

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

## FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

### ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



### **Actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus***

**AUTOR:**

CÉSPEDES ARTEAGA HENRY MICHAEL  
ROJAS SUAREZ ANA TERESA

**ASESOR:**

Mg. Q.F. CARMEN ROSA SILVA CORREA

**CO – ASESOR:**

Dr. Q.F JOSE LIZARDO CRUZADO RAZCO

**TRUJILLO – PERÚ**  
**2015**

PRESENTACION

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO:

En cumplimiento de las normas dispuestas en el reglamento interno de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, sometemos a su consideración el informe de Tesis II intitulado:

**“Actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus*”**

Dejamos a vuestra consideración señores miembros del jurado la calificación del siguiente trabajo.

Trujillo, abril del 2015

---

Céspedes Arteaga Henry Michael

---

Rojas Suarez Ana Teresa

**JURADO CALIFICADOR**

---

Dr. Q.F José Lizardo Cruzado Razco  
**PRESIDENTE**

---

Mg. Q.F. Carmen Rosa Silva Correa  
**MIEMBRO**

---

Mg. Villarreal La Torre Víctor Eduardo  
**MIEMBRO**

# *Dedicatoria*

*A Dios,*

*por ser el que cada mañana nos regala un día más de vida  
que ilumina nuestro camino y siempre está a nuestro lado  
en todo momento*

*A mis  
padres*

*Luz Angélica y Arsenio*

*por siempre estar ahí cuando los necesitaba ,  
por apoyarme en cada decisión que he tomado,  
por todo el amor que me dan cada día  
gracias a ustedes soy la persona que soy*

*A mi hermana*

*Melissa Angélica*

*Por haber sido mi apoyo incondicional,  
por siempre brindarme tu ayuda cuando te necesitaba  
Por ser más que mi hermana..*

**A**

**Henry Michael Céspedes Arteaga**

*por tu amistad, cariño y amor,  
durante todo este tiempo que nos conocemos .*

*Gracias por tu apoyo incondicional.*

*Todo mi cariño y agradecimiento para Ti*

**Ana Teresa Rojas Suarez**

**A Dios,**

*Por guiarme en cada decisión que he tomado*

*Por darme la fuerza necesarias para cumplir mis metas*

*Por regalarme la dicha de conocer a buenas personas.*

**A mis padres**

**Hayde y Sigifredo**

*Por brindarme sus sabios consejos para ser mejor persona*

*Por ayudarme a superar los obstáculos que se presentaron*

*Por su amor incondicional.*

**A mis hermanos**

**Danny, Peter, Lisseth**

*Por siempre brindarme su amistad*

*Y apoyarme en lo que necesitaba*

**A**

***Ana Teresa Rojas Suarez***

*por tu hermosa amistad, cariño y amor,*

*Gracias siempre apoyarme*

*Todo mi cariño y agradecimiento para Ti*

***Henry Michael Céspedes Arteaga***

# *Agradecimiento*

*A nuestro Asesor y Co-asesor:*

***Mg. Q.F. Carmen Rosa Silva Correa y Dr. Q.F José Lizardo Cruzado Razco***

*Por su apoyo en todo momento en la elaboración del presente informe*

*Por la confianza necesaria para realizar exitosamente nuestro trabajo y*

*por el impulso que siempre nos dan para lograr nuestros objetivos*

*Por brindarnos su amistad y consejos día a día*

*Por hacer que cada día seamos mejores estudiantes y futuros profesionales.*

***Los autores***

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo está orientado a evaluar Actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus* .Se realizó la marcha fitoquímica preliminar del extracto metanolico de *Paranephelius uniflorus* , donde se observó que dio reacción positiva Liebermann- Burchard con una coloración verde azulada, si mismo da positivo a Felhing (Azucares reductores) a Shinoda (Flavonoides) a Tricloruro Ferrico (fenoles). . Los resultados obtenidos en los linfocitos presentes en sangre de *Cavia porcellus* tratada *in vitro* con diferentes dosis del extracto metanolico de *Paranephelius uniflorus*, observando que a dosis mayores el efecto es significativo,así mismo se realizó una evaluación *in vitro* con las muestras de sangre de los especímenes observando una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )

**Palabras claves:** *Paranephelius uniflorus* , Inmunosupresor.

## ABSTRACT

The aim of this study is aimed at evaluating immunomodulatory activity in vitro and in vivo of the methanol extract of *Paranephelium uniflorum* on lymphocyte response Cavys .It made the preliminary phytochemical march of methanol extract of *Paranephelium uniflorum*, where it was observed that gave positive reaction Liebermann Burchard with a bluish green color, if it is positive to Felhing (reducing sugars) to Shinoda (flavonoids) Ferric trichloride (phenols). . Results obtained in lymphocytes present in blood Cavys treated in vitro with different doses of methanol extract *Paranephelium uniflorum*, noting that at higher doses the effect is significant, likewise in vitro evaluation was conducted with blood samples of specimens observed a statistically significant ( $p < 0.05$ )

**Keywords:** *Paranephelium uniflorum*, immunosuppressive.

## ÍNDICE

Presentación	i
Resumen	ii
Abstract	iii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODO	8
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	24
RECOMENDACIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS	32

## I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es el resultado de un complejo proceso evolutivo que le ha permitido a la especie humana sobrevivir a la infinidad de microorganismos y sustancias agresivas del ambiente. Éste se distingue por dos niveles de respuesta: la innata y la adaptativa. La innata constituye la línea de defensa inmediata frente a la entrada de los microorganismos para su eliminación, es poco específica, no genera memoria y está constituida por barreras anatómicas y fisiológicas, diversos tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, basófilos, eosinófilos y las células naturales Killer. El sistema adaptativo es evolutivamente posterior a la innata, respuesta es de gran especificidad y con la característica distintiva de generar memoria inmunológica. Sus componentes celulares principales son los linfocitos B y T. La respuesta inmune efectora involucra a las células de ambos tipos de inmunidad así como a los mediadores moleculares por ellas producidos como anticuerpos, citocinas, ERO, ERN histamina, moléculas de adhesión, enzimas, factores de transcripción, entre otros. (1,2,3,5)

Los linfocitos son importantes células sanguíneas del sistema inmune que se originan en la médula ósea. Existen distintos tipos de estas células que difieren en sus funciones y productos proteicos: linfocitos B, T y células asesinas naturales. Los linfocitos B son las únicas células del organismo capaces de producir anticuerpos. La interacción de los antígenos con sus receptores de membrana y otras señales coestimuladoras inician la secuencia de activación, proliferación y diferenciación que culmina en el desarrollo de células plasmáticas que secretan activamente anticuerpos y de células memorias capaces de

perdurar largos períodos de tiempo para enfrentar exposiciones sucesivas al mismo antígeno.<sup>(11)</sup>

Los linfocitos T terminan de madurar en el timo y se subdividen además en poblaciones funcionalmente distintas; las más estudiadas son las células T cooperadoras y las T citotóxicas. Las principales funciones de las células T cooperadoras son la producción de citocinas y la cooperación celular, mientras que las células T citotóxicas inducen la lisis de células infectadas y también producen citocinas.<sup>(1,2,4,5,6)</sup>

La tercera clase importante de linfocitos no expresa marcadores de células T ni B. Estos son linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos capaces de lisar células tumorales e infectadas por virus, conocidas como células asesinas naturales (N.K).<sup>(1)</sup>

A pesar de la importancia del sistema inmune para el organismo, existe un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por alteraciones en sus funciones, bien por exceso o defecto en la producción de algunos mediadores, por sobreactivación de diferentes mecanismos efectores, por pérdida de la tolerancia inmunológica, fallos en los mecanismos de regulación, o por inmunodeficiencias congénitas y adquiridas.<sup>(7,8,10)</sup>

Las enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, son ejemplos clásicos de alteraciones en las capacidades discriminatorias del sistema inmune; que conducen a la pérdida de la tolerancia y la producción de autoanticuerpos y células T autorreactivas. Las patologías mencionadas anteriormente y otras como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn, el cáncer y el Alzheimer, han

sido atribuidas entre otros factores, al desbalance en las funciones de las células T cooperadoras y al descontrol en la producción de citocinas por diferentes tipos celulares incluidos los macrófagos. <sup>(11,13)</sup>

El desbalance en el control de las funciones de los macrófagos ha sido relacionado con la fisiopatología de diferentes enfermedades como la artritis reumatoide, la osteoartritis, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple y otras. <sup>(9,11)</sup>

Las enfermedades alérgicas como la rinitis, la dermatitis atópica o el asma bronquial constituyen otro importante grupo de patologías donde se manifiestan alteraciones de la respuesta inmune explicadas en el acápite anterior. <sup>(1,211)</sup>

