Y, Yasgar A, Shinn P, Jadhav A, Nguyen DT, Austin CP. (2011). The NCGC pharmaceutical collection: a comprehensive resource of clinically approved drugs enabling repurposing and chemical genomics. Sci. Transl. Med. 3 (80). doi: 10.1126/scitranslmed.3001862.

INEC (2001): Instituto nacional de estadísticas y censos, Ecuador

INTRACEN (2016) <http://www.intracen.org/>

IOPI (International organization for plant information) (2016) En: <http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/iopi/iopihome.htm>

IPNI, (2016). International Plant Nutrition Institute. Base de datos botánica. Disponible Online en: [www.ipni.org/ipni/plantNameByVersion.do?jsessionId=9BEE85F1BC377F157117EA75C059F468?id=171458-2&version=1.4&output\\_format=Isid-metadata&show\\_history=true](http://www.ipni.org/ipni/plantNameByVersion.do?jsessionId=9BEE85F1BC377F157117EA75C059F468?id=171458-2&version=1.4&output_format=Isid-metadata&show_history=true). Retomado Julio 2016.

IWALEWA, E. O.; L. J. McGaw, V. Naidoo, J. N. Eloff. (2007) Inflammation: the

foundation of diseases and disorders. African Journal of Biotechnology 6 (25): 2868-2885

KNOX C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC, Wishart DS. (2011). DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res.* 39: D1035-41. doi: 10.1093/nar/gkq1126.

KORHONEN, RIKU, Aleksii Lahti, Hannu Kankaanranta, Eeva Moilanen. (2005). Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 4: 471-479.

KORWAR, PRAKASH G., Arun Kumar Beknal, Basawaraj S. Patil, M. A. Halkai, Upendra Kulkarni, Hariprasanna R. C., Srinivas R. Soodam. (2010). A study on phytochemical investigation of *Drynaria quercifolia* Linn. Rhizome. *IJPSR* 1 (12): 148-158

LERNER, T.; A. Ceroni & C. Gonzáles. (2003). Etnobotánica de la comunidad campesina "Santa Catalina de Chongoyape" en el bosque seco del Área de Conservación Privada Chaparrí - Lambayeque. *Ecología Aplicada*, 2(1):14 - 20.

LISTER, JL; HORSWILL, AR. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4: 178. doi: 10.3389/fcimb.2014.00178

LITUMA, M. (2014). La medicina ancestral gana nuevos espacios en Ecuador. *Diario El Comercio*. Quito-Ecuador. Retomado 07/06/2016, disponible online en: <http://www.elcomercio.com/tendencias/medicina-ancestral-gana-nuevos-espacios.html>

LÓPEZ CAMACHO, R. y Montero González, MI. (2005) Manual de identificación de especies forestales en bosques naturales con manejo certificable por comunidades. Ed. Instituto amazónico de investigaciones científicas, SINCHI. Bogota, Colombia

LORENZI, H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum, Nova Odessa, Brasil. 351p

LUCIARDI, MC; Blazquez, MA; Cartagena, E; Bardon, A; Arena, ME. (2016) Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* LWT - Food Science and Technology 68:373 e 380

