



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

“Potencial antioxidante y caracterización de ADN de plantas nativas ecuatorianas: Mortiño (*Vaccinium floribundum* K.), Ataco (*Amaranthus caudatus* L.) y Maíz morado, (*Zea mays*)”.

Trabajo de Graduación previo a la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos.

AUTOR

Faicán Benenaula María Auxiliadora

DIRECTOR

Dra. María Elena Cazar Ramírez

Cuenca - Ecuador

2009

Dedicatoria:

Para aquellos que aman, el tiempo es eterno.... Con mucho cariño, para la persona que siempre nos dio su amor sin condición y nos dejó como legado la unidad.

Para mi querida Mamá Teresa.

Agradecimiento

“En la bondad se encierran todos los géneros de sabiduría”. Es por ello que quiero agradecer a la Doctora María Elena Cazar por todos los conocimientos compartidos, por ser un soporte fundamental en la ejecución de este trabajo y por su amistad.

A mis Padres ya que el esfuerzo realizado por ellos diariamente me ha permitido alcanzar una de mis metas; siempre serán un ejemplo de constancia y voluntad en mi vida.

Al Doctor Piercosimo Tripaldi y la Ingeniera Aída Cazar por su contribución en el desarrollo de la investigación.

A Juan Diego, por ser una persona muy especial que de una u otra forma ha sido un apoyo.

A Ximena, Linda y Diego por los momentos compartidos durante la realización de este trabajo.

“POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y CARACTERIZACIÓN DE ADN DE PLANTAS NATIVAS ECUATORIANAS: MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* K.), ATACO (*Amaranthus caudatus* L.) Y MAÍZ MORADO, (*Zea mays*)”.

RESUMEN

En el presente trabajo, las especies vegetales: *Amaranthus caudatus* (ataco), *Vaccinium floribundum* (mortiño), y dos ecotipos de maíz morado *Zea mays*, fueron evaluados en su potencial antioxidante, con el fin de relacionar esta bioactividad con el perfil de ADN de estas especies nativas.

La capacidad antioxidante fue determinada por dos métodos: capacidad de captura del radical libre DPPH y actividad atrapadora del radical superóxido. Este trabajo experimental permitió señalar a *Z. mays* ecotipo 1 y *V. floribundum* como las especies más promisorias. El estudio comparativo del perfil de ADN de estas especies permitió identificar isomorfismos, siendo estos resultados preliminares para estudios posteriores enfocados a establecer regiones de ADN específicamente relacionadas con la actividad antioxidante de especies vegetales.

**“ANTIOXIDANT CAPACITY AND DNA CHARACTERIZATION FROM NATIVE
ECUADORIAN PLANTS: MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* K.), ATACO
(*Amaranthus caudatus* L.) AND PURPLE CORN,(*Zea mays*)”.**

ABSTRACT

In the present work, *Amaranthus caudatus* (ataco), *Vaccinium floribundum* (mortiño), and two ecotypes of purple corn, *Zea mays*, were tested as potential antioxidant, with the aim of relate this bioactivity with the DNA profile of the native species studied.

The antioxidant capacity was determined by two methods: scavenge of the free radical DPPH and capture of radical superoxide. The results showed *Z. mays* ecotype 1 and *V. floribundum* as the most active species. The comparison of the AND profile of the studied species evidenced isomorphic regions. These preliminary results may relate specific DNA regions with the antioxidant activity showed by this species.

INDICE

Contenido	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
ANTIOXIDANTES	3
1.1. Generalidades.....	3
1.2. Mecanismos de actividad.....	4
1.3. Rol de los antioxidantes como nutracéuticos.....	6
1.4. Compuestos Antioxidantes: Estructura y Propiedades.....	10
CAPITULO II	
VARIABILIDAD GENÉTICA EN ESPECIES VEGETALES: RELACIÓN CON SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA	17
2.1. ADN vegetal: estructura y rol a nivel celular y molecular.....	17
2.2. Isomorfismos y polimorfismos.....	19
2.2.1. Polimorfismos.....	19
2.2.2. Isomorfismos.....	21
2.3. Estudios basados en regiones polimórficas de ADN, relacionadas con la producción de metabolitos secundarios vegetales.....	22

CAPITULO III**ESPECIES VEGETALES**

SELECCIONADAS	24
3.1. ATACO (<i>Amaranthus caudatus</i>).....	24
3.1.1. Descripción botánica.....	24
3.1.2. Composición.....	25
3.1.3. Propiedades.....	26
3.2 MAÍZ MORADO (<i>Zea mays</i>).....	27
3.2.1 Descripción botánica.....	27
3.2.2 Composición.....	28
3.2.3 Propiedades.....	28
3.3 MORTIÑO (<i>Vaccinium floribundum</i>).....	29
3.3.1 Descripción botánica.....	29
3.3.2 Composición.....	31
3.3.3 Propiedades.....	31

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 Preparación de material vegetal.....	32
4.2 Obtención de extractos.....	32
4.2.1 Método de Soxhlet.....	33
4.2.2. Método de maceración.....	35
4.3 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteau.....	37
4.4 Evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH.....	39
4.5 Evaluación de la actividad atrapadora del radical superóxido.....	40
4.6 Establecimiento del perfil de ADN de las plantas en estudio, y comparación de la diversidad del perfil de ADN del maíz morado con dos especies de maíz comercializadas en mercados locales.....	45

RESULTADOS	51
5.1. Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH.....	51
5.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu.....	52
5.2.1. Curva de calibración del ácido gálico como sustancia de referencia.....	52
5.2.3 Determinación de actividad antioxidante por método del anión superóxido.....	54
5.3 Análisis de ADN vegetal por electroforesis.....	58
5.3.1 Extracción de ADN vegetal.....	58
5.3.2 Electroforesis de ADN vegetal.....	59
 CAPITULO VI	
DISCUSION	64
6.1. Evaluación de actividad antioxidante de extractos vegetales.....	64
6.2. Electroforesis de ADN vegetal.....	65
 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFIA	70
 ANEXOS	
Anexo N° 1: Equipos utilizados para la determinación de la actividad antioxidante.....	74
Anexo N° 2: Equipo utilizado para la electroforesis de ADN.....	74

Índice de Ilustraciones y Cuadros

Figura 1. Mecanismo de acción de los antioxidantes AO*, radical fenoxi; AOH, fenol.....	6
Figura 2. Estructuras de los ácidos fenólicos derivados de: (A) ácido benzoico (B) ácido cinámico, y (C) ácido clorogénico.....	13
Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.....	14
Figura 4. Estructura química de uno de los flavonoides más comúnmente hallados en la naturaleza, la quercetina.	14
Figura 5. Estructuras básicas de varias clases de flavonoides.....	15
Figura 6: Estructura tridimensional del ADN.....	18
Figura 7: Ataco (<i>Amaranthus Caudatus</i> L.).....	24.
Figura 8: Maíz Morado (<i>Zea mays</i>).....	27
Figura 9: Mortiño (<i>Vaccinium Foribundum</i> K.).....	29
Figura 10: Aparato de soxhlet, cargado con los cartuchos de maíz morado.....	33
Figura 11: Procedimiento para la obtención de extractos por el método de soxhlet.....	34
Figura 12: Maceración del Ataco.....	35
Figura 13: Obtención de extractos por el método de maceración.....	36
Figura 14: Extractos listos para la lectura en el espectrofotómetro luego de que se ha realizado la reacción correspondiente para el método.....	37
Figura 15: Soluciones de extracto y soluciones finales, con los reactivos correspondientes; listas para se leídas en el espectrofotómetro.....	41
Figura 16: Procedimiento para la extracción de ADN.....	46
Figura 17: Electroforesis de ADN vegetal N° 1.....	59
Figura 18: Electroforesis de ADN vegetal N° 2.....	60
Figura 19: Electroforesis de ADN vegetal N° 3.....	61
Figura 20: Electroforesis de ADN vegetal N° 4.....	62
Figura 21: Electroforesis de ADN vegetal N° 5.....	63
Cuadro 1: Tabla de composición química de los alimentos del ministerio de salud.....	26
Cuadro 2: Composición Nutricional de Maíz.....	28
Cuadro 3: Composición nutricional de Mortiño.	31

Cuadro 4: Actividad antioxidante determinada por el método DPPH.....	52
Cuadro 5: Curva de calibración del ácido gálico como sustancia de referencia.....	52
Cuadro 6: Cuantificación de fenoles totales.	53
Cuadro 7: Porcentaje de atrapamiento del anión superóxido de las especies en estudio.....	57
Cuadro 8: Valores de pureza del ADN obtenido de cada una de la especies en estudio.....	58
Cuadro 9: Especificaciones de la electroforesis N° 1.....	59
Cuadro 10: Especificaciones de la electroforesis N° 2.....	60
Cuadro 11: Especificaciones de la electroforesis N° 3.....	61
Cuadro 12: Especificaciones de la electroforesis N° 3.....	62
Cuadro 13: Especificaciones de la electroforesis N° 3.....	63
Gráfico 1: Tiempo vs. Absorbancia del maíz (ecotipo1).....	55
Gráfico 2: Tiempo vs. Absorbancia del maíz (ecotipo 2).....	55
Gráfico 3: Tiempo vs. Absorbancia del Mortiño.....	56
Gráfico 4: Tiempo vs. Absorbancia del Ataco.....	56

Faicán Benenaula María Auxiliadora
Trabajo de Graduación
Dra. María Elena Cazar Ramírez
Julio, 2009

“POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y CARACTERIZACIÓN DE ADN DE PLANTAS NATIVAS ECUATORIANAS: MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* K.), ATACO (*Amaranthus caudatus* L.) Y MAÍZ MORADO, (*Zea mays*)”.

INTRODUCCION

Tan sólo en América Latina, más de 2.5 millones de hectáreas se cultivan con métodos agrícolas tradicionales. Estos agroecosistemas constituyen los principales repositorios en sitio de germoplasma tanto de plantas cultivadas como de variedades silvestres. Se evidencia, además, que los países que albergan la mayor diversidad en especies de flora son también los que cuentan con mayores números de grupos étnicos. La presencia de tal diversidad genética, sobre todo en los centros de origen, ha sido de fundamental importancia para conservar y mejorar la productividad de los cultivos agrícolas en los países en desarrollo caracterizados por agroclimas variados y ambientes heterogéneos. Las variedades nativas de cultivo, de especies como maíces criollos o variedades tradicionales, son asimismo valoradas por los campesinos debido a los valores culturales que entrañan, por ejemplo, su simbolismo en ceremonias religiosas o su uso como retribución al trabajo comunitario. Al mismo tiempo, estas variedades tradicionales son sumamente importantes para la agricultura industrializada puesto que producen diferentes compuestos que pueden ser aprovechados por sus potenciales beneficios a la salud de los consumidores (Altieri, 1995).

En la sierra ecuatoriana se utilizan algunas variedades de maíz, junto con otras plantas, para la elaboración de alimentos tradicionales. Su cultivo se desarrolla desde épocas preincaicas, por lo cual prevalecen ecotipos que difieren de las variedades mejoradas. El estudio de la diversidad genética en función de patrones de ADN para el maíz morado, junto con la comparación de su perfil ante plantas que producen colorantes similares, como el ataco y mortiño, generará información sobre similaridad de regiones de ADN, responsables de la producción de

compuestos fenólicos, y diversidad en relación a la comparación del ADN del maíz morado con especies comerciales.

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en plantas comestibles y no comestibles; estos han sido reconocidos por poseer múltiples efectos biológicos, incluyendo la actividad antioxidante (Lima et.al., 2007)

La investigación propone evaluar el perfil de ADN y la capacidad antioxidante de plantas utilizadas en preparación de alimentos típicos ecuatorianos, las cuales son conocidas por la población en general: MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* K.), ATACO (*Amaranthus caudatus* L.) Y MAÍZ MORADO, (*Zea mays*). Estas plantas contienen antocianos, pigmentos flavonólicos que poseen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar átomos de hidrógeno o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos; de esta manera se brinda una buena alternativa a la industria alimentaria como aditivo alimentario con un efecto sobre la degradación de grasas a mas de brindar efectos útiles para el organismo.

CAPITULO I

ANTIOXIDANTES

1.1. Generalidades

Diversas reacciones bioquímicas en nuestro cuerpo generan especies reactivas de oxígeno, las cuales son capaces de dañar biomoléculas cruciales. Si estas especies no son captadas eficientemente por constituyentes celulares, pueden ocasionar enfermedades. Sin embargo, la acción nociva de los radicales libres puede ser bloqueada por sustancias antioxidantes, las cuales captan los radicales libres detoxificando el organismo. (Álvarez, *et.al.*, 2008)

Es por ello que hoy en día los consumidores se preocupan mucho más acerca de los alimentos que adquieren, buscando así aquellos que a más de poseer un buen valor nutricional, sean capaces de brindar un beneficio sobre su salud. De ahí que se ha dado una gran importancia a los alimentos que poseen una actividad antioxidante.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, siendo parte importante de la dieta tanto humana como animal; son un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad.

El interés en los compuestos fenólicos se debe a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas en la salud humana, tales como en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares,

neurodegenerativas, envejecimiento celular y otras patologías de carácter inflamatorio. En general los compuestos fenólicos poseen efectos fisiológicos en el cuerpo humano y el metabolismo (Martínez *et al.*, 2000).

Sin embargo además de brindar un efecto sobre la salud, los compuestos fenólicos son de gran utilidad dentro del procesamiento de alimentos ya que su capacidad antioxidante inhibe el deterioro oxidativo de alimentos lipídicos, los que a su vez afectan la calidad e inocuidad de un alimento; la ventaja de su uso es que son compuestos naturales y por lo tanto no representan un peligro sobre el consumidor a diferencia de otro tipo de aditivos sintéticos utilizados con la misma finalidad.

1.2. Mecanismos de actividad antioxidante

Los antioxidantes actúan disminuyendo la concentración de oxígeno, previniendo la reacción de iniciación por un radical hidroxilo, secuestrando metales y degradando los productos de oxidación primarios a compuestos estables.

Reacción de auto-oxidación

La producción en exceso de especies de radicales de oxígeno, particularmente radicales hidroxilo, pueden afectar a las membranas de las células lipídicas para producir peróxidos y especies de oxígeno reactivo, las cuales están asociadas a una variedad de enfermedades. (Maniak y Targonski, 1996)

La oxidación, es la reacción del oxígeno molecular con compuestos orgánicos bajo determinadas condiciones. En el mecanismo de oxidación de los lípidos existen 3 etapas:

Iniciación: El oxígeno existe en dos estados, en el estado más estable es el triplete ($3O_2$), el cual tiene 2 electrones sin aparear con el mismo sentido de espín; y el oxígeno singulete ($1O_2$) que es un estado excitado y más reactivo, con los electrones sin aparear con sentidos opuestos de espín.