- Enfermedades alérgicas: rinitis, asma bronquial, dermatitis atópica, otras. : Activación mastocitaria con liberación de mediadores preformados y sintetizados de novo, promoción de eosinofilia y de citocinas Th2 como IL- 4, IL-5, IL-10 y IL-13, incremento de la producción de IgE e IgG1. <sup>(1,2,11)</sup>

- Artritis reumatoide : Incremento de las concentraciones de TNF $\alpha$  como mediador proinflamatorio fundamental, así como IL-1, IL-6, GM-CSF y quimiocinas como IL-8, RANTES, MIP-1 y MCP-1, producción de autoanticuerpos. <sup>(1,2,11)</sup>

- Esclerosis múltiple : Incremento de las concentraciones de TNF $\alpha$  en suero y fluido cerebroespinal y de la expresión de ICAM-1 en endotelio cerebral y astrocitos, elevadas concentraciones de varias moléculas de adhesión y quimiocinas MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, y MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$  y sus receptores. <sup>(1,2,11)</sup>

- Enfermedad de Crohn: Incremento en la expresión de  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-6, elevada actividad de las células Th1. (1,2,11)

Los productos naturales constituyen una gran fuente de compuestos capaces de modular algunos de los mediadores o de los mecanismos de la respuesta inmune. Entre los compuestos de origen natural con propiedades inmunomoduladoras podemos citar a los polifenoles, alcaloides, quinonas, terpenoides, esteroides, polisacáridos, glicoproteínas, entre otros. (1,3,11)

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Dentro de los polifenoles se incluyen las xantonas, los diferentes tipos de flavonoides, las cumarinas, los taninos y otras moléculas, las cuales son importantes constituyentes de un gran número de extractos obtenidos de fuentes naturales y poseen una gran variedad de actividades biológicas relacionadas con las funciones del sistema inmune. Las catequinas son flavonoides presentes en el té capaces de disminuir la producción de IL-1 $\beta$  e incrementar los niveles de IL-10, la quercetina y la rutina inhiben la presentación de péptidos por las CPA] y tienen efectos antioxidantes y anti-inflamatorios, las xantonas antagonizan los receptores del factor activador de plaquetas, las coumarinas inhiben la actividad de la enzimas COX-1 y COX-2, la producción de PGE2 y la liberación de NO. (1,5,11)

Los terpenoides constituyen otro importante grupo de compuestos capaces de modular funciones del sistema inmune. La literatura reporta que poseen actividad inhibitoria sobre la

producción de  $TNF\alpha$ , IL-6, IL-8,  $IFN\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-4, en la degradación de I $\kappa$ B y consecuentemente en la activación de NF $\kappa$ B, en la producción de ERO y en las concentraciones de NOS-2, COX-2 y PGE2. <sup>(1,5,11)</sup>

La literatura científica reconoce varios extractos naturales con propiedades inmunomoduladoras, lo que promueve la utilización de estos para el tratamiento complementario de enfermedades relacionadas con alteraciones inmunopatológicas. El Pycnogenol® es un extracto de la corteza de *Pinus pinaster* que reduce la expresión de ICAM-1 y la activación de NF $\kappa$ B, las preparaciones de *Tripterygium wilfordii* inhiben la producción de importantes citocinas proinflamatorias como  $TNF\alpha$ , IL-6, IL-8,  $IFN\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-2, la proliferación de linfocitos T y B y la formación de anticuerpos, extractos de *Withania somnifera* estimulan funciones inmunes como la producción de anticuerpos y la actividad fagocítica y el extracto metanólico de *Cyperus rotundus* inhibe la producción de ERO y NO en macrófagos. <sup>(1)</sup>

Igualmente, la comunidad científica reconoce varios productos naturales que actúan sobre mecanismos relacionados con la respuesta alérgica, como extractos acuosos y alcohólicos de *Striga orobanchioides* que inhiben las contracciones inducidas por histamina en íleo de cobayos y la desgranulación de los mastocitos y preparaciones obtenidas de los frutos de *Rubus coreanus* inhiben el choque anafiláctico sistémico inducido por el compuesto 48/80. <sup>(1,2,3)</sup>

La especie de *Paranephelium uniflorus* es conocida con diversos nombres como “pacha rosa”, “puña puña”, “jarac de coche”, “carapa de chancho” entre otros; se halla repartida,

además de Bolivia, en los departamentos de Cuzco, Junín, Huancavelica, Pasco y Cajamarca; y es usada tradicionalmente en el norte del Perú para problemas reproductivos y de salud femenina reportándose además propiedades para combatir la bronquitis; empleándose para dichos fines la planta en su totalidad ya sea fresca o seca. En el centro del Perú en pedregales a 4000-5000 msnm. *P. asperifolius* se encuentra muy relacionada con esta especie; llegándose a considerar similares. La especie de *Paranephelius uniflorus* posee Hojas oblanceoladas, 3-12cm de longitud algo irregular; incisa y dentadas, de textura áspera por encima y por lo general escasamente pilosas, el envés blanco pubescente. <sup>(14,15,16)</sup>

Así mismo en el reciente estudio “Características farmacognósticas, y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Paranephelius uniflorus* “carapa de chancho” proveniente de la ciudad de Cutervo” se identificó la presencia de metabolitos como esteroides, aminoácidos, flavonoides, antocianidinas, saponinas y alcaloides tanto en la hoja como en el extracto fluido a excepción de los alcaloides que solo dieron positivo en el extracto fluido. <sup>(15)</sup>

Por ello en el presente trabajo se pretende evaluar la actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus*.

**Se planteó la siguiente interrogante:**

¿Cuál es la actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus*?

**HIPÓTESIS**

El extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* presenta posible actividad inmunosupresora de la respuesta linfocitaria de *Cavia porcellus*

**OBJETIVOS:**

**Objetivo general:**

- Evaluar la actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus*

**Objetivos específicos:**

- Determinar la actividad inmunomoduladora *in vitro* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus*.
- Determinar la actividad inmunomoduladora *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus*.

## II. MATERIAL Y MÉTODO

### 1. MATERIALES Y EQUIPOS:

#### A. Material Biológico:

- 5 Kg de hojas frescas de *Paranephelius uniflorus* “carapa de chancho” provenientes de la ciudad de Cutervo
- 12 *Cavia porcellus* de 4 meses de edad con peso aproximado de 350 – 400 g, adquiridos en el valle de Chicama – Trujillo; criados y mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

#### B. Material de Laboratorio:

- De uso común de laboratorio.

#### C. Reactivos:

- Alcohol metílico Merck.
- Acetato cúprico Sigma.
- Ácido acético glacial 99.8% de pureza, calidad sigma.
- Ácido clorhídrico 37% de pureza, calidad sigma.
- Ácido nítrico 85% de pureza, calidad sigma.
- Ácido sulfúrico 98% de pureza,  $\rho$ : 1.8g/ml calidad sigma.
- Ácido pícrico q.p.
- Anhídrido acético 98% de pureza, calidad sigma.
- Cloruro de sodio 99.5% de pureza, calidad sigma.

- Cloruro de mercurio (II) 99.5% de pureza, calidad sigma.
- Cloruro férrico hexahidratado 97% de pureza, calidad sigma
- Gelatina from porcine skin, calidad sigma.
- Hidróxido de sodio 98% de pureza, calidad sigma.
- Magnesio metálico.
- Nitrato de bismuto 98% de pureza, calidad sigma.
- N- propanol Merck
- Tricloruro de Antimonio 30%.
- Vainillina
- Anticoagulante EDTA al 10%.
- Tampón de fosfatos (PBS)
- Histopaque
- Suero fetal bovino (SFB)
- Colorante Wright
- Antígeno Derivado Proteico Purificado (PPD)
- Gentamicina inyectable sol. 160 mg/2ml - Farminindustria.
- Vacuna BCG.
- Cultivo de Waymonth.

#### **D. Equipos:**

- Balanza triple brazo 700/800 series OHAUS US PAT. N° 2, 729,439.
- Balanza analítica OHAUS GA 200 ( precisión 0.0001 gr)
- Estufa THELCO H.W. Kessel Model 17
- Microscopio Karl Zeiss Primo Star 176 065
- Centrifuga HW. Kessel S.A- UNICO

#### **E. Otros:**

- Papel krafft.

- Cámara fotográfica.
- Laptop lenovo G580.

## 2. METODOLOGIA:

### 2.1. De la droga vegetal: <sup>(17,18,19)</sup>

#### 2.1.1. Recolección :

La especie de estudio *Paranephelius uniflorus* “carapa de chancho” fue recolectada en la ciudad de Cutervo (6.38° latitud sur, 78.82° longitud oeste y 2649 msnm), provincia del mismo nombre, Departamento de Cajamarca.

