

UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERIA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TRABAJO EXPERIMENTAL:

COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CUATRO
METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA PLANTA AMAZÓNICA
Banisteriopsis caapi (AYAHUASCA) FRENTE A LA N-ACETIL CISTEINA,
FÁRMACO ANTIOXIDANTE COMERCIAL

AUTORA:

FABIOLA MICHELLE BRAVO BERNAL

TUTOR:

ING. PABLO ARÉVALO MOSCOSO. PhD

CUENCA-ECUADOR

2018

CESIÓN DE DERECHOS DEL AUTOR

Yo, Fabiola Michelle Bravo Bernal, con documento de identidad N° 0105567564, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CUATRO METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA PLANTA AMAZÓNICA *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) FRENTE A LA N-ACETIL CISTEINA, FÁRMACO ANTIOXIDANTE COMERCIAL**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora, me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que entrego el trabajo en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, octubre del 2018



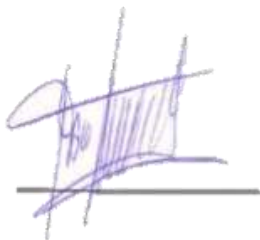
Fabiola Michelle Bravo Bernal.

CI. 0105567564

CERTIFICACIÓN

Yo, Pablo Wilson Arévalo Moscoso, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo titulación: **COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CUATRO METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA PLANTA AMAZÓNICA *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) FRENTE A LA N-ACETIL CISTEINA, FÁRMACO ANTIOXIDANTE COMERCIAL**, realizado por Fabiola Michelle Bravo Bernal, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, octubre del 2018.



Dr. Pablo Wilson Arévalo Moscoso PhD

CI. 0102156957

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Fabiola Michelle Bravo Bernal con cédula de identidad N° 0105567564 autora del trabajo de titulación: **COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CUATRO METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA PLANTA AMAZÓNICA *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) FRENTE A LA N-ACETIL CISTEINA, FÁRMACO ANTIOXIDANTE COMERCIAL**, certifico que el total contenido total del *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, octubre del 2018



Fabiola Michelle Bravo Bernal

CI. 0105567564

DEDICATORIA

La vida se encuentra plegada de retos, desde el momento mismo en el que nos comprometemos a vivirla, primero está la escuela, el colegio, actividades extras, la universidad, y cuando menos te das cuenta, esta etapa va terminando y puedes decir, un reto más cumplido.

Por eso, esta tesis la dedico principalmente a mis padres, los promotores de mis sueños, los protagonistas de mi cuento. A ellos que estuvieron conmigo en todo momento, que me dieron su apoyo incondicional, su inmenso cariño y comprensión. A los que con su ejemplo y valores formaron la persona que soy ahora, a los que sin importar nada me dieron todo.

Y en especial la dedico a mi abuelito Bolívar Bernal, quien me impulsó a seguir esta carrera, y aun que él ya no esté aquí conmigo, creo que le hubiera enorgullecido grandemente, este título próximo a obtener. Él siempre fue un ejemplo de valor, trabajo, perseverancia, honestidad y más que todo responsabilidad. No buscaba la perfección, buscaba que las cosas estén bien hechas y que se haya hecho con el esfuerzo necesario. Poco a poco yo fui aprendiendo eso de él, desde niña cuando no podía un ejercicio y primero teníamos que iniciar con la ley de los signos o, cuando en el colegio no sabía formular y revisábamos desde la formación de la tabla periódica, esto fue calando muy fuerte en mí, para entender que en la vida no tienes que saber todo, tienes que aprender a llegar al inicio de las cosas para poder entenderlas, nada más.

Y aun que me hubiera encantando compartir este logro con él, yo sé que, desde el cielo, me ve y junto con mis demás seres queridos que no están ya conmigo, me dan su bendición y de la mano de la Auxiliadora y Dios, celebran este triunfo conmigo y mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco primero a Dios y a la Auxiliadora, porque han sido ellos mi luz y guía durante todo este caminar y mi vida en general.

A mis padres, por su lucha diaria e inagotable por hacer de mi hermano y de mí, personas de bien y buenos profesionales. Por haberme dado esta hermosa familia, los estudios y todo lo necesario para culminarlos. Por enseñarme a dar desde mis primeros pasos hasta por permitir que pueda abrir mis alas y volar, gracias porque sin ellos no sería nada y no tendría nada. Gracias por tanto amor y protección.

A mi hermano, que siempre con sus bromas me ha dado la valentía para seguir y la responsabilidad de ser un buen ejemplo para él.

A mis abuelitos por ser uno de los pilares fundamentales en mi vida, aquellos que me han brindado su apoyo y mano generosa en todo momento. Y han contribuido en mi formación.

A mi tutor de tesis, Dr. Pablo Arévalo, que con sus conocimientos ha sabido guiar mi trabajo de titulación y mi formación profesional.

A mis maestros que me han acompañado a lo largo de la carrera, que a ejemplo de Don Bosco me han educado con su sistema preventivo, es decir con el corazón.

A la Universidad Politécnica Salesiana, por brindarme la oportunidad de tener una carrera y formarme como buena cristiana y honrada ciudadana.

Y por último y no menos importante agradezco a mis amigos de la universidad, que a lo largo de este camino más que compañeros se fueron convirtiendo en esa familia que escogemos, gracias por sus risas, consejos, cariño, amistad incondicional, gracias por hacer de esta etapa, una de los mejores de mi vida. Hay mucho que recordar, pero nos queda muchos más por vivir. Siempre los llevaré en el corazón.