Las moléculas de oxígeno en estado singulete oxidan directamente al grupo –CH del ácido graso insaturado (RH) a la vez que desplazan el doble enlace y forman un radical alquilo (R*). La velocidad de reacción de iniciación es lenta. El oxígeno en estado fundamental (triplete), no puede llevar a cabo esta reacción, sin embargo por efecto de la radiación (luz), se puede transformar en singulete.



Propagación: Los radicales alquilo (R*) formados en el paso de la iniciación son reactivos con el oxígeno disponible, formando radicales peroxilo (ROO*) a una velocidad alta (Ecuación 2). El radical peroxilo desaparece a una velocidad lenta formando un hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical libre puede propagar la reacción en cadena. (Ecuación 3)



Los hidroperóxidos (ROOH) también pueden descomponerse para producir alcoholes, aldehídos, ácidos, cetonas y otras sustancias menos reactivas.

Terminación: Cuando los ácidos grasos poliinsaturados (RH) son consumidos, los radicales tienden a dimerizarse y la reacción en cadena termina. La terminación completa un ciclo de autooxidación lipídica.

Mecanismo

Mediante la adición de antioxidantes se controla la oxidación de los lípidos, los antioxidantes interfieren con el proceso de oxidación por diferentes mecanismos.

Estos involucran la inactivación de los pro-oxidantes en el medio, tales como los carotenoides que neutralizan el oxígeno singlete o los agentes quelantes que inactivan a los catalizadores metálicos. Estas reacciones conducen a un retraso en el inicio de la oxidación y la extensión del periodo de inducción.

Los antioxidantes pueden donar un átomo de hidrógeno o un electrón a los radicales formados en los ácidos grasos insaturados formando productos más estables (Shahidi, 1997).

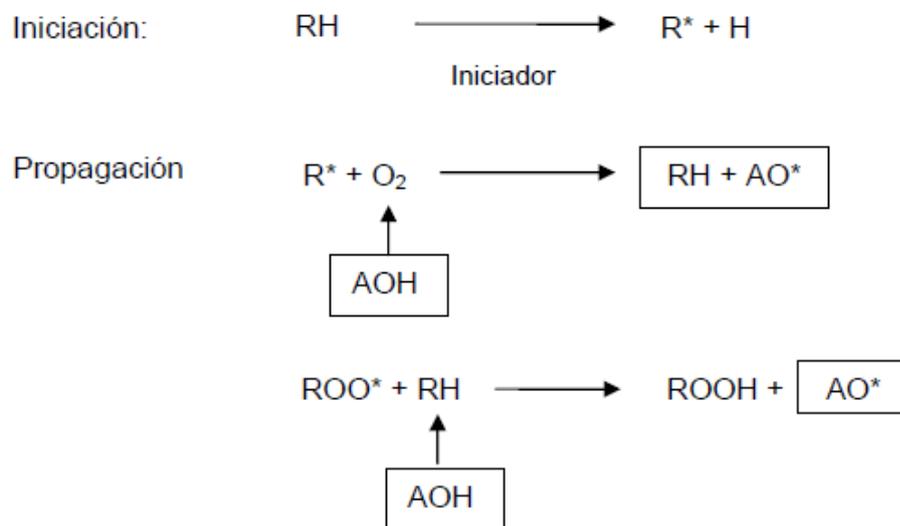


Figura 1. Mecanismo de acción de los antioxidantes AO^* , radical fenoxi; AOH , fenol. Fuente: Shahidi, f., Tang ho, c., 1992

1.3. Rol de los antioxidantes como nutraceuticos

Numerosas investigaciones nos han dado a conocer la importancia de los antioxidantes en la prevención y tratamiento de un sinnúmero de enfermedades. Entre los antioxidantes más importantes en los alimentos se encuentran: la vitamina C, la vitamina E y en la actualidad los flavonoides; en los cuales se centra este estudio.

Uno de los principales beneficios de los antioxidantes es su capacidad para proteger las células de los radicales libres y reducir el estrés oxidativo en el cuerpo.

El estrés oxidativo ocurre en los organismos que, por mala nutrición, enfermedad u otras causas; pierden el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes. Es en esta situación de estrés oxidativo en la que se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres, que reaccionan químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN al interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular. Algunas enfermedades o procesos malignos han sido asociados al daño oxidativo en las moléculas biológicas:

- Ateroesclerosis:** Peroxidación de lípidos en las partículas de LDL con daño en otros componentes.
- Cáncer:** Daño del ADN.
- Cataratas:** Modificaciones irreversibles en las proteínas.
- Cuadros Inflamatorios Crónicos:** Activación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.
- Envejecimiento:** Peroxidación de los ácidos grasos de la membrana celular y daño del ADN.

En el proceso de envejecimiento se considera que los radicales libres producen cambios degenerativos en el sistema inmune y esto podría conducir a la formación de cataratas, placa aterosclerótica, artritis, enfermedad de Parkinson; además de neoplasias y de la enfermedad de Alzheimer.

- Apoptosis
- Enfermedades neurodegenerativas y del corazón

(Shahidi y Chi Tang Ho,2007)

La creciente aceptación de la dieta como terapia preventiva y de la medicina verde como alternativa, está acompañada de muchas ideas erróneas, una de las más frecuentes es atribuirles a las vitaminas todos los beneficios de los vegetales y el desconocimiento (y en consecuencia la falta de estímulo para su estudio) de otros agentes presentes en ellas que contribuyen con un amplio espectro de propiedades a la prevención de ciertas enfermedades, un ejemplo de estos son los polifenoles.

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas; se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común y por sus propiedades antioxidantes merecen mayor atención.

Entre sus efectos clínicos cabe destacar:

Acción antirradicalaria

- Inhiben la oxidación de b-carotenos catalizada por la mioglobina.
- Inhiben la oxidación de b-carotenos producida por el sistema Fe-ácido ascórbico.
- Son donantes de hidrógenos con actividad atrapadora de radicales libres.
- Son agentes quelantes.

Actividad antimutagénica

- La actividad antimutagénica de los polifenoles es controvertida puesto que la quercetina y los colorantes fenólicos del café y el vino tinto, entre otros, han sido reportados como positivos en estudios de mutagenicidad.
- La quercetina y sus glicósidos muestran un potente efecto supresor del daño al ADN inducido por H₂O₂ en ensayos "in Vitro". Además se evidencia baja citotoxicidad en estudios con líneas celulares.
- La isoquercetina, hiperina, quercitrina y la rutina también protegieron al ADN en ensayos con líneas celulares en dosis mayores que la quercetina.

- La mircetina inhibe significativamente la rotura de cadena simple en el ADN del plásmido pbr 322 producida por el oxígeno singlete generado por la disociación térmica de un endoperóxido.
- El ácido tánico, (+) catequina, rutina, fisetina, luteolina y apigenina protegen al ADN plasmidial de los daños producidos por oxígeno singlete.
- El efecto protector de la mircetina sobre el ADN plasmidial es superior, a concentraciones equimolares, al conferido por el lipoato y b-caroteno.
- El efecto anticarcinogénico puede adscribirse a su capacidad de inhibir el daño oxidativo al ADN lo que podría evitar eventos de iniciación.
- Su acción anticarcinogénica puede estar relacionada con el bloqueo de la actividad promotora, que en muchos casos está vinculada a la capacidad oxidativa del promotor.
- El extracto de ginkgo protege al ADN de la oxidación. (Maureen y Prieto,1999)

Efecto Antiteratogénico:

- Disminuyen el riesgo de enfermedades coronarias
- Inhiben la oxidación de las LDL
- Reducen los niveles de colesterol

Actividad Antitrombogénica:

- Inhiben la agregación plaquetaria

Efecto Antiinflamatorio:

- Disminuyen la inmovilización de los leucocitos
- Disminuyen la activación del complemento (mecanismo del sistema inmune)
- Reducen los niveles de ciclooxigenasa en el organismo.

Actividad Antitumoral:

- Protegen al ADN del daño oxidativo
- Impiden la modificación de bases

Antiosteoporosis:

- Mantienen la densidad ósea

Algunos antioxidantes tienen la capacidad de quelar iones metálicos (Fe^{3+} , Cu^{2+}), impidiendo la formación del radical hidroxilo.

Los estudios reportados hasta el momento presentan resultados “*in Vitro*”, falta saber si su comportamiento in vivo será el mismo, sin embargo, las perspectivas son bastante esperanzadoras. Por otra parte, la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo con flavonoides aislados; no obstante, la combinación de flavonoides puede tener mayor actividad antioxidante. (Valls, 2003).

1.4. Compuestos antioxidantes: estructura y propiedades

Como se indicó anteriormente, los compuestos fenólicos representan hoy en día un gran interés nutricional por su contribución en el mantenimiento de la salud humana ya que muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal asociadas principalmente a la actividad antioxidante están relacionadas con la presencia del contenido de compuestos fenólicos. Estos alimentos pueden considerarse dentro de los alimentos funcionales.

Estructura y clasificación

Los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o mas grupos hidrófilos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). la naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma mas común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos glucorónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Martinez., *et,al* 2000).

Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, describiéndose a continuación aquellas con un mayor interés nutricional:

Ácidos fenólicos.

Son formados por la vía del ácido siquimico, durante la liberación de los aminoácidos aromáticos (tirosina y fenilalanina). Los ácidos fenólicos encontrados en plantas tienen la estructura química básica de C6-C1 (ácido benzoico) y de C6-C3 (ácido cinámico) (Fig.2). Ambos tipos de ácidos fenólicos están generalmente en forma conjugada o esterificada (Fig. 2).

Los ácidos fenólicos se comportan como antioxidantes muy eficientes en los sistemas biológicos, ya que pueden actuar como receptores de radicales libres y neutralizadores de la cadena alifática. Los monofenoles son antioxidantes menos eficientes que los polifenoles, la introducción de un grupo secundario de hidroxilo en la posición orto o para aumenta la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos hidroxilados. Por lo tanto, los ácidos protocatequico y caféico, que son o-difenoles, son antioxidantes más eficientes que su ácido monofenol respectivo, el p-hidroxibenzoico y el p-coumarico.

El ácido gálico con tres grupos hidroxilo es más activo que el ácido protocatequico; sin embargo, la presencia de más de tres grupos hidroxilo en un núcleo aromático dado, no mejora la eficacia antioxidante (Pokorny, 1987).

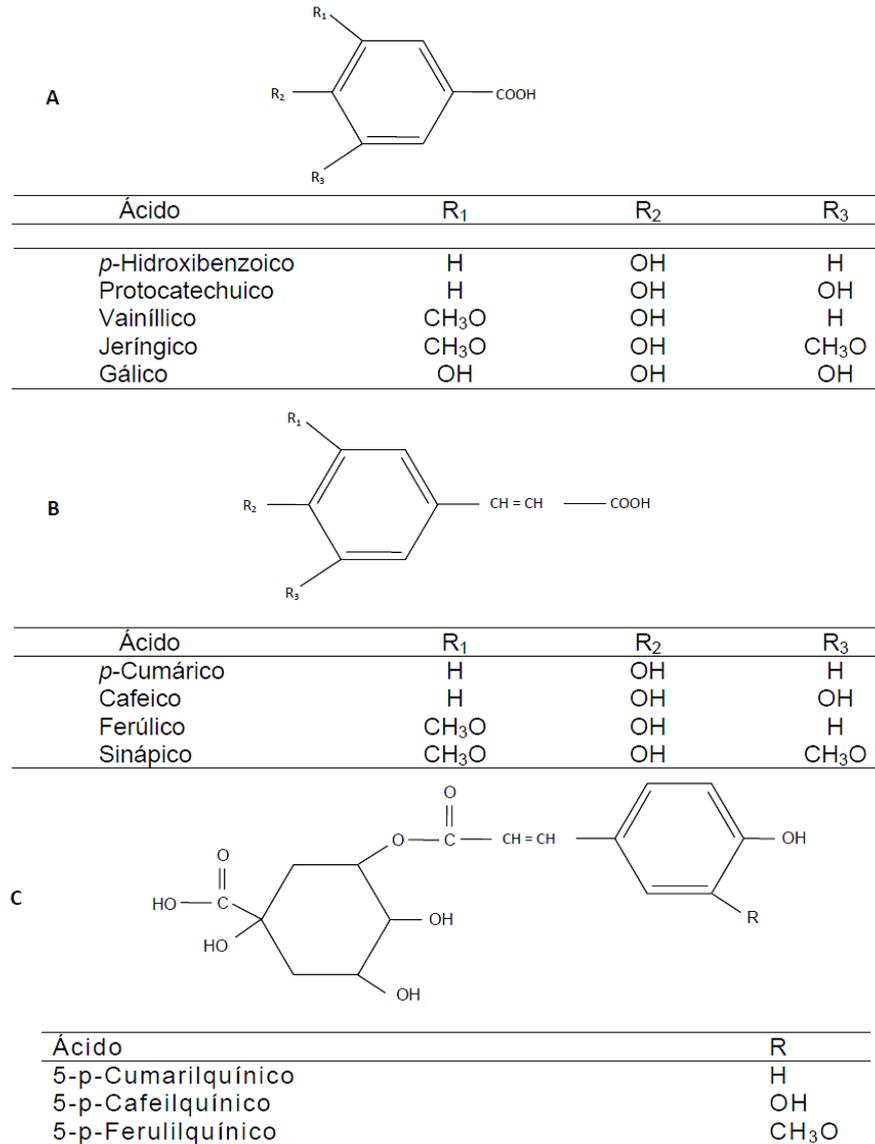


Figura 2. Estructuras de los ácidos fenólicos derivados de: (A) ácido benzoico (B) ácido cinámico, y (C) ácido clorogénico. Fuente: Shahidi *et, al.*, 1992.

La sustitución de uno o dos grupos metoxi en la posición orto en relación al hidroxilo, aumenta marcadamente la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos. La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos y de sus ésteres depende del número de los grupos hidroxilo en la molécula. Generalmente, los ácidos fenólicos se encuentran presentes en las plantas como glucósidos por esterificación del grupo ácido con un azúcar.

Flavonoides

Para los químicos los flavonoides tienen una estructura química muy definida como se muestra en la figura 3. Puede observarse que de manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos $C_6C_3C_6$. En la Figura 4 se muestra la estructura química de la quercetina, uno de los flavonoides más comunes.