#### 2.1.2. Selección:

Se seleccionó la especie *Paranephelius uniflorus* (“carapa de chancho”) la cual fue recolectada en la ciudad de Cutervo (6.38° latitud sur, 78.82° longitud oeste y 2649 msnm), provincia del mismo nombre, Departamento de Cajamarca.

#### 2.1.3. Identificación taxonómica :

Un ejemplar de esta planta, con todas sus partes completas, se llevó al *Herbarium Truxillense* de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación Taxonómica.

#### 2.1.4. Selección de la Droga:

Posteriormente a la selección e identificación de la especie vegetal, se procedió a separar las hojas del resto de la planta.

#### 2.1.5. Desecación:

Se deseco a temperatura ambiente por 2 días y en estufa a 40 °C, hasta que tenga peso constante.

#### 2.1.6. Molienda :

Una vez desecado el material vegetal, se procedió a su molienda en un molino mecánico hasta tamaño de partícula adecuado, y se almaceno adecuadamente en frascos color ámbar, en un lugar desprovisto de humedad y luz directa hasta su utilización.

## 2.2. Preparación del extracto metanólico : (17,20,21,22)

Se pesó 100 g de droga vegetal y se colocó en un recipiente de vidrio color ámbar con capacidad suficiente para agregar 1000 mL de metanol y dejarlo macerar por 7 días.

Luego se llevó a evaporar el solvente utilizando Rotavapor, y dejando secar en estufa a 40 ° C hasta obtener extracto seco, que se guardó en refrigeración hasta su posterior utilización.

## 2.3. Marcha Fitoquímica preliminar : “Prueba de la Gota” : (17,20,21,22,23)

### A. Extracto metanólico:

Se identificó compuestos de polaridad muy variada, como: Esteroles, Flavonoides, Polifenoles, Taninos y alcaloides.

#### ❖ Ensayo de Liebermann-Burchard: (ESTEROIDES - TRITERPENOS)

Medimos X gotas del extracto en una capsula, llevamos a sequedad y posteriormente extraer con 1 ml de diclorometano, evaporar el solvente y luego agregar X gotas de Anhídrido acético, XX gotas de Ácido Acético y I gota de ácido sulfúrico concentrado.

**Reacción Positiva:** La reacción será positiva si aparece coloración azul, verde o naranja.

#### ❖ Ensayo de Catequinas: (CATEQUINAS)

Se tomó I gota del extracto alcohólico y se colocó sobre papel de filtro, finalmente se agregara III gotas de una solución de carbonato de sodio.

**Reacción Positiva:** La aparición de una macha verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo.

- ❖ **Ensayo de Baljet:** (LACTONAS) Se vertió una alícuota del extracto y se agregó 1 ml del reactivo.

**Reacción Positiva:** Las sustancias con agrupamiento lactónico se colorearán de rojo.

- ❖ **Ensayo de resinas:** (RESINAS)

Se tomó 2 ml de extracto etanólico y se añadirá 5 ml de agua destilada.

**Reacción Positiva:** La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo.

- ❖ **Ensayo de Felhing:** (AZUCARES REDUCTORES)

Se mezcló en un tubo de ensayo fracciones iguales de los reactivos felhing A y felhing B, se calentará en baño de agua por 5 minutos y se añadirán II gotas del extracto etanólico llevado a sequedad y redisolto en agua destilada.

**Reacción Positiva:** La aparición de un color rojo ladrillo indica un ensayo positivo.

- ❖ **Ensayo de Shinoda:** (FLAVONOIDES)

Se midió X gotas del extracto llevamos a sequedad, redisolto en 1 ml de metanol y trasvasar a un tubo de ensayo agregar limadura de magnesio más II gotas de HClcc.

**Reacción Positiva:** La reacción será considerada positiva con las coloraciones roja (flavonas), roja a crimson (flavonoles), crimson a magenta (flavanonas) y algunas veces azules o verdosas.

❖ **Ensayo de Tricloruro férrico:** (FENOLES)

Se medió X gotas del extracto en una capsula, llevamos a sequedad, posteriormente redissolver en metanol y trasvasar a un tubo de ensayo, añadir II gotas de Cloruro Férrico.

**Reacción Positiva:** La reacción será considerada positiva con la aparición de un color azul-negrusco, la cual nos indica la presencia de polifenoles.

❖ **Ensayo de Gelatina:** (TANINOS)

Se medió XX gotas del extracto, en una capsula, llevamos a sequedad y redissolver en XX gotas de agua, trasvasar a un tubo de ensayo y luego añadir I gota de solución reactiva de gelatina al 1%.

**Reacción Positiva:** El ensayo se considera positivo al observar un precipitado blanco, el cual nos indica la presencia de Taninos.

❖ **Ensayo de Dragendorff:** (ALCALOIDES)

Se medió XX gotas del extracto en una capsula, llevamos a sequedad y redissolver con XX gotas de solución de ácido clorhídrico al 1%. Luego agregar II – III gotas de reactivo.

**Reacción Positiva:** La reacción será considerada positiva con la formación de precipitados de color rojo o anaranjado.

❖ **Ensayo de Mayer:** (ALCAOLIDES)

Se medió XX gotas del extracto en una capsula, llevamos a sequedad y redissolver con XX gotas de solución de ácido clorhídrico al 1%. Luego agregar III – IV gotas de reactivo.

**Reacción positiva:** La reacción será considerada positiva con la formación de precipitados de color blanco, blanco amarillento o amarillo limón claro.

## **2.4. Evaluación *in vitro* del extracto metanólico de *Paranephelium uniflorus* sobre linfocitos de *Cavia porcellus* : <sup>(1,26)</sup>**

### **2.4.1. Aislamiento y purificación de linfocitos de *Cavia porcellus*:**

Se utilizó a 2 especímenes *Cavia porcellus* a los que se extraemos muestras de sangre por punción cardiaca, obteniendo 5 mL de sangre de cada espécimen, se utilizó como anticoagulante EDTA al 10%.

La sangre se diluyó 1:2 en tampón de fosfatos (PBS) y se colocó en un tubo de ensayo que contiene 3 ml de Histopaque. Luego se centrifugo a 1.800 rpm por 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y se extraerá la interfase, donde se encuentra los linfocitos, que presenta un color blanco opaco, colocándola en pellets para ser utilizadas en los ensayos biológicos.

### **2.4.2. Tratamiento de linfocitos con el extracto metanólico de:**

- Los linfocitos se suspendieron en Medio Cultivo de Waymonth , suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y con gentamicina, luego se añadió el extracto metanólico diluido en Solución Salina Fisiológica a dosis de 1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml. Se dejó incubar por 72 h a 37°C.

### **2.4.3. Evaluación de la actividad inmunomoduladora *in vitro*: Transformación linfoblástica**

Los conteos de linfocitos con transformación blástica se realizarón a las 72 horas, preparando frotis y coloreando con Wright y luego se evaluó la transformación linfoblastica realizando la lectura en microscopio con lente de inmersión 100x. A la vez se prepara un grupo control a fines de comparación.

## **2.5. Evaluación *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelium uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus*. <sup>(1,26)</sup>**

### **2.5.1. Distribución de grupos experimentales y administración de tratamientos**

**Grupo Control:** Conformado por 5 especímenes *Cavia porcellus* , recibieron la vacuna BCG.

**Grupo Problema I :** Conformado por 5 especímenes *Cavia porcellus* que recibieron la vacuna BCG y a la vez el extracto metanólico a *Paranephelium uniflorus* a dosis de 250 mg/Kg v.o por 7 días.

**Grupo Problema II :** Conformado por 5 especímenes *Cavia porcellus* que recibieron la vacuna BCG, antígeno PPD 0.1 ml y a la vez el extracto metanólico a *Paranephelium uniflorus* a dosis de 250 mg/Kg v.o por 7

### **2.5.2. Evaluación del tratamiento sobre la respuesta linfocitaria:**

Se extrajo 5 mL de sangre de *Cavia porcellus* de cada grupo experimental utilizando EDTA sódico al 10% como anticoagulante, se centrifugó a 1200 rpm por 30 minutos, se extrajo la fracción superior con la jeringa de tuberculina se retiró la fracción opalescente, que es la que contiene los linfocitos y se distribuyó en cámaras de cultivo de células. Luego agregamos 1 ml de cultivo Waymonth y se llevó a incubar a 37 ° C, durante 72 horas, para hacer la evaluación de transformación blástica de los linfocitos.

Los conteos de linfocitos con transformación blástica se realizó a las 72 horas, preparando frotis y coloreando con Wright para realizar la lectura en microscopio con lente de inmersión.