RESUMEN

La Región Amazónica Ecuatoriana, representa una de las áreas más ricas en biodiversidad del planeta con una gran fuente de metabolitos secundarios para el sector farmacéutico, cosmético y alimenticio, dado que estos son utilizados como principios activos por las distintas acciones terapéuticas que poseen. Determinando que en los últimos años se ha generado un auge que busca nuevos compuestos bioactivos, que replacen a moléculas sintéticas, se realizó el presente estudio el mismo que se enfoca, en la comparación de la capacidad antioxidante de cuatro metabolitos secundarios presentes en la planta amazónica *Banisteriopsis caapi*, ayahuasca frente al fármaco comercial N-acetil cisteína, (FLUIMUCIL ®). Para lo cual se ejecutó un tamizaje fitoquímico, identificando la presencia de flavonoides, alcaloides, cumarinas, lactonas, triterpenos, taninos y saponinas, en cuatro fracciones purificadas, siendo estas clorofórmica, acuosa, metanólica y etanólica, las mismas que fueron cuantificadas posteriormente determinando que: la fracción metanólica y etanólica poseen una gran cantidad de taninos, saponinas y flavonoides, mientras que la clorofórmica de alcaloides. Finalmente, al evaluar la capacidad antioxidante se evidenció que de los cuatro metabolitos cuantificados, los flavonoides tienen mayor porcentaje de captación de radicales libres con 89,65% mientras que el patrón de estudio N-acetil cisteína 92,84%, rechazando la hipótesis planteada en el estudio, sin embargo, se manifiesta una presencia significativa de capacidad antioxidante, siendo un importante precedente para el estudio fitoquímico de esta especie amazónica teniendo en cuenta que la presente investigación fue la primera en determinar la concentración cuantitativa de los metabolitos secundarios de la ayahuasca.

Palabras claves: extracto etanólico total, metabolitos secundarios, fracciones, capacidad antioxidante.

ABSTRACT

The Amazon Region of Ecuador has an abundant biodiversity, one of the richest in the planet. It is a great source of secondary metabolites for the pharmaceutical, cosmetic, and food production sectors; these are used as active precursors given their distinct therapeutic activities. Because of the recent, intensified search for new bioactive compounds to replace synthetic molecules, the present study had as main objective and focus the comparison of the antioxidant capabilities of four secondary metabolites found in the amazon plant *Banisteriopsis caapi* (ayahuasca) with the commercial drug N-acetil cisteina, (FLUIMUCIL ®). As a first step, a phytochemical screening was performed on four purified fractions with different solvents: chloroform, water, methanol, and ethanol. The presence of distinct components was detected and identified in these portions, components such as flavonoids, alkaloids, coumarins, lactones, triterpenes, tannins, and saponins. Upon further study and quantification, it was found that the methanol and ethanol fractions had a great number of tannins, saponins, and flavonoids while the chloroform fraction had a great number of alkaloids. Finally, after an evaluation of the antioxidant powers of these four metabolites, we concluded that flavonoids have the highest antioxidant capacity; they can neutralize about 89.67% of free radicals. This percentage is lower than the one observed in the N-acetil cisteina standard of 92.84% which rejects the hypothesis introduced at the beginning of this study. Nevertheless, and given that this is the first quantification of these metabolites in literature, this study sets an important precedent in reference to the high antioxidant capacity of the ayahuasca plant.

Key words: total ethanolic extract, secondary metabolites, fractions, antioxidant capacity.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES.....	1
1.1. Introducción	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Pregunta de investigación	5
1.4. Justificación	5
1.5. Objetivos.....	8
1.5.1. Objetivo general	8
1.5.2. Objetivo específico.....	8
1.6. Hipótesis	9
1.7. Limitaciones del problema.....	9
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO	10
2.1. Marco referencial	10
2.2. Marco conceptual.....	16
2.3. Fundamento teórico	21
2.3.1. Ayahuasca (<i>Banisteriopsis caapi</i>).....	21
2.3.2. Metabolitos secundarios.....	26
2.3.3. Métodos de extracción y purificación	35
2.3.4. Métodos cuantitativos	40
2.3.5. Antioxidantes	43
CAPÍTULO 3 MARCO METODOLÓGICO	50
3.1. Tipo y diseño de investigación	50
3.2. Población y muestra.....	50
3.3. Variables	51
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	52
3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	52
3.6. Procedimiento	53
• Fase 1. Recolección de la muestra	53

3.6.1. Identificación de población y toma de muestra.....	53
3.6.2. Preparación de la muestra	54
3.6.3. Obtención del extracto etanólico total.....	55
• Fase 2. Caracterización cualitativa	57
3.6.4. Fraccionamiento y purificación del extracto.....	57
3.6.5. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios	58
• Fase 3. Cuantificación de metabolitos	62
3.6.6. Cuantificación de saponinas.....	62
3.6.7. Cuantificación de Alcaloides	64
• Fase 4. Capacidad antioxidante.....	70
3.6.8. DPPH.....	70
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
4.1. Obtención del extracto etanólico total	73
4.2. Fraccionamiento y purificación del extracto.....	74
4.3. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios.....	74
4.4. Determinación cuantitativa de metabolitos secundarios.....	76
4.4.1. Cuantificación de alcaloides.....	76
4.4.2. Cuantificación de flavonoides.....	77
4.4.3. Cuantificación de taninos	78
4.4.4. Cuantificación de saponinas.....	79
4.5. Determinación de la capacidad antioxidante	82
4.6. Comparación de la capacidad antioxidante.....	84
4.6.1. Comparación de la capacidad antioxidante de los metabolitos de interés, frente al extracto etanólico total	84
4.6.2. Comparación de la capacidad antioxidante de los metabolitos de interés, frente al patrón de estudio, N acetil – cistena	87
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	92
5.1. Conclusiones	92

