



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
ESCUELA DE BIOLOGIA DEL MEDIO AMBIENTE

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES “IN VITRO”
DE 10 PLANTAS MEDICINALES NATIVAS DEL ABVP
AGUARONGO, PROVINCIA DEL AZUAY**

*TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIÓLOGO*

AUTORES:

ELIZABETH DEL CISNE PADILLA GUARNIZO

VERÓNICA PATRICIA PAUCAR FLORES

DIRECTORA:

DRA. RAFFAELLA ANSALONI

CUENCA - ECUADOR

2008

DEDICATORIA:

A nuestros padres y familiares que siempre creyeron
en nosotras y nos apoyaron incondicionalmente.

Elizabeth y Verónica

AGRADECIMIENTOS

- A Dios quien siempre nos lleno de fortaleza en los momentos difíciles.
- Nuestro profundo agradecimiento a la Dra. María Elena Cazar Ramírez por su asesoría científica, confianza, amistad y apoyo desinteresado durante el proyecto.
- A la Dra Raffaella Ansaloni y a la Ing. Aída Cazar, por su ayuda técnica durante el transcurso del proyecto.
- Al Blgo. Danilo Minga curador del Herbario Azuay por su apoyo y amistad.
- A Esther Contento quien supo brindarnos su apoyo y amistad en todo momento.
- A la Blga. María Elisa Durán, por su ayuda en la fase de laboratorio.
- Agradecemos al personal de laboratorio de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay, por su apoyo.
- A la Fundación Ecológica Rikcharina, en persona de su director ejecutivo Ing. Antonio Arellano por darnos la oportunidad de realizar esta investigación en el ABVP Aguarongo. Nuestros más sinceros agradecimientos al componente de Recursos Naturales en persona del Ing. Diego Delgado, Blga. Zaira Vicuña, Blga. Tatiana Chicaiza, Ing. Alejandro Parra por su apoyo y amistad.
- Al Sr. Olivo Arizabal, por su apoyo en la recolección de las especies vegetales.
- A mi tío Livio Guarnizo por su apoyo en los momentos difíciles de mi vida.
- A nuestras familias y amigos/as por su apoyo.

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de caracterizar los extractos orgánicos de plantas medicinales, tanto en su actividad antioxidante como en su contenido de compuestos fenólicos. Se colectaron muestras aéreas de las 10 plantas medicinales en ABVP Aguarongo. La evaluación de la actividad antioxidante se determinó mediante el radical libre estable DPPH y la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos fue determinado de acuerdo al método de Folin Ciocalteu. Los resultados obtenidos señalan a los extractos de *Onagracea Fuchsia sp* (flor) y *Vicia cf andicola* (vainita) como los más promisorios en actividad antioxidante y *Onagracea Fuchsia* (hojas y flores) como una especie vegetal con una alta concentración de compuestos fenólicos.

ABSTRACT

The present work was performed to quantify the antioxidant activity and phenolic content from organic extract of medicinal plants. The aerial parts from ten medicinal plants were collected in ABVP Aguarongo. The enzymatic DPPH essay was used to value the antioxidant activity of plant extracts. The phenolic content was quantified using the Folin – Ciocalteau method. Extracts from Onagraceae *Fuchsia sp* (flowers) and *Vicia cf andicola* (husk) displayed the highest antioxidant activity. Onagraceae *Fuchsia* (leaves and flowers extracts) presented the highest phenolic compounds concentration.

INDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Índice de Contenidos.....	vi
Índice de Contenidos.....	vii
Índice de Contenidos.....	viii
Índice de Ilustraciones y cuadros.....	ix
Índice de Ilustraciones y cuadros.....	x
Introducción.....	1
CAPÍTULO 1: GENERALIDADES	
1.1 Metabolismo Vegetal.....	4
1.2 Actividad antioxidante de extractos vegetales.....	5
1.3 Los Radicales Libres.....	10
1.4 Estrés oxidativo.....	13
1.5 Antioxidantes y Salud.....	14
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA	
2.1 Materiales, solventes y reactivos químicos.....	16
2.1.1 Materiales.....	16
2.1.2 Solventes y Reactivos Químicos.....	16

2.2 Métodos.....	17
2.2.1 Fase de campo: Zona de muestreo.....	17
2.2.1.1 Descripción del Área de Estudio.....	17
2.2.1.2 Selección de las especies vegetales.....	18
2.2.2 Fase de Laboratorio.....	20
2.2.2.1 Selección de las partes vegetales.....	20
2.2.2.2 Preparación de extractos metanólicos de las especies vegetales.....	21
2.2.2.2.1 Preparación de la solución madre.....	23
2.2.2.3 Puesta a punto del ensayo para determinación de la actividad antioxidante.....	23
2.2.2.3.1 Actividad atrapadora de radicales libres.....	23
2.2.2.3.1.1 Cálculo para obtención del IC ₅₀	24
2.2.2.4 Cuantificación de fenoles.....	24
2.2.2.5 Análisis estadístico de datos.....	25

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados.....	26
3.1.1 Rendimiento de extractos vegetales.....	26
3.1.2 Actividad atrapadora de radicales libres.....	28
3.1.3 Cuantificación de Fenoles por el método de Folin Ciolcalteau.....	30
3.1 Discusiones	31
3.2.1 Rendimiento de obtención de extractos	31

3.2.2 Actividad antioxidante. Determinación de IC ₅₀ para extractos	
Vegetales.....	32
3.2.3 Cuantificación de Flavonoides por el método de	
Folin Ciocalteu.....	34
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXOS.....	42

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

Cuadro 2.1 Especies vegetales seleccionadas para el estudio de la actividad antioxidante	19
Cuadro 3.1 Especies vegetales seleccionadas para el estudio de actividad antioxidante, rendimiento de obtención de extractos metanólicos por método Soxhlet.....	27
Cuadro 3.2 Resultados de la actividad atrapadora de radicales libres.....	29
Cuadro 3.3 Determinación del contenido de flavonoides por el método de Folin Ciocalteau.....	30
Gráfico 3.1 Rendimiento de Obtención de Extracción a partir de Flores	31
Gráfico 3.2 Rendimiento de Obtención de Extractos a partir de Hojas	32
Gráfico 3.3 Actividad atrapadora de Radicales Libres	33
Gráfico 3.4 Relación de la concentración de los extractos bioactivos y el porcentaje de	34
captura de radicales libres, determinado por el método DPPH.	
Gráfico 3.5 Cuantificación de fenoles por el método de Folín Ciocalteau (Meq de Ac. Gálico/mL).....	35
..	
Figura 1.1 Estructuras diversas de flavonoides.....	9
Figura 1.2 Interacción de radicales libres con biomoléculas	12

Figura 1.3 Relación del estrés oxidativo en mecanismos de salud y enfermedad	14
Figura 2.1 Esquema de equipo soxhlet usado para la extracción de aceites esenciales	22

Padilla Guarnizo Elizabeth del Cisne

Paucar Flores Verónica Patricia

Trabajo de Graduación

Dra. Raffaella Ansaloni

Marzo 2008

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES “IN VITRO”
DE 10 PLANTAS MEDICINALES NATIVAS DEL ABVP
AGUARONGO, PROVINCIA DEL AZUAY.**

INTRODUCCION

Ecuador es considerado uno de los diecisiete países que concentra la mayor biodiversidad del mundo. Tiene el 8% de fauna, y el 18% de especies de aves del planeta. El endemismo es un fenómeno común en la biodiversidad del Ecuador. Se han citado 4011 plantas endémicas dentro de la flora local (Valencia, R. et. al. 2000).

Las interacciones del ser humano y la naturaleza han cambiado, ya que la complejidad de los ecosistemas tropicales demanda el desarrollo de culturas aptas para utilizar y transformar los bosques, las mismas que han elaborado y perfeccionado técnicas para el uso y manejo de los recursos. En este sentido el tiempo ha desempeñado un factor esencial en este proceso, pues se requieren muchos años para simplemente llegar a “conocer” la biodiversidad. (Ríos y Perderson, 1997).

Durante la historia de la evolución muchas especies han tenido que desaparecer para dar origen a otras. Pero en los últimos años los cambios que el ser humano ha provocado en el ambiente ha hecho que muchas especies de animales y plantas desaparezcan para siempre de la naturaleza (Cfr. Mena, P. S/F).

En nuestro país se han hecho pocos estudios sobre los principios activos producidos por las plantas que conforman nuestra biodiversidad. Pero estas plantas en los últimos años están siendo amenazadas por la masiva deforestación. En este sentido, se conoce muy poco sobre los beneficios que brindan las plantas, por lo tanto la desaparición de estas especies se han llevado consigo todos los beneficios curativos.

Existe una gran cantidad de plantas medicinales, aquellas que nuestros pueblos indígenas utilizan con fines terapéuticos. Durante siglos el conocimiento de las plantas ha sido empleadas y validados en el laboratorio de la vida y en la actualidad han llamado la atención de muchos investigadores a fin de descubrir los posibles principios activos que intervienen en procesos terapéuticos.

Las plantas con sus principios activos nos sirven para curar y aliviar males de los seres humanos, en realidad son la esencia de la humanidad en materia de curación. Muchas plantas contienen potentes principios activos que, si se usan correctamente, traerán beneficios a nuestra salud. (Agapito y Sung, 2005).

El estudio de los principios activos de las plantas es reciente y es una preocupación que se ha desarrollado desde occidente de la ciencia formal que pretende validar el conocimiento de los pueblos sobre el uso de las plantas a través de la comprobación de los principios activos que estas presentan.

La propuesta de esta investigación es caracterizar los extractos orgánicos de plantas medicinales, tanto en su actividad antioxidante como en su contenido de compuestos fenólicos, con el objeto de incrementar los conocimientos relativos a las plantas de nuestra región y poder identificar aquellas especies promisorias como fuentes de antioxidantes.

Para este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

Cuantificar mediante ensayos enzimáticos la actividad antioxidante de diez especies medicinales nativas del ABVP Aguarongo, relacionándolas con su contenido de compuestos fenólicos.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar un ensayo “in vitro” para determinar la actividad antioxidante por captura de radicales libres.
2. Evaluar la actividad antioxidante de extractos crudos de diez especies medicinales nativas del ABVP Aguarongo, cuyos usos tradicionales se relacionen con la actividad biológica a investigar.
3. Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos de las especies en estudio por métodos espectrofotométricos.