### **2.5.3. Análisis estadístico:**

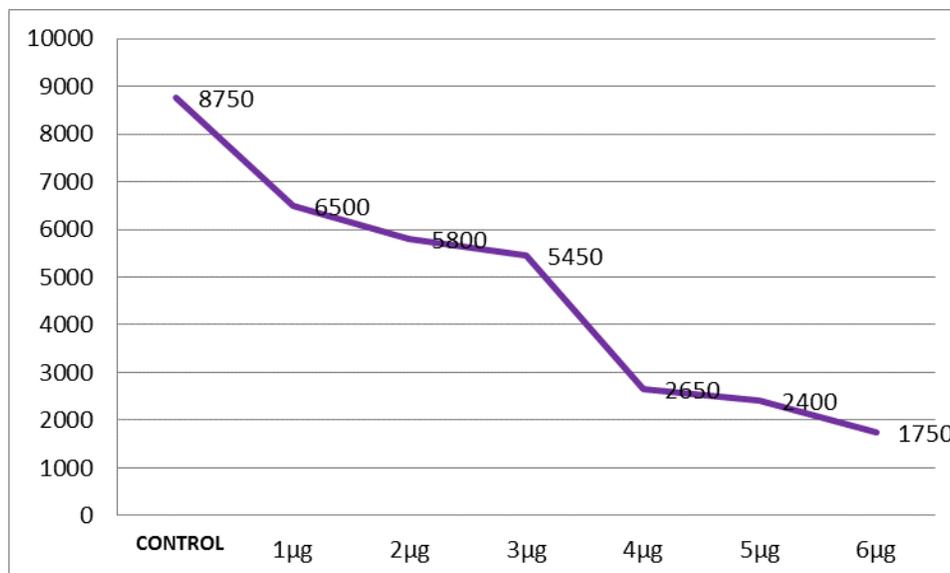
Se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2013, para analizar los datos obtenidos mediante un tratamiento estadístico con los estimadores de promedio, desviación estándar y límites de confianza.

### III. RESULTADOS

**TABLA 1:** Marcha fitoquímica preliminar del extracto *Paranephelius uniflorus* .

	<b>METABOLITO</b>	<b>ENSAYO</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>EXTRACTO METANÓLICO</b>	<b>TRITERPENOS ESTEROLES</b>	<b>/ LIEBERMANN- BURCHARD</b>	<b>+</b>
	<b>CATEQUINAS</b>	<b>CATEQUINAS</b>	
	<b>LACTONAS</b>	<b>BALJET</b>	<b>-</b>
	<b>RESINAS</b>	<b>RESINAS</b>	<b>-</b>
	<b>AZUCARES REDUCTORES</b>	<b>FELHING</b>	<b>+</b>
	<b>FLAVONOIDES</b>	<b>SHINODA</b>	<b>+</b>
	<b>FENOLES</b>	<b>TRICLORURO FERRICO</b>	<b>+</b>
	<b>TANINOS</b>	<b>GELATINA</b>	<b>-</b>
	<b>ALCALOIDES</b>	<b>DRAGENDORFF</b>	<b>-</b>
	<b>ALCALOIDES</b>	<b>MAYER</b>	<b>-</b>

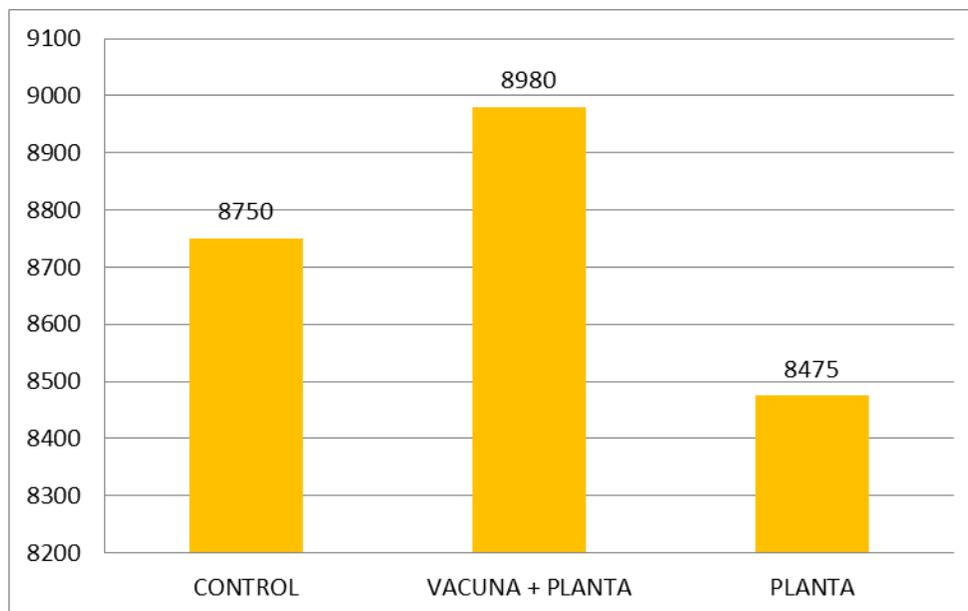
**FIGURA 1:** Respuesta linfocitaria en la evaluación *in vitro* con diferentes dosis de extracto metanólico de *Paranephelium uniflorus in vitro*.



**TABLA 2:** Análisis de varianza de la respuesta linfocitaria del efecto *in vitro* de difere dosis de extracto metanólico de *Paranephelium uniflorus* .

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	79174285,7	6	13195714,3	8,3366426	<b>0,00656722</b>	3,86596885
Dentro de los grupos	11080000	7	1582857,14			
Total	90254285,7	13				

**FIGURA 2:** Respuesta linfocitaria presentes en la evaluación *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelium uniflorus* in vivo en *Cavia porcellus* a dosis de 250 mg /Kg



**TABLA 3:** Análisis de varianza de la respuesta linfocitaria del efecto *in vivo* de extracto metanólico de *Paranephelium uniflorus* .

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	255700	2	127850	0.42852355	<b>0.68596107</b>	9.5520945
Dentro de los grupos	895050	3	298350			
Total	1150750	5				

**TABLA 4:** Evaluación linfocitos de la actividad *in vitro* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus*.

	<i>CONTROL</i>	<i>VACUNA + PLANTA</i>
Media	8750	1475
Varianza	125000	211250
Observaciones	2	2
P(T<=t) una cola	<b>0,00158079</b>	

#### IV. DISCUSIÓN

El presente trabajo tiene por objetivo evaluar la actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* sobre la respuesta linfocitaria en *Cavia porcellus*.

En la Tabla 1 se muestra los metabolitos secundarios del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* donde al realizar los ensayos dio como reacción positiva en Liebermann- Burchard con una coloración verde azulada que esto significa q hay presencia de núcleo esteroideo , si mismo da positivo a Felhing (Azucares reductores) a Shinoda (Flavonoides) a Tricloruro Ferrico (fenoles). Los esteroides se derivan biogénicamente de la AcetilCoA (Ruta del Acetato) vía mevalonato y escualeno. Los esteroides vegetales tienen como precursor inmediato al cicloartenol, en la biogénesis de los esteroides también están implicados procesos tales como hidrogenaciones y deshidrogenaciones C-C, metilaciones

(vía Sadenosilmetionina), hidroxilaciones, etc. Un hecho estructural notable es que la gran mayoría de esteroides naturales tienen sustituyentes alquílicos sobre los carbonos 4 y 24 fundamentalmente, y este hecho es justificado por la misma biogénesis. El conocimiento de la biosíntesis de esteroides ha contribuido al desarrollo de la Quimotaxonomía vegetal, particularmente en el caso de las algas, y ha servido para correlacionar la estructura de estas sustancias con aspectos evolutivos. <sup>(22,24,26,28)</sup>

Un número creciente de sustancias naturales se han identificado como moduladoras del sistema inmune; entre ellas se encuentran los flavonoides que han demostrado poseer efectos inmunomoduladores, antimutagénicos, anticarcinogénicos , entre otros . Diversos datos experimentales han demostrado la acción antiproliferativa y anti- carcinogénica, así como el papel de agente quimiopreventivo de los flavonoides. . <sup>(26,28)</sup>

Los resultados que se presentan en la Fig. 1 muestra la cantidad de linfocitos presentes en sangre de *Cavia porcellus* tratada in vitro con diferentes dosis del extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus*, observando que a dosis de 6µg hay un conteo linfocitario de 1750 linfocitos, el cual es menor a la muestra control que presenta 8750 linfocitos ( $p < 0.05$ ); observando que a dosis mayores el efecto es significativo, lo cual demuestra el posible efecto inmunomodulador de la especie vegetal ensayada (Tabla 1.)