5.2. Recomendaciones	95
BIBLIOGRAFÍA.....	96
ANEXOS.....	102
ANEXO A. Reacciones positivas tras las prueba de caracterización cualitativa de las fracciones más representativas.	102
ANEXO B. Equipos utilizados a lo largo de la investigación	103
ANEXO C. Curvas de calibración	105
ANEXO D. Tablas de concentraciones de DPPH.....	107

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Planta amazónica ayahuasca	21
Ilustración 2. Esquema de metabolito secundario.....	26
Ilustración 3. Estructura química de algunos compuesto fenólicos.....	31
Ilustración 4. Cromatografía en capa fina.....	37
Ilustración 5. Cromatografía en columna.....	38
Ilustración 6. Cuadro de elución y polaridad de compuestos	39
Ilustración 7. Equipo de HPLC con sus partes	43
Ilustración 8. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante ..	49
Ilustración 9. Mapa de la zona de recolección de la muestra en estudio	54
Ilustración 10. Hojas y tallos de ayahuasca, lavados	55
Ilustración 11. ETT, previo al proceso de filtración.	56
Ilustración 12. a) Filtración del extracto; b) evaporación del solvente/ rotavapor	56
Ilustración 13. a) Preparación de la columna; b) Columna con ETT; c) Purificación	58
Ilustración 14. ETT y fracciones clorofórmica, metanólica, etanólica y acuosa	59
Ilustración 15. Histograma de la cantidad de metabolitos presentes	81
Ilustración 16. Histograma del porcentaje de la capacidad antioxidante de los metabolitos de interés y ETT.....	82
Ilustración 17. Diagrama de caja y bigotes	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>Banisteriopsis caapi</i>	22
Tabla 2. Clasificación de terpeno según sus unidades de Isopreno	29
Tabla 3. Preparación de estándares para la curva de calibración	65
Tabla 4. Preparación de soluciones patrones	71
Tabla 5. Porcentaje de rendimiento de extracción	73
Tabla 6. Caracterización cualitativa de la planta <i>B. caapi</i>	75
Tabla 7. Cuantificación de alcaloides en la fracción etanólica y clorofórmica	76
Tabla 8 . Cuantificación de flavonoides en la fracción etanólica y metanólica	77
Tabla 9. Datos obtenidos de la cuantificación de taninos	78
Tabla 10. Datos obtenidos tras la cuantificación de saponinas	79
Tabla 11. Prueba de normalidad con Shapiro-Wilks	85
Tabla 12. ANOVA	86
Tabla 13. Prueba de Dunnett	87
Tabla 14. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilks	88
Tabla 15. ANOVA	89
Tabla 16. Prueba de Dunnet	90

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1.Introducción

Somos un continente que tiene una amplia riqueza natural y por ende un amplio reservorio de moléculas con potenciales aplicaciones en distintas áreas, como la salud, alimentos, cosméticos, servicios ambientales, entre otras. Por lo que se considera necesario la investigación de las especies, especialmente de aquellas que no han sido estudiadas científicamente para su posible aprovechamiento industrial (Morales, Sanabria, Vásquez., 2013).

Gran parte de la flora, ha sido utilizada por nuestros ancestros en el campo medicinal, generando saberes tradicionales que se han ido puliendo a través del tiempo, por el rigor científico de análisis químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos (Venegas, 2012).

Por ende, el estudio fitoquímico de las plantas es esencial, debido a que este nos permite identificar, cualificar y cuantificar los metabolitos secundarios, los cuales son responsables de la acción terapéutica y con ello se fundamenta una base científica para su uso apropiado, verificando así su bio-actividad y su potencial medicinal. Reconociendo de esta manera que la obtención y análisis de los mismos, es uno de los temas de mayor interés en la actualidad, dado que son productos naturales que se utilizan como

medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. Por lo que se apegan a las tendencias actuales del remplazo y consumo de productos naturales por los sintéticos. Ya que, según Castro, et al., (2016), a medida que la tecnología avanza y crece un mundo más globalizado, se genera la conciencia de que el universo químico natural es un arsenal de sustancias y compuestos de gran valor terapéutico.

Por otro lado dentro de esta investigación se destaca que una de las problemáticas actuales es el estrés oxidativo y sus efectos adversos en la salud humana, con enfermedades tales como el cáncer, alzheimer, envejecimiento prematuro, entre otras, por lo que ha llegado a ser un tema de mucho estudio dentro de los campos biológico, medicinal, nutricional y agroquímico (Magalhães, Santos , Segundo , Reis , & Lima , 2010). De acuerdo a lo que establece la bibliografía, se ha encontrado que entre los metabolitos secundarios con actividad antioxidante son aquellos que contienen grupos fenólicos y nitrogenados, en su estructura (Valentão , Fernandes , Carvalho , & Andrade , 2002). Sin duda se puede estudiar la planta amazónica Ayahuasca, ya que la misma posee los metabolitos con estructuras antes mencionadas, sustentando de esta manera el presente estudio, que tiene como objetivo comparar la capacidad antioxidante que poseen cuatro metabolitos secundarios presentes en la planta amazónica *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca) frente a N-acetil cisteína (FLUIMUCIL ®).