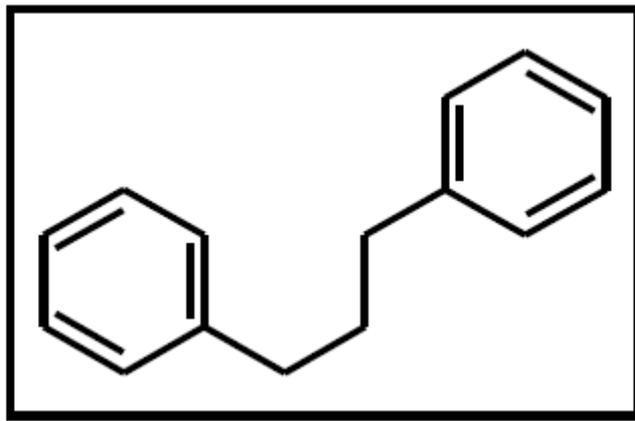


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides. Fuente: Martínez, M., 2005

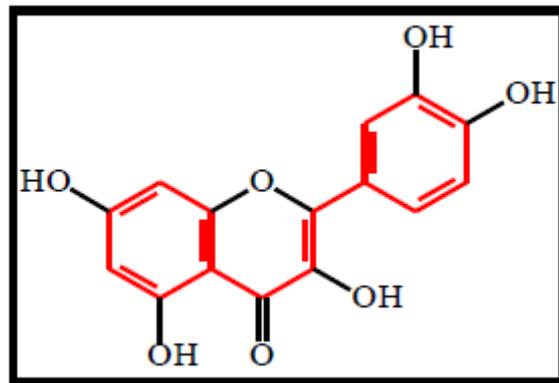


Figura 4. Estructura química de uno de los flavonoides más comúnmente hallados en la naturaleza, la quercetina. Se destaca, en color rojo, la estructura básica de los flavonoides. Fuente: Martínez, M., 2005.

Para su estudio sistemático los más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C₃ (Figura 6). De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en varios grupos: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc.

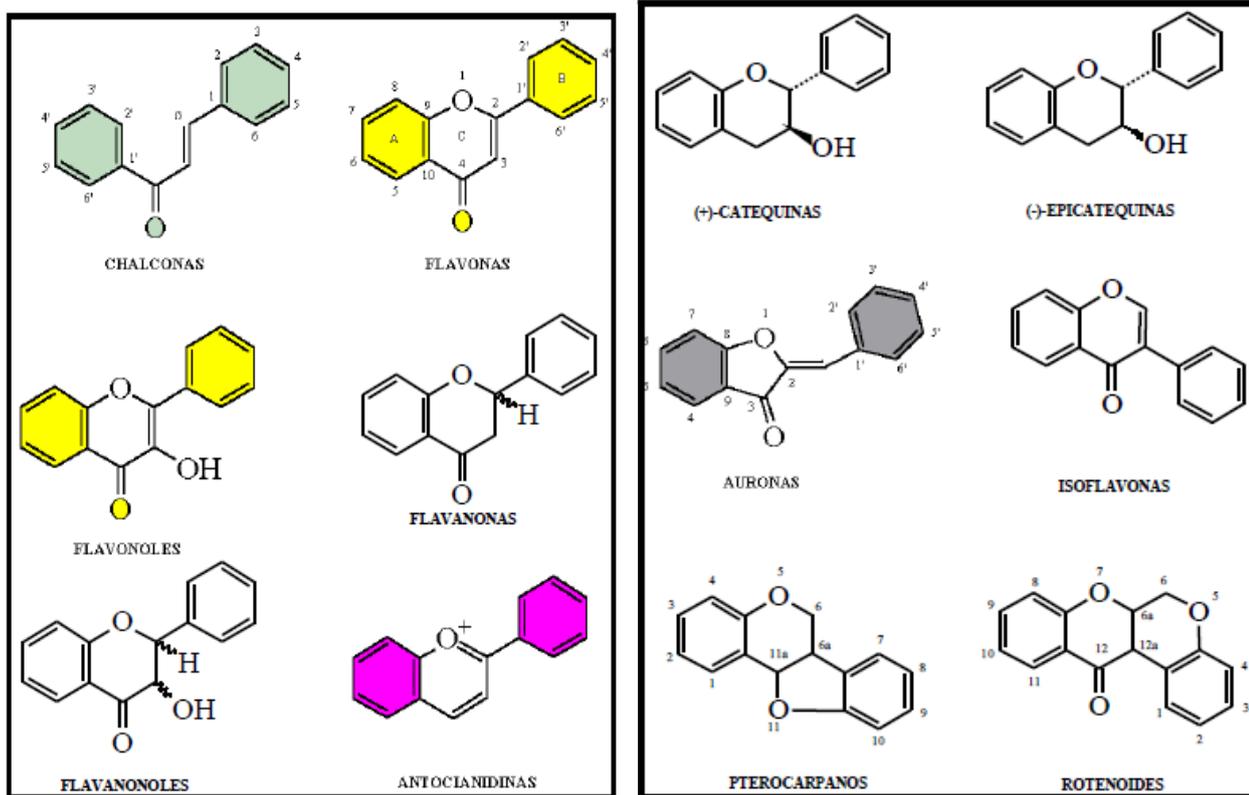


Figura 5. Estructuras básicas de varias clases de flavonoides. Fuente: Martínez, M., 2005.

En las plantas, los flavonoides se encuentran mayoritariamente ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación se le denomina **glicósidos**, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se las denomina **agliconas flavonoides**. Por ejemplo la acetina, eriodictiol, quercetina, naringenina son agliconas flavonoides. Un ejemplo de glicósido es la vitexina que corresponde al 8-C- β -D glucopiranosido de apigenina.

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y su forma (libre, glicósido ó sulfato). Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanoles debido al carbono quiral C-2 presentan el fenómeno de la rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos. La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo (Martinez, 2005).

CAPÍTULO II

VARIABILIDAD GENÉTICA EN ESPECIES VEGETALES: RELACIÓN CON SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA

2.1. ADN vegetal: estructura y rol a nivel celular y molecular

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una macromolécula de aspecto filamentososo que contiene la información hereditaria necesaria para el funcionamiento de todos los organismos vivos. Las unidades estructurales básicas del ADN son los desoxirribonucleótidos, los cuales están formados por un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato que cumplen una función meramente estructural y una base nitrogenada portadora de la información necesaria para sintetizar las proteínas. Existen cuatro bases nitrogenadas diferentes que dan lugar a cuatro desoxirribonucleótidos: dos bases púricas (con estructura de doble anillo), adenina (A) y guanina (G) y dos pirimídicas (con estructura en anillo simple), timina (T) y citosina (C). Los cuatro desoxirribonucleótidos se encadenan uno tras otro, millones de veces mediante la unión del azúcar de uno de ellos con el azúcar del contiguo a través del grupo fosfato, formando cadenas de secuencias determinadas de ADN que codifican toda la diversidad de organismos existentes, desde los unicelulares más sencillos hasta el más complejo existente, el Hombre.

El ADN presenta una estructura tridimensional en la que dos cadenas o hebras complementarias se retuercen una en torno a otra formando lo que se conoce como doble hélice. Las cadenas complementarias se unen entre sí por las bases nitrogenadas mediante puentes de hidrógeno de tal forma que la estructura de las bases nitrogenadas solo permite que la G se una con la C (tres puentes de hidrógeno) y la A con la T (dos puentes de hidrógeno). Así, mientras que la secuencia de la primera cadena no responde a ningún orden establecido, el orden de los nucleótidos de la cadena complementaria está condicionado por la secuencia de la primera. La cadena de uniones azúcar-fosfato está constituida de manera que

el fosfato en el carbono 5' de la desoxirribosa se une al carbono 3 de la siguiente desoxirribosa, diciéndose que tiene una dirección 5' a 3'. Las dos hebras de ADN están dispuestas de manera antiparalela, donde una de ellas va de 5' a 3' y la complementaria de 3' a 5'. La cadena portadora de la información genética, dado que se transcribe a ácido ribonucleico (ARN), se conoce como cadena sentido y su cadena complementaria, llamada antisentido, sirve como molde para la reparación del ADN cuando este se daña, por ejemplo, por el estrés oxidativo o radiaciones. La estructura en doble cadena del ADN supone que en la duplicación de este primero se separen las dos cadenas complementarias y luego, debido al carácter obligatorio de complementariedad, se sintetiza una cadena idéntica a la que se separó, asegurando así que la información contenida en esa molécula de ADN se transmite fielmente de célula a célula, generación tras generación. (Palacios y Villoslada, 2005).

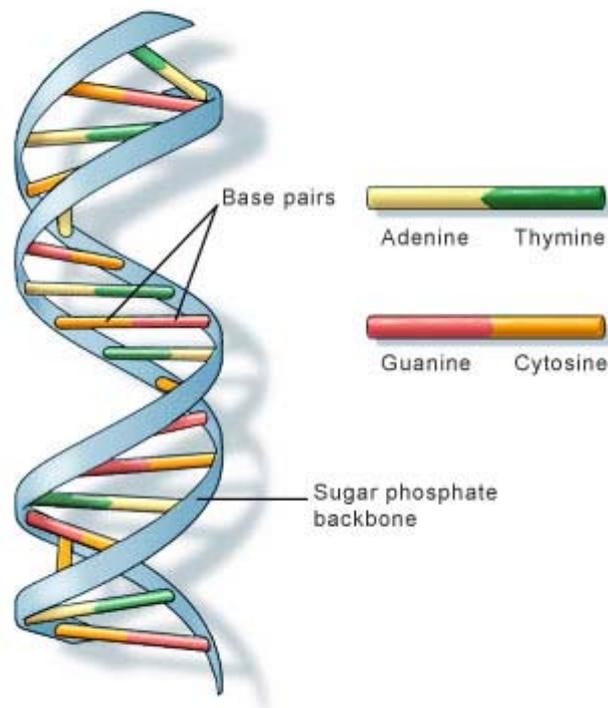


Figura 6: Estructura tridimensional del ADN. Fuente: Maniak, B., Targonski, Z., 1996

2.2. Isomorfismos y polimorfismos

2.2.1. Polimorfismos

Un polimorfismo es una variación en la secuencia del ADN en una posición determinada del genoma entre los individuos de una población, que da lugar a la existencia de distintas variantes de un gen en al menos un 1% de la población. Estas variantes se conocen como alelos y generalmente producen variaciones en las características hereditarias como el color, forma, etc. El hecho de tener el material genético duplicado, mitad materno y mitad paterno, hace que cada gen posea dos alelos. Los individuos que poseen los dos alelos iguales se conocen con el nombre de homocigotos, mientras que aquellos que poseen los dos alelos diferentes se denominan heterocigotos. La secuencia del genoma humano es idéntica en un 99.99% para toda la población, por lo que solo el 0,1% del genoma da lugar a polimorfismos y produce la gran variabilidad existente entre individuos. Los polimorfismos que ocurren con una frecuencia inferior al 1% de la población se denominan mutaciones y generalmente tienen un efecto patológico. Estas mutaciones son producidas por fallos en el proceso de replicación del ADN durante la división celular o por la exposición y radiaciones ionizantes, a determinados agentes químicos o a determinados agentes biológicos como virus o bacterias. Los fallos que pueden ocurrir son la eliminación o inserción de un nucleótido, copiado, incorrecto, y eliminación o inserción de una cadena de nucleótidos. La evolución ha empleado los polimorfismos como mecanismo básico para generar nuevos rasgos. Los tipos de polimorfismos se clasifican según su tamaño como se muestra a continuación:

Macropolimorfismos

Variaciones cromosómicas numéricas

Se dan cuando se cuenta con uno o varios cromosomas de más o de menos del número cromosómico normal. Se habla entonces de individuos aneuploides, es decir, su constitución cromosómica no es exactamente completa. Se denominan individuos monosómicos ($2n-1$) a aquellos a los que les falta un cromosoma completo, nulisómicos ($2n-2$) a aquellos a los que les falta una pareja completa de cromosomas y trisómicos ($2n+1$) a aquellos que tienen un cromosoma extra.

Variaciones cromosómicas estructurales

Se produce cuando existen variaciones en el número o en la disposición de los genes. La pérdida de genes se le conoce con el nombre de deleción y el aumento en el número de genes como duplicación. Cuando un segmento cromosómico concreto cambia de orientación dentro del cromosoma se denomina inversión y cuando dos cromosomas son homólogos intercambian segmentos cromosómicos se denomina translocación. Las duplicaciones de los genes son una herramienta importante para la evolución, dado que el gen duplicado puede ser mutado sin perder su función, gracias a la copia existente.

Polimorfismos medianos

Secuencias repetidas

Se denominan como microsatélites, son secuencias de dos, tres o cuatro nucleótidos que se repiten entre 10 y 100 veces.

Dada la abundancia y el carácter altamente polimórfico de los microsatélites, estos son utilizados para realizar pruebas de identificación de paternidad; en los últimos años se ha demostrado que los microsatélites son de gran importancia en la regulación y por lo tanto en la variabilidad de la expresión genética.

Elementos translocados

Estos polimorfismos son causados por los transposones. Los transposones son secuencias de ADN de origen retroviral que se pueden mover por distintas posiciones del genoma en un proceso denominado transposición. Estos constituyen aproximadamente el 45% del genoma humano y pueden haber colaborado en la evolución de la diversidad de producción de anticuerpos del sistema inmune.

Micropolimorfismos

Inersiones o deleciones de un nucleótido

Cuando dentro de la secuencia de ADN se introduce o elimina un solo nucleótido.

Polimorfismos de un nucleótido

Llamados comúnmente SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) ocurren cuando se produce el cambio de un nucleótido por otro. Se calcula que en el genoma humano hay unos tres millones de SNP, constituyendo aproximadamente el 90% de todos los polimorfismos existentes. Los SNP aparecen tanto en regiones codificantes como no codificantes y dos de cada tres SPN sustituyen una Citosina por una Timina. (Palacios y Villoslada, 2005).

2.2.2. Isomorfismos

La comparación del ADN de especies de diferentes poblaciones puede dar lugar a evidenciar regiones similares. Si las regiones son conservadas y se atribuyen a una secuencia definida de pares de bases, pueden denominarse isomorfismos. Así como los polimorfismos pueden convertirse en los marcadores de elección en estudios de variabilidad de poblaciones, los isomorfismos pueden ser usados para relacionar las propiedades físicas o químicas de especies (Renneberg, 2007).

2.3. Estudios basados en regiones polimórficas de ADN, relacionadas con la producción de metabolitos secundarios vegetales.

Dado el potencial de las plantas como productores de metabolitos secundarios vegetales, se ha encontrado en la biotecnología una herramienta eficaz para mejorar la producción de compuestos bioactivos a partir de diversas estrategias. Inicialmente, la producción de cultivos vegetales (células no diferenciadas, callus y tejidos especializados) ha sido investigada con el fin de producir metabolitos bioactivos. Algunos ejemplos exitosos son citados por la literatura científica, tales como la producción de berberina, alcaloide presente en el metabolismo de *Berberis wilsoniae*, vinblastina; principio anticarcinogénico extraído de *Catharantus roseus* (Buchanan *et al.*, 2000).