A continuación se describirán los siguientes contenidos: En el primer capítulo se argumenta el tema de investigación con otros estudios ya realizados sobre antioxidantes. En el segundo capítulo se describe la metodología que nos facilitó el proceso investigativo y la zona de estudio. En el tercer capítulo se encuentran los resultados y las discusiones de los antioxidantes. Por último se detalla las conclusiones y las recomendaciones.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1.1. Metabolismo Vegetal

En toda célula viviente se realizan varias reacciones químicas de diversa naturaleza, pero estas reacciones químicas también ocurren en la materia inerte, participan transformaciones energéticas. Algunas actividades, como la fotosíntesis, la asimilación y la síntesis de alimentos y de otros materiales complejos a partir de sustancias más simples, elaboran compuestos nuevos y, por lo tanto, son procesos constructivos. Otras reacciones son destructivas., de éstas, las mas importantes son las digestión y la respiración, en las que sustancias alimenticias complejas se degradan y transforman en compuestos mas sencillos. Se da el nombre de metabolismo al conjunto de las transformaciones químicas asociadas con las actividades del protoplasma (Wilson y Loomis, 1968).

Metabolismo primario compromete aquellos procesos químicos que cada planta debe llevar a cabo cada día para sobrevivir y reproducir su actuación, como son: fotosíntesis, glicólisis, ciclo del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos, síntesis de proteínas, enzimas, coenzimas, síntesis de material genético, reproducción de células, síntesis de nutrientes, etc (Torsell, 1997).

Se llama metabolitos secundarios de las plantas a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo de las plantas. Los metabolitos secundarios de las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

Por muchos años el valor adaptativo de la mayoría de los metabolitos secundarios fue desconocido. Muchas veces fueron pensados simplemente como productos finales de

procesos metabólicos, sin función específica, o directamente como productos de desecho de las plantas. En general fueron percibidos como insignificantes por los biólogos por lo que históricamente han recibido poca atención por parte de los botánicos. Muchas de las funciones de los metabolitos secundarios aún son desconocidas. El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, que estaban interesados en estas sustancias por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria. De hecho, el estudio de los metabolitos secundarios de las plantas estimuló el desarrollo de las técnicas de separación, la espectroscopia para dilucidar su estructura, y metodologías de síntesis que hoy constituyen el fundamento de la química orgánica contemporánea (Buchanan, 2000).

En estudios biológicos más recientes se determinó que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas. El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas (Buchanan, 2000).

1.1.2 Actividad antioxidante de extractos vegetales

Existe un amplio uso de plantas en la medicina tradicional para el alivio de varias dolencias. Las plantas son una gran fuente de antioxidantes que pueden servir como guía para el desarrollo de nuevas medicinas. La diversidad de compuestos producidos por el metabolismo secundario vegetal es responsable de su

bioactividad¹, siendo los compuestos fenólicos uno de los grupos más ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, en base a sus orígenes biosintéticos:

1. **Terpenoides.** Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25.000 metabolitos secundarios, son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato o "5-carbono isopentenil difosfato") que se forman en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante (Goodwin 1971). Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. La distribución de unos pocos de ellos en las plantas es más restringida, como los que forman los aceites esenciales, entre otros. (Torssell, 1997).
2. **Compuestos fenólicos como los fenilpropanoides y sus derivados.** Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido shikímico o por la vía del malonato/acetato.
3. **Compuestos nitrogenados o alcaloides.** Los alrededor de 12.000 alcaloides que se conocen, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas. Son fisiológicamente activos en los animales, aun en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la quinina y la estricnina (Torsell, 1997).

¹ Bioactividad: actividad biológica, referida al efecto que tiene cierta sustancia sobre un sistema vivo (microorganismo, tejido o sistema).

La dieta humana incluye gran variedad de componentes no nutritivos cuyo papel sobre la salud no está bien establecido. Muchos de ellos no ejercen seguramente ningún efecto en el organismo en las cantidades en que son ingeridos, pero otros incluso en baja cantidad, podrían tener acciones benéficas.

Tenemos que reconocer el hecho que una proporción mayor de la medicina tradicional involucra el uso de extractos vegetales y sus principios activos. Los principios activos que se obtienen pueden ser sustancias simples, como por ejemplo los alcaloides o bien mezclas complejas entre ellas: resinas o aceites esenciales. Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos, que pueden ser glucósidos, galactósidos, etc. Otros compuestos activos de las plantas, a más de los alcaloides son: lípidos, gomas, mucílagos, principios amargos, taninos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas y compuestos fenólicos. (Torsell, 1997).

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en plantas comestibles y no comestibles, y en sus productos derivados (zumos, confituras, cervezas, vinos). En los últimos tiempos se han acumulado evidencias de que algunos compuestos fenólicos ingeridos con la dieta habitual pueden tener implicaciones sobre la salud humana, al haber sido asociados en distintos estudios epidemiológicos con variaciones en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Las sustancias polifenólicas se integran en dos familias principales: ácidos fenólicos y flavonoides. Además de éstos hay

otros compuestos fenólicos, entre los que se incluyen diversos fenoles simples y estilbenos como el resveratrol (Saura y Goñi, 2005).

La actividad antioxidante de los fenólicos se debe sobre todo a las propiedades redox, que les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, boqueando del singlete de oxígeno y captadores de radicales OH^\cdot . Retrasan la degradación

oxidativa de los lípidos y por lo tanto mejoran la calidad y el valor nutricional de los alimentos (Santos, C.2001).

Además de presentar un potencial de actividad antioxidante, los polifenoles que poseen grupos o-dihidroxifenil son excelentes quelantes de metales de transición como Fe(III), Al(III) o Cu(II), que juegan un papel fundamental en la formación de radicales e influyen sobre la peroxidación lipídica. De este modo, la complejación de metales por parte de los polifenoles contribuye a la protección frente al daño ejercido por estos procesos. Cuando la complejación se produce en el tracto gastrointestinal, se inhibirá la absorción de estos metales. Asimismo, la presencia de ácido ascórbico, que favorece la formación de Fe (II), reducirá la captación del hierro por los polifenoles (Santos, C.2001).

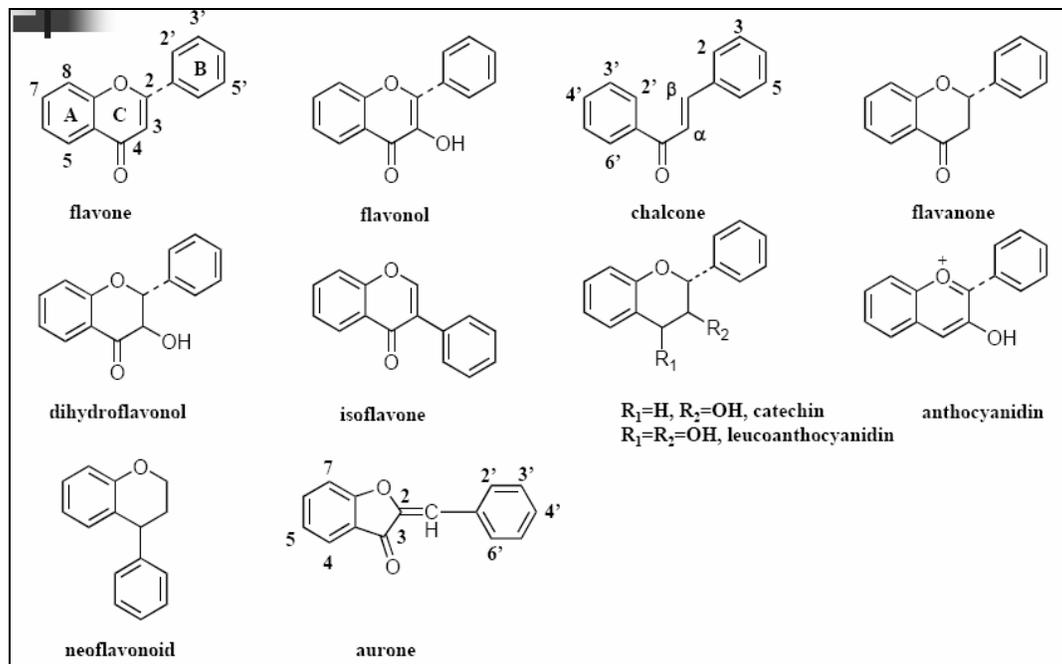
Se han reportado varias actividades biológicas, entre las que se incluye el efecto antioxidante. Extractos crudos de frutas, hierbas, y otros materiales vegetales ricos en fenólicos son de creciente interés en la industria de alimentos y farmacéutica ya que pueden retardar la degradación oxidativa de lípidos, y por consiguiente mejorar la calidad y valor nutricional de los alimentos. La importancia de la elección de los componentes de los antioxidantes en el material vegetal de salud y protección de la enfermedad del corazón coronaria y el cáncer también está levantando el interés entre científicos, fabricantes de comida, y consumidores como la tendencia del futuro está acercándose a la comida funcional con la salud específica (Kahkonen *et al.*, 1999).

Las especies vegetales superiores desarrollaron su capacidad de adaptación a los ambientes terrestres mediante la biosíntesis de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos vegetales son metabolitos aromáticos que poseen grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático fenilo. En este grupo se incluyen los flavonoides, constituidos por un esqueleto difenilpropano (C₆-C₃-C₆). La familia de los flavonoides está constituida por flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanos, flavanoles, leucoantocianidinas, antocianidinas, auronas, charconas e isoflavonas. La diferencia estructural en cada flavonoide resulta de la variación y el número de grupos hidroxilo y el grado de

glicosilación de estos grupos. En el metabolismo vegetal estos compuestos cumplen funciones variadas, entre ellas: defensa ante otras especies, pigmentación de flores y contribución sustancial a ciertos sabores de frutos (Buchanan, 2000).

La investigación sobre nuevas fuentes de compuestos fenólicos ha atraído creciente interés después del descubrimiento de la “paradoja francesa”, es decir, la baja tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares observada en la población del mediterráneo, asociada con el consumo de vino rojo y una ingesta elevada de grasas saturadas. Los flavonoides del vino rojo son responsables, en parte, de este efecto (Nijveldt *et al.*, 2001).