1.2.Planteamiento del problema

El 90% de los agentes químicos utilizados actualmente en la industria especialmente en los fármacos, son derivados del petróleo. Miles de millones de sustancias creadas en los laboratorios, son vertidas en el ambiente generando un gran impacto sobre los ecosistemas y la población (Navarro , Nuñez, & Cebrián, 2012). Por lo que la filosofía de productos sostenibles, orgánicos y naturales está teniendo un muy importante impacto en el mercado de los fármacos, cosméticos y más productos especialmente en América y Europa. Y este auge es cada vez mayor debido a la educación ambiental que la población va adquiriendo. La misma que promueve una disminución del uso de compuestos sintéticos, especialmente de aquellos derivados del petróleo.

Teniendo en cuenta que el Ecuador se ha caracterizado siempre por ser uno de los países con mayor biodiversidad y riqueza en conocimientos ancestrales, relacionados con el uso de las plantas medicinales (Jaramillo, Espinoza, D'Armas, Troccoli, & de Astudillo, 2016) nuestra flora se convierte en una fuente de investigación de interés constante, especialmente para el desarrollo de nuevas materias primas en el campo industrial (Radice & Vidari, 2005). Pero a pesar de ello, hay ausencia de información sobre el contenido de metabolitos secundarios y evaluación de acciones terapéuticas de la mayoría de plantas endémicas, tal es el caso que se manifiesta que en la naturaleza existe

prácticamente medio millar de especies de plantas superiores, sin embargo, de todas ellas un porcentaje de apenas del 5 al 10%, han sido investigadas respecto a su composición química, relación estructura-función o actividad biológica (Varas, 2014).

Otra problemática relacionada con esto, es el caso de algunas plantas, como la ayahuasca, planta amazónica, la misma que es estudiada por su amplia cantidad de alcaloides y por ser ingrediente principal de una bebida psicoactiva que genera alucinaciones, existe poca literatura que proporcione un enfoque diferente que genere información fitoquímica de otros metabolitos que se encuentran presentes, los cuales podrían ser estudiados, para la verificación de su efectividad ante distintos problemas terapéuticos y comparación ante fármacos comerciales derivados sintéticamente, que pueden ser remplazados por estos compuestos.

Por otro lado en las últimas décadas, dentro de la salud una de las áreas que más ha destacado, es la búsqueda de nuevos antioxidantes naturales para el control de enfermedades neurodegenerativas, en las cuales está implicado el daño oxidativo. En este sentido, los extractos de plantas y diferentes clases de fitoquímicos han demostrado ser una fuente importante de compuestos con marcada actividad antioxidante, permitiendo el crecimiento acelerado de investigaciones en esta área.

1.3. Pregunta de investigación

El incremento de la utilización de productos naturales ha llevado a realizar amplias investigaciones sobre recursos naturales, que puedan remplazar o potenciar la actividad de las moléculas presentes en los fármacos. Debido a esto se plantea, las siguientes preguntas de investigación.

¿Uno de los cuatro metabolitos estudiados de la planta amazónica *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA), tienen mayor o menor capacidad antioxidante que la N-acetil cisteína, fármaco antioxidante comercial?

¿Se puede validar la bibliografía encontrada sobre la especie en estudio, con los análisis que se realizarán dentro de la investigación?

1.4. Justificación

Apoyando el auge de los productos naturales, especialmente en el campo de la salud durante los últimos años se ha venido promoviendo el remplazo de moléculas sintéticas por naturales, siendo estas provenientes de sustancias generadas por las plantas como son los metabolitos secundarios, por lo que según Castro, et al. (2016), la

importancia del análisis de estos metabolitos, radica en el desarrollo de nuevas técnicas más rápidas y efectivas al momento del aislamiento y determinación de la acción terapéutica de los mismos, por lo que el interés es cada vez mayor por aprobar y apoyar investigaciones que lleven al descubrimiento de las distintas acciones de metabolitos que puedan ser aprovechados en la industria.

Las plantas por su complejo metabolismo, son un verdadero depósito químico (Savithramma, Linga, & Suhrulatha, 2011) por lo que su utilización como agentes de la salud es muy conocido en múltiples culturas del mundo como es el caso de los pueblos y nacionalidades de la Amazonía ecuatoriana que tienen una amplia sabiduría ancestral, lo cual es su legado más grande. Ellos poseen sus conocimientos desde una cosmovisión profunda caracterizándose por tener un modo de vida espiritual, en un entorno de respeto y culto a la naturaleza, tanto es así que las plantas que utilizan las denominan “sagradas y visionarias”, dados los vastos poderes curativos que las mismas poseen. La planta más utilizada en sus ritos de sanación es la ayahuasca o conocida también como natem, que sin duda constituye un gran poder fitofarmacéutico debido a su uso como tratamiento para mejorar el desempeño de las personas, sanar quebraduras, paperas, dolores internos, externos, fiebre, gripe, infecciones, inflamaciones y más (Mashinkias, 2012). Pero a pesar de todas estas propiedades descritas, que son recolectadas de saberes ancestrales, no existen muchas investigaciones enfocadas a sus metabolitos como agentes terapéuticos, por lo que es una gran oportunidad para estudiarla y darla a conocer.