- LUNA VELEZ, VIRGINIA M. (2015). "Estudio de mercado de plantas medicinales en el cantón Quevedo, provincia de Los Rios". Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador.
- MABBERLEY, D. J. 1993. The plant book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press. Londres. 707 pp.
- MAYA JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, et al.(2007) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*; 146:601-20.
- MCWILLIAMS, A. (2006) Plant-Derived Drugs: Products, Technology, Applications (BIO022D) BBC Research (<http://www.bbcresearch.com>)
- MEJÍA, K.; Rengifo, E. (2000) Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana. Editor: Enrique Uldemolins. Agencia española De Cooperación Internacional (AECI) y el Instituto De Investigaciones De La Amazonía Peruana (IIAP)
- MELO CARNEIRO, F; Pereira da Silva, MJ; Borges, LL; Carneiro Albernaz, L.; Pereira Costa, JD. (2014). Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais – UEG/Câmpus de Iporá*, v.3, n. 2, p.44-75
- METCALFE, C. y Chalk, L. (1957). *Anatomy of the dicotyledons, leaves, stem, and Wood In relation to taxonomy with notes on economic uses Vol. I.* Clarendon Press, Oxford.
- MOBOT (2016) Missouri Botanical Garden <http://www.mobot.org>
- MORALES LIZARAZO, Edison. (2010) La recolección de datos. Disponibles en: <http://www.slideshare.net/edimor72/la-recoleccion-de-datos-1384547> (recuperado el 05/07/2010)
- MORETTI, C.; Arrázola, S.; Naessany, L. (1990). Plantas medicinales del oriente boliviano (I): Estudio etnobotánico en el trópico cochabambino y sus potencialidades farmacobotánicas. Publicaciones de la Facultad de Ciencias y Tecnología. Serie Científica vol. 1 Nro 4
- MOSMANN T. (1983) Rapid colorimétric assay for cellular growth and survival:

application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65: 55-63

MSAL, (2016). Ministerio de Salud Pública de Argentina. Programa nacional de Chagas. Disponible online: <http://www.msal.gov.ar/chagas/index.php/informacion-para-ciudadanos/i-que-es-el-chagas>

MEJIA, K. y Rengifo, E. (2000) Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía peruana. 2da Edición. Ed. Agencia Española de Cooperación Internacional. Lima, Perú. 286 pp. ISBN. 9972-614.00.5

MULLIKEN, T. 1998. New support for medicinal plants. *TRAFFIC Dispatches*. September. TRAFFIC International. UK

MUNICIPALIDAD DE QUEVEDO. (2010). Características geográficas del Cantón Quevedo – Disponible en: <http://www.quevedo.gov.ec/Site/Fijos/ciudad.aspx> (Recuperado 01/07/10)

MURAKAMI A, Ohigashi H. Targeting (2007) NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer*. 121(11):2357-63.

NARANJO, P., Escaleras, R. 1995. La Medicina Tradicional en el Ecuador. Corporación Editora Nacional, Quito, p. 192

NEWMAN, D. y Cragg, G. (2007) Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* 70: 461-477

NOVARA, L.J. (2012) Aportes botánicos de Salta - Ser. Flora. Flora del valle de Lerma Bombacaceae Kunth. <http://eprints.natura.unsa.edu.ar/272/1/BOMBACACEAE.pdf>

NOVICK PA, Ortiz OF, Poelman J, Abdulhay AY, Pande VS (2013) SWEETLEAD: an *In Silico* Database of Approved Drugs, Regulated Chemicals, and Herbal Isolates for Computer-Aided Drug Discovery. *PLoS ONE* 8(11): e79568. doi:10.1371/journal.pone.0079568

OMS (1991) Organización Mundial de la Salud, 1991 (documento de referencia WHO/TM/91.1). *WHO/DANIDA Intercountry Course on the Appropriate Methodology for the Selection and Use of Traditional Remedies in National Health Care Programmes (Curso OMS/DANIDA entre Países sobre la Metodología Apropriada para la Selección y Uso de Remedios Tradicionales en Programas Nacionales Sanitarios). Informe de un Curso entre Países Celebrado en Kadoma, Zimbabwe, 26 de junio - 6 de julio de 1989*. Ginebra,