Fig 1.1 Estructuras diversas de flavonoides



Fuente (Buchanan, 2000)

Se ha sugerido que los flavonoides pueden ejercer un papel protector frente a algunos cánceres humanos, basándose en sus efectos antioxidantes y complejación con proteínas. En estudios epidemiológicos no se ha podido asociar la protección frente a mortalidad total por cáncer con la ingesta de flavonas y flavonoles, para los cuales

existen algunos datos relativamente fiables de presencia y contenido en alimentos. No se dispone, sin embargo, de estudios similares para otros grupos de flavonoides, ya que no existen datos suficientes sobre su distribución y contenido en alimentos. No obstante si existen estudios epidemiológicos que relación el consumo de te con una reducción en la mortalidad por cáncer, apoyados por datos obtenidos en ensayos con animales. Así se ha visto que extractos de polifenoles del te administrados oralmente a ratas y ratones tienen efectos protectores frente al efecto carcinogénico inducido por diversos agentes químicos. (Saura y Goñi, 2005).

El efecto protector se ha asociado a flavanoles, al ser los flavonoides mejor representados en el té, tanto en forma de catequinas, epigallocatequina-3,0-galato (EGCG, principal compuesto fenólico del té verde, como de polímeros derivados de su oxidación, existentes en té negro (Saura y Goñi, 2005).

Se ha visto que estos polímeros son capaces de inhibir la mutagenicidad de agentes mutagénicos muy diversos en el test de Ames y que también son capaces de inhibir la transformación *ex- vivo* de líneas celulares de epidermis de ratón y la proliferación de células de carcinoma epidérmico humano, tratadas con distintos agentes inductores así como de promover la apoptosis en líneas celulares de linfoma y cánceres de estómagos humanos (Saura y Goñi, 2005).

1.1.3 Los Radicales Libres

Desde hace 3.500 millones de años la vida ha sufrido una enorme evolución debido a cambios en la composición de la atmósfera. Con la aparición de las algas verdeazuladas que tomaban el hidrógeno del agua, surgió el oxígeno, que al acumularse en la atmósfera resultó incompatible, especialmente en conjunción de la luz, con aquella forma de vida anaeróbica, que actualmente sigue aún atrincherada en ciertos reductos en los que el oxígeno difícilmente alcanza (Ballester *et al.*, 1996).

Este factor forzó la aparición de la vida aeróbica, no sólo resistente al oxígeno –cuya concentración fue aumentando hasta estabilizarse en un 21% sino que, por añadidura, dio lugar a metabolismos de alta eficacia energética, lo que permitió la aparición de vegetales y animales de creciente complejidad y eficacia. La toxicidad del oxígeno se manifiesta cuando es respirado a altas concentraciones, produciendo lesiones en el tracto respiratorio y, hace años, ceguera permanente en bebés de incubadora (retinopatía del prematuro). No obstante, el organismo utiliza el oxígeno para destruir microorganismos patógenos. (Ballester *et al.*, 1996).

En las últimas décadas han surgido diversas teorías que intentan explicar el proceso de envejecimiento celular, entre ellas una de las que tiene más adeptos es la generación de los radicales libres. Esta teoría propone que, debido a la alteración de los mecanismos antioxidantes, se generan y acumulan los radicales libres y se produce un estrés oxidativo que daña estructuras celulares, lo cual conduce a la muerte celular (Velásquez *et al.*, 2004).

La formación excesiva de radicales libres ocasionan la destrucción de las macromoléculas de la célula (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas), induciendo una disminución en la resistencia al ambiente y un incremento en la fragilidad celular. Estos mecanismos podrían relacionarse con el desarrollo de enfermedades como arterioesclerosis y ciertos tipos de cáncer. Cuando existe un desbalance entre la generación de ROS² y antioxidantes, el daño oxidativo puede esparcirse hacia el ADN, proteínas y lípidos de las células (Okawa *et al.*, 2001).

Las ROS son varias formas de oxígeno reactivo, las que incluyen radicales libres como el ión superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo (OH[•]), o especies no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En los organismos vivos los ROS se generan en diferentes procesos como la respiración aeróbica, en leucocitos polimorfonucleares,

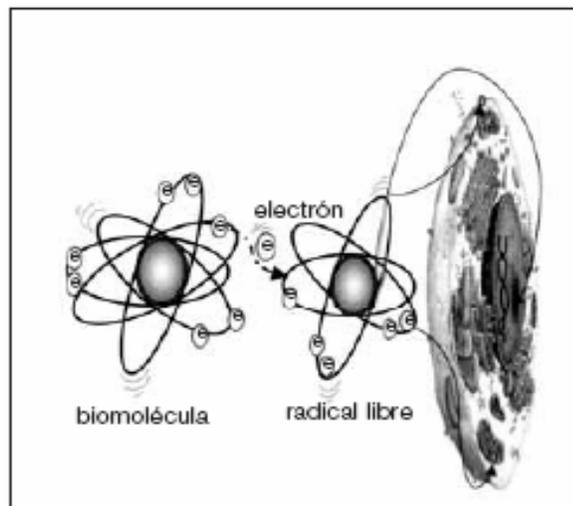
² ROS: especies reactivas de oxígeno

macrófagos y peroxisomas (Yildirim, A.et.al.2000). Las fuentes exógenas de radicales libres incluyen al humo del cigarrillo, radiaciones ionizantes, contaminantes ambientales, solventes orgánicos y pesticidas (Robinson *et al.*, 1997).

Las condiciones pro-oxidantes predominan debido a la creciente generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o al exceso de estrés oxidativo en las condiciones de vida actuales (Govindarajan. *et al.*, .2004).

Los radicales libres son resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio, o bien son generados por factores ambientales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas. Se trata de átomos o moléculas extremadamente reactivos, debido a que en el orbital más extremo de su estructura tiene uno o más electrones sin aparear. Esta inestabilidad les confiere una avidez física por la captura de un electrón de cualquier otra molécula de su entorno, ocasionando que la estructura afectada quede inestable. (Velásquez *et al.*, 2004).

Fig. 1.2 Interacción de radicales libres con biomoléculas



(Velásquez, M. 2004)

1.1.4 Estrés Oxidativo

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aeróbica representando la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular. Sin embargo, al mismo tiempo entraña un peligro potencial debido a su participación en la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad, conocidos como especies oxigénicas reactivas (ROS), las cuales son potencialmente tóxicas para los organismos aeróbicos. Adaptativamente, las células han desarrollado numerosos mecanismos de defensa, mecanismos antioxidantes, de distinta índole entre los que se encuentran las estrategia enzimáticas y las de interacción molécula (Thomas. 1994).

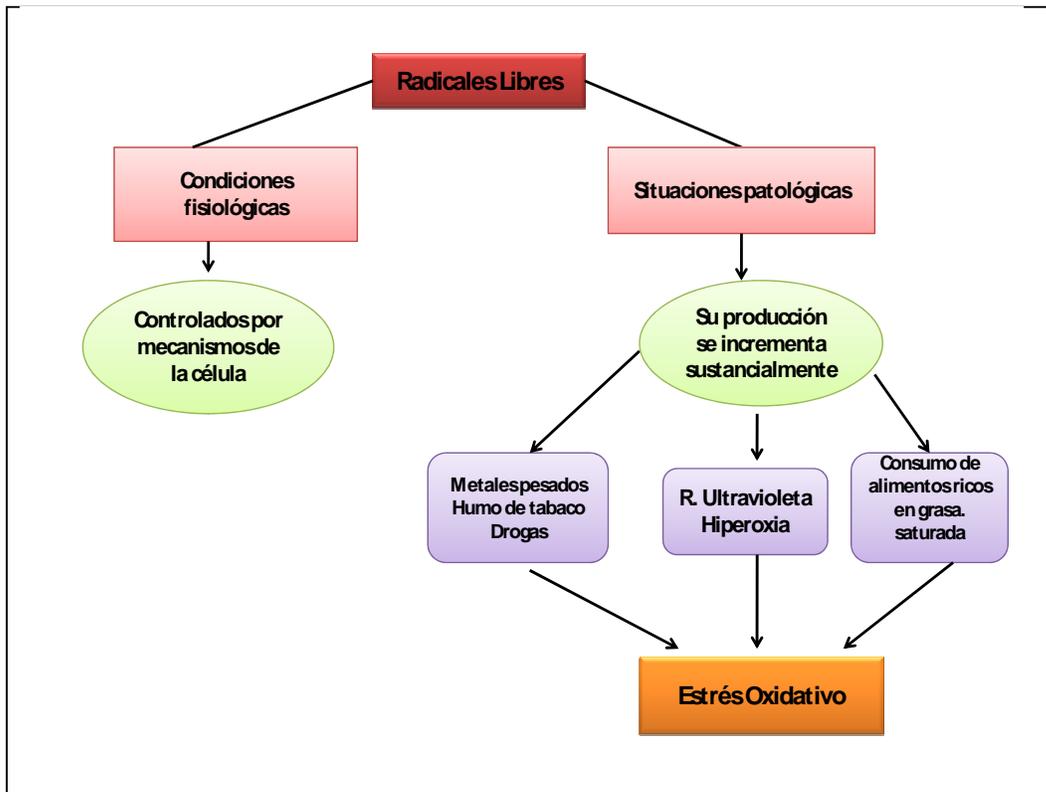
Los antioxidantes son compuestos que protegen las células contra los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Un desbalance entre antioxidantes y ROS produce estrés oxidativo, y por consiguiente daño celular. El estrés oxidativo se vincula con cáncer, envejecimiento, arteriosclerosis, inflamación y procesos neurodegenerativos, por ejemplo enfermedad de Parkinson y Alzheimer. En la actualidad se reconoce que varias enfermedades que aquejan a la población se deben a un desplazamiento en el balance de las condiciones pro-oxidantes y antioxidantes del organismo (Govindarajan, *et al.*, 2004), incluso una concentración excesiva de antioxidante puede resultar ineficaz o aún provocar una inversión en el efecto protector (Berk, 1980).