La producción de metabolitos secundarios con estrategias de cultivos “in Vitro” presenta ciertas debilidades. En general, los rendimientos de obtención de productos bioactivos son bajos, por lo que se debe producir una cantidad elevada de biomasa, en un proceso de elevado costo. Estos factores hacen que estas técnicas no puedan satisfacer el reto comercial de la puesta a punto de bioprocesos basados en cultivos celulares (Bourgand *et al.*, 2001).

Ante la problemática planteada, se han iniciado nuevas investigaciones orientadas a investigar el gen responsable de la producción de metabolitos secundarios de interés, con el fin de facilitar la producción de estos compuestos bioactivos en las plantas. Evidentemente, se trata de una línea de investigación compleja y multidisciplinaria en biotecnología, por este motivo se encuentran publicados trabajos preliminares. No obstante, la interpretación de perfiles metabólicos en plantas presenta dificultades debidas a numerosos parámetros críticos: discrepancias entre el bajo número de metabolitos relevantes y el número real de moléculas en la planta, el proceso de extracción de material genético, la superposición de muchos procesos metabólicos en la muestra (Weckwerth, 2003).

Los estudios reportados se basan en especies de importancia económica. Se ha estudiado las regiones génicas responsables de la sobreexpresión de enzimas que inhiben procesos oxidativos en especies de álamo (Foyer *et al.*, 1995).

El uso de marcadores moleculares también permite establecer diferencias entre poblaciones vegetales. En este campo se encuentran algunos estudios, sobre todo orientados a conservación de especies en peligro de extinción (Herrera, 2008). Este contexto permite plantear investigaciones con las especies vegetales de nuestro entorno, las cuales son nativas y tienen potencial por su producción de metabolitos secundarios. El alcance de la investigación planteada en este estudio es importante pues plantea la comparación del perfil de ADN de especies productoras de flavonoides y busca establecer una relación con el potencial antioxidante mostrado por estas plantas.

CAPITULO III

ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS

3.1. Ataco (*Amaranthus Caudatus*)



Figura 7: Ataco (*Amaranthus Caudatus* L.)

3.1.1. Descripción botánica

Nombre científico: *Amaranthus caudatus* Linnaeus.

Nombre común: En nuestro medio es más conocido como Ataco, asimismo se lo conoce como amaranto, kiwicha, sangorache, inca jataco, achis, achita, coima, trigo inca, quinoa.

Clasificación científica: Pertenece a la familia Amaranthaceae.

Esta es una planta dicotiledónea. Su tallo central puede alcanzar de 2 a 2.5m. de altura en la madurez, a pesar de que algunas variedades son más pequeñas. Las ramas de forma cilíndrica, pueden empezar tan abajo como la base de la planta dependiendo de la variedad de ésta. La raíz principal es corta y las secundarias se dirigen hacia abajo, dentro del suelo. Sus vistosas flores brotan del tallo principal, en algunos casos las inflorescencias llegan a medir 90 cms. Estas pueden ser erectas, semierectas o sueltas, cada panoja tiene flores masculinas y femeninas y se autopolinizan, como también lo pueden hacer mediante el viento. Los frutos contienen una sola semilla y presentan una diversa gama de colores que van desde el negro pasando por el rojo hasta el marfil y el blanco.

3.1.2 Composición

Por su rendimiento, valor nutritivo y usos variados la kiwicha puede competir fácilmente con la quinua y otros cereales. El análisis de 100 gr. de kiwicha dan los siguientes resultados:

Componentes	Contenido en 100g de Ataco
Calorías	428
Agua	12g
Proteína	14,5g
Grasa	7,8g
Carbohidratos	71,3g
Fibra	3g
Ceniza	2,7g
Calcio	2,93g
Fósforo	5,02g
Hierro	0,081g
Tiamina	0,003g
Riboflavina	0,0001g
Niacina	0,004g
Acido ascórbico	0,032g

Cuadro 1: Tabla de composición química de los alimentos del ministerio de salud.

Fuente: 2007 Ministerio de Salud del Ecuador.

3.1.3. Propiedades

El ataco es considerado un astringente, por lo tanto puede ser utilizado en tratamientos para la diarrea, de la misma manera es aplicable para irritaciones de la boca y la garganta. Esta planta además es usada cuando se producen hemorragias del intestino o cuando existe menstruación excesiva. La infusión de tallos frescos sirve como laxante.

En varias partes del mundo, las hojas de ataco son valoradas como hortalizas y en nuestro país, sus flores constituyen un elemento de la colada morada. (White, 1976).

3.2 Maíz morado (*Zea Mays*)



Figura 8: Maíz Morado (*Zea mays*)

3.2.1 Descripción botánica

Nombre científico: *Zea Mays* L.

Nombres comunes: Maíz Morado, maíz cuzco, maíz chulpi.

Clasificación Científica: El Maíz Morado pertenece a la familia de las Gramineas.
Especie: Kculli.

Las variedades de maíz en general se clasifican según factores tales como color, tipo de superficie (lisa o arrugada), utilización, sabor de la pulpa de los tallos; asimismo este maíz posee alta concentración de antocianinas en el pericarpio y en la capa de aleurona.

El maíz es un cultivo originario de América (específicamente el maíz chulpi es originario del Perú), donde era el alimento básico desde mucho antes que los europeos llegaran al Nuevo Mundo.

Este cultivo se distribuye a lo largo del Callejón Interandino; se produce en las provincias de: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, con especies y variedades propias en Cañar y Azuay. Se lo ha venido cultivando por muchos años aun antes de la conquista Inca y forma parte de la "cultura andina del maíz".

3.2.2 Composición

A continuación se muestra la composición en 100g de maíz.

Componentes	Porcentaje
Materia Seca	88.00%
Proteína Cruda	0.90%
Grasa	3.50%
Fibra Cruda	2.90%
Calcio	0.01%
Fósforo total	0.25%
Cenizas	1.50%

Cuadro 2: Composición Nutricional de Maíz. Fuente: Komsan, A., *et.al.* 1987.

3.2.4 Propiedades

El maíz morado tiene un ingrediente natural que está dentro de las denominadas Antocianinas, cianidina-3-b-glucosa, el cual es un importante antioxidante.

Las Antocianinas son un tipo de flavonoides complejos que se caracterizan por tener un importante efecto antioxidante al apoyar la regeneración de los tejidos, fomentar el flujo de la sangre, reducir el colesterol y promover la formación de colágeno, mejorando la circulación, también disminuye los riesgos de ataque al corazón y son excelentes preventivos contra el cáncer.

Así también encontramos los fitonutrientes tales como: flavonoides, carotenoides, luteína, terpenos, antocianinas, sulfurorafanos, entre muchos otros. A diferencia de las vitaminas y minerales, los fitonutrientes carecen de valor nutricional. Sin embargo, actúan como antioxidantes, protegiendo al ADN celular y evitando mutaciones que podrían causar cáncer.

También desintoxican al cuerpo de los agentes de la contaminación ambiental, desactivan sustancias cancerígenas, fortalecen el sistema inmune y protegen al cuerpo del desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como cataratas, artritis, tensión alta, diabetes, envejecimiento, arterosclerosis y enfermedades cardíacas, entre otras. (Revista Nutraceuticals World).

3.3 Mortiño (*Vaccinium floribundum*)



Figura 9: Mortiño (*Vaccinium Foribundum* K.)

3.3.1 Descripción botánica

Nombre científico: *Vaccinium floribundum* Kunth

Nombre común: Mortiño, Arándano, Uva del monte, Andean blueberry.

Clasificación científica: El mortiño pertenece a la familia de las Ericáceas (Ericaceae).

En Ecuador el mortiño que es comercializado en mercados locales y a menudo en las ciudades se obtiene únicamente de las plantas silvestres de los páramos andinos. El mortiño de los Andes es diferente del *blueberry* (nativo de Norte América) y que se comercializa en el mercado internacional, por lo que en Ecuador está siendo promocionado como *Andean blueberry*.

Es un arbusto pequeño de hasta 3.5 m de altura con hojas pequeñas, coriáceas, elípticas a ovado lanceoladas y márgenes finamente aserrados. Las inflorescencias son racimos que salen de las axilas de tallos y hojas, con 6-10 flores pequeñas con cáliz articulado, corola con forma de olla de color blanco, rosa o rojo. El fruto es una baya esférica de 5-8 mm de diámetro de color entre azul y azul oscuro, lisa a veces glauca.

Es una fruta de fácil uso pues no es necesario ni pelarla ni cortarla. Se consume en fresco, como complemento en ensaladas de frutas, vegetales y mezclados con cereales y yogurt. Por su sabor fuerte y agradable se la utiliza en la preparación de salsas, acompañamientos para diversos platos de carnes y preparaciones de tipo gourmet, además de rellenos para *pies*, salsas para *pancakes*, *waffles* y pastelería variada.

En Ecuador se consume comúnmente fresca para preparar la tradicional colada morada durante la época de Día de los Difuntos. (Sanjinés *et.al.*,2006).

3.3.2 Composición

COMPOSICIÓN POR 100G FRUTA	
Calorías (Kcal.)	30.1
Hidratos de Carbono (g)	6.9
Fibra (g)	1.8
Potasio (mg)	88
Magnesio (mg)	0.5
Pro vitamina A (mcg)	12
Vitamina C (mg)	17
Vitamina E (mg)	5
Agua (g)	87.4
Proteínas (g)	0.3

Cuadro 3: Composición nutricional de Mortiño. Fuente: 1995 Blueberry Statistical Record, NABC (North American Blueberry Council)

3.3.3 Propiedades

Estas frutas son de bajo valor calórico por su escaso aporte de hidratos de carbono. En general constituyen una buena fuente de fibra, de potasio, hierro, calcio y diversos ácidos orgánicos. Sin embargo, lo que en realidad caracteriza a estas frutas es su abundancia de pigmentos naturales (antocianos y carotenoides) de acción antioxidante. En la alimentación humana, este tipo de frutas constituyen una de las fuentes más importantes de antocianos, que les confieren su color característico y que están junto con ácidos orgánicos tales como el ácido oxálico o el ácido málico, responsables también de su sabor. (Fundación Eroski, 2009).

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Preparación de material vegetal

El material vegetal usado para el trabajo de investigación se adquirió en mercados de nuestro medio y del norte del país; dentro del mismo se encuentran:

- Dos ecotipos de maíz morado (*Zea mays*), encontrados en el norte del país; el primero con una coloración morada mas intensa que el segundo.
- Ataco (*Amaranthus caudatus, L*), adquirido en la ciudad de Cuenca.
- Mortiño (*Vaccinium floribundum K*); adquirido en el Parque Nacional El Cajas y en el norte del país; este es el mortiño utilizado en la tradicional colada morada.

Antes de obtener los extractos se procedió a secar el material vegetal por un periodo de cinco días. Luego de este proceso se realizó la pulverización, mediante el uso de una licuadora de laboratorio; a excepción del mortiño al cual no se le dio este último tratamiento.

4.2. Obtención de extractos

Los extractos fueron obtenidos utilizando estrategias que incluyen hidrólisis ácidas y/o alcalinas, y extracción con solventes apolares. El extracto obtenido fue evaporado a sequedad y utilizado en la cuantificación de compuestos fenólicos y ensayos de actividad antioxidante. Los métodos utilizados se describen a continuación:

4.2.1. Método de Soxhlet.



Figura 10: Aparato de soxhlet, cargado con los cartuchos de maíz morado

Materiales y reactivos:

- Acetona
- Metanol destilado
- Aparato de Soxhlet
- 4 matraz redondo de 500ml para el aparato de soxhlet y el rotavapor.
- Probeta de 250ml
- Cartuchos de papel filtro de 10x10 cm
- Maíz pulverizado
- Rotavapor
- Aparato de ultrasonido
- Pipetas pasteur
- Peras para las pipetas pasteur
- Envases de vidrio de aproximadamente 20ml

Procedimiento:



Reflujo



Evaporación del
solvente



Recolección del pigmento

Figura 11: Procedimiento para la obtención de extractos por el método de soxhlet.

Con las muestras pulverizadas se procedió a realizar la extracción guiada a la obtención de compuestos fenólicos mediante destilación por arrastre de vapor utilizando el aparato de soxhlet y un rotavapor; para ello se llevó a cabo el siguiente proceso:

1. Colocar 20g de muestra en un cartucho de papel filtro que se introduce luego en el aparato de soxhlet.
2. De la misma manera en el balón adosado en la parte inferior del aparato se coloca 300ml de metanol destilado para proceder a realizar el arrastre por un tiempo de cuatro horas.
3. Una vez transcurrido el tiempo se toma el extracto que ha quedado en el balón del aparato de soxhlet y se lo lleva al rotavapor para separar el metanol utilizado, del extracto.

4. Este procedimiento se realiza a 60°C y a 80rpm.
5. Una vez obtenido el extracto se retiran los restos del mismo que han quedado impregnados en las paredes del balón, utilizando una pipeta pasteur, el aparato para ultrasonido y como solvente acetona, la misma que será evaporada a sequedad una vez que se han retirado todos los residuos. Finalmente es necesario proteger al extracto de la luz y mantenerlo en refrigeración.

4.2.2. Método de maceración



Figura 12: Maceración del Ataco

Materiales y reactivos:

- Ácido clorhídrico
- Metanol destilado
- Un pilón y un mortero
- Soporte universal
- Papel Filtro
- Embudo
- Pipeta automática
- Vaso de precipitación de 100ml
- Balón de aforo de 100ml

Procedimiento:



Figura 13: Obtención de extractos por el método de maceración.

Los extractos por maceración se obtuvieron mediante el siguiente proceso:

1. Tomar 25g de muestra y macerar en un pilón mediante la adición de una solución al 0.1% de metanol ácido clorhídrico.
2. Una vez que se ha macerado se procede a filtrar el extracto, utilizando papel filtro y un embudo.
3. El extracto filtrado es dejado al ambiente para que se evapore a sequedad el solvente utilizado y finalmente se lo protege de la luz y se lo almacena en refrigeración hasta el momento de su uso.

4.3 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu

Materiales y reactivos:

- Reactivo de Folin
- Carbonato de sodio al 7.5%
- Agua destilada
- Metanol destilado
- Extractos obtenidos de las distintas especies vegetales
- Balanza analítica
- Tubos eppendorf de 1,5ml
- Pipetas pasteur y peras para las mismas
- Pipetas automáticas de: 5ml, 1000ul y 100μl
- Tubos de ensayo y gradilla
- Espectrofotómetro UV-VIS GENESIS Serie 10
- Celdas de Cuarzo
- Piseta
- Papel absorbente

Procedimiento:



Figura 14: Extractos listos para la lectura en el espectrofotómetro luego de que se ha realizado la reacción correspondiente para el método.