## 8. - Bibliografía

- OSORIO E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111:630-5
- OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. (2008) *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322: 207–228
- PALADINI, A. (1996). **¿Cómo se Descubre o Inventa un Medicamento?** *Ciencia Hoy* 6 (34) <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy34/medic01.htm>
- PARDO, M. & E. GÓMEZ. (2003). Etnobotánica: Aprovechamiento tradicional de plantas y patrimonio cultural. *Jardín Botánico de Madrid*, 60(1):171-182.
- PARKER, ER; Sethi, A (2011) Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin.* 29:53-62
- PATZELT, E. (2008). Flora del Ecuador. Edit. Fundación Inprefepp, Quito, Ecuador
- PÉREZ, E. (1996). Plantas Útiles de Colombia. Bogotá - Colombia.
- PEREZ-ARBELAEZ, E. (1956) *Plantas Útiles de Colombia*, 3.ed. Ed. Camacho Roldan Bogota, Colombia 1956. 831p
- PHAM-HUY, Lien Ai, Hua He, Chuong Pham-Huy. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4 (2): 89-96
- PRINCIPE, P. (Ed.) (1989). The economic significance of plants and their constituents as drugs”, en *Economic and Medicinal Plant Research*. Academic Press, New York, vol 3
- QUIJANO, A. (2010) América latina: hacia un nuevo sentido histórico. En I. Leon (Ed.), *Sumak Kawsay/Buen Vivir y cambios civilizatorios* (2 ed.). Quito: Fundación de Estudios, Acción y Participación Social (FEDAEPS).
- RAMOS CORRALES, PC; Crivos, M.; Colares, MN; Spegazzini, ED; Rosella, MA (2011) “Relevamiento etnofarmacobotánico de plantas medicinales usadas en tres zonas diferentes del cantón Quevedo, Provincia de Los Ríos (Ecuador)” (2011) *Revista Rojasiana* 10 (1): 9-20



- RASAMIRAVAKA, T.; Labtani, Q.; Duez, P.; El Jaziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. BioMed Research International. Volume 2015 (2015), Article ID 759348, 17 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/759348>
- RENNER, S. (1993) A history of botanical exploration in amazonian Ecuador, 1739-1988. Ed: Smithsonian Institution Press. Washington DC.
- REYES, A. (2013). "Estudio etnobotánico en las explotaciones agropecuarias de la parroquia Fátima (Puyo). Tesis de grado. Puyo (Ecuador)
- RODRIGUES COURA, Jose; Albajar Viñas, Pedro (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature 465, S6–S7. doi:10.1038/nature09221
- RODRIGUES COURA J., de Castro S.L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97, 3-24.
- RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ, J.; Sinaca Colín, P.; Jamangapé García, G. (2009). Frutos y semillas de árboles tropicales de México. Edición para internet: Susana Escobar Maravillas. ISBN: 978-968-817- Impreso en México. Printed in Mexico
- SAKLANI, A.; Kutty, S.K. (2008). Plant-derived compounds in clinical trials. Drug Discovery Today.13 (3-4): 161-171.
- SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, O. y C. Hernández-Zepeda. (2004). Estudio de plántulas de la familia Bombacaceae en Quintana Roo, México. *Foresta Veracruzana* 6:1-6.
- SANDASI, M., Leonard, C. M., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2011). Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. South African Journal of Botany, 77, 80e85.
- SANDI, C. y Flores, EM Part II—*Species Descriptions* • *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. En Tropical Tree Seed Manual. Species Descriptions 586-588  
<http://www.rngr.net/publications/ttsm/species> Recuperado 11-08-16
- SANTIANA, J., Gorky Villa, N, Garwood, P. (2003) Algunos árboles comunes de Bombacaceae en los Bosques Húmedos del Ecuador  
En: The Natural History Museum U.K, Proyecto Iniciativa Darwin 'Conocimientos para fortalecer la conservación en el Parque Nacional Yasuni', Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Herbario QCA, Quito. Versión 1. 11/ 2003

SASS, E. (1958) Botanical microtechniques. 3<sup>o</sup> ed. Ed. Iowa State College Press. 228 p. Iowa, USA

SIDALC (Alianza de Servicios de Información y Documentación Agropecuaria de las Américas) (2016). *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. Nota técnica Nro 46 <http://orton.catie.ac.cr/reprodoc/A0008s/A0008s46.pdf>