La primera defensa de las células frente a la agresión o radicales libres radica principalmente en la acción de tres enzimas, la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, es por ello que estos sistemas enzimáticos suelen usarse como testigos en los ensayos biológicos de estrés oxidativo (Saura y Goñi, 2005).

Por otra parte la respuesta antioxidante de naturaleza no enzimática agrupa diversos tipos de moléculas capaces de rendir complejos estables o de menor reactividad, entre ellas se encuentran tioles intercelulares como glutatión (GSH), o sustancias ligadas a la

dieta como la vitamina E (tocoferoles), la vitamina A (carotenos), la vitamina C (ác. Ascórbico) y los flavonoides (Saura y Goñi, 2005).

Fig.1.3 Relación del estrés oxidativo en mecanismos de salud y enfermedad



1.1.5 Antioxidantes y salud

Según la estimación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor del 80% de la población mundial dependen de la medicina tradicional en las necesidades primarias para el mantenimiento de su salud y que en la actualidad, gran parte de los medicamentos, provienen del Reino Vegetal. Estudios efectuados a nivel mundial por la OMS señalan la existencia potencial de 800.000 especies vegetales, de las cuales cerca de 2.000 especies tienen propiedades medicinales, pero que lamentablemente no se ha llegado a un estudio de la mayoría de ellas (OMS, 2003).

Los procesos de oxidación a nivel celular están relacionados con una serie de patologías, que incluyen el envejecimiento celular, cáncer, enfermedades degenerativas, entre otros. La inhibición de la oxidación celular se logra con la acción de compuestos con actividad antioxidante. La relación entre antioxidantes y salud radica en que los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la iniciación o propagación de las reacciones de oxidación en cadena bloqueando los radicales libres que dañan células, lípidos, proteínas y ADN hasta que sean captadas y recuperen una estructura estable (Buhler, D. 2005).

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente -membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular . La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN) funcionalmente vitales o más importantes (Reitte, 1995).

Por los problemas ocasionados gracias al incremento de la concentración de ROS en el ambiente, se hacen necesarias investigaciones orientadas hacia la búsqueda de fuentes de sustancias capaces de atrapar radicales libres. La auto oxidación de sustratos orgánicos puede ser inhibida por sustancias cuyas estructuras químicas presenten grupos funcionales capaces de detener los mecanismos radicálicos presentados en los procesos de oxidación.

Capítulo II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales, solventes y reactivos químicos

2.1.1 Materiales

- Erlenmeyers 500ml
- Cápsulas, morteros
- Puntas para pipetas Automáticas de 100 ul
- Embudos de Separación
- Puntas para pipetas Automáticas de 1000 ul
- Balones volumétricos varios tamaños
- Pinzas dentadas
- Papel Filtro
- Podadoras pequeñas
- Fundas de polietileno
- Prensas (unidad)
- Cartulina plegable (pliegos)
- Goma (unidad)
- Hilo (madeja)
- Cámara digital
- Fundas de papel

2.1.2 Solventes y Reactivos Químicos

En los procesos de preparación de extractos se usó metanol de grado técnico destilado. Para el ensayo de actividad atrapadora de radicales libres se utilizó metanol de grado analítico. Los reactivos empleados en los ensayos para determinar

la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de los extractos fueron comprados a la casa SIGMA Aldrich Inc, St. Louis, MO, y se detallan a continuación:

- Acido Gálico
- Butil hidroxil anisol
- Carbonato de Sodio, químicamente puro
- 2.2 Difenil-1-picril-hidrazil tetrazolio
- Reactivo de Folin Ciocalteu, 2N

Los reactivos fueron almacenados en oscuridad y temperatura controlada durante el trabajo de laboratorio. Para los bioensayos se utilizó agua destilada y desmineralizada. Las soluciones de trabajo fueron almacenadas en frascos ámbar durante el desarrollo de los bioensayos.

2.2 Métodos

2.2.1 Fase de campo: Zona de muestreo

2.2.1.1 Descripción del Área de Estudio

El bosque Aguarongo fue declarado área de vegetación protectora n° 10, mediante acuerdo Ministerial n° 292, publicado en el registro oficial n° 255 del 22 de Agosto de 1985. El bosque Aguarongo representa uno de los pocos fragmentos de Bosque Andino que subsisten en la sierra interandina de la provincia del Azuay, que corresponde Bosque Húmedo Montano Bajo, bhmb³. Constituye un refugio para la fauna y flora característica de estos hábitats. Aunque su diversidad biótica está empobrecida, debido principalmente a la caza de animales, la extracción de plantas y la deforestación, todavía representa una riqueza biológica que merece esfuerzos de conservación.

³ Según la clasificación bioclimática de Cañadas (1983), las zonas de vida presentes en el área corresponden al Bosque Húmedo Montano Bajo (bhmM) en el filo de la cordillera, localizándose dentro de la cuenca del río Paute, en los cantones de Gualaceo y Sigsig, provincia del Azuay, entre los 2.500 y 3.200 de altitud.

Asimismo, por su posición geográfica, ubicado en la parte sur de la cuenca media del río Paute, el bosque es importante en el abastecimiento de agua y control de sedimentos para la presa hidroeléctrica Daniel Palacios, que genera el 70% de la energía que consume el país. Su mayor importancia radica en la dotación de fuentes de agua para consumo humano y uso agropecuario para las comunidades campesinas adyacentes al Bosque, integradas por unas 10.000 personas. Es también una fuente de leña, forraje, plantas medicinales y madera para la elaboración de artesanía (Fundación Ecológica Rikcharina. 199..) (Ver anexo 1).

2.2.1.2 Selección de las especies vegetales

Para llevar a cabo una investigación orientada a la valoración de una actividad biológica específica en plantas, es necesario establecer un grupo de especies bajo estudio, con una selección basada en antecedentes botánicos y/o de usos en medicina tradicional, para esto se tomó en cuenta el estudio etnobotánico realizado por la Fundación Ecológica Mazán en el año 1999 en el bosque Aguarongo, cuyo contenido describe el efecto curativo que ellas poseen. La identificación taxonómica, unida a la información etnobotánica, nos permite seleccionar especies vegetales fundamentadas en antecedentes previos válidos. Con la información disponible de las plantas medicinales de nuestro entorno se conformó un grupo de diez especies vegetales a ser estudiadas en su capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos.

Las diez especies medicinales seleccionadas para el presente estudio se describen a continuación:

Cuadro 2.1: Especies vegetales seleccionadas para estudio de actividad antioxidante

Nombre Científico	Nombre común	Usos
Asteraceae <i>Barnadesia arborea</i> Kunt	shiñan	La flor es utilizada como expectorante de las vías respiratorias, sistema nervioso.
Asteraceae <i>Bidens andicola</i> Kunt	ñachag	La flor es utilizada para curar los nervios y cólicos estomacales.
Asteraceae <i>Chuquiragua jussieui</i> J.F.Gmel	chuquiragua	Se utiliza las hojas y la flor para curar la gripe dañada, además la flor es utilizada para bajar los niveles de colesterol en la sangre.
Hypericaceae <i>Hypericum sp</i>	matequilca	El tallo y las hojas son utilizados para curar las heridas, además se utiliza con otras plantas en baños para las mujeres paridas.
Lamiaceae	toronjil	Sirve para calmar los nervios.
Fabaceae <i>Vicia cf andicola</i>	arverjilla	Se utiliza toda la planta para la inflamación, calmante de los nervios, para el susto, infección estomacal y respiratoria.
Onagraceae <i>Fuchsia sp</i>	pena pena	Se utiliza toda la planta para los nervios, hígado.
Piperaceae <i>Piper andreanum</i> C.Dc	matico	Sirve como cicatrizante y desinfectante de heridas.
Solanaceae <i>Cestrum sp</i>	sauco blanco	Se utiliza como antiinflamatorio.
Valerianaceae <i>Valeriana tomentosa</i> Kunt	shipalpal	Se utiliza para los nervios ataque del corazón.

Con la ayuda del guía del Centro de Gestión e Interpretación Ambiental Aguarongo Sr. Olivo Arizabal Arizabal se realizó un reconocimiento de la zona de estudio, luego durante un lapso de tres meses se realizaron doce salidas de campo para la recolección

de las diez especies vegetales seleccionadas, la recolección de éstas plantas fueron hechas con una podadora manual, y colocadas en fundas plásticas y etiquetadas debidamente hasta su traslado al laboratorio.

Se georeferenció cada punto de muestreo y la clasificación taxonómica de las plantas se realizó con ayuda del curador del Herbario Azuay Blgo Danilo Minga.

2.2.2 Fase de Laboratorio

2.2.2.1 Selección de las partes vegetales

Las partes aéreas de las plantas presentan la mayor biodiversidad de metabolitos secundarios, pues en este entorno se desarrollan mayoritariamente las interacciones con otros reinos, y se estimula la producción de compuestos de defensa a patógenos, atracción de polinizadores, etc (Torsell, 1997). Es en base a esta información que, para el presente estudio, se seleccionaron partes aéreas, mayoritariamente hojas y flores, de las especies seleccionadas.

El material vegetal, previamente clasificado según las partes aéreas a utilizar, fue secado en estufa de corriente de aire a 40°C durante un tiempo promedio de 48 horas, en dependencia del tipo de material vegetal seleccionado. El secado, realizado en condiciones controladas, evita los posibles cambios químicos en el material vegetal (Harborne, 1998). El material seco fue pulverizado en una licuadora de laboratorio, hasta llegar a obtener una partícula fina. Este proceso garantiza tener una mejor eficiencia de extracción con solventes orgánicos. Se pesaron 25 g de material vegetal pulverizado el mismo que se lo vertió y selló en papel absorbente para realizar el siguiente paso que es la preparación de los extractos metanólicos de las especies vegetales descrito mas adelante.