En la Fig 2 se presenta los valores obtenidos en el ensayo in vivo, donde el grupo problema I que recibió BCG (vacuna) y tratamiento con el extracto de *Paranephelius uniflorus* 250 mg/kg durante 7 días, presenta un incremento de linfocitos en relación al control (vacuna BCG), mientras que en el grupo Problema II que recibió solo el extracto

vegetal se evidencia una disminución con respecto al grupo control, pero no significativa según el análisis estadístico (Tabla 2).

Así mismo se realizó una evaluación *in vitro* con las muestras de sangre de los especímenes del grupo control que recibieron vacuna BCG, aislando sus linfocitos e incorporando dosis de 2µg de la planta en el cultivo de células, observando una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), confirmando la actividad inmunosupresora de *Paranephelius uniflorus* (Tabla 3).

Sanchez C. (2002) demuestra que la witaferina A (esteroide), inhibe el rechazo de trasplante en pollos y suprimir la artritis en ratas y que el alcaloide esteroideal, solasodina, también parece poseer actividad inmunosupresora. Así mismo, da a conocer de dos heterosidos de fenetilalcohol (jionosidos A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub>), aislados recientemente, de las raíces *Rehmania glutinosa* var. hueichingensis, demostraron tener actividad inmunosupresora. Este mismo autor menciona numerosos estudios de plantas con actividad inmunosupresora, entre ellas tenemos a la *Curcuma Longa* (rizoma), *Panax ginseng* (raíz), *Polypodium decumanum* (hoja), entre otras especies vegetales (Anexo 9).<sup>(29,30)</sup>

Los posibles mecanismos para producir inmunosupresión están relacionados con la IL-2 que juega un papel central en la activación de los linfocitos T, de acuerdo a esto, el bloqueo temprano de la cadena  $\alpha$  del receptor de IFN- $\gamma$  pudiera regular negativamente la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2, lo que pudiera explicar en parte la actividad antiproliferativa mediada por IFN- $\gamma$ , esto se puede atribuirse a algunos de los componentes presentes en la especie vegetal. En este trabajo no se dispone de datos suficientes para

apoyar esta hipótesis, pero en estudios se ha observado también que el IFN- $\gamma$  induce apoptosis de linfocitos T estimulados en ausencia de células accesorias y en presencia de grandes cantidades de IL-2<sup>(21)</sup>

El otro mecanismo que probablemente pueda explicar la inhibición de la linfoproliferación no constatada en este trabajo es la inducción de apoptosis. La muerte celular programada es un importante mecanismo de control de la respuesta inmune y es uno de los que permiten que determinados lugares anatómicos sean sitios inmunológicamente privilegiados.<sup>(3)</sup>

En la última década, se han producido cambios en la inmunosupresión con la tendencia de evitar la administración o eliminar los esteroides de la terapia inmunosupresora, con este estudio realizado, y viendo el efecto que produce, podemos utilizar la planta de *Paranephelius uniflorus* como tratamiento alternativo pues los resultados presentados constituyen importantes hallazgos que demuestran que el extracto metanólico de *Paranephelius uniflorus* tiene propiedades inmunosupresoras sobre la funcionalidad de los linfocitos .

Es nuestra preocupación, que no hayamos encontrado trabajos desarrollados con la especie que ensayamos y sólo existe estudios con otras especies, lo cual nos hubiera permitido hacer un análisis comparativo de nuestros resultados.

## V. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* con diferentes dosis del extracto metanólico de *Paranephelium uniflorus*, observamos que hay una significancia estadística en linfocitos ( $p < 0.05$ ) en relación al aumento de dosis.
2. Los valores obtenidos en el ensayo *in vivo* con el extracto de *Paranephelium uniflorus* a dosis de 250mg/Kg se evidenció que no hay significancia estadística.
3. Se concluye que el extracto de *Paranephelium uniflorus* tiene efecto inmunosupresor.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar nuevas investigaciones con la planta *Paranephelius uniflorus* para así dar a conocer a la población sus virtudes y así como realizar ensayo de toxicidad.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. García D. Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Mangifera indica* L. sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica. Habana. 2006. Disponible en : <http://tesis.repo.sld.cu/50/1/9789591608123.pdf>
2. Sanchez , C : Actividad Inmunomoduladora en plantas II. Vol N°2 . Panama [Revista en internet] .2003. [acceso 20 de abril del 2015]; Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/21006096/actividad-inmunomoduladora-de-las-plantas-ii-fitoterapianet>.
3. Rodriguez A.: La modulación de la síntesis de IL-2 e IFN- $\gamma$  por células mononucleadas humanas se asocia a la inmunosupresión fisiológica del fluido epididimario. Vol. 18 .Año 2009. Mexico. [acceso 30 de abril del 2015]; Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2009/al092a.pdf>
4. Pons de Ves J. Activación y función cooperadora del linfocito T en la inmunodeficiencia variable común. Madrid. 2011. Disponible en: [http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/16401/Linfocito%20T%20en%20IVC-Tesis%20doctoral%20Jaime%20Pons%202011.pdf?sequence=1&isAllowed](http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/16401/Linfocito%20T%20en%20IVC-Tesis%20doctoral%20Jaime%20Pons%202011.pdf?sequence=1&isAllowed=y)  
 $\equiv y$
5. Irigoyen M. Canales iónicos involucrados en la activación de linfocitos T. Colima. 2007. Disponible en: [http://digeset.ucol.mx/tesis\\_posgrado/Pdf/Mariana\\_Irigoyen\\_Anguiano.pdf](http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Mariana_Irigoyen_Anguiano.pdf)

6. Neira J. La adhesión de linfocitos b a células endoteliales Induce la migración preferencial de Linfocitos t de memoria central. Chile. 2008. Disponible en : [http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2008/qf-neira\\_jc/html/index-frames.html](http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2008/qf-neira_jc/html/index-frames.html)
7. Rivera E. Efecto genotxico del tamoxifeno en linfocitos humanos. Veracruz. 2008. Disponible en : <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/28697/1/RiveraLeon.pdf>
8. Aristimuño C. Caracterización de linfocitos T Reguladores y células dendríticas en Pacientes con esclerosis múltiple Recurrente-remitente. Madrid. 2008. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/8155/1/T30277.pdf>
9. Díaz D. Desarrollo de nuevas metodologías para la Enumeración de células en cultivo y la Cuantificación de la apoptosis. Alcalá. 2006. Disponible en : <http://www2.uah.es/daviddiaz/SobreElAutor/Documentos/Tesis.pdf>
10. Monte M. Estudio sobre la activación de linfocitos para inducir angiogénesis durante la portación tumoral. Buenos Aires. 1996. Disponible en: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2835\\_Monte.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2835_Monte.pdf)
11. Borge M. Leucemia linfocítica crónica de células B: el papel de las señales del microambiente en la patogénesis de la enfermedad. Buenos Aires. 2012. Disponible en : [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_5198\\_Borge.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5198_Borge.pdf)
12. Carpio E. Identificación de receptores que modulan las funciones de los linfocitos T citotóxicos humanos.2006. Disponible en : [http://tesis.repo.sld.cu/294/1/TESIS\\_CARPIO.pdf](http://tesis.repo.sld.cu/294/1/TESIS_CARPIO.pdf)

13. Lasso P. Determinación de la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos del péptido K1 de la proteína KMP-11 del parasito *Trypanosoma cruzi* en pacientes chagásicos. Bogotá. 2008. Disponible en : <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis182.pdf>
14. Hurtado K. Respuesta de células T cocultivada con células mesenquimales frente a mitogenos y aloantigenos en pacientes colombianos con esclerodermia. Bogotá. 2009. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis312.pdf>
15. Allende L. Efectos del retinol (Vitamina A) en la Activación de linfocitos t humanos y sus Implicaciones terapéuticas. Madrid. 1997. <http://biblioteca.ucm.es/tesis/bio/ucm-t21864.pdf>
16. Benítez de Rojas C y Col. Botánica Sistemática. Fundamentos para su estudio. 2ed. Maracay: Universidad Central de Venezuela (UCV); 2003.
17. Dillon M. & Zapata M. Systematics of *Paranephelis Poepp.* &Endl. (Liabeae-Asteraceae): A case study in high-elevation speciation. [Monografía en internet].Chicago (IL): Departamento de Botánica, Field Museum; 2004. [acceso 20 de abril del 2015]. Disponible en : <http://www.sacha.org>
18. Mostacero León J, Mejía Coico F, Gamarra Torres O. Fanerógamas del Perú: Taxonomía, utilidad y ecogeografía. 1° ed. Trujillo: Concejo nacional de ciencia y tecnología (Concytec); 2009.