El método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteau, para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de material seco. (Kuskoski, *et.al.*2005)

La técnica debe realizarse por duplicado y el procedimiento a seguir para su desarrollo es el siguiente:

1. Previamente, se prepara una solución metanólica de 1000 mg/ml con los extractos correspondientes a cada una de las especies vegetales. A partir de dicha solución se preparan diluciones de 75 μ g/ml en los tubos eppendorf, aforando a 1ml con las pipetas pasteur; así tenemos listas las muestras que serán evaluadas.
2. Tomar un tubo de ensayo para cada muestra y colocar en cada uno 1ml de la misma, a continuación se adiciona 1ml del reactivo de Folin, 1ml de carbonato de sodio y finalmente 1ml de agua destilada.
3. Una vez realizado este paso se procede a llevar los tubos a la oscuridad durante un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente, para que se lleve a cabo la reacción correspondiente.
4. Cuando ya ha transcurrido el tiempo se retiran los tubos de la oscuridad y utilizando las celdas de cuarzo se mide la absorbancia de las soluciones en el espectrofotómetro a 765 nm. El blanco que se utiliza en este paso es metanol.

4.5. Evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

Materiales y reactivos:

- DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132)
- Metanol
- Balón de aforo ámbar de 100ml
- Balanza analítica
- Tubos eppendorf
- Pipetas pasteur y peras de goma para las mismas
- Tubos de ensayo
- Pipetas automáticas de: 5ml, 1000 μ l, 100 μ l y 20 μ l
- Espectrofotómetro UV-VIS GENESIS Serie 10
- Celdas de Cuarzo
- Piceta
- Papel absorbente

Procedimiento:

Este método consiste en la medición a 517 nm de la reducción del radical libre estable DPPH. La absorbancia característica de este radical que posee un color violeta intenso y disminuye en presencia de un antioxidante, entonces se cuantifica la capacidad antioxidante de radicales libres de los extractos mediante la determinación del grado de decoloración que provocaron a una solución metanólica de DPPH.

La técnica se realiza por duplicado y se desarrolla de la siguiente manera:

1. Preparar una solución madre de 1000 μ g/ml en metanol con cada uno de los extractos obtenidos de las especies en estudio, luego tomamos volúmenes distintos de la solución madre y los colocamos en los tubos eppendorf y aforamos a 1ml, de esta manera obtenemos diluciones con concentraciones de: 250,125,75,50 y 25 μ l/ml.
2. Preparar una solución \square etabólica de DPPH (20mg/L) que debe ser protegida de la luz en un balón de color ámbar.
3. En los tubos de ensayo, colocar 0,5ml de cada dilución y 1,5ml de la solución de DPPH y agitar.
4. Dejar los tubos en la oscuridad por un lapso de 20 minutos para que se realice la reacción de decoloración.
5. Tomar cada una de las soluciones obtenidas y en una celda de cuarzo medir la absorbancia a 517nm.

4.6. Evaluación de la actividad atrapadora del radical superóxido.

Materiales y reactivos:

- Xantina oxidasa de leche de vaca
- K_2HPO_4
- KH_2PO_4
- Hipoxantina
- Nitrobluetetrazolium
- Etanol absoluto
- Hielo
- Balanza analítica
- Tubos eppendorf
- Pipetas pasteur
- Potenciómetro
- Probetas de 100 y 250ml

- Balón de aforo de 50 y 100ml
- Vasos de precipitación
- Espectrofotómetro UV-VIS GENESIS Serie 10
 - Celdas de Cuarzo
 - Piceta
 - Papel absorbente

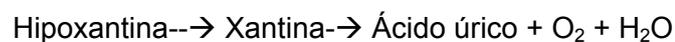
Procedimiento:



Figura 15: Soluciones de extracto y soluciones finales, con los reactivos correspondientes; listas para se leídas en el espectrofotómetro.

El radical superóxido (O_2^-) es el primer producto de la reducción univalente del oxígeno, su importancia biológica estriba en su capacidad para generar otras especies oxigenadas más reactiva, por ejemplo el radical hidroxilo, además de participar en la reacción bactericida de las células fagocitarias.

La xantina oxidasa es una enzima capaz de generar radicales O_2^- *in vivo*, por la oxidación de productos reducidos, provenientes del catabolismo del ATP intracelular, siendo este el mecanismo al que se atribuye el daño celular, tras la repercusión de tejidos isquémicos. Esta enzima cataliza las siguientes reacciones de oxidación:



El O_2 generado en esta secuencia de reacciones, debido a su carácter reductor, puede reducir compuestos como el ferricitocromo C o nitrobluetetrazolium (NTB). El NTB cuando es reducido por el O_2 , da lugar a la formación de un cromóforo que presenta su máximo de absorción a 560nm. Aquellos principios activos captadores del radical O_2 disminuyen la velocidad de formación de dicho cromóforo.

Para llevar a cabo la técnica se realiza el siguiente procedimiento:

Antes de realizar los análisis, los sólidos totales de las muestras deben ajustarse a aproximadamente $0.1\text{mg/ml} = 100\mu\text{g/ml}$. La concentración final en la muestra de ensayo debe ser 10 y $20\mu\text{g/ml}$. Esto se realiza mediante la dilución apropiada de una solución stock (etanol o agua) con los volúmenes respectivos de solvente.

Soluciones:

Todas las soluciones, en especial la de la enzima deben ser preparadas frescas, cubiertas con papel de aluminio y guardadas en la oscuridad y a 4°C .

Buffer Fosfato de Potasio

Especificaciones: 50mM buffer fosfato de potasio pH 7.5 en agua destilada con 0.05mM EDTA.

1. Preparar una solución 50mM KH_2PO_4 , disolviendo 0.3g de KH_2PO_4 (peso molecular 120g/mol) en 50ml de agua destilada.
2. Preparar una solución 50mM de K_2HPO_4 disolviendo 1.77g de K_2HPO_4 (peso molecular 141,96 g/mol) en 250 ml de agua destilada.
3. Mezclar 200ml de la solución básica (K_2HPO_4 , pH aproximado 9.0) con 32ml de la solución ácida (KH_2PO_4 , pH cercano a 4.3). Ajustar el pH con el resto de ambas soluciones, agregando gota a gota hasta que se alcance un pH de 7.5. Determinar el volumen final V del buffer.
4. Agregar $m(\text{g}) = V (1) \times 0.018615$ (g/l) $\text{Na}_4 - \text{EDTA}$ (peso molecular 380,2 g/mol) al buffer para tener una concentración final de EDTA de 0.05mM.

Solución Hipoxantina 0.2 mM

Especificaciones: Hipoxantina 2 mM en buffer fosfato de sodio (solución stock concentrada diez veces)

1. Pesar 1.35mg de hipoxantina y disolver en 50ml de buffer fosfato de potasio. La concentración de la solución será 0.2mM.

Solución de nitrobluetetrazolium (NTB)

1. Pesar 21mg de NBT, disolver con 1ml de DMSO (dimetil sulfoxido) y agregar 1.5ml de buffer fosfato (volumen final: 2,5ml). Esta solución tiene una concentración de 10mM.
2. Tomar 1ml de la solución 10mM y agregar 9ml de buffer fosfato, para obtener la solución de trabajo de 1mM.

Solución de Xantina Oxidasa

1. La solución enzimática deberá ser utilizada a 1,2 U/ml de xantina oxidasa preparada en buffer fosfato. Para los cálculos debe considerar que esta enzima viene a una concentración de 0.0385 U/ μ l.

Solución de extracto/ compuesto 1

Especificaciones: 0.10mg/ml en etanol

1. Tomar 100ul de la solución y llevarla a un volumen final de 5ml.

Solución de extracto/compuesto 2

Especificaciones: 0.20mg/ml en etanol

1. Tomar 200ul de la solución y llevarla a un volumen final de 5ml.

Esquema de ensayo

Los reactivos se agregarán en las cantidades estipuladas en la tabla y respetando el orden de adición:

Soluciones (ml)	Control	Blanco control	Muestra	Blanco muestra
Buffer fosfato	0.380	0.380	0.380	0.380
Solución hipoxantina 0.2mM	0.063	0.063	0.063	0.063
Agua destilada o etanol	0.063	0.125	-	0.063
Muestra	-	-	0.063	0.063
Solución NBT 1mM	0.063	0.063	0.063	0.063
Solución enzimática	0.063	-	0.063	-
Volumen final	0.632	0.632	0.632	0.632

1. Usar buffer fosfato para encerrar el equipo, leer a 560nm
2. Leer primero la absorbancia de los blancos
3. Agregar la enzima a un solo tubo, mezclar bien y hacer la cinética leyendo el aumento de la absorbancia cada 20 segundos durante 7-8 minutos, hasta alcanzar el "plateau" de la curva.
4. Mientras se hace la cinética se debe mantener el resto de los tubos tapados, debido a que el NBT se oxida rápidamente en presencia de la luz.

Para controlar la estabilidad del sistema se debe insertar una solución control cada seis muestras.

4.6. Establecimiento del perfil de ADN de las plantas en estudio, y comparación de la diversidad del perfil de ADN del maíz morado con dos especies de maíz comercializadas en mercados locales.

Extracción de ADN vegetal

La metodología de extracción de ADN descrita a continuación permite la obtención de ADN genómico de buena calidad, libre de compuestos secundarios que atrapan el ADN en una matriz gelatinosa y de proteínas y polifenoles que coprecipitan con el ADN los cuales afectan el proceso de electroforesis.

Materiales y Reactivos:

- Buffer CTAB (500ml):
 - 60.57g de Tris 1M (PM: 121.14g/mol) ajustado con HCl hasta pH 8
 - 40.90g de NaCl
 - 3.80g EDTA
 - 1.5ml de B- mercaptoetanol

- Etanol absoluto refrigerado a -20°C
- Isopropanol refrigerado a -20°C
- Fenol: Cloroformo: Isoamil alcohol (IAA) (25:24:1)
- Nitrógeno líquido
- Material vegetal
- Mortero y pilón
- Pipeta automática
- Tubos eppendorf
- Centrífuga Eppendorf modelo 5804, velocidad máxima 14000rpm
- Hielo

Procedimiento:

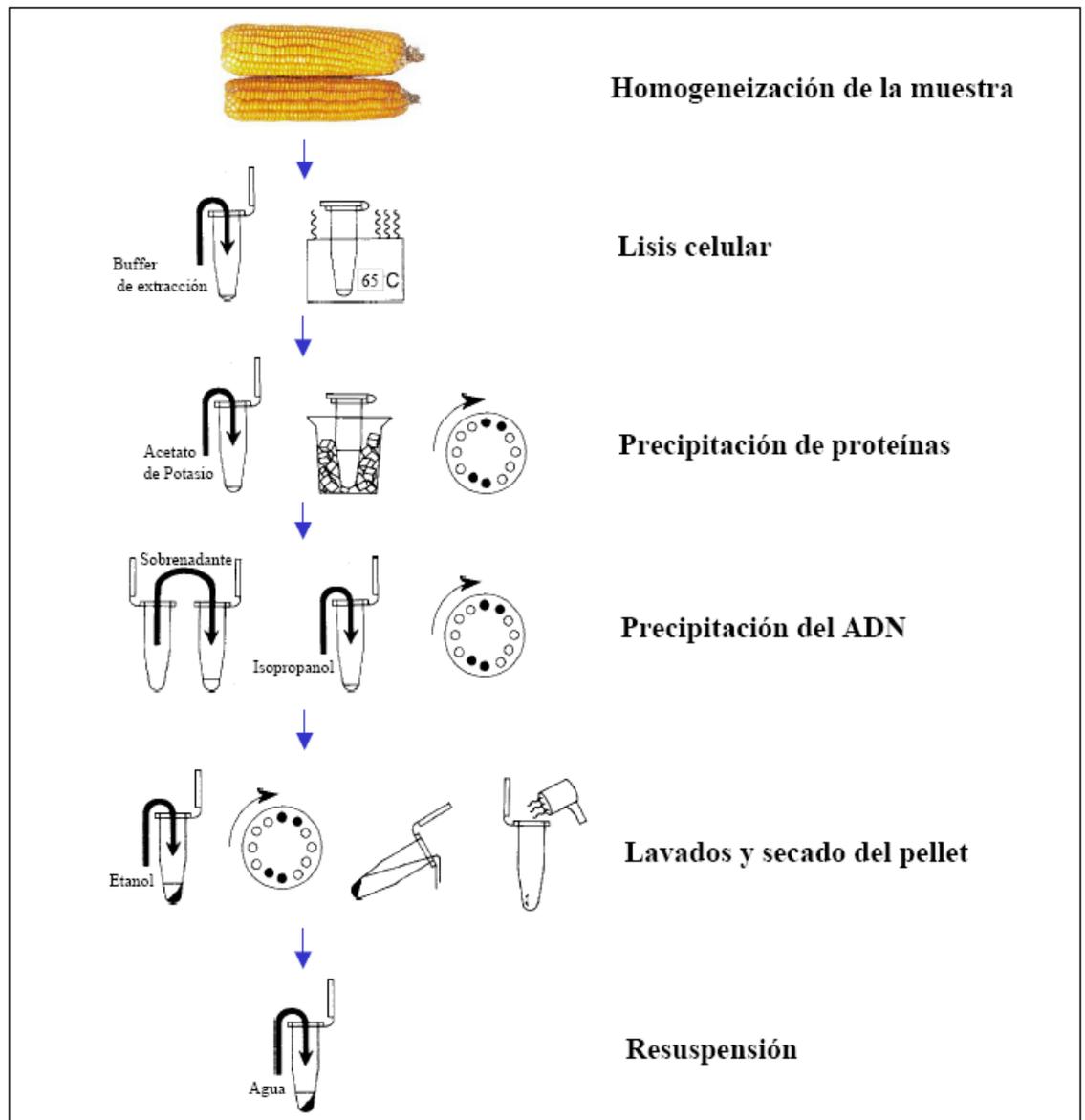


Figura 16: Procedimiento para la extracción de ADN. Fuente: Instituto de Nacional Biotecnología de Argentina.