Cabe recalcar que si las plantas secas son almacenadas debidamente para diferentes tipos de estudio su vida útil se extenderá enormemente. Existen dos enemigos principales para la preservación efectiva de las hierbas que son la luz y el oxígeno, por

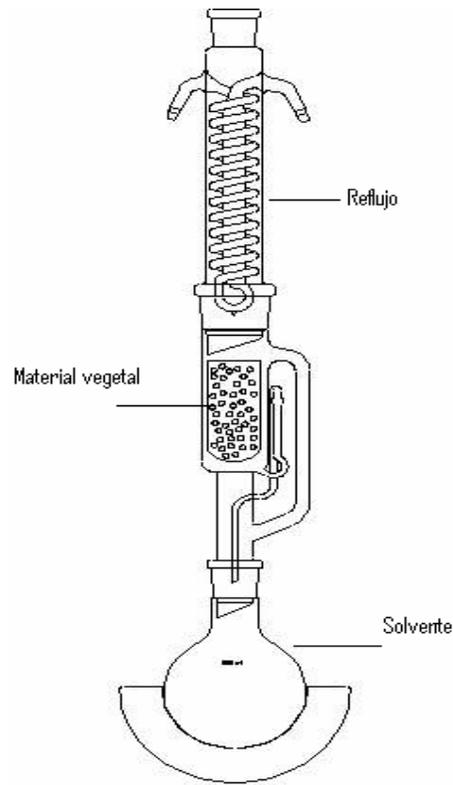
lo que, las hierbas secas tienen que ser almacenadas en un lugar oscuro, frío y seco, ya que el calor destruye ciertas virtudes de la planta. La hierba seca pierde su efectividad después de más o menos un año de almacenamiento (APIC, 1999)

2.2.2.2 Preparación de extractos metanólicos de las especies vegetales

Los extractos metanólicos de las especies en estudio se prepararon utilizando un sistema de reflujo en equipo Soxhlet. En este equipo se colocaron las muestras en papel filtro, para obtener la evaporación del solvente a presión reducida. Este proceso de evaporación-condensación-reflujo tiene que realizarse hasta que el líquido que se recoge en el balón alimentador tenga una coloración verde intenso y el líquido condensado una tonalidad verde transparente, lo que indica que los elementos extraíbles están en el balón.

El extracto obtenido fue concentrado en un rotavapor, a una temperatura aproximada entre 65-70° C, a 125 rpm; bajo estas condiciones de trabajo, el extracto no se desnaturaliza, siendo además la temperatura de ebullición del solvente. Los extractos obtenidos fueron trasvasados en frascos de vidrio ámbar debido a que son fotosensibles.

Fig. 2.1 Esquema de equipo soxhlet usado para la extracción de aceites esenciales



(Cazar, 2006)

El metanol es un solvente de elevada polaridad, lo cual, unido al proceso de extracción, garantiza la extracción exhaustiva de los principios activos vegetales. Este método es utilizado ampliamente en investigaciones similares, orientadas a la extracción, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios (Wang y Lin, 2000).

Una vez trasvasados los extractos fueron colocados de nuevo en la estufa a 45°C durante 48 horas para llegar a un peso constante. Los extractos se mantienen en condiciones de temperatura de 4°C y protegidos de la luz solar.

2.2.2.2.1 Preparación de la solución madre

Se preparó una solución de concentración 20 000 µg/mL de la muestra, disuelta en metanol. Para lo cual se realizó el siguiente procedimiento:

- a. Se pesaron aproximadamente 20 mg de extracto que se colocó en tubos Eppendorf.
- b. Se adicionó 1 mL de metanol, agitando en vortex hasta obtener una mezcla uniforme.
- c. Las soluciones madre se almacenaron en condiciones de refrigeración hasta su uso.

2.2.2.3 Puesta a punto del ensayo para determinación de actividad antioxidante

2.2.2.3.1 Actividad atrapadora de radicales libres

Los diferentes extractos vegetales fueron evaluados en su capacidad de donar iones hidronio (H^+) o habilidad atrapadora de radicales libres usando al radical libre estable DPPH método propuesto por Blois en 1958 (Molineus. 2004).

Para el efecto se preparó un gradiente de concentración de soluciones (250, 100, 50 y 25 µg/mL), a partir de una solución madre del extracto crudo (1000µg/mL). Para preparar estas soluciones se aplicó la fórmula de $V_1C_1 = V_2C_2$, donde V=volumen y C=concentración. El resultado obtenido fue transformado en µL.

Para el desarrollo de la reacción de captura de radicales libres, se tomó 1 mL de cada solución preparada en gradiente de concentración, fue mezclado con 2 mL del reactivo DPPH en solución metanólica (20mg/L). La mezcla de reacción fue mantenida en oscuridad por 30 minutos para permitir el desarrollo de la reacción. Al mismo tiempo fue incubado un tubo con DPPH (control de reacción) y como blanco se utilizó metanol.

Transcurrido este período se registró la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer doble haz ($\lambda = 517$ nm), empleando dos celdas de cuarzo, una para el blanco (metanol) y otra para la muestra, la lectura final se obtuvo de un promedio de tres mediciones por cada concentración (150 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$).

El porcentaje de decoloración fue estimado estableciendo una comparación con el control de reacción, y expresando el resultado como porcentaje de decoloración (Parejo et al. 2003).

2.2.2.3.1 .1 Cálculo para obtención del IC_{50}

El IC_{50} es la concentración de extracto responsable de la captura del 50% de los radicales libres, en las condiciones del ensayo. Esta concentración permite expresar la actividad antioxidante de los extractos en estudio. Mientras menor sea la IC_{50} , mayor es el potencial del extracto como antioxidante (Cazar, 2006).

Para la obtención del IC_{50} se realizó el siguiente cálculo

$$\text{IC}_{50} = (50 - b) / m$$

Donde: **b**= intercepto **m**= pendiente

El intercepto y la pendiente se obtienen de la relación lineal entre las concentraciones de extracto y los porcentajes de captura de radicales libres.

2.2.2.4 Cuantificación de fenoles

El contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos en estudio fue determinando de acuerdo al método de Folin Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi, en 1965. Para este ensayo se prepararon soluciones de trabajo de los extractos a evaluar (250 g/mL), a partir de una solución madre.

La mezcla de reacción fue preparada en tubos de ensayo de vidrio, se colocaron 1 mL de solución saturada de Carbonato de Sodio, 500 μ L de la solución de trabajo del extracto a evaluar, 8 mL de agua destilada y 0.5 mL del reactivo de Folin Ciocalteu. Después de un período de incubación de 30 minutos, la absorbancia de las soluciones fue registrada en el espectrofotómetro Perkin Elmer AA a una λ de 725 nm empleando dos celdas de cuarzo, una para el blanco (metanol) y otra para la muestra. Se realizó en paralelo una reacción en las mismas condiciones con una solución estándar de ácido gálico (250 μ g/mL) (Känkönen *et al*, 1999).

2.2.2.5 Análisis estadístico de datos

Las lecturas espectrofotométricas obtenidas de los ensayos fueron procesadas en base a fórmulas para expresar los resultados en las escalas establecidas (ver 2.2.2.3 y 2.2.2.4). Se realizaron promedios y desviaciones estándar para los datos obtenidos. La precisión de los métodos se evaluó en función de la desviación de las lecturas. La comparación de la actividad antioxidante de los extractos frente a la sustancia de referencia (ácido gálico) fue evaluada mediante una prueba de comparación de medias.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2 Resultados

3.1.1 Rendimiento de extractos vegetales

Las plantas seleccionadas fueron procesadas de acuerdo a lo descrito en Metodología (ver pag 22 -23). En dependencia del material vegetal, se prepararon extractos de hojas y flores. El rendimiento de extracción fue calculado como la relación entre el peso de extracto obtenido con el del material de partida y expresado en porcentaje. La siguiente tabla resume los resultados de este trabajo.

Cuadro 3.1 Especies vegetales seleccionadas para el estudio de actividad antioxidante, rendimiento de obtención de extractos metanólicos por método Soxhlet

Especie	Parte procesada	Peso 1 (Material vegetal seco)	Peso 2 (Extracto)	Rendimiento % (P2/P1)*100
Asteraceae <i>Barnadesia arborea</i> Kunt	flor	30 g	3,12g	10,40%
Asteraceae <i>Barnadesia arborea</i> Kunt	hoja	30 g	7,22	24,06%
Asteraceae <i>Bidens andicola</i>	flor	30 g	11,17g	37,23%
Asteraceae <i>Bidens andicola</i>	hoja	35 g	7,98g	22,80%
Asteraceae <i>Chuquiragua jussieui</i> J.F.Gmel	flor	35 g	3,55g	10,14%
Asteraceae <i>Chuquiragua jussieui</i> J.F.Gmel	hoja	30 g	6,9g	23,00%
Hypericaceae <i>Hypericum sp</i>	flor	24 g	5,52g	22,99%
Hypericaceae <i>Hypericum sp</i>	hoja	35 g	7,43g	21,22%
Lamiaceae	flor	20.49g	7,97g	38,89%
Lamiaceae	hoja	35 g	9,08	25,94%
Febaceae <i>Vicia cf andicola</i>	hoja	35 g	8,57g	24,48%
Fabaceae <i>Vicia cf andicola</i>	vaina	26,55	1,17g	4,40%
Onagraceae <i>Fuchsia sp</i>	flor	21.7 g	7,74g	35,61%
Onagraceae <i>Fuchsia sp</i>	hoja	35 g	8,45g	24,14%
Piperaceae <i>Piper andreanum</i> C.Dc	hoja	30 g	1,91g	6,36%
Solanaceae <i>Cestrum sp</i>	hoja	35 g	6,11g	17,45%
Valerianaceae <i>Valeriana tomentosa</i>	hoja	30 g	15,35g	51,16%

3.1.2 Actividad atrapadora de radicales libres

El ensayo de captura del radical libre estable DPPH fue realizado conforme a lo descrito en la sección Metodología. Los resultados de absorbancia, en función al gradiente de concentración preparado para cada extracto se encuentran en el Anexo 2. Estos datos fueron comparados con la lectura del blanco para determinar la relación existente entre la absorbancia y la concentración a la cual fueron probados los extractos. De los extractos que presentaron una buena correlación lineal se obtuvo una ecuación de regresión, de la cual se pudo calcular la concentración a la cual se captura el 50% del radical libre DPPH (IC_{50}).