19. Boncun B. Zari G, Ruiz S. Guía de Practica de Farmacobotanica. 1ª ed. Trujillo: Multicopias; 2011.
20. Kuklinski C. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000.
21. Miranda M. Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. 1ª ed. Ciudad de La Habana: Universidad de la Habana; 2 000.
22. Bruneton J. Farmacognosia: Fitoquímica de Plantas medicinales. 2ª ed. Madrid: Acribia S.A.; 2001
23. Chávez M. Eustaquio C. Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. noni y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. 2010. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo.
24. Céspedes H; Rojas A. : “Características farmacognosticas, y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Paranephelius uniflorus* “carapa de chanco” proveniente de la ciudad de Cutervo” . Tesis I. 2015. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo.
25. Lock O. Análisis fitoquímico y el certificado de marcha fitoquímica. En: Zavaleta Martínez-Vargas A, editor. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. Serie de: Documentos N° 9. Lima: Ministerio de Salud (MINSa); 1999. p. 32-40.

26. Ennquez A, Prieto E, De Los Rios E, Ruiz S. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinal* Roscoe "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo-Region Junín. Peru. Rev. Med. Vallejana. [Revista en internet] 2008 [acceso 20 de abril del 2015]; a(1): [50-64]. Disponible en: [revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext](http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?script=sci_arttext)
27. Martinez F.: Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. España. [Revista en internet] .2002. [acceso 20 de abril del 2015]; Disponible en: [https://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FJavier\\_Gonzalez-Gallego%2Fpublication%2F10961859\\_Flavonoids\\_properties\\_and\\_antioxidizing\\_action%2Flinks%2F0deec52a6b0057f327000000.pdf&ei=FGpCVazePMGmggTmzoGQBA&usg=AFQjCNF702Hv9KRqu40wqQgStGhnp77HHQ&bvm=bv.92189499,d.eXY](https://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FJavier_Gonzalez-Gallego%2Fpublication%2F10961859_Flavonoids_properties_and_antioxidizing_action%2Flinks%2F0deec52a6b0057f327000000.pdf&ei=FGpCVazePMGmggTmzoGQBA&usg=AFQjCNF702Hv9KRqu40wqQgStGhnp77HHQ&bvm=bv.92189499,d.eXY)
28. Avalos J. Estudios Morfohistológicos e identificación de los fitoconstituyentes del extracto acuoso hojas, flores y fruto de la especie *Vicia Faba L.* Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo (Informe de tesis)
29. Silva V. Estudio Farmacotécnico en Drogas Vegetales. Ponencia organizada por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo; 2009 Nov 10; Trujillo, Perú.
30. Chávez M. Eustaquio C. Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia L.* noni y cuantificación espectrofotométrica de los

flavonoides totales. 2010. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo.

- 31.** Sanchez , C : Revista de Fitoterapia Vol N°2 . Panama [Revista en internet] .2002. [acceso 20 de abril del 2015]; Disponible en: [http://passthrough.fw-notify.net/download/109571/http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/inmuno\\_1.pdf](http://passthrough.fw-notify.net/download/109571/http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/inmuno_1.pdf)
- 32.** Sanchez , C : Actividad Inmunomoduladora en plantas II. Vol N°2 . Panama [Revista en internet] .2003. [acceso 20 de abril del 2015]; Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/21006096/actividad-inmunomoduladora-de-las-plantas-ii-fitoterapia.net>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

#### Identificación taxonómica de hojas de *Paranephelius uniflorus*



#### TAXONOMIA

- **REINO:** Plantae
- **SUBREINO:** Tracheobionta
- **DIVISION:** Magnoliophyta
- **CLASE:** Magnoliopsida
- **ORDEN:** Asterales
- **FAMILIA:** Asteraceae
- **SUBFAMILIA:** Cichorioideae
- **TRIBU:** Liabeae
- **GENERO:** *Paranephelius*
- **ESPECIE:** *Paranephelius uniflorus*

## ANEXO 2

### Procesamiento de la droga: ( hojas de *Paranephelius uniflorus*)

SELECCIÓN



ESTABILIZACIÓN





### ANEXO 3

**Marcha Fitoquímica del extracto metanolico de las hojas de *Paranephelius uniflorus*.**



**EXTRACTO METANOLICO**

### ENSAYO DE LIEBERMANN-BURCHARD:

**Reacción Positiva:** La reacción será positiva si aparece coloración azul, verde o naranja.



Medimos X gotas de extracto

Llevamos a sequedad  
Y posteriormente extraer con 1ml de diclorometano  
Evaporar el solvente  
+  
X gotas de anhídrido acético  
+  
XX gotas de Acido Acético  
+  
I gota de Acido sulfúrico cc.

### ENSAYO DE FELHING:

Se mezclan en un tubo de ensayo fracciones iguales de los reactivos felhing A y felhing B, se calentara en baño de agua por 5 minutos y se añadió II gotas del extracto metanólico llevado a sequedad y redisolto en agua destilada.

**Reacción Positiva:** La aparición de un color rojo ladrillo indica un ensayo positivo.

### ENSAYO DE CATEQUINAS:

**Reacción Positiva:** La aparición de una macha verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo.

I gota de extracto

Colocamos sobre papel filtro

Agregar III gotas de una solución de Carbonato de Sodio

### ENSAYO DE BALJET

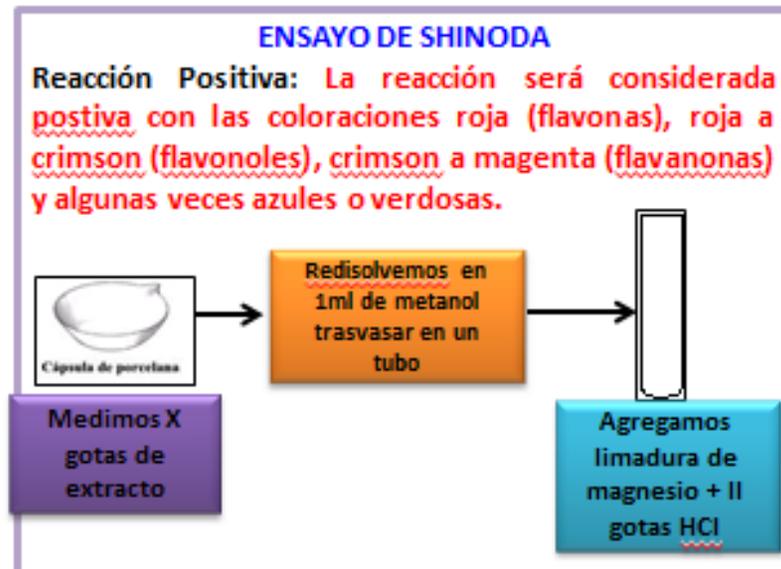
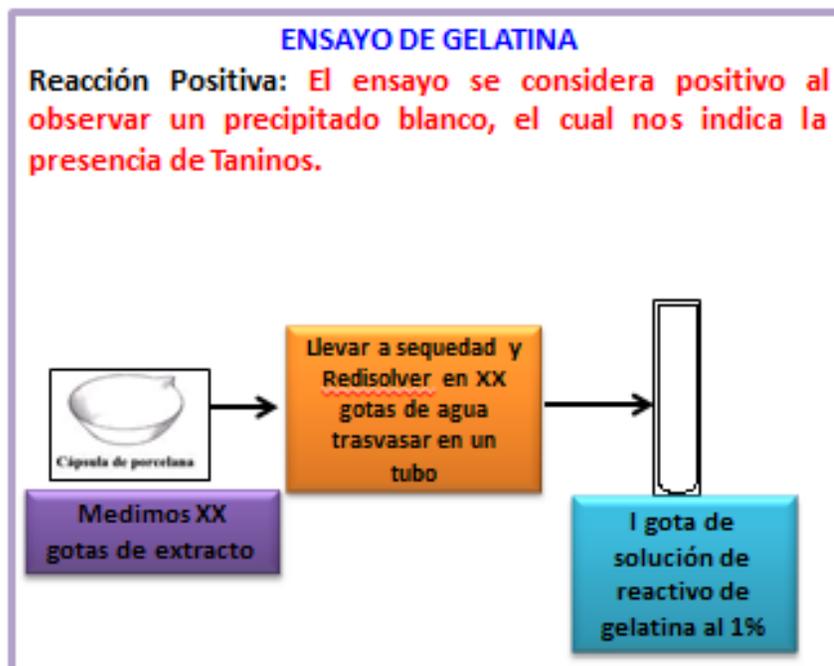
Se agrego una alícuota del extracto y se agregará 1 ml del reactivo.