Por otra parte teniendo en cuenta los poderes curativos de esta planta, se manifiesta que puede ser útil también ante el estrés oxidativo, tomándola como un antioxidante natural, teniendo en cuenta que el ser humano necesita radicales libres para realizar procesos biológicos como lo es el transporte de electrones, la regulación de la presión sanguínea, el control de las infecciones, entre otros (Buitrago et al., 2004); sin embargo, la acumulación excesiva de estos agentes en el organismo puede provocar daños en las células, originando degeneración de los tejidos, lo que conlleva al desarrollo de diferentes enfermedades. Y la manera más efectiva de evitar el daño producido por dichos radicales es su destrucción o estabilización por parte de antioxidantes (Vargas, Rivas, Nursamaa, & Zoltan, 2007).

Por todo lo antes mencionado, se ejecutó el estudio, pretendiendo realizar un gran aporte al campo científico investigativo, dentro del área de análisis de metabolitos secundarios dejando una ventana abierta para el remplazo de moléculas sintéticas por naturales.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

- Comparar la capacidad antioxidante que poseen cuatro metabolitos secundarios presentes en la planta amazónica *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca) frente a N-acetil cisteína (FLUIMUCIL ®) para la búsqueda de una alternativa natural ante el fármaco comercial.

1.5.2. Objetivo específico

- Obtener extractos de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca), por medio de maceración alcohólica para la obtención y evaluación de los bioactivos presentes en la planta.
- Fraccionar los extractos, mediante el proceso de cromatografía de columnas, utilizando cuatro distintos solventes, para la obtención de fracciones más puras.
- Caracterizar las fracciones, por medio de procesos fisicoquímicos para la identificación de grupos funcionales, que posean actividad antioxidante

- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto total, de metabolitos presentes en las fracciones obtenidas, como del patrón de estudio, por medio de espectrofotometría para el análisis de moléculas polares y apolares.

1.6. Hipótesis

Si uno de los metabolitos secundarios obtenidas de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca), posee mayor actividad antioxidante que la N-acetil cisteína, entonces se encontraría una alternativa natural para la industria farmacéutica.

1.7. Limitaciones del problema

La presente investigación se llevará a cabo durante el lapso de 6 meses, por lo que uno de los limitantes sería el tiempo y los recursos económicos, causantes que impiden ampliar la investigación, pudiendo analizar otros metabolitos, utilizando otras técnicas, e incluso tomando muestras de distintos pisos climáticos o zonas.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1.Marco referencial

Con el afán de demostrar que los metabolitos secundarios pueden ser importantes ingredientes farmacéuticos y funcionales, se han realizado varios estudios a nivel mundial, para manifestar las propiedades terapéuticas que estos poseen, utilizando distintas técnicas de extracción y análisis. Como es el caso de la investigación realizada por Colina (2016), en Lima-Perú, la cual es de tipo descriptiva. Trabaja con las hojas de la planta *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, un pequeño arbusto al cual los nativos le atribuyen propiedades curativas. Para el estudio se tomó como muestra las hojas y se realizó una extracción de metabolitos mediante un macerado con cuatro distintos solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, etanol y metanol los cuales se sabe que arrastran grupos fenólicos, luego se hizo una determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, utilizando métodos espectrofotométricos, seguido de una evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de las mismas, los cuales según la autora los identifica como compuestos antioxidantes. Y dado el análisis microbiológico se mostró que los mismos también tienen efecto antimicrobiano.

Castro (2015), en Colombia realizó una investigación de tipo descriptiva, titulada “CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL CITOTÓXICO DE *Iresine spiculigera* Seubert (AMARANTHACEAE)”, la misma que fue dividida en dos fases. En la primera se llevó a cabo la caracterización de los metabolitos secundarios, los mismos que fueron extraídos mediante maceración con etanol al 96% y purificados por el método de cromatografía en columna utilizando 13 distintas fracciones con distintos solventes polares y cuantificándolos por medio de espectrofotometría de absorción; mientras que en la segunda se evaluó el potencial citotóxico de la especie. Tras los distintos análisis se demostró que esta planta por su contenido de saponinas, terpenos, taninos, y flavonoides es un bactericida natural de origen vegetal.

Otro estudio relacionado, fue realizado por Espinoza (2014) siendo parte de un estudio local, titulado “DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES EN DOCE PLANTAS MEDICINALES Y SU ACTIVIDAD EXPECTORANTE”, realizado en la Universidad Técnica de Machala. En donde se relacionó el contenido de alcaloides con actividad expectorante de doce plantas medicinales cultivada en el Ecuador. La investigación de tipo experimental se llevó a cabo en dos fases. En la primera se realizó la extracción de los metabolitos mediante maceración obteniendo tres tipos de extractos, uno acuoso, otro alcohólico y el último etéreo, para con estos poder realizar los respectivos estudios químicos cualitativos y cuantitativos en donde se indicó la presencia

de alcaloides en todas las plantas analizadas, mientras que en la segunda fase se desarrolló un estudio pre-clínico sobre animales de experimentación, ratas Wistar, para determinar la capacidad expectorante. Demostrando que de las 12 plantas en estudio, cuatro de ellas tenían esta capacidad, por la cantidad abundante de alcaloides presentes en las especies. Y así como estos existen más investigaciones que demuestran la actividad antitumoral, antiinflamatoria, antiespasmódica, antimicrobiana, antioxidante y antiséptica de los metabolitos secundarios.