Cuadro 3.2 Resultados de la actividad atrapadora de radicales libre

Especie	Parte procesada	IC₅₀ (mg/mL)
Asteraceae <i>Barnadesia arborea</i> Kunt	flor	N/A
Asteraceae <i>Barnadesia arborea</i> Kunt	hoja	N/A
Asteraceae <i>Bidens andicola</i> Kunt	flor	N/A
Asteraceae <i>Bidens andicola</i> Kunt	hoja	N/A
Asteraceae <i>Chuquiragua jussieui</i> J.F.Gmel	flor	N/A
Asteraceae <i>Chuquiragua jussieui</i> J.F.Gmel	hoja	N/A
Hypericaceae <i>Hypericum sp</i>	flor	N/A
Hypericaceae <i>Hypericum sp</i>	hoja	N/A
Lamiaceae	flor	N/A
Lamiaceae	hoja	N/A
Fabaceae <i>Vicia cf andicola</i>	hoja	N/A
Fabaceae <i>Vicia cf andicola</i>	vaina	31,16
Onagraceae <i>Fuchsia sp</i>	flor	10,07
Onagraceae <i>Fuchsia sp</i>	hoja	85,01
Piperaceae <i>Piper andreanum</i> C.Dc	hoja	84.38
Solanaceae <i>Cestrum sp</i>	hoja	N/A
Valerianaceae <i>Valeriana tomentosa</i> Kunt	hoja	N/A

N/A: No Activo.

3.1.3 Cuantificación de Fenoles por el método de Folin Ciocalteu

A continuación se reporta el contenido de fenoles de los extractos estudiados, expresados como miliequivalentes de ácido gálico. Estos resultados se calcularon en base al promedio de tres determinaciones.

Cuadro 3.3 Determinación del contenido de flavonoides por el método de Folin Ciocalteu

Especie	Parte procesada	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Meq de Acido Gálico /mL
Asteraceae Barnadesia arborea Kunt	flor	0,007	0,002	0,03
Asteraceae Barnadesia arborea Kunt	hoja	0,008	0,003	0,05
Asteraceae Bidens andicola Kunt	hoja	0,005	0,001	0,02
Asteraceae Bidens andicola Kunt	flor	0,008	0,004	0,06
Asteraceae Chuquiragua jussieui J.F.Gmel	hoja	0,003	0,000	0,00
Asteraceae Chuquiragua jussieui J.F.Gmel	flor	0,004	0,000	0,00
Lamiaceae	flor	0,016	0,011	0,18
Lamiaceae	hoja	0,012	0,008	0,13
Fabaceae Vicia cf andicola	hoja	0,012	0,007	0,11
Fabaceae Vicia cf andicola	vaina	0,007	0,003	0,05
Hypericaceae Hypericum sp	hoja	0,014	0,009	0,15
Hypericaceae Hypericum sp	flor	0,006	0,002	0,03
Onagraceae Fuchsia sp	hoja	0,016	0,012	0,19
Onagraceae Fuchsia sp	flor	0,037	0,032	0,52
Piperaceae Piper andreanum C.Dc	hoja	0,006	0,002	0,03
Solanaceae Cestrum sp	hoja	0,004	0,000	0,00
Valerianaceae Valeriana tomentosa Kunt	hoja	0,005	0,001	0,02

3.3 DISCUSIÓN

3.3.1 Rendimiento de obtención de extractos

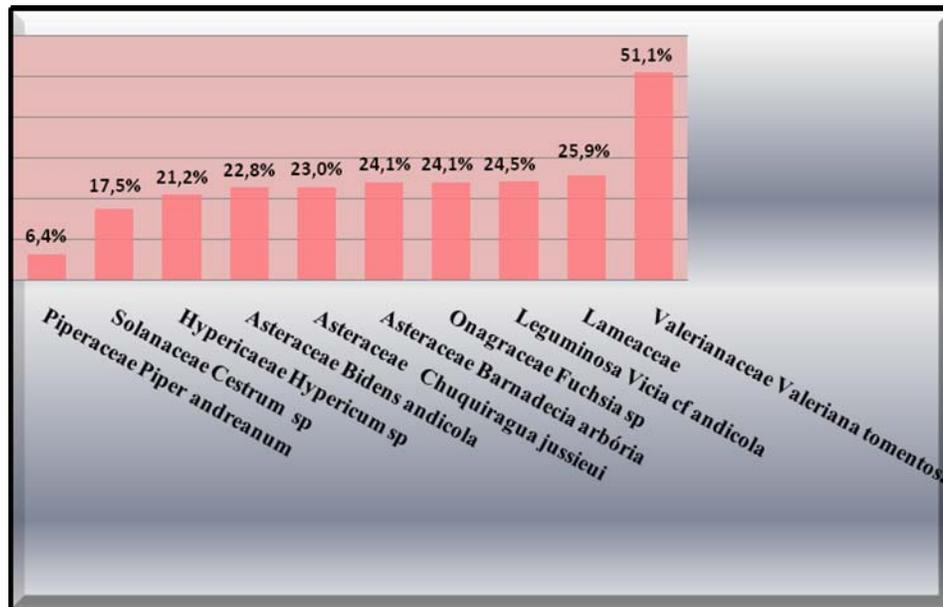
El gráfico 1 nos indica el rendimiento de la obtención de extractos con las flores de las especies vegetales estudiadas. Las especies con mejor rendimiento de extracción por el método Soxhlet fueron: Asteraceae *Bidens andicola* (37.23%) y Lamiaceae (38.89%). El rendimiento de obtención de extractos depende del método seleccionado para este fin y de la naturaleza de los compuestos que se obtienen en el mismo. También se consideran factores influyentes la naturaleza y la edad de los tejidos vegetales utilizado.

Gráfico 3.1 Rendimiento de Obtención de Extracción a partir de Flores



En el gráfico No 3.2 se puede observar que en la utilización de las hojas de las plantas medicinales estudiadas en el proceso de obtención de extractos Valerianaceae *Valeriana tomentosa* Kunt presenta el mejor rendimiento de extracción (51.16%). Cabe mencionar que el extracto de la Leguminosa *Vicia cf andicola* fue preparado a partir de las vainas y las hojas. Estos resultados nos indican que las especies vegetales estudiadas con un buen rendimiento de extracción requieren una baja cantidad de material vegetal de partida para obtener un extracto orgánico adecuado para estudios de bioactividad.

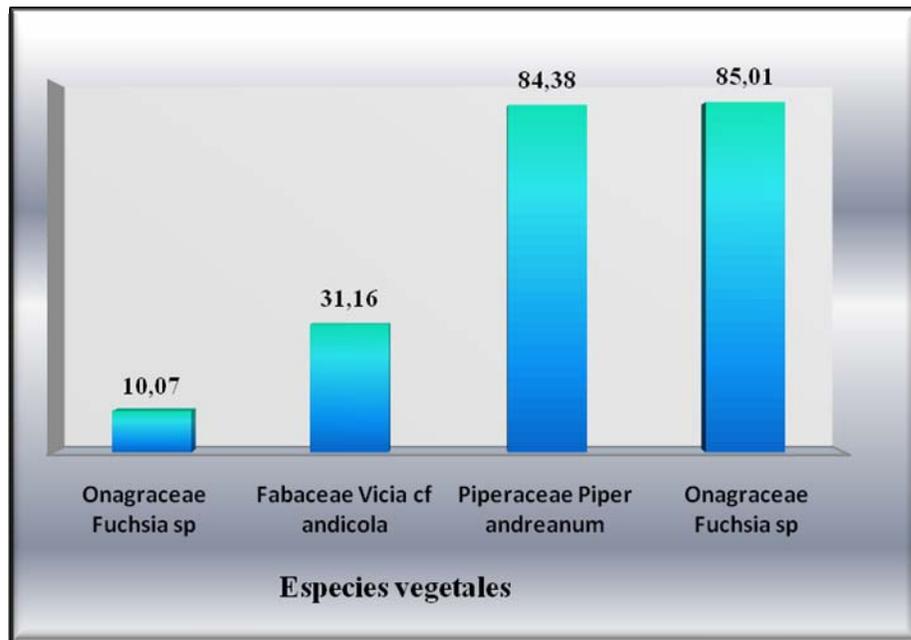
Grafico 3.2 Rendimiento de Obtención de Extractos a partir de Hojas



3.2.2 Actividad antioxidante. Determinación de IC₅₀ para extractos vegetales

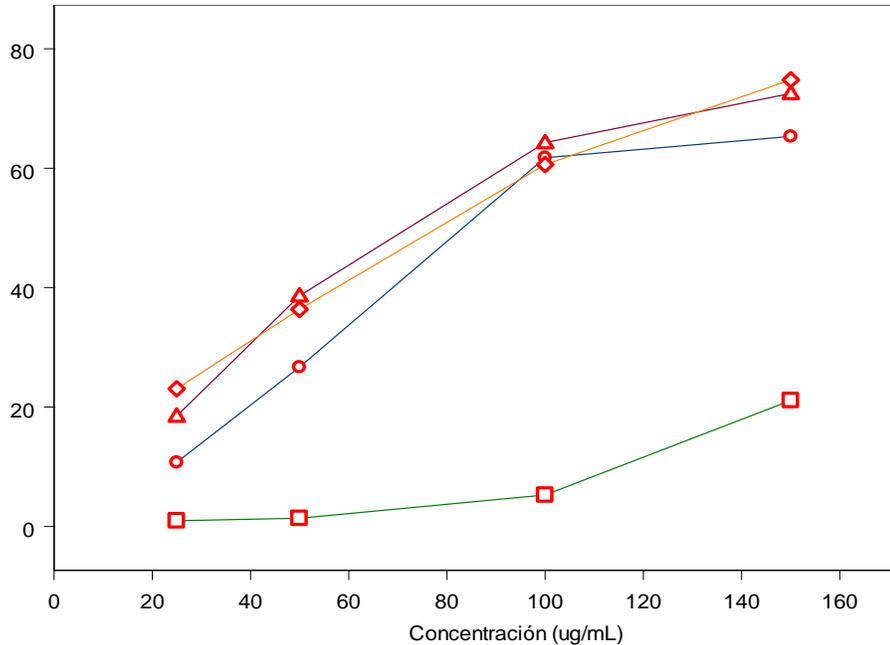
El análisis de los resultados obtenidos a partir de los bioensayos desarrollados nos permiten señalar a los extractos de Onagraceae *Fuchsia sp* (Flor), y *Vicia cf andicola* (Vaina) como los más promisorios en actividad antioxidante, con IC₅₀ de 10.07 y 31.16 µg/mL, respectivamente. Los extractos preparados a partir de las hojas de Piperaceae *Piper andreanum* C.Dc y Onagraceae *Fuchsia sp* presentaron IC₅₀ moderadas (84.38 y 85.01 µg/mL).