1. Tomar 0.2-0.5g de material vegetal (hojas, yemas, etc.).
2. Agregar una cantidad de nitrógeno líquido y triturar la muestra.
3. Adicionar 2-3 ml de Buffer CTAB que previamente debió ser autoclavado a 121°C por 15 minutos y mantenido luego a 65°C en baño María.
4. Transferir 700µl a un tubo eppendorf.
5. Incubar el tubo por 40 minutos a 65°C en baño María con agitación constante.
6. Aplicar 700µl de Fenol: Cloroformo: Isoamil alcohol (25:24:1).
7. Mezclar y centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad (14000rpm).
8. Tomar el sobrenadante y transferir a un tubo limpio. Aplicar 700µl de Fenol: Cloroformo: Isoamil alcohol (25:24:1).
9. Mezclar y centrifugar por cinco minutos a velocidad máxima.
10. Tomar el sobrenadante y transferir a un tubo limpio.
11. Adicionar un volumen de isopropanol, dejar en hielo por 5 minutos y luego centrifugar durante 15 minutos.
12. Eliminar el sobrenadante y agregar 500µl de etanol absoluto.
13. Dejar las muestras a -20°C overnight.
14. Transcurrido el tiempo, centrifugar las muestras por 15 minutos y eliminar el etanol, para que solamente quede el pellet.
15. Dejar secar el pellet por una hora y media, finalmente resuspender el mismo en 50µl de agua destilada autoclavada.

Determinación de la pureza del ADN obtenido

1. Se debe realizar una lectura a 260nm para la pureza y 280nm para los contaminantes y se compara con el valor teórico de 1.8 a 2.
2. La razón de la pureza se obtiene dividiendo el valor de la absorbancia a 260nm para el valor de 280nm.
3. Para leer en el espectrofotómetro se prepara de la siguiente manera:
 - De la muestra obtenida tomamos 10µl de ADN y añadimos 790µl de agua, para tener 800µl de solución diluida, ya que la celda de cuarzo mide 1ml.

Electroforesis de ADN vegetal

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos.

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa.

Materiales y reactivos:

- Buffer TAE 10X (50ml):
 - 12.10g de Tris base
 - 2.73ml de ácido acético glacial
 - 0.73g de EDTA

- Loading buffer:
 - 0.03% de azul de bromofenol
 - 10mM Tris-HCl (pH 8)
 - 60mM EDTA
 - 40-60% de glicerol

- Bromuro de etidio
- Gel de agarosa
- Equipo de electroforesis BIO RAD, modelo Sub-Cell GT Wide mini.
- Fuente de poder BIO RAD, Power Pack 200
- Trasiluminador 3UV™, modelo LSM-20E
- Erlenmeyer de 250ml
- Microondas
- Pipeta automática de 10µl

Procedimiento:

Preparación del gel

1. Prepara el gel de agarosa al 2% en buffer TAE (1%) (1g de agarosa en 100ml de buffer).

Nota: El buffer se usa para preparar el gel y también para correrlo, es decir se lo coloca en los dos extremos del aparato de electroforesis; de la misma manera al poner el gel en la cama no se lo debe tocar para evitar su contaminación.

Colocación del gel en la cama

1. Colocar la agarosa en la cama, cuidando de que no queden burbujas, en ese caso se rompen con una punta.
2. El gel debe cubrir la cama (aproximadamente 60ml), se coloca el peina para que se formen los pocillos al gelificarse la agarosa.
3. Dejar gelificar por el lapso de una hora, cubriendo el aparato para evitar la contaminación del gel.

Corrida del gel

1. Para observar la migración del ADN, es necesario teñir el mismo con azul de bromofenol.
2. En placas elisa, colocar 2µl de colorante y luego 5µl de muestra.
3. Colocar cada una de las muestras (7µl) en los pocillos que se formaron en el gel y dejar correr por una hora aproximadamente, a 60 voltios.

4. En un recipiente aparte colocar el buffer TAE que estaba en los extremos del aparato y adicionar 50ul de bromuro de etidio.
5. Tomar el gel, sumergirlo en la solución con el bromuro de etidio y dejarlo por un periodo de 5 a 10 minutos.
6. Colocar la plancha de gel en el transiluminador para hacer la lectura de bandas.

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1. Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH.

Una vez que se obtuvieron los extractos de las distintas especies vegetales se aplicó la técnica para la determinación de actividad antioxidante por el método del DPPH, descrita (4.4) A continuación se presentan los datos obtenidos en el ensayo:

ESPECIE VEGETAL	CONCENTRACIÓN (µl/ml)	ABSORBANCIA MEDIA	% DECOLORACIÓN	IC ₅₀
Maíz morado (ecotipo 1)	375	0.784	122.72	84.86
	250	0.6295	99.43	
	125	0.3485	78.83	
	75	0.1675	52.41	
	50	0.146	58.52	
	25	0.078	77.84	
	15	0.053	85.08	
	10	0.0415	88.21	
	5	0.0295	91.61	
Maíz morado (ecotipo 2)	375	0.0325	108.22	ND
	250	0.0225	106.25	
	125	0.018	103.54	
	75	0.0195	104.06	
	50	0.115	84.12	
	25	0.22	62.76	
	15	0.2475	53.40	

Mortiño	250	0.534	4.64	51.16
	125	0.3195	42.94	
	75	0.244	56.42	
	50	0.2055	63.30	
	25	0.1605	71.33	
	15	0.15	73.21	
Ataco	375	0.1985	62.47	191.8
	250	0.1313	75.23	
	125	0.4205	20.51	
	75	0.1225	76.84	

Cuadro 4: Actividad antioxidante determinada por el método DPPH (ND: no detectado; IC₅₀: concentración inhibitoria de 50% de DPPH).

Los valores del cuadro anterior nos muestran un rango de IC₅₀ que va desde 191 a 51 µg/ml. La especie que presenta la IC₅₀ más baja es el mortiño (IC₅₀ = 51.16 µg/ml).

5.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu.

5.2.1. Curva de calibración del ácido gálico como sustancia de referencia.

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA
125	2.527
75	1.373
25	0.492
5	0.062

Cuadro 5: Curva de calibración del ácido gálico como sustancia de referencia.

Una vez que se realizó la curva de calibración se obtuvo la siguiente ecuación de la recta:

$$\text{Absorbancia} = 0.020 (\text{concentración UAG}) + 0.046$$

Para expresar el contenido de compuestos fenólicos como (UAG) Unidades de Ácido Gálico despejamos la concentración en la ecuación anterior y obtenemos:

$$UAG = \frac{\text{Absorbancia} - 0.046}{0.020}$$

De esta manera se puede realizar el cálculo de UAG en cada una de las especies vegetales; los datos obtenidos son los siguientes:

ESPECIE VEGETAL	ABSORBANCIA MEDIA	UAG
Maíz morado (ecotipo 1)	1.90875	94.54
Maíz morado (ecotipo 2)	0.3175	15.97
Mortiño	0.973	48.21
Ataco	1.0345	51.26

Cuadro 6: Cuantificación de fenoles totales. (UAG: Unidades de Ácido Gálico).

Luego de analizar los datos del cuadro N° 6 se concluye que el rango de variación de UAG va de 94.54 a 15.97 μ l/ml; siendo el maíz morado 1 la especie vegetal con mayor concentración de ácido gálico con UAG= 94.54.

5.2.3 Determinación de actividad antioxidante por método del anión superóxido.

Los extractos estudiados fueron evaluados en su capacidad atrapadora del radical superóxido. Se evaluaron los extractos totales, según la metodología descrita en (4.5).

A continuación se muestran las gráficas obtenidas al monitorear la absorbancia de las muestras en función del tiempo. El tiempo en segundos se representa en las ordenadas y la absorbancia en las abscisas. El dato de absorbancia empleado para el cálculo del porcentaje de atrapamiento del radical superóxido se obtuvo al estabilizar la lectura de absorbancia.

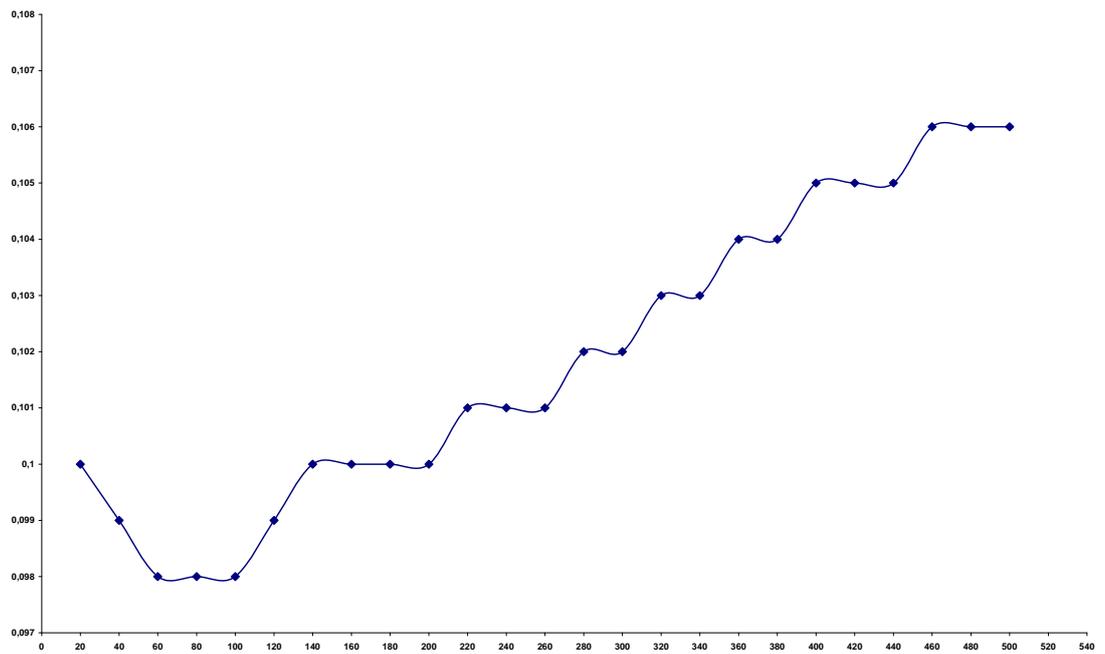


Gráfico 1: Tiempo (en segundos) vs. Absorbancia del maíz (ecotipo1)

Absorbancia máxima: 0.107

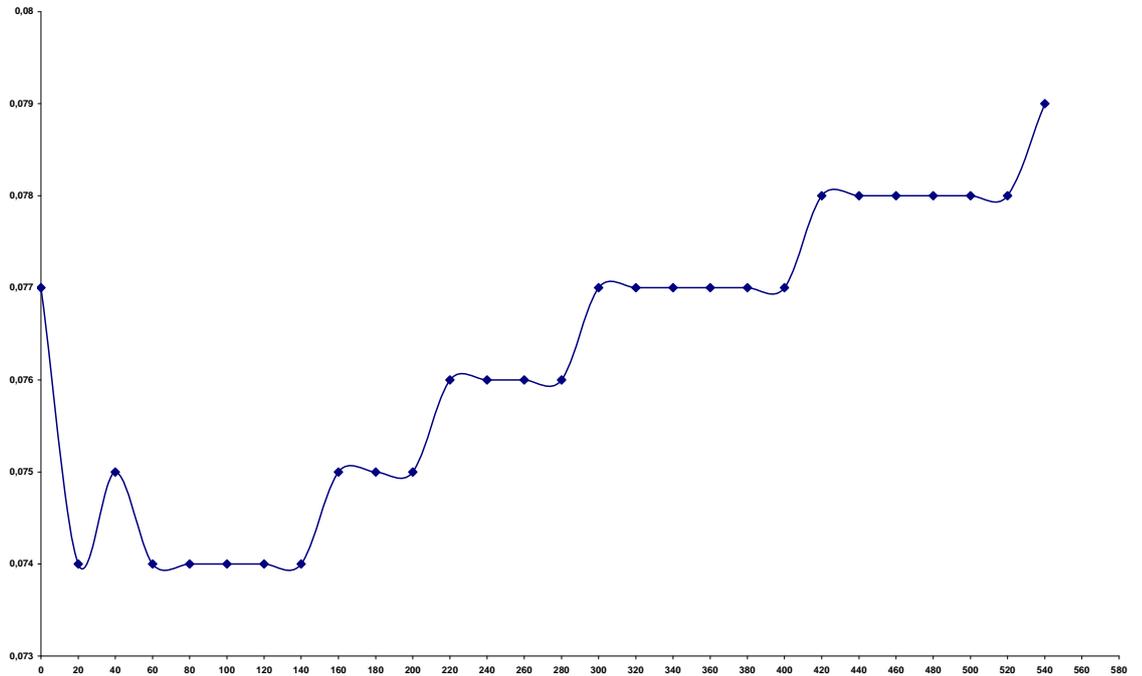


Gráfico 2: Tiempo (en segundos) vs. Absorbancia del maíz (ecotipo 2)