Existen estudios que se enfocan en una determinada acción terapéutica, como aquellos que analizan la actividad antioxidante que tienen estos metabolitos, por ejemplo Tobar del Rio en el año 2013, realizó una investigación de tipo experimental, de 30 plantas pertenecientes a 8 distintas familias, recolectadas en las zonas de reserva de la Ecorregión Cafetera en Colombia, para evaluar la actividad antioxidante de los extractos crudos de metanol y diclorometano mediante los métodos del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y del 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico ácido (ABTS). Esta investigación dio como resultado que el 50% de los extractos de metanol evaluados presentaron, en ambos métodos, un porcentaje de actividad antioxidante superior al 25%; por el contrario en los extractos de diclorometano solo fue del 18.5%. Demostrando que las especies en estudio tienen gran capacidad antioxidante, relacionando esta actividad con el contenido de fenoles presentes en la plantas.

En la ciudad también existen varias investigaciones que tienen el mismo enfoque, como es el caso de un estudio de tipo descriptivo, realizado en la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, titulado "DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA C Y COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTOS NATIVOS DEL AUSTRO". Esta investigación enfocó sus estudios hacia los antioxidantes presentes en distintos frutos del austro, como naranjilla, zambo, tuna y tomate de árbol. Por lo que dentro del proceso de análisis utilizaron el método DPPH. En el que fue analizada la capacidad antioxidante de los extractos de las frutas y de la vitamina C comercial, con el objetivo de comparar la capacidad antioxidante de los flavonoides presentes en los extractos versus la capacidad antioxidante de la vitamina C. Dando como resultado que de las cuatro especies estudiadas, el tomate de árbol tiene mayor cantidad de flavonoides, por ende mayor capacidad antioxidante. Y que dentro de la relación existente entre los metabolitos secundarios versus la concentración de vitamina C existe una gran correlación.

Otro estudio que evalúa la capacidad antioxidante es el de Ganitan (2009), teniendo como variable el método a utilizar, ya que en los estudios antes mencionados se distinguen los métodos de DPPH y ABTS, mientras que en esta tesis experimental realizada en Guatemala, se evalúa la actividad antioxidante de cinco especies vegetales utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones de la memoria y los nervios.

Utilizando el método descrito por Muraina en el 2009, el cual utiliza como reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) para determinar la capacidad antioxidante. Por otra parte usa dos extractos uno metanólico y otro de diclorometano, dejando como resultado la evidencia de la actividad antioxidante en cuatro especies vegetales de las cinco estudiadas siendo estas *Brugmansia candida*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Erythrina berteroana* y *Ternstroemia tepezapote*.

Otro estudio representativo es el de Cerón et al. (2011), “Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina”. La investigación realizada es de tipo descriptiva, ya que no interviene ningún estímulo externo dentro del estudio. Enfocándose en la capacidad antioxidante el autor describe que entre los métodos más usados para medir esta actividad, se encuentran FRAP (Ferric Reducing Activity Power), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y los métodos ABTS y DPPH basados en la captación de los radicales libres 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico ácido) y 2,2-difenil-1- picrilhidrazil, respectivamente. En su proceso realiza los cuatro métodos recalando que “uno u otro depende del disolvente empleado para la extracción y la presencia de compuestos (no antioxidantes) que puedan interferir en la medición” descartando así, la sensibilidad o exactitud de cualquiera de los cuatro métodos. Lo interesante en este estudio son las distintas técnicas usadas para la extracción de antioxidantes, siendo estas: extracción por solvente en la cual los autores utilizan acetona, metanol y agua, y la extracción supercrítica, que consiste en la obtención

de extractos de productos naturales mediante la tecnología de extracción con CO₂. Por lo que con respecto a estas técnicas concluyen que “la tecnología más utilizada para la obtención de antioxidantes es el proceso de extracción con solventes, a pesar de que el proceso de extracción con fluidos supercríticos presenta ventajas en cuanto a rendimiento, calidad y capacidad antioxidante del extracto. Sin embargo, los estudios acerca de la tecnología de extracción de antioxidantes usando fluidos supercríticos son pocos en la literatura”. Y se da como resultado general de la investigación que las especies presentan alto contenido fenólico que les confiere propiedades terapéuticas

Dentro de los pocos estudios realizados en *Banisteriopsis caapi*, ayahuasca, existe el artículo publicado por Escobar (2015) el mismo que fue un estudio descriptivo en donde recopila información y describe las características químicas y los efectos del consumo de la ayahuasca para conocer el estado actual de los descubrimientos existentes hasta la fecha sobre sus propiedades farmacológicas. Y manifiesta que debido a los alcaloides presentes en esta especie como β -carbolineas, tetrahidroharmina y harmina, se le atribuye a la planta un efecto antioxidante, que debido a eso la misma es de gran uso terapéutico en patologías relacionadas con estrés oxidativo.

Yankur (2013) en su tesis de pregrado realizada en la Universidad de Cuenca titulada “PLANTAS SAGRADAS Y VISIONARIAS DE LA NACIONALIDAD SHUAR EN LA ASOCIACION SHUAR NANKAIS” describe a la planta ayahuasca

desde el punto de vista tradicional, con saberes ancestrales. La investigación pone en conocimiento la composición química de la planta, la parte botánica y usos tanto medicinales como en rituales. Siendo estas una de las pocas bibliografías que se puede encontrar sobre la planta como tal.

2.2.Marco conceptual

Con la recopilación de los estudios antes descritos, se pudo identificar distintas variables que se encuentran presentes dentro de la investigación las cuales serán presentadas a continuación con el fin de aportar una visión conjunta sobre algunos apartados y su relación entre sí.