Gráfico 3.3 Actividad atrapadora de Radicales Libres.



A continuación se puede observar un cuadro donde se distingue los diferentes niveles de IC_{50} encontrados en donde especifica que solo cuatro de las diez especies vegetales estudiadas contienen un IC_{50} significativo.

Gráfico3.4: Relación de la concentración de los extractos bioactivos y el porcentaje de captura de radicales libres, determinado por el método DPPH. La interpolación al 50% de actividad determina la IC_{50} . □ Fabaceae *Vicia cf andicola*(vaina)○ :Onagraceae *Fuchsia sp* (flor)◇ Onagraceae *Fuchsia sp* (hoja); △: Piperaceae *piper andreanum* (hoja).



3.2.2 Cuantificación de Flavonoides por el método de Folin Ciocalteu

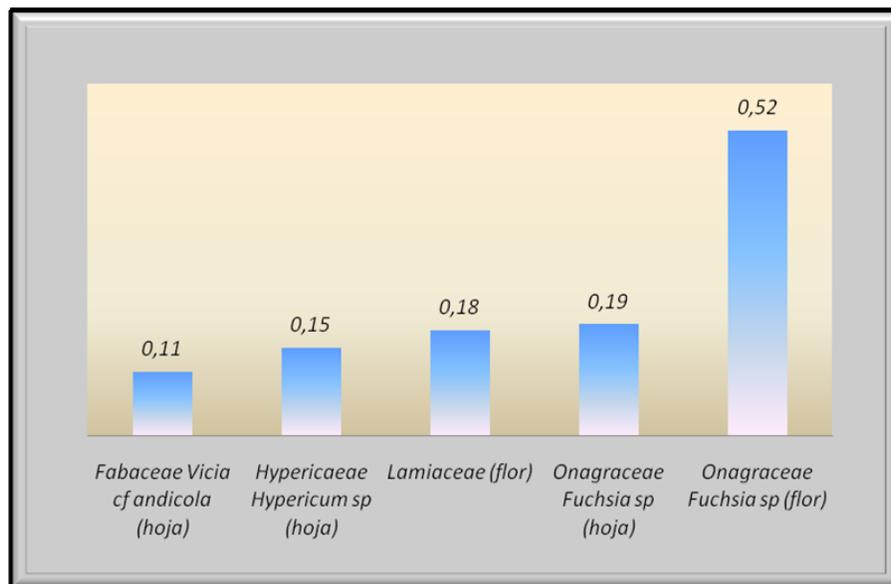
Como se puede observar en el gráfico 5, la especie Onagracea *Fuchsia sp* tanto en flores 0.52 meq Ac. Gálico/mL y hojas 0.19 meq Ac. Gálico/mL presenta un valor representativo de flavonoides, seguido por Lamiaceae (flor) 0.18 meq Ac. Gálico/mL, Hypericaceae *Hypericum sp* (hoja) con 0.15 meq Ac. Gálico/mL y Fabaceae *Vicia cf andicola* (hojas) con un valor de 0.11 meq Ac. Gálico/mL.

Los resultados obtenidos nos muestran claramente que la *pena pena* (Onagracea *Fuchsia sp*) es una especie vegetal con un gran potencial de contenido de flavonoides, esto se puede deber a que esta planta posee un color llamativo, o porque dicha especie

fabrica algún tipo de atrayente para los polinizadores naturales de ésta, ya que los flavonoides son los responsables de la producción de color, mecanismos

de defensa, etc. Es conocido que los compuestos responsables del color de los tejidos vegetales tienen estructuras que pertenecen a la familia de los flavonoides (Buchanan, 2000).

Gráfico 3.5 Cuantificación de fenoles por el método de Folín Ciocalteau (Meq de Ac. Gálico/mL)



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ♠ Los radicales libres circulan por el organismo humano y tienen acceso a todos los órganos y tejidos por lo que constituyen un peligro potencial. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas oxidándose al neutralizar un radical libre, requiriéndose una continua reposición a través de los nutrientes.

- ♠ Onagraceae *Fuchsia sp* (Flor), y *Vicia cf andicola* (Vaina) son las especies vegetales que, según los resultados obtenidos en este estudio, presentan la mayor actividad antioxidante, en función de su capacidad antioxidante expresada como IC₅₀ y el contenido de compuestos fenólicos determinado.

- ♠ Los resultados obtenidos con Onagraceae *Fuchsia sp* (Flor) se relaciona con el uso medicinal que le dan las personas que viven el Aguarongo o cerca de el, ya que ellos utilizan esta planta como calmante del sistema nervioso por lo tanto dichos resultados valora este conocimiento pues, según los estudios realizados por otros autores (Parejo et al., 2003) los antioxidantes previenen problemas neurodegenerativos.

- ♠ El contenido de compuestos fenólicos de las especies promisorias Onagracea *Fuchsia sp* Fabaceae *Vicia cf andicola* oscila entre 0.11 y 0.52 meq AG/mL, En base a estos resultados se recomienda realizar estudios de identificación de los fenoles mayoritarios y relación con la actividad biológica determinada en el extracto.

- ♣ Las especies promisorias identificadas en este estudio pueden ser estudiadas en función a estrategias de propagación que permitan disponer de material vegetal suficiente para nuevos estudios sin agotar las especies actualmente existentes.
- ♣ En el presente estudio se utilizaron extractos orgánicos totales, los cuales son mezclas complejas de compuestos provenientes del metabolismo vegetal. Se recomienda realizar nuevos estudios en los cuales se realice el fraccionamiento bioguiado de estos extractos usando métodos cromatográficos con el fin de aproximarse a la probable naturaleza química de los compuestos antioxidantes.
- ♣ Se reportan en literatura varios métodos para evaluar la actividad antioxidante “in Vitro. Además del DPPH, existen metodologías que evalúan la captura de otros radicales libres en sistemas hidrofílicos y lipofílicos o la inhibición de oxidación en compuestos con gran número de dobles enlaces, como el β -caroteno. Se recomienda el uso de estas estrategias para validar la actividad antioxidante de los extractos estudiados.
- ♣ Si bien los valores reportados para las especies vegetales estudiadas son promisorios en cuanto a su actividad antioxidante es necesario complementar este tipo de estudio *in vitro* con estudios más específicos a nivel de líneas celulares o en sistemas *in vivo* en donde se evalúe el efecto benéfico que se puede lograr en la salud humana ya sea tras el consumo de estas especies o mediante aplicaciones médicas, estéticas, alimenticias, etc.
- ♣ El conocimiento tradicional tiene una ruptura generacional y no se valora el conocimiento de uso por lo que los jóvenes denominan a las plantas de malas hierbas que pueden ser de fácil eliminación se recomienda elaborar programas de difusión para la valoración del uso de las plantas medicinales a las nuevas generaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- APIC (1999). **Active Pharmaceutical Ingredients Committee**. Good Manufacturing Practices in Active Pharmaceutical Ingredients Development, Disponible en la World Wide Web: <http://apic.cefic.org/pub/5GMPDev9911.PDF>
- AGAPITO, T., Sung, I. 2005. **1100 Plantas Medicinales**. Tomo I. Editorial Isabel I.R.L. Perú. pp 1-3.
- BALLESTER, M., Honorem, V. 1996. **Antioxidantes, radicales libres y salud**. Un enfoque químico-orgánico-físico.
- BERK, Z. 1980. **Introducción a la Bioquímica de los Alimentos**. Editorial El Manual Moderno, S. A. México. pp 258- 263.
- BUCHANAN, B. 2000. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants** (American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD).
- BUHLER, D y Miranda, C., 2005. **Antioxidant activities of flavonoids**. Disponible en la World Wide Web : <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>.
- CAZAR, M.E. 2006. Curso teórico-práctico: **Aislamiento bioguiado de productos naturales**. Apuntes. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Biotecnología. Ecuador. pp 30.
- FUNDACIÓN ECOLÓGICA RIKCHARINA. (f. a199...). **Evaluación de Impactos Ambientales para la Creación del Centro de Gestión e Interpretación Ambiental Aguarongo**. pp 2.
- GOVINDARAJAN, R., 2004. **Antioxidant potential of Anogeissus latifolia**. Biol. Pharm. Bull. Mexico. pp 1266 – 1269.
- KAHKONEN, M., et al.1999. **Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds**. University of Helsinki. Finland. pp 3954-3962.