SILVER HIGHFIELD, E.; Kemper, KJ. (1999) White Willow Bark. En: Longwood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>

SKALICKA Krystyna; Wozniak, Jarosław Widelski, and Kazimierz Głównia (2008) Plant Materials in Modern Pharmacy and Methods of Their Investigations. En: : Monika Waksmundzka-Hajnos, Joseph Sherma, and Teresa Kowalska (2008) Thin Layer Chromatography in Phytochemistry PressTaylor & Francis Group, LLCBoca Raton, FL, USA

SOCOLSKY, C.; Arena, ME; Asakawa, Y.; Bardón, A. (2010) Antibacterial prenylated acylphloroglucinols from the fern *Elaphoglossum yungense*. J Nat Prod. 73(11):1751-5

SOTERO-GARCÍA, AI., Gheno-Heredia, YA.; Martínez-Campos, ÁR.; Arteaga-Reyes, TT. (2016) plantas medicinales usadas para las afecciones respiratorias en loma alta, nevado de Toluca, México. Acta Botánica Mexicana 114: 51-68

STANDLEY, PC; J. A. Steyemark, (1949). Bombacaceae. Flora de Guatemala. Fieldana Botany, vol 24: 386-403.

STANDLEY P.C. (1923). Bombacaceae. Trees and Shrubs of Mexico. U. S. Nat. Mus. Contr. vol. 23 (3): 786-794.

STEVENS, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 13, Aug. 2016. <http://www.mobot.org/MOBOT7research/APweb/>

STEWART R., Hinsley, S.R. 2007. Malvatheca (Malvoideae and Bombacoideae) <http://www.malvaceae.info/> consultado el 13 de septiembre de 2016

STOODLEY, P. Sauer, K., Davies, D. G. y Costerton, J. W. (2002). Biofilm as complex differentiated communities, Annu Rev Microbiol 56, 187-209

## *8. - Bibliografía*

TAMAYO, M. (2001; 2007) El Proceso de la Investigación Científica. Cuarta edición. Editorial Limusa, S.A. México

TENORIO, J. (2006). Actividad tripanomicida en el *Tripanosoma cruzi* del extracto etanólico de las semillas de la *Xylopia aromática*. Revista Cubana de Farmacia. v.40 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic. 2006

THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Published on the Internet;  
<http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).

TOLKER-NIELSEN, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., y Molin, S. (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms, J Bacteriol 182, 6482-6489.

TROPICOS. 2016. Tropicos.org Missouri Botanical Garden. 12 Sep 2016  
<http://www.tropicos.org>

USDA Plant database (2016) En: <http://plants.usda.gov/java/>

VALENCIA, DL; Muñoz, Sara; Robledo, M; Echeverri, F; Arango, GJ; Vélez, ID; Triana, O. (2011) Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. Valencia Vol. 31, Núm. 4: DOI: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.426>

VALENCIA, L. (2011). Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. Revista Biomédica. Bogotá-Colombia

VALENCIA, R., N. Pitman, S. León-Yáñez; P.M. Jorgensen (eds.) (2000). Libro rojo de plantas endémicas del Ecuador. Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito

VALVERDE, F.M. (1998). Plantas Útiles del Litoral Ecuatoriano, Ministerio de Medio Ambiente/ECORAE/EcoCiencia. Guayaquil

VANE, JOHN, Regina Botting. (1987). Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. FASEBJ. 1: 89-96

VARGAS TÚQUERES, CR. (2012) "Estudio etnobotánico de especies amazónicas en la parroquia Madre Tierra"  
Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniero Ambiental  
Universidad Estatal Amazónica, Puyo, Ecuador

VARÓN P. Teresita, (1995). Morales León, Londoño J. Alberto. Árboles del Valle de Aburrá. Medellín, Colombia. Disponible online:

<http://recursosbiologicos.eia.edu.co/ecologia/estudiantes/ceiba.htm>

VAZQUEZ E., Martinez EM, Cogordan JA, Delgado, G (2001) Triterpenes, phenols and other constituents from the leaves of *Ochroma pyramidale* (balsa wood, Bombacaceae). Preferred conformations of 8-C-glucopyranosil-apigenin (vitexin). Journal of the mexican chemical society. 46(3): 254-258

VIOTTI R, Vigliano CA, Alvarez MG, Lococo BE, Petti MA, Bertocchi GL, Armenti AH. (2009). The impact of socioeconomic conditions on chronic Chagas disease progression. Rev. Esp. Cardio. 62:1224–1232. 10.1016/S0300-8932(09)73074-X

W.H.O. (2013). World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet nro. 340.

WAGNER, H.; S. Bladt (1996). Plant Drug Analysis. 2nd Edition. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York

WAKSMUNDZKA Monika -Hajnos, Joseph Sherma, and Teresa Kowalska (2008) "Overview of the Field of TLC in phytochemistry" En: Monika Waksmundzka-Hajnos, Joseph Sherma, and Teresa Kowalska 2008 Thin Layer Chromatography in Phytochemistry Press Taylor & Francis Group, LLC Boca Raton, FL, USA

WALKER GABY, Josef Pfeilschifter, Dieter Kunz. Mechanisms of Suppression of Inducible Nitric-oxide Synthase (iNOS). Expression in Interferon (IFN)-g-stimulated RAW 264.7 Cells by Dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. (1997) The journal of biological chemistry. June 27, 1997 - 272, 16679-16687. doi: 10.1074/jbc.272.26.16679.

WATSON, L., DALLWITZ, M.J. (1992) onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Disponible online: <http://delta-intkey.com/angio/www/bombacac.htm>

WUNDER, S. (1994). Resumen de consulta de expertos latinoamericanos sobre productos Forestales No Maderables. PROBONA, UICN-SUR, Quito.

## 8. - Bibliografía

- WIJSEKERA, R. (Ed.) (1991). "Plant-derived medicines and their role in global health", en: *The Medicinal Plant Industry*. CRC Press, London, pp. 1-18
- YANG, EUN-JIN, Sang-Suk Kim, Tae-Heon Oh, Jong Seok Baik, Nam Ho Lee, Chang-Gu Hyun. (2009). Essential Oil of Citrus Fruit Waste Attenuates LPS-induced Nitric Oxide Production and Inhibits the Growth of Skin Pathogens. *Int. J. Agric. Biol.* 11(6): 791-794
- YUAN GAOFENG, Mark L Wahlqvist, Guoqing He, Min Yang MD, Duo Li, (2006) Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac J Clin Nutr.* 15 (2): 143-152
- ZENG, Zhi; Teng, Jiuwei. (2007). Application of Chromatographic Fingerprint to Quality Control for *Clematis chinensis* (pag. 117) En: Yi-Zhun Zhu Benny K-H Tan Boon-Huat Bay, Editores (2007) *NATURAL PRODUCTS Essential Resources for Human Survival*. Ed. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. London, UK. ISBN-13 978-981-270-498-6
- ZULOAGA, F.; O. Morrone, (1999). Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina, II (Acanthaceae-Euphorbiaceae). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 74(1): 1-621.
- ZULOAGA FO, Morrone O, Belgrano MJ. (2008). Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Missouri Botanical Garden Press*. St. Louis, Missouri, USA.