Las plantas, organismos autótrofos, aparte de los metabolitos primarios, que son las moléculas más importantes para la vida, cumplen funciones esenciales de crecimiento y desarrollo, pero poseen también metabolitos secundarios (Pedraza, 2008) los mismos que son compuestos con una distribución mucho más limitada y concreta según el ser vivo (Guitierrez, 2009). Dentro de este gran grupo de compuestos bioquímicos sintetizados a partir del metabolismo primario tenemos flavonoides, taninos, terpenos, alcaloides, saponinas, cumarinas, y más. Estos, dentro de la planta cumplen funciones biológicas, por lo que actúan como mediadores, interviniendo en las funciones de la especie vegetal o de los organismos con los que interaccionan, dando respuestas a

innumerables variables (CONACYT, 2014). Por otro lado dentro de la industria juegan un papel importante en la producción de insecticidas, colorantes, medicamentos y más. Siendo esta última un gran campo de aplicación en los últimos años, debido a que se los describen como aquellos que poseen propiedades terapéuticas, como antioxidantes, antitumorales, analgésicos, bactericidas entre otros, por lo que actúan como principios activos de medicamentos y nutraceuticos. Se utiliza también en la industria alimenticia, cosmética y agronómica (García & Carril, 2011). Determinando esto, se plantea los metabolitos secundarios como esenciales para esta investigación ya que se determinó la capacidad antioxidante de cuatro de ellos presentes en la planta ayahuasca, siendo estos taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides. Manifestando que según varios autores los responsables directos de la capacidad antioxidante son los grupos fenólicos, cuya característica es la presencia de un grupo -OH.

Dada la importancia del estudio fitoquímico de los metabolitos se han descrito varios métodos para la extracción y purificación de estos, los mismo que varían dependiendo de múltiples factores, como el tipo de metabolito a extraer, la planta, y la parte de la materia vegetal de la que se realizará el estudio. Definiendo a estos como técnicas físico químicas que permiten la separación de componentes que conforman una mezcla, sometiendo a un tratamiento que la separa en distintas sustancias, manteniendo su identidad sin ningún cambio en sus propiedades químicas. Dependiendo la técnica a utilizar se utiliza distintos solventes, equipos o condiciones de temperatura, que ayudan

en la extracción de los elementos de interés como los metabolitos que se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal (Valderrama, 2008). Ya que son varias técnicas de extracción y purificación, a continuación se describirán las más relevantes para este trabajo. Siendo estas la maceración y cromatografía.

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, en donde la materia prima posee una gran cantidad de compuestos solubles, pudiendo ser la misma una parte vegetal disuelta en el líquido de extracción. Existen varios tipos de maceración siendo estos alcohólica, acuosa u oleosa. Escogiendo el tipo adecuado según la solubilidad de los principios activos de la planta, este proceso forma dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción (López, 2008). Otra técnica de separación, y también purificación es la cromatografía, que se usa para obtener los componentes individuales puros de una mezcla. La separación producida por este proceso, se basa en las características físicas y químicas que posea cada elemento, recalcando la capacidad de interacción de cada componente de la sustancia. El proceso se da cuando las moléculas se distribuyen entre dos fases distintas, y la separación tiene relación directa con la diferencia de solubilidad que muestran algunas moléculas en cada fase. La separación se lleva a cabo al introducir compuestos orgánicos en una fase estacionaria y dejando luego que una fase móvil fluya a través de la mezcla. Cada componente interactúa con la fase

estacionaria y se disuelve en la fase móvil en diferente medida, obteniendo así distintas fracciones (Valderrama, 2008). Como se puede evidenciar la obtención de compuestos, aparte de la técnica, también depende mucho del solvente a utilizar como por ejemplo, los grupos fenólicos son arrastrados por alcoholes (metanol, etanol), los grupos nitrogenados por compuestos de baja polaridad como cloroformo, éter, acetona y las saponinas por compuestos polares como el agua. Por lo que se consideran a los mismos como variable a tratar dentro de este estudio.

Para el proceso fitoquímico, una vez que los metabolitos sean extraídos, también es necesario cuantificarlos ya que se ha confirmado que estos varían su concentración en cada especie por lo que no existe un patrón de producción (Martínez et al., 2012). Dentro de los métodos analíticos más utilizadas para la cuantificación de metabolitos secundarios se encuentra la espectrofotometría, la misma en la que se encuentra un conjunto de técnicas que miden la respuesta de las moléculas en la aportación de energía (Valderrama, 2008). Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se selecciona una longitud de onda determinada y luego se mide la cantidad de luz absorbida por el analito a diferentes concentraciones. Esta técnica se utiliza una vez que la mezcla se haya separado en sus componentes y de esta forma interacciona con la radiación electromagnética (Rojas, Jaramillo, & Lemus, 2015). Dada esta descripción se manifiesta este postulado como una variable dentro del estudio ya que para cuantificar los metabolitos se utilizó espectrofotometría de UV/visible para alcaloides, taninos y

flavonoides, mientras que para saponinas debido al limitado acceso de reactivos y considerando una técnica también eficiente se utilizó HPLC, cromatografía líquida de alta eficiencia.