Absorbancia máxima: 0.079

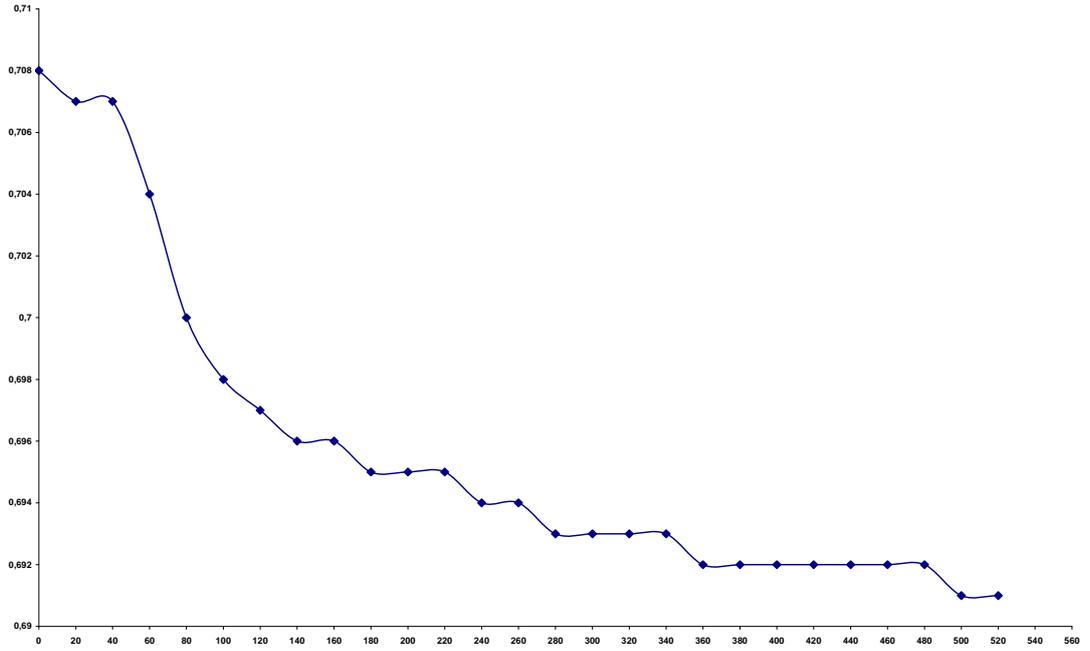


Gráfico 3: Tiempo (en segundos) vs. Absorbancia del Mortiño

Absorbancia máxima: 0.708

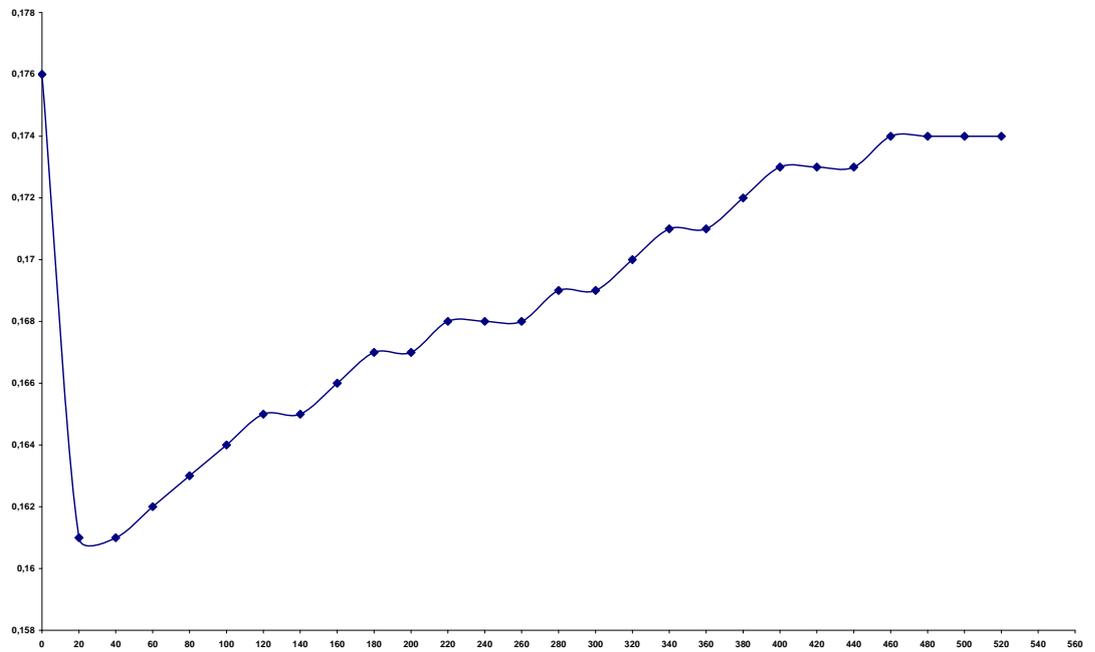


Gráfico 4: Tiempo (en segundos) vs. Absorbancia del Ataco.

Absorbancia máxima: 0.174

Una vez que se ha determinado la absorbancia máxima de cada una de las especies vegetales, se procedió a realizar el cálculo del porcentaje de atrapamiento del anión superóxido que se expresa mediante la inhibición del máximo de la muestra en comparación con el control y se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{atrapamiento} = \frac{E - S}{E} \times 100$$

E= A- B

S= C- (B+D)

A= densidad óptica del control

B= densidad óptica del blanco del control

C= densidad óptica de la muestra

D= densidad óptica del blanco de la muestra

Los datos del porcentaje de atrapamiento obtenidos al finalizar el análisis se presentan a continuación:

Especie Vegetal	% Atrapamiento
Maíz (ecotipo 1)	96.29
Maíz (ecotipo 2)	94.15
Mortiño	81.16
Ataco	34.41

Cuadro 7: Porcentaje de atrapamiento del anión superóxido de las especies en estudio

Según el cuadro N° 7 el maíz morado 1 es la especie con un mayor porcentaje de atrapamiento (96.29%).

5.3 Análisis de ADN vegetal por electroforesis

5.3.1 Extracción de ADN vegetal

Una vez obtenido el ADN de las muestras en estudio, se procedió a determinar su pureza. Se realizaron mediciones de absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm; estableciendo una razón entre las lecturas. Los valores de pureza recomendados para el trabajo de electroforesis se encuentran en un rango de 1.8 a 2.0.

A continuación se presentan los rangos de pureza de ADN obtenidos y el promedio para cada especie, que en este caso incluyen dos tipos de maíz comercializados en nuestro medio:

Especie Vegetal	Pureza mínima y máxima	Promedio
Maíz Morado (ecotipo 1)	1.6 -1.76	1.68
Mortiño	1.62 - 1.8	1.72
Ataco	1.5 – 1.66	1.55
Maíz blanco	1.8 – 1.82	1.81
Maíz para canguil	1.85 – 1.91	1.88

Cuadro 8: Valores de pureza del ADN obtenido de cada una de la especies en estudio

5.3.2 Electroforesis de ADN vegetal

La electroforesis de ADN vegetal se realizó según las condiciones descritas en el capítulo referente a Metodología (4.6). Para obtener una mejor resolución del ADN en el gel de agarosa, se ensayaron varias condiciones que incluyeron: concentración del gel, variación de voltaje y cantidad de muestra aplicada.

Los resultados obtenidos fueron registrados como imágenes, las cuales se presentan a continuación, con las condiciones a las cuales se realizó la electroforesis, y la pureza de las muestras aplicadas en la separación.

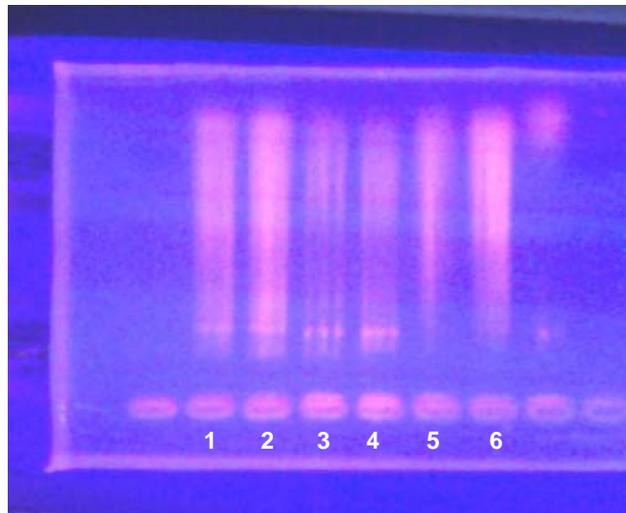


Figura 17: Electroforesis de ADN vegetal N° 1.

N°	ESPECIE	PUREZA
1	Mortiño	1.71
2	Mortiño	1.71
3	Maíz Morado Ecotipo 1	1.65
4	Maíz Morado Ecotipo 1	1.65
5	Ataco	1.54
6	Ataco	1.54
Concentración del gel de agarosa = 1%		
Voltaje = 90 Volt		
Cantidad de muestra = 2µl de loading buffer + 6 µl de ADN		

Cuadro 9: Especificaciones de la electroforesis N°1.

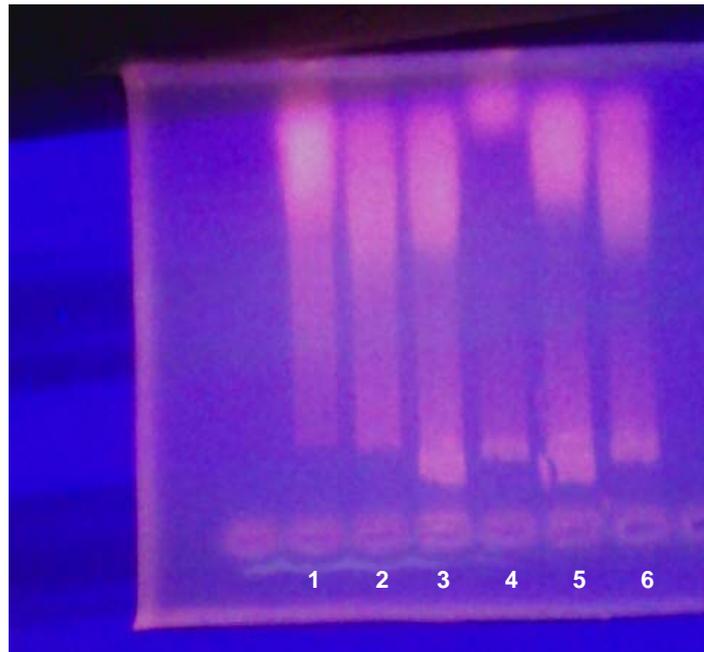


Figura 18: Electroforesis de ADN vegetal N° 2.

N°	ESPECIE	PUREZA
1	Maíz Blanco	1.82
2	Maíz Morado	1.6
3	Mortiño	1.71
4	Mortiño	1.8
5	Mortiño	1.62
6	Ataco	1.66
Concentración del gel de agarosa = 1%		
Voltaje = 60 Volt		
Cantidad de muestra = 2µl de loading buffer + 5 µl de ADN		

Cuadro 10: Especificaciones de la electroforesis N°2.

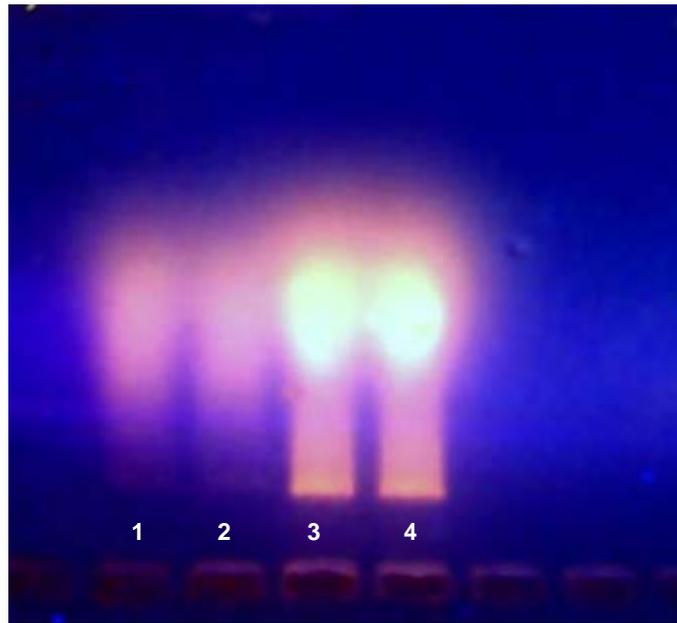


Figura 19: Electroforesis de ADN vegetal N° 3.

N°	ESPECIE	PUREZA
1	Maíz Blanco	1.82
2	Maíz Blanco	1.8
3	Maíz Morado	1.76
4	Maíz Morado	1.76
Concentración del gel de agarosa = 1%		
Voltaje = 60 Volt		
Cantidad de muestra = 2µl de loading buffer + 5 µl de ADN		

Cuadro 11: Especificaciones de la electroforesis N° 3.

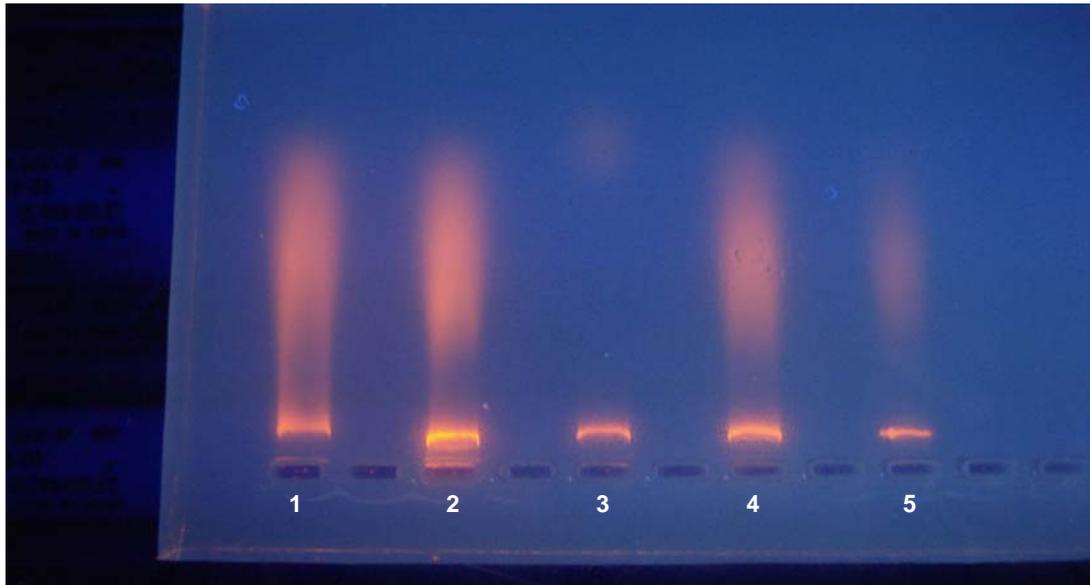


Figura 20: Electroforesis de ADN vegetal N° 4.

N°	ESPECIE	PUREZA	CANTIDAD DE MUESTRA
1	Maíz Morado	1.76	6µl de ADN + 2µl de loading buffer
2	Mortiño	1.71	7µl de ADN y 7µl de glicerol
3	Mortiño	1.8	6µl de ADN + 2µl de loading buffer
4	Ataco	1.5	6µl de ADN + 2µl de loading buffer
5	Ataco	1.5	7µl de ADN y 7µl de glicerol
Concentración del gel de agarosa = 2%			
Voltaje = 60 Volt			

Cuadro 12: Especificaciones de la electroforesis N° 3.

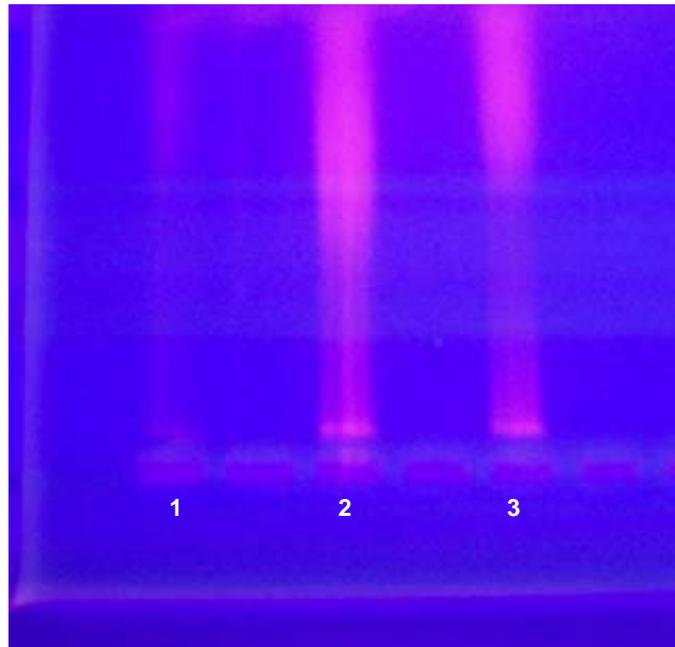


Figura 21: Electroforesis de ADN vegetal N° 5.