## 9.- Anexos

---

## ANEXO I

### FIGURAS y TABLAS

#### Figuras

		Pag.
Fig. 1	Delfa Iñamagua(curandera) Foto: Diario el comercio	7
Fig 2	Base del tronco (Foto R. Aguilar, <a href="http://sura.ots.ac.cr/">http://sura.ots.ac.cr/</a> )	12
Fig. 3	Hojas y estípulas (Foto R. Aguilar, <a href="http://sura.ots.ac.cr/">http://sura.ots.ac.cr/</a> )	13
Fig. 4	Flores (Foto R. Aguilar, <a href="http://sura.ots.ac.cr/">http://sura.ots.ac.cr/</a> )	13
Fig. 5	Flores (Foto: HUgh Wilson, <a href="http://botany.csd.tamu.edu">http://botany.csd.tamu.edu</a> )	14
Fig. 6	Fruto y semillas (Foto: HUgh Wilson, <a href="http://botany.csd.tamu.edu">http://botany.csd.tamu.edu</a> )	14
Fig. 7	Balsa Kon-tiki <a href="http://www.todayifoundout.com/">http://www.todayifoundout.com/</a>	15
Fig.8	Escultura de madera balsa realizada por Jeffro Uittto ( <a href="http://muycompartible.com">http://muycompartible.com</a> )	16
Fig. 9	Ciclo biológico del <i>T. cruzi</i> (tomado de Bellera, 2014)	23
Fig. 10	Esquema representando las etapas presentes durante el desarrollo de un biofilm sobre un sustrato (tomado de Davies <i>et al.</i> , 1998)	28
Fig. 11	Ubicación de las áreas en estudio	32
Fig. 12	Screening fitoquímico	45
Fig. 13	<i>O. pyramidale</i> : Corte transversal de pecíolo	66
Fig. 14	Detalle del haz vascular	67
Fig. 15	Corte transversal de hoja	67
Fig. 16	Corte transversal de la lámina con célula mucilagínifera	68
Fig. 17	Corte transversal de la lámina con célula mucilagínifera	68
Fig. 18	Corte transversal de la lámina con estomas elevados	68
Fig. 19	Desgarrado de la lámina con pelos estrellados y estomas	69
Fig. 20	Diafanización de la lámina y coloración con safranina: pelos	69

	estrellados y drusas	69
Fig. 21	Diafanización de la lámina y coloración con safranina. Pelos glandulares	69
Fig. 22	Diafanización de la lámina y coloración con safranina. Pelos glandulares y estoma	69
Fig. 23	Diafanización de la lámina. Drusas acompañando al haz vascular	70
Fig. 24	Diafanización de la lámina. Drusas y pelos e-glandulares	70
Fig. 25	CCD-FM1: EtOAc/AcOH/ForH/H2O	73
Fig. 26	CCD-FM2: EtOAc/MeOH/H2O (100:13,5:10) 76	73
Fig. 27	CLAR del extracto MeOH de hojas de <i>O. pyramidale</i>	74
Fig. 28	% Viabilidad de células RAW frente a extractos de hojas de <i>O. pyramidale</i>	79
Fig. 29	% de Expresión de producción de óxido nítrico en función de la concentración de los extractos de hojas de <i>O. pyramidale</i>	80

### Tablas

		Pag.
Tabla 1.	Especies denominadas "balsa" y sus usos medicinales entre los sanadores de Puyo	59
Tabla 2.	Especies denominadas "balsa" y sus usos medicinales entre los sanadores de Quevedo	60
Tabla 3.	Encuesta de <i>Ochroma pyramidale</i> en la localidad de Puyo a un total de 100 personas no sanadores	61
Tabla 4.	Especies conocidas como "balsa" y sus distintos usos entre los "no sanadores" de la región de Puyo	62
Tabla 5.	Especies conocidas como "balsa" y sus distintos usos en la región de Quevedo	63
Tabla 6.	Encuesta de <i>Ochroma pyramidale</i> en la localidad de Quevedo a un total de 100 personas no sanadores	64



Tabla 7.	Análisis fitoquímico de la hoja de <i>Ochroma pyramidale</i> (Cav. ex Lam.) Urban.	70
Tabla 8.	% inhibición crecimiento extracto A (decocción hojas <i>O. pyramidale</i> )	76
Tabla 9	% inhibición crecimiento extracto B (metanólico hojas <i>O. pyramidale</i> )	76
Tabla 10.	% inhibición crecimiento extracto C (decocción corteza <i>O. pyramidale</i> )	76
Tabla 11.	% inhibición crecimiento extracto D (metanólico corteza ( <i>O. pyramidale</i> ))	76
Tabla 12.	Inhibición del Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	83
Tabla 13.	Inhibición de la Formación de Biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	84
Tabla 14.	Inhibición del Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6738	85
Tabla 15.	Inhibición de la Formación de Biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6738	85