**Reacción Positiva:** Las sustancias con agrupamiento lactónico se colorearan de rojo.

### ENSAYO DE RESINAS

Se tomó 2 ml de extracto y se añadirá 5 ml de agua destilada.

**Reacción Positiva:** La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo.



## ANEXO 4

### EXTRACTO METANÓLICO

**LIEBERMANN-  
BURCHARD**



**Rx. (+)**

**BALJET**



**Rx. (-)**

**RESINAS**



**Rx. (-)**

**FELHING**



**Rx. (+)**

**SHINODA**



**Rx. (+)**

**TRICLORURO  
FERRICO**



**Rx. (+)**

**GELTAINA**



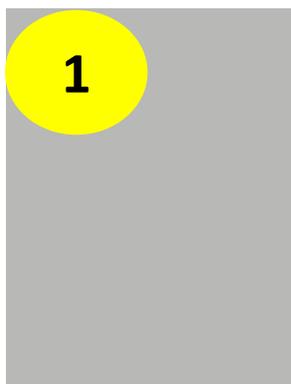
**Rx. (+)**

## ANEXO 5

### ESTERILIZACION DE MATERIAL



### PESADA DEL EXTRACTO PARA DAR A LOS ESPECIMENES

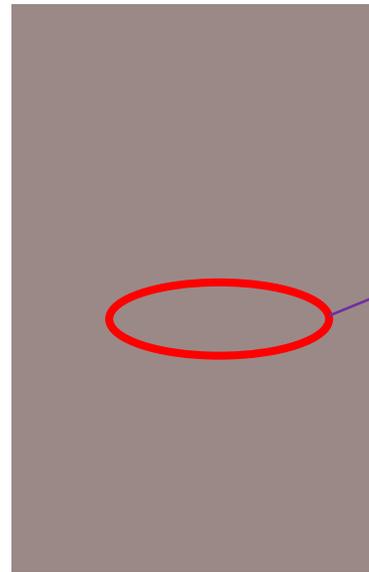




## ANEXO 6

### EXTRACCION DE SANGRE DE LOS ESPECIMENES TRATADOS CON LA VACUNA BCG Y CENTRIFUGACION

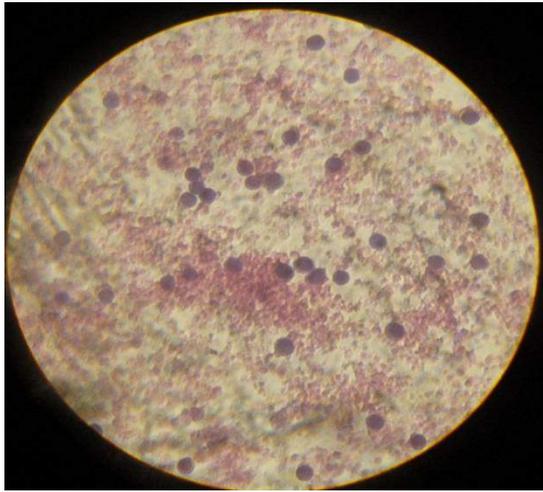




OPALESCENCIA

## ANEXO 7

### OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO EN EL ENSAYO *IN VITRO* A DISTINTAS DOSIS DE CONCENTRACIÓN



**GRUPO CONTROL**

**AUMENTO: 100 X**

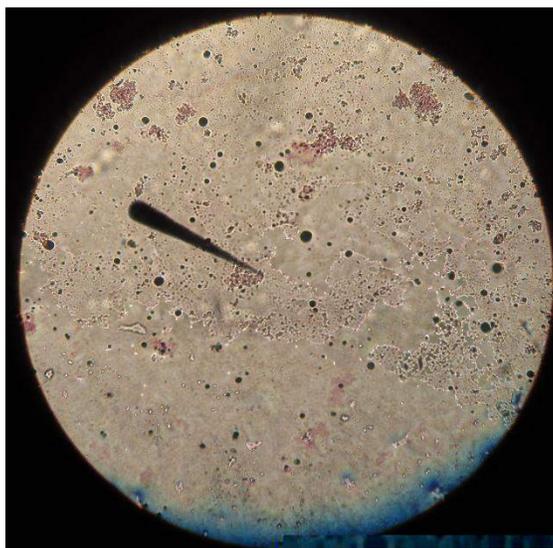


**GRUPO PROBLEMA: 1µg dosis  
extracto**

**AUMENTO: 100 X**

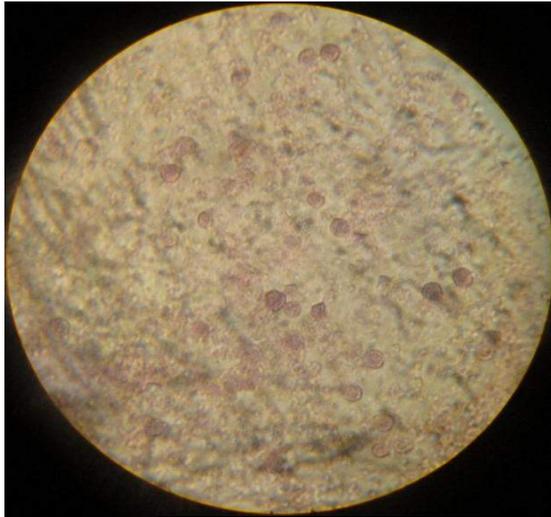
**GRUPO PROBLEMA: 2µg dosis  
extracto**

**AUMENTO: 100 X**



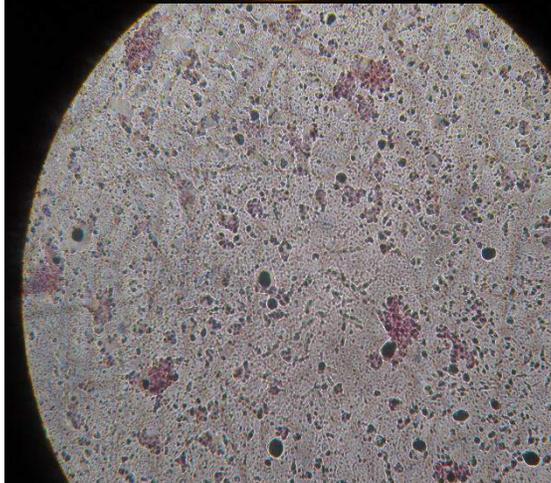
**GRUPO PROBLEMA: 3 $\mu$ g dosis  
extracto**

**AUMENTO: 100 X**



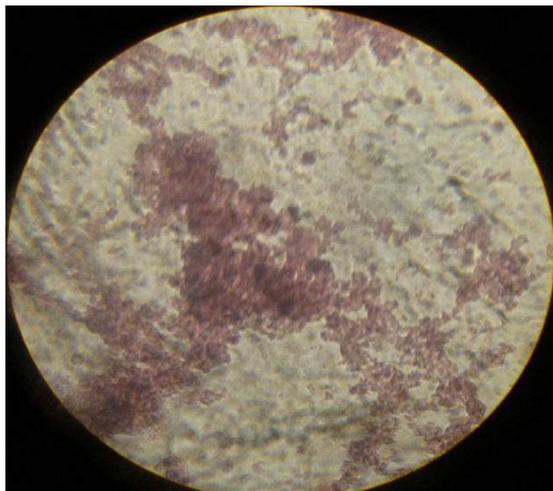
**GRUPO PROBLEMA: 4 $\mu$ g dosis  
extracto**

**AUMENTO: 100 X**



**GRUPO PROBLEMA: 5 $\mu$ g dosis  
extracto**

**AUMENTO: 100 X**



**GRUPO PROBLEMA: 6 $\mu$ g dosis  
extracto**

**AUMENTO: 100 X**

## ANEXO 8

**TABLA 1:** Respuesta linfocitaria en la evaluación *in vitro* con diferentes dosis de extracto metanólico de *Paranephelium uniflorus in vitro*.