Nº	Especie	Pureza
1	Maíz Morado	1.78
2	Maíz Blanco	1.93
3	Maíz Canguil	1.85
Concentración del Gel: 2%		
Voltaje: 60 Volt		
Cantidad de muestra: 5µl de muestra y 2µl de loading buffer		

Cuadro 13: Especificaciones de la electroforesis N° 3.

CAPITULO VI

DISCUSION

6.1 Evaluación de actividad antioxidante de extractos vegetales.

De los resultados obtenidos para las especies vegetales estudiadas se observa que, los extractos de maíz morado proveniente de la región centro - norte de Ecuador, mortiño y ataco capturan el radical libre DPPH. El extracto de mortiño presenta la IC_{50} más baja (51,16 ug/mL); señalándose como la especie más promisoría. En relación a resultados obtenidos en el trabajo de Guamán (2009), se puede relacionar la actividad antioxidante reportada con el contenido de cianidina detectado en el análisis de fenólicos para este extracto.

El extracto de maíz morado obtenido a partir de muestras colectadas en la región de Azuay no es capaz de capturar el radical libre DPPH. Este resultado puede relacionarse con la baja intensidad de la coloración de esta especie. El color característico del maíz morado está en relación con la concentración de cianidina, reportada como flavonoides mayoritario por Guamán, 2009. Es posible que la concentración de este flavonoide sea menor que la del ecotipo 1, y a eso se deba la baja actividad de este extracto en el ensayo de captura de DPPH.

El ensayo de cuantificación de compuestos fenólicos por el Método de Folin-Ciocalteu determinó concentraciones de fenólicos para las especies en estudio en un rango que varía de 15 a 95 UAG. La especie con mayor contenido de compuestos fenólicos es el maíz morado (ecotipo 1), seguido del ataco y mortiño. El extracto de maíz morado proveniente del ecotipo 2 presenta el contenido más bajo de fenólicos (15.97 UAG); lo cual es concordante con la baja actividad antioxidante detectada por el ensayo de captura de DPPH.

En cuanto a la determinación de actividad antioxidante por el método del radical superóxido; el porcentaje de atrapamiento obtenido para cada especie varía de 34% al 97%; siendo el maíz morado (ecotipo 1) aquel que tiene el mayor valor reportado (96.29%); con esto podemos corroborar la información obtenida mediante el método de Folin Ciocalteu y DPPH en donde este maíz representa la especie con una mayor actividad antioxidante.

6.2. Electroforesis de ADN vegetal.

La extracción de ADN vegetal de las especies en estudio fue una de las tareas clave para el desarrollo de electroforesis de calidad que permitan visualizar adecuadamente el patrón de ADN. De las especies en estudio se lograron obtener muestras de ADN de calidad aceptable para el desarrollo de la electroforesis. No obstante, la estandarización de este proceso tomó tiempo y esfuerzo pues el color de las especies en estudio era un factor de interferencia para lograr ADN de pureza adecuada. El ataque presentó rendimientos de extracción menores y fue la especie más difícil para obtener ADN de pureza aceptable.

Para lograr el desarrollo de electroforesis con una buena visualización del ADN de las especies en estudio, se debió estandarizar el protocolo de electroforesis que anteriormente se ensayó en otras especies vegetales. Luego de ensayar con diferentes concentraciones de gel, tiempos de corrida, voltaje y cantidad de muestra como factores que incidían en la calidad de la electroforesis, se logró condiciones óptimas, las cuales son reportadas en la sección Resultados.

De los resultados obtenidos en este trabajo, podemos señalar que el desarrollo de electroforesis a concentraciones de gel de agarosa de 2% y voltaje de 60V son las condiciones adecuadas. La concentración y preparación de muestra varían en relación a la especie y a la calidad de ADN logrado en la extracción.

Para revelar los geles y visualizarlos en el transiluminador, el proceso de inmersión en bromuro de etidio también fue estandarizado. Se determinó que el tiempo de tñido adecuado oscila entre 15 a 20 minutos para lograr una buena visualización. Es necesario tomar las precauciones necesarias para el manejo y descarte de este reactivo, el cual puede ser perjudicial para las personas en contacto y el entorno.

Las electroforesis visualizadas mostraron diferencias debidas a las condiciones experimentales. La concentración del gel de agarosa influyó en el desarrollo de la separación. A diferencia de trabajos anteriores realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales, con las especies estudiadas no se logró un establecimiento de bandas específicas en todos los casos. Cabe destacar que la comparación de las especies en estudio muestra una banda característica al inicio de la electroforesis (ver Electroforesis 1). La comparación del ADN del maíz morado con otras especies de maíz que no presentan color característico mostró ligeras diferencias en los patrones de ADN.

La secuenciación de ADN ha provisto nuevas herramientas para el entendimiento de los caracteres de los cultivos y para la selección de rasgos importantes para el mejoramiento de los cultivos. Los genes que gobiernan la expresión de ciertos caracteres como: altura, color, resistencia, dependen de patrones de herencia cuantitativa y epístasis. Esto significa que existe una interacción entre genes y que la presencia o ausencia de cierto número de genes determina la mayor o menor expresión de estas características. En nuestro caso, el gen *r1*, localizado en el cromosoma 10; regula la producción de pigmentos en la semilla de maíz. La secuencia de este gen produce una variación de color desde el rojo hasta el púrpura. Este gen está siendo usado extensivamente en estudios relacionados a estructura genética, interacción y expresión génica (Gardner, 1998)

En nuestro estudio, la comparación de patrones de ADN de las especies que expresan la producción de pigmentos púrpura; a los cuales se atribuye su actividad antioxidante, revela una similaridad. Es necesario desarrollar nuevos estudios que involucren el uso de enzimas de restricción específicas para las especies, con el fin de establecer patrones específicos de similaridad. A pesar de tratarse de un trabajo preliminar en el área de biotecnología vegetal, los resultados obtenidos nos conducen a establecer un patrón común para las especies analizadas. Además, la comparación de maíces coloreados con especies similares que no expresan color muestra ciertas diferencias. No obstante, estos resultados deberán ser confirmados en estudios posteriores.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos del presente trabajo, se presentan las siguientes conclusiones:

1. La actividad antioxidante de las especies en estudio fue determinada con el método de referencia; atrapamiento del radical libre DPPH, y por el nuevo método puesto a punto en este trabajo: Determinación de la actividad atrapadora del anión superóxido por el método del nitrobluetetrazolium (NTB), sistema hipoxantina /xantina oxidasa.
2. Mediante la realización de estas técnicas, se pudo demostrar la relación entre el potencial antioxidante de las especies en estudio con la producción de pigmentos; los cuales fueron identificados en el trabajo de Guamán, 2009.
3. Las especies evaluadas con mayor potencial antioxidante fueron respectivamente: Maíz Morado (ecotipo 1) (*Zea mays*), Mortiño (*Vaccinium floribundum* K.), Maíz Morado (ecotipo 2) (*Zea mays*) y finalmente el Ataco (*Amaranthus caudatus* L.). Con este resultado se concluye que la concentración de cianidina; flavonoide prevaleciente en el Maíz Morado es responsable de la actividad antioxidante que presenta; de esta manera se ratifica la información obtenida en la investigación de Guamán, 2009.
4. En esta investigación se estandarizaron los protocolos para el proceso de extracción y electroforesis de ADN de muestras vegetales, a partir de hojas y brotes de plántulas. En cuanto a la extracción, se adicionó mercaptoetanol al buffer CTAB para proteger el ADN de enzimas como peroxidasas y polifenoloxidasas y el otro cambio fue reemplazar Fenol: Cloroformo: Isoamil alcohol 24:25:1 en lugar de Fenol: Cloroformo 24:1; para conseguir una mejor desnaturalización de las proteínas; mediante estos cambios efectivamente se obtuvo un ADN con una mejor pureza.

De la misma manera las variantes llevadas a cabo en el proceso de electroforesis permitieron conseguir mejores resultados.

5. En el proceso de electroforesis se presentó una similitud relativa entre las tres especies en estudio, sin embargo en la comparación del maíz morado con dos especies de maíz no pigmentadas se pudieron observar ciertas diferencias. Es recomendable la realización de estudios posteriores en los cuales se utilicen enzimas de restricción que nos permitan instaurar patrones específicos de similitud entre las especies en cuanto a la actividad antioxidante; para de esta manera, confirmar los resultados obtenidos en esta investigación.

BIBLIOGRAFIA

ALTIERI, M. Como parte de la Iniciativa del Artículo 13: Maíz y biodiversidad: Efectos del maíz transgénico en México. México. 1995. <www.agroeco.org/doc/alt.contam-maiz.pdf> Consulta: Septiembre de 2008.

ÁLVAREZ, E., JIMÉNEZ, O., POSADA, C., ROJANO, B., GIL, J., GARCIA, C., DURANGO, D. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género vismia (guttiferae). Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Medellín – Colombia. 2008. [http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php?journal=vitae&page=article&op=view&path\[\]=781&path\[\]=673](http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php?journal=vitae&page=article&op=view&path[]=781&path[]=673). Vol. 15, No. 1. Pág. 165-172. Consulta: Noviembre del 2008.

BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. Editorial Kapelusz. 2000. Pág. 1275-1280.

FUNDACIÓN EROSKI, Arándanos. España. 2008. <<http://frutas.consumer.es/documentos/frescas/arandano/salud.php>. Consulta: Febrero del 2009.

FRACCAROLI, M. Passiflora spp: Metabolomic Approach to study bioactive compounds. Report. Leiden University. Pharmacognosy Department. Holanda. 2007.

GARDNER, E., SIMMONS, M., SNUSTAD, P.,. Principios de Genética. México. Editorial Limusa. 1998. Cuarta Edición.

HASLAM, E. Chemistry of Vegetable Tannins. Academic Press, New York.1966.

HERRERA, R. Apuntes del Seminario Taller: “Uso de Marcadores Moleculares en Identificación y Tipificación de Especies Vegetales”. Universidad del Azuay. Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales. Cuenca- Ecuador. 2008.

KOMSAM, A., PARANPEE, A., TINNAGON, T. Nutrient Evaluation of New Feed Stuff, Purple Field Corn, for Poultry Feed. Faculty of Animal Science Rajamangala University of Technology Lanna, Phitsanuloke, Thailand. 1987. <http://www.nan.rmutl.ac.th/webnew/job/new/180450.pdf>.

KUSKOSK, M., ASUERO, A., TRONCOSO, A., MANCINI, J., FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Campinas- Brasil. 2005. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000400016 25(4). Pág. 726-732. Consulta: Octubre del 2008.

LIMA, M., FONSECA, M., DE FRANCA, J., SILVEIRA, V., TATSUO, L. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de daño oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Brasil. 2007. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01000422007000500046&script=sci_arttext .Quim. Nova, Vol. 30, No. 5: Pág. 1323-1338. Consulta: Febrero del 2009.

MAUREEN, A., PRIETO, E. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. Cuba. 1997. http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol18_1_99/ibi04199.pdf. Vol.18 No. 1. Pág. 4-12. Consulta octubre del 2008.

MANIAK, B., TARGONSKI, Z. Antioxidant naturally occur in food.. Polonia. Przem. Ferm. Owoc. Warz 1996. Pág. 7-9.

MARTÍNEZ, I., PERIAGO, M., ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Publicación Oficial de Sociedad Latinoamericana de nutrición. México. 2000. http://www.nutricionemexico.org.mx/alan/2004_1_12.pdf. Volumen 50-Nº1

MARTÍNEZ, M. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Colombia. 2005. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>. Consulta: Febrero 2009.

NUTRACEUTICALS WORLD, Diabetes tratamiento con maíz morado, España, 2009. <http://zaragoza.campusanuncios.com/trabajo-1381171812X-DIABETES-TRATAMIENTO-Zaragoza.html>. Consulta: Mayo del 2009

PALACIOS, R., VILLOSLADA, P. Conceptos básicos de genética molecular. Laboratorio de Neuroinmunología, Centro de Investigación Médica aplicada, Universidad de Navarra. España. 2005. http://www.arsxxi.com/pfw_files/cma/ArticulosR/NeurologiaSuplementos/2005/01-03/119030500040013.pdf. Supl 1(3) Pág. 4-13. Consulta: Mayo del 2009.

POKORNY, J., 1987. Major factors affecting the autoxidation of lipids. Editorial: H.W.S. London. 1987. Pág. 141-206.

SANJINÉS, A., OLLGAARD, B., BALSLEV, H. Frutos comestibles. Botánica Económica de los Andes Centrales La Paz- Bolivia. Editores: M. Moraes R., B. Ollgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev .Universidad Mayor de San Andrés. 2006. <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2021.pdf> . Pág. 329-346. Consulta: Noviembre del 2008.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. Champaign, Illinois. Edición de Shaidi F. 1997.. Pág. 97-132

SHAHIDI, F., JANITHA, P., WANASUNDARA, P. Phenolic antioxidants. Critical reviews in Food Science and Nutrition. EEUU-Illinois. 1992. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-7602009000100009&Ing=pt&nrm=iso&tIng=pt. Vol 32.No. 1. Pág. 67-103.

SHAHIDI, F., TANG HO, C. Antioxidant Measurement and Applications, ACS Division of Agricultural and Food Chemistry, EEUU. 1992. Pág. 326

VALLS, V. Papel Antioxidante de los alimentos de origen vegetal. Vitaminas y Polifenoles. Facultad de medicina, Universidad de Valencia. España. 2003. http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-16112005000300008&script=sci_arttext Consulta: Noviembre del 2008.

WECKWERTH, W .Metabolomics in Systems Biology. EEUU. 2003. Annu. Rev. Plant. Biol. 54 .Pág. 669-689

WHITE, A. Hierbas del Ecuador, Hierba Mora. Ecuador. Editorial Curvan-Caya. 1976. Pág. 63

SICA. Mortiño. 2008. <http://www.sica.gov.ec/> Consulta: Enero del 2009.

ZAMORA, J. Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud. Revista Chilena de Nutrición. Universidad de Costa Rica. 2007. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182007000100002&script=sci_arttext Vol. 34, N°1.

ANEXOS

Anexo 1: Equipos utilizados para la determinación de la actividad antioxidante.



Figura 21: Aparato de Soxhlet y rotavapor utilizados en la extracción de pigmentos para la determinación de la actividad antioxidante.

Anexo 2: Equipo utilizado para la electroforesis de ADN.



Figura 22: Equipo de electroforesis (cama y fuente de energía)