## ANEXO II

### ABREVIATURAS y SIMBOLOS

AB	Abuela
AB+	Abuelo
AcOH	Acido acético
Antinf	Antiinflamatorio
APG	Angiosperm Phylogeny Group
ATCC	American Type Culture Collction
BH4	Tetrahidrobiopteridina
BHT	Butil hidroxi tolueno
BIRM	Modulador Biológico de la Respuesta Inmune
C. CREC	Control de crecimiento
C. INH	Control de inhibición
C.f	Concentracion final
CCD	Cromatografía en capa delgada
Cl <sub>3</sub> Al	Cloruro de aluminio
Cl <sub>3</sub> Fe	Cloruro férrico
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
DCM	Diclorometano
DMEM	Dulbecó's modified eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido

DO	Densidad óptica
EDc	Extracto diclorometánico de corteza
EDh	Extracto diclorometánico de hojas
EMc	Extracto metanólico de corteza
EMh	Extracto metanólico de hojas
Enf vene	Enfermedades venéreas
eNOS	Oxido Nítrico Sintasa Endotelial o Tipo III
Est vac	Estómago vacío
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
FBS	Suero fetal bovino
Fig.	Figura
ForH	Acido fórmico
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Acido bórico
HCl	Acido clorhídrico
infec	Infecciones
iNOS	Oxido Nítrico Sintasa Inducible o Tipo II
KOH	Hidróxido de potasio
LIDEB	Laboratorio de investigación y desarrollo de bioactivos
LPS	Lipopolisacáridos
MA	Madre
MeOH	Metanol
MO	Microscopio óptico
MTT	3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio
NADPH	Adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NH <sub>3</sub>	Amoníaco
nNOS	Oxido Nítrico Sintasa Neuronal o Tipo I
NO	Oxido nítrico
p.a.	Pro Analisis
PA	Padre
PBS	Phosphate buffered saline
Pro riñón	Problemas de riñón
RAW 264.7	línea de macrófagos murinos obtenida del líquido ascítico generado por un tumor inducido en ratones macho Balb/C por inyección intraperitoneal del virus de la leucemia Abelson
Rf	Relación de frente cromatográfico
dsRNA	Acido ribonucleico de doble cadena
SEM	Standard error of the mean (error estándar de la media)
SENESCYT	Secretaria Nacional de Educación Superior en Ciencia, Tecnología e Innovación (Ecuador)
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	Sulfato de sodio
UV	Ultravioleta

**ANEXO III**  
**PRESENTACIONES A CONGRESOS**

Parte de los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo se difundieron mediante las siguientes presentaciones a Congresos

**1.-** Pablo C. Ramos Corrales, María E. Del Valle, Esperanza Ruiz, Vanina Pérez, Fiorella Bruno, Silvia V. Aquila, Carlos M. Valle, María A. Rosella

Determinación de perfiles cromatográficos por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución de extractos de *Ochroma pyramidale* Cav. ex Lam. (Bombacaceae).

XI SIMPOSIO ARGENTINO XIV SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE FARMACOBOTÁNICA I CONGRESO LATINOAMERICANO DE PLANTAS MEDICINALES

Rosario, Argentina, Noviembre 2013

Con referato

**2.-** Ramos Corrales, P.C.; Moracci, L.; Menestrina, B.; Del Valle, M.E.; Rosella, M.A.

Ethnobotanical survey of plants known as "balsa" in two natural regions of Ecuador

23º SILAE Congress Marsala, Italy, 12 septiembre 2014-07-07

Con referato