<i>Paranephelium uniflorus</i>	MEDIA	D.E
DOSIS		
(BLANCO)	8750	353,6
1µg	6500	707,1
2µg	5800	424,3
3µg	5450	2050,6
4µg	2650	1484,9
5µg	2400	1555,6
6µg	1750	1202,1

**TABLA 02:** Respuesta linfocitaria presentes en la evaluación *in vivo* del extracto metanólico de *Paranephelium uniflorus* in vivo en *Cavia porcellus* a dosis de 250 mg /Kg

<i>Paranephelium uniflorus</i>	MEDIA	D.E
CONTROL	8750	353,6
VACUNA + PLANTA	8980	876,8
PLANTA	8450	8500

**D.E.:** Desviación Estándar

## ANEXO 9

## PLANTAS CON ACTIVIDAD INMUNOSUPRESORA

ESPECIE	PARTE / EXTRACTO	TIPO DE ENSAYO
<i>Aconitum heterophyllum</i>	Rizoma: Etanol 95%	<i>In vivo</i> (rata) <sup>(321)</sup>
<i>Albizia lebbek</i>	Corteza: Agua caliente	<i>In vivo</i> (cobayo) <sup>(356)</sup>
<i>Allium cepa</i>	Bulbo: Acuoso	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(367)</sup>
<i>Allium sativum</i>	Bulbo: Agua caliente	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(368)</sup>
	Bulbo: Extracto liofilizado	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(369)</sup>
<i>Angelica polymorpha</i>	Raíz: Acuoso	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(370)</sup>
<i>Aphanamixis polystachya</i>	Parte no especificada: No especificado	<i>In vivo</i> (cobayo) <sup>(371)</sup>
	Parte no especificada: Acuoso	<i>In vitro</i> <sup>(372)</sup>
<i>Aralia mandshusica</i>	Raíz: Fracción de saponinas	<i>In vivo</i> (ratón) . Sistema complemento y fagocitosis. <sup>(373)</sup>
<i>Astragalus membranaceus</i>	Raíz: Fracción de saponinas	<i>In vivo</i> (cobayo) <sup>(374)</sup>
<i>Azadirachta indica</i>	Corteza: acuoso	<i>In vitro</i> <sup>(375)</sup>
<i>Bidens pilosa</i>	Hojas: Metanólico	<i>In vitro</i> : Frente a proliferación linfocítica estimulada por fitohemaglutina y concanavalina A. <sup>(376)</sup>
<i>Boswellia serrata</i>	Oleo-resina: Etanol 100%	<i>In vivo</i> (ratón): Inhibición de producción y respuesta de hipersensibilidad e inhibición de la infiltración de leucocitos PMN. <sup>(255)</sup>
<i>Bryophyllum pinnatum</i>	Hoja fresca: acuoso	<i>In vivo</i> (ratón). Supresión de hipersensibilidad retardada inducida por ovoalbúmina. <sup>(377)</sup>
<i>Camellia sinensis</i>	Hoja fresca: Fracción polifenólica	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(378)</sup>
<i>Carthamus tinctorius</i>	Flores	<i>In vivo</i> (ratón): Disminución de concentración de lisozima, disminución la fagocitosis por macrófagos y leucocitos. <sup>(379)</sup>
<i>Casearia guianensis</i>	Hoja: Fracción cromatográfica	<i>In vitro</i> : Unión de antígeno superficial a células T. <sup>(380)</sup>
<i>Cinnamomum cassia</i>	Planta entera: Acuoso	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(381)</sup>
<i>Codonopsis pilosula</i>	Raíz: Fracción de polisacáridos	<i>In vivo</i> (cobayo): Recuperación de los niveles de complemento, disminución de la fagocitosis. <sup>(374)</sup>

**Tomada :** Sanchez , C : R: Actividad Inmunomoduladora en plantas II. Vol N°2.Panama

<i>Commiphora mukul</i>	Goma: Acuoso	<i>In vivo</i> (rata): Disminución del título de anticuerpos. <sup>(382)</sup>
<i>Cornus officinalis</i>	Fruto: Mezcla de heterósidos	<i>In vivo</i> (ratón): Prolonga el tiempo de supervivencia tras trasplante de corazón. <sup>(383)</sup>
<i>Curcuma longa</i>	Rizoma: Acuoso	<i>In vivo</i> : Disminución del título de anticuerpos. <sup>(368,382)</sup>
<i>Datura stramonium</i>	Planta entera	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(384)</sup>
<i>Glehnia littoralis</i>	Raíz: Fracción de polisacáridos	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(385)</sup>
	Hojas: Etanol 95%	<i>In vitro</i> : Frente a proliferación linfocitaria inducida por PMA. <sup>(386)</sup>
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Raíz: Acuoso	<i>In vitro</i> <sup>(372)</sup>
<i>Gonatantus pumilus</i>	Flor: Agua caliente	<i>In vivo</i> . Disminuye los anticuerpos (Ig-E) <sup>(387)</sup>
<i>Helianthus annuus</i>	Semilla: Aceite	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(388)</sup>
<i>Hemidesmus indicus</i>	Raíz: Etanol 95%	<i>In vivo</i> (ratón): Frente a la estimulación por eritrocitos de cordero. <sup>(321)</sup>
<i>Holarrhena antidysenterica</i>	Semilla: Etanol 95%	<i>In vivo</i> (ratón): Frente a la estimulación por eritrocitos de cordero. <sup>(321)</sup>
<i>Indigofera arrecta</i>	Hoja: Acuoso	<i>In vivo</i> (humanos): Incrementa la velocidad de sedimentación de eritrocitos. (ESR) <sup>(389)</sup>
<i>Lantana camara</i>	Hoja: Polvo	<i>In vivo</i> (oveja): Supresión de inmunidad humoral y celular. <sup>(390)</sup>
<i>Lasiosiphon kraussianus</i>	Raíz: Fracción de polisacáridos	Disminuye los anticuerpos (Ig-E). <sup>(391)</sup>
<i>Lysimachia christinae</i>	Parte aérea: Agua caliente	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(392)</sup>
<i>Macrocerceus eruca</i>	Planta entera: Fracción de cromatografía	Datos incompletos <sup>(393)</sup>
<i>Melia azedarach</i>	Hoja: Acuoso	<i>In vivo</i> (ratón): Respuestas de anticuerpos. <sup>(394)</sup>
<i>Mentha piperita</i>	Hoja: Acuoso	<i>In vivo</i> (ratón): Reacción de inmunidad celular. <sup>(395)</sup>
<i>Meripilus giganteus</i>	Carpóforo: Metanólico	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(396)</sup>
<i>Oenothera biennis</i>	Semilla: Aceite	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(388)</sup>
<i>Olea europaea</i>	Semilla: Aceite	<i>In vivo</i> (cobayo) <sup>(388)</sup>
<i>Panax ginseng</i>	Raíz: Fracción de polisacárido	<i>In vivo</i> (ratón): Recuperación de los niveles de complemento. <sup>(374)</sup>

<i>Physalis angulata</i>	Planta entera: No especificado	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(384)</sup>
<i>Physalis pubescens</i>	Planta entera: No especificado	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(384)</sup>
<i>Physalis viscosa</i>	Planta entera: No especificado	<i>In vivo</i> (rata) <sup>(384)</sup>
<i>Polygonum perfoliatum</i>	Planta entera: Acuoso	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(394)</sup>
<i>Polypodium decumanum</i>	Hoja: Metanólico	<i>In vitro</i> <sup>(397)</sup>
<i>Polyporus versicolor</i>	Carpóforo: Acuoso	<i>In vivo</i> (humanos) <sup>(398)</sup>
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Raíz: Decocción	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(399)</sup>
<i>Sophora japonica</i>	Fruto fresco: Fracción EtOAc	<i>In vitro</i> : Inhibición de IL-5. <sup>(400)</sup>
<i>Thuja orientalis</i>	Semilla: Aceite	<i>In vivo</i> (conejo) <sup>(401)</sup>
<i>Tinospora cordifolia</i>	Tallo: Acuoso	<i>In vivo</i> (ratón) <sup>(402)</sup>
<i>Tricholoma populismun</i>	Carpóforo: Acuoso	<i>In vivo</i> (cobayo): Disminuye la reacción de hipersensibilidad inducida BCG. <sup>(403)</sup>
<i>Tripterygium hypoglaucum</i>	Raíz: Acuoso	<i>In vivo</i> . Disminuye la reacción de hipersensibilidad inducida DNCB. <sup>(404)</sup>
	Corteza de raíz: Diclorometánico	<i>In vivo</i> (ratón): Frente a. sobreactivación de células T durante infección. <sup>(405)</sup>
		<i>In vivo</i> (ratón): Inhibición de proliferación celular inducida por célula de bazo alogénica. <sup>(405)</sup>
	Parte no especificada: Acetato de etilo	<i>In vitro</i> <sup>(407)</sup>
<i>Tripterygium regellie</i>	Parte no especificada: Decocción	<i>In vivo</i> (rata): Disminuye la concentración de IgG. <sup>(408)</sup>
	Raíz: Decocción	<i>In vivo</i> (rata). Induce atrofia del timo; disminuye IL-1; disminuye proliferación de células T inducida por concavalina-A y el porcentaje THY-1. <sup>(409)</sup>
<i>Tripterygium wilfordii</i>	Parte no especificada: Decocción	<i>In vivo</i> (ratón): Se postula acción citotóxica análoga a los agentes inmunosupresores. <sup>(410, 411)</sup>