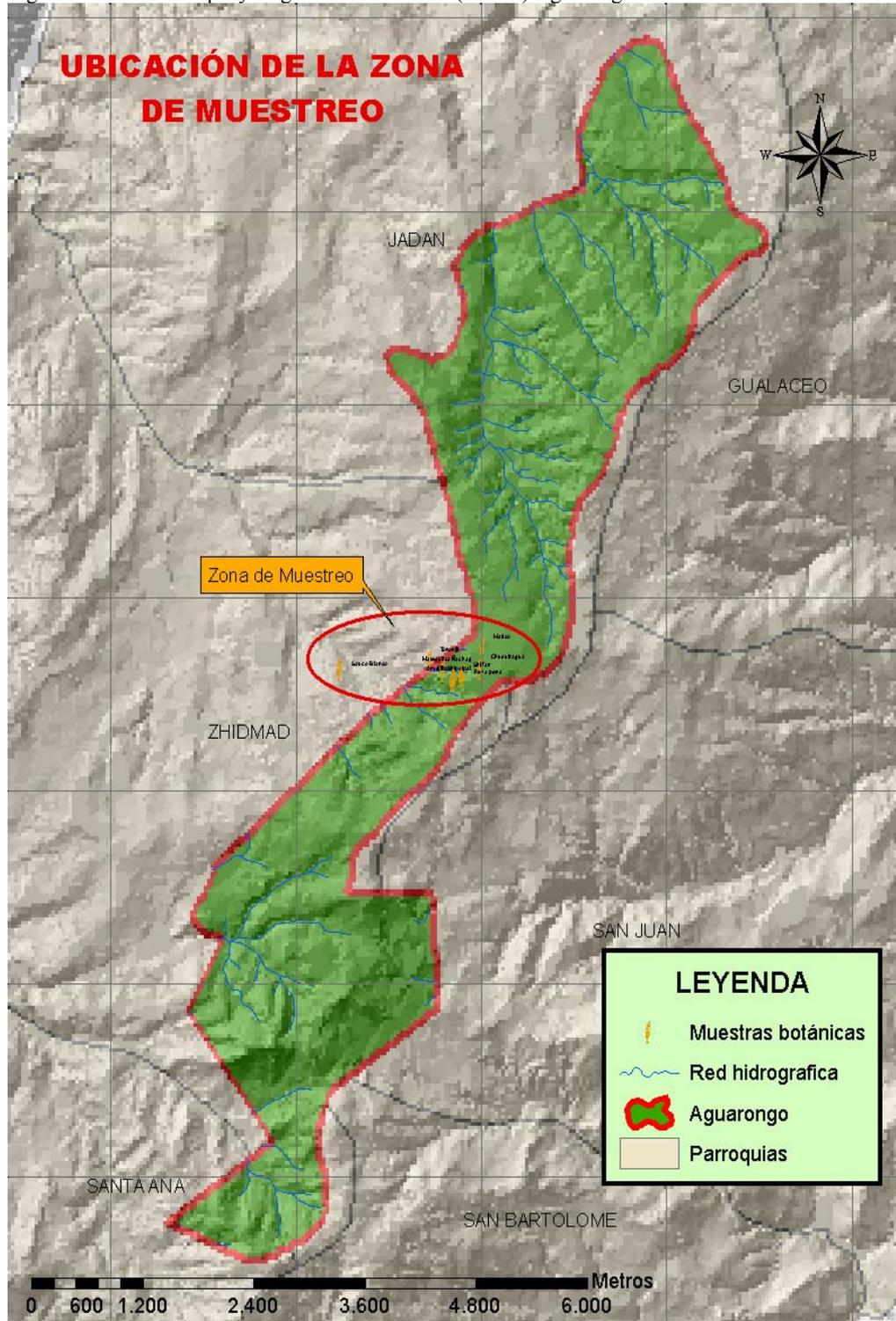
- LOOMIS, W., Wilson, C. 1968. **Botánica**. Primera Edición en Español. Editorial Hispano – Americana. México. 121pg.
- MENA. P. s.a. **Introducción al Estudio del Ambiente**. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Ciencias Ambientales. Ecuador. Pg. 32-33.
- NIJVELDT, R., Van Nood, E., VAN HOORN, D., BOELEN, P., VAN NORREN, K., VAN LEEWEN, P. 2001. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications**. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**, pp 418 – 425.
- ODEPLAN. 2002. **División Político Administrativa Parroquial del Ecuador**. Escala 1:250000, Fuente: ODEPLAN 2002, período 2000-2002, Universidad del Azuay. Cuenca, Ecuador.
- OKAWA, M., Kinjo, J., Nohara, T., Ono, M. (2001). **DPPH (1,1-Diphenil-2-Picrylhydrazyl) radical scavenging flavonoids obtained from some medicinal plants**. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **24** (10), pp 1202 – 1205.
- Organización Mundial de la Salud, OMS. 2003. 56^a. **Asamblea Mundial de la Salud. Punto 14.10 del Orden del Día provisional. A56/18. Medicina Tradicional**, informe de la Secretaría. Disponible en la World Wide Web :http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA56/sa5618.pdf.
- PAREJO, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, A., Jiménez, A., Codina, C. 2003. **Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity**. *Life Sciences*, **73**, pp 1667 – 1681.
- REITTER RJ. 1995. Oxidative processes and antioxidative mechanisms. *FASEB J.* pp 9-33.
- RÍOS, M., Pedersen, H. 1997. **Uso y Manejo de los Recursos Vegetales**. Edición Abya – Yala. Ecuador. pp 6-14-15.

- ROBINSON, E., Maxwell, S, 1997. **An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminiscence.** *Free Radical Research* 26, pp. 291 – 302.
- SAURA, C., Goñi, I. 2005. **Alimentos funcionales: fibra dietética y antioxidantes de la dieta española.** *Alimentación, Nutrición y Salud.* 14 (4), pp 132 – 149.
- THOMAS JA. 1994. **Oxidative stress, oxidant defense and dietary constituents.** *Modern nutrition in health and disease.* Octava Edición. Willians and Wilkins; Philadelphi. pp501-512.
- TORSELL, K. 1997. **Natural Product Chemistry. A mechanistic, biosynthetic and ecological approach.** Apotekarsocieteten, Suecia. pp 480.
- VALENCIA, R., Pitman, N., León-Yáñez, S., Jørgensen, P.M.2000. **Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador.** Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- VELÁSQUEZ, M., Prieto, B., Contreras, R. 2004. **El Envejecimiento y los Radicales Libres.** México. pp 36-43.
- YILDIRIM, A., Oktay, M. 2000. **The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*.** *Turk. J. Med. Sci,* 31, pp. 23 – 28.
- WANG, S., Lin, H. 2000. **Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry fruits with cultivar and development stage.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 48, pp. 140 – 146.
- SANTOS, C.2001. **Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta.** *Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia.* Campus Miguel de Unamuno. pp 20-26.
- MOLYNEUX,P. 2004 **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.** pp 211-219.

ANEXOS

Anexo 1 Mapa de la zona de muestreo

Figura 1. Área de Bosque y Vegetación Protectora (ABVP) Aguarongo



División Político Administrativa Parroquial del Ecuador. Escala 1:250000

Anexo 2. Medidas de absorbancia de los extractos vegetales con actividad antioxidante

shiñan flor	Asteraceae <i>Barnadecia arborea</i> Kunt	150 ug/ml	0,229
		100 ug/ml	0,242
		50 ug/ml	0,246
		25 ug/ml	0,251
shiñan hoja	Asteraceae <i>Barnadecia aroborea</i> Kunt	150 ug/ml	0,096
		100 ug/ml	0,128
		50 ug/ml	0,157
		25 ug/ml	0,179
ñachag flor	Asteraceae <i>bidens andicola</i> Kunt	150 ug/ml	0,14
		100 ug/ml	0,168
		50 ug/ml	0,25
		25 ug/ml	0,178
ñachag hoja	Asteraceae <i>bidens andicola</i> Kunt	150 ug/ml	0,162
		100 ug/ml	0,161
		50 ug/ml	0,242
		25 ug/ml	0,249
chuquiragua flor	Asteraceae <i>Chuquiragua jussieui</i> J.F.Gmel	150 ug/ml	0,232
		100 ug/ml	0,241
		50 ug/ml	0,247
		25 ug/ml	0,255
chuquiragua hoja	Asteraceae <i>Chuquiragua jussieui</i> J.F.Gmel	150 ug/ml	0,193
		100 ug/ml	0,191
		50 ug/ml	0,192
		25 ug/ml	0,192
matequilca flor	Hypericaceae <i>Hypericum sp</i>	150 ug/ml	0,179
		100 ug/ml	0,205
		50 ug/ml	0,234
		25 ug/ml	0,222
matequilca hoja	Hypericaceae <i>Hypericum sp</i>	150 ug/ml	0,092
		100 ug/ml	0,153
		50 ug/ml	0,201
		25 ug/ml	0,23
toronjil flor	Lameaceae	150 ug/ml	0,113
		100 ug/ml	0,103
		50 ug/ml	0,175
		25 ug/ml	0,189
toronjil hoja	Lameaceae	150 ug/ml	0,123
		100 ug/ml	0,151
		50 ug/ml	0,168
		25 ug/ml	0,185
arvejila	Fabaceae <i>Vicia cf andicola</i>	150 ug/ml	0,196
		100 ug/ml	0,192
		50 ug/ml	0,137
		25 ug/ml	0,197
arvejilla vaina	Fabaceae <i>vicia cf andicola</i>	150 ug/ml	0,376

		100 ug/ml	0.482
		50 ug/ml	0.492
		25 ug/ml	0.509
pena pena flor	<i>Onagraceae fuchsia sp</i>	150 ug/ml	0.490
		100 ug/ml	0.503
		50 ug/ml	0.485
		25 ug/ml	0.493
pena pena hoja	<i>Onagraceae fuchsia sp</i>	150 ug/ml	0,06
		100 ug/ml	0,078
		50 ug/ml	0,134
		25 ug/ml	0,178
matico hoja	<i>Piperaceae Piper andreanum C.Dc</i>	150 ug/ml	0,055
		100 ug/ml	0,086
		50 ug/ml	0,139
		25 ug/ml	0,168
sauco blanco hoja	<i>Solanaceae Cestrum sp</i>	150 ug/ml	0,181
		100 ug/ml	0,182
		50 ug/ml	0,2
		25 ug/ml	0,2
shipalpal hoja	<i>Valerianaceae valeriana tomentosa Kunt</i>	150 ug/ml	0,212
		100 ug/ml	0,208
		50 ug/ml	0,206
		25 ug/ml	0,211

Anexo 3. Colecciones botánicas

Figura 1. Asteraceae *Barnadecia arborea* Kunt



Figura 2. Asteraceae *Bidens andicola* Kunt



Figura 3. Asteraceae *Chuquiragua jussieui* J.F.Gmel



Figura 4 . Hypericaceae *Hypericum* sp



Figura 5. Lameaceae



Figura 6. Fabaceae *Vicia cf andicola*



Figura 7 . Onagraceae *Fuchsia sp*



Figura 8. Piperaceae *Piper andreanum* C.Dc



Figura 9. Solanaceae *Cestrum* sp



Figura 10. Valerianaceae *Valeriana tomentosa* Kunt



Anexo 4. Recolección de las especies en estudio

Figura 11 recolección del material vegetal



Anexo 5. Trabajo de Laboratorio

Figura 12. Peso de las Muestras



Figura 13. Muestras pulverizadas



Figura 14. Estufa para el secado de las muestras



Figura 15 Evaporador rotatorio



Figura 16 Equipo Soxhelt



Figura. 17 Preparación de los extractos metanólicos



Figura. 18 Extractos vegetales



Figura 19. Preparación de soluciones madre



Figura 20. Soluciones Madre de los Extractos