Como parte final, se presenta también lo relacionado con antioxidantes, ya que es la base del estudio. Según Benavidez et al., (2009) un antioxidante es una molécula que es capaz de prevenir o retardar la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones. Los niveles bajos o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células (Colina, 2016). En los últimos años, la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica, se ha enfrentado a la tendencia de los consumidores a exigir en los productos elementos “no químicos”, con el fin de favorecer y cuidar su salud, por lo que la ciencia se enfoca en la búsqueda de antioxidantes naturales, siendo los metabolitos secundarios su potencial candidato. Y para establecer la capacidad antioxidante existen varios métodos los mismos que difieren en la vía de generación de radicales libres, la forma de medida, el punto final de inhibición de la reacción y la sensibilidad de reducción de las moléculas en la muestra (Roginsky & Lissi, 2005). Entre los métodos más usados se establece, FRAP (Ferric Reducing Activity Power), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), ABTS y DPPH basados en la captación de los radicales libres 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico ácido) y 2,2-difenil-1- picrilhidrazil, respectivamente. Convirtiéndose estos métodos también como una variable de estudio ya que la aplicación de una u otra técnica depende del

disolvente empleado para la extracción y la presencia de compuestos (no antioxidantes) que puedan interferir en la medición (Tovar, 2013). Determinando que la que se usó dentro del estudio es 2,2-difenil-1- picrilhidrazil, DPPH.

2.3.Fundamento teórico

2.3.1. Ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*)



Ilustración 1. Planta amazónica ayahuasca
Fuente: (Carlini, 2015).

La ayahuasca o también conocida como natem, es un bejuco o liana que se da en la selva amazónica de Brasil, Bolivia, Colombia, Perú y Ecuador. Para los nativos, dicha especie es considerada como una planta sagrada y visionaria, la clave del conocimiento empírico de los saberes de la medicina tradicional amazónica. Generalmente se le da el mismo nombre al bejuco y a la bebida

(Fericgla, 2000), la misma que es una mezcla de distintas plantas como *Psychotria viridis* (chacrona) y *Diplopterys cabrerana* (oco yagé), que al ser consumida produce efectos alucinógenos a causa de la combinación de los componentes psicoactivos presentes en dichas plantas.

2.3.1.1.Taxonomía

En la siguiente tabla, se detalla los datos taxonómicos de ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*)

Tabla 1. Descripción taxonómica de *Banisteriopsis caapi*

Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Malpighiaceae
Género	Banisteriopsis

Fuente: (Fericgla, 2000)

2.3.1.2.Hábitat

Es nativa de Sudamérica, principalmente de las regiones andinas y amazónicas, de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil y Venezuela pero su popularidad ha hecho que sea trasplantada a otros lugares como planta ornamental o cultivo, mas no tolera los fríos extremos (Anderson, 2014). Se adapta en climas tropicales hasta los 1500 msnm, con

precipitaciones entre los 1,800 y 3,500 mm/año. Opta por suelos arenosos-arcillosos con abundante materia orgánica y se propaga por estacas de tallo y raíz. Su siembra se realiza al iniciar la temporada de lluvia, mas su cosecha se puede hacer durante todo el año a través del corte manual del tallo. Su territorio es compartido con algunas especies maderables como la castaña, la capirona, el pijuayo, uña de gato y uvilla. Se adapta en lugares frescos y secos, tomando en cuenta que es una liana que se sujeta a otros árboles (Yankur, 2013).

2.3.1.3.Descripción botánica

El botánico inglés Richard Spruce en los estudios que realizó entre los años 1849 y 1864 en la Amazonía brasileña, venezolana y ecuatoriana en compañía de Alfred Russel Wallace y Henry Walter Bates, identificó a *Banisteriopsis caapi* dentro de la familia de las malpighiaceae (Cleversley, 2002).

Es una especie de liana, bejuco selvático, con ramas largas y fuertes, puede alcanzar a medir hasta 30m. de largo, sus tallos son elongados y delgados, nunca se sostienen por sí solos ya que cada nudo tiene su propio entrenudo y yemas, sus hojas son grandes, redondas, verdes y puntiagudas, crecen opuestas y alternas, poseen márgenes enteros lobulados, con glándulas pluricelulares en el margen, las flores están distribuidas en un sistema simpódico de ramificación, con dimensiones de hasta 14 centímetros, son

hermafroditas, raramente unisexuales, radiales de cuatro a cinco pétalos que pueden ser blancos y rosados, sus frutos brotan entre marzo y agosto (Anderson, 2004).

2.3.1.4.Composición química

Yankur (2013) plantea que la estructura química de la *Banisteriopsis caapi* está estrechamente relacionada con la composición química de varios neurotransmisores que segrega naturalmente nuestro cerebro.

Ya que la misma posee como principales compuestos activos distintos alcaloides tales como, β -carbolina, harmina, harmalina, tetrahydroharmina, harmol, ácido harmico, ácido harmalinico y ketotetra-hidronorharminaharmina. Siendo los principales harmalina, tetrahydroarmina, harmol y 6-methoxytryptamina (Yankur, 2013). Estos compuestos son ligeramente solubles en agua, alcohol, cloroformo y éter.

2.3.1.5.Efecto alucinógeno

Algunos investigadores han manifestado que en sí la Ayahuasca no puede ser considerada como una droga. Ya que desde la perspectiva química y farmacológica, se conoce que para que la misma resulte como un psicoactivo produciendo alucinaciones es necesario que la liana, cuyo principio activo más importante que es la harmina, se

combine con otras planta que sea la fuente de la dimetiltriptamina (DMT) principal responsable de la experiencia alucinatoria; llegando así a que ninguno de estos componentes por separado puede generar efectos alucinógenos (Yankur, 2013).

Los β -carbolinos, como la harmina, son inhibidores de la monoaminooxidasa (IMAOs) reversibles, que permiten activar y prolongar la duración y la intensidad de los efectos de la DMT, previenen la descomposición de los neurotransmisores monoaminas mediante la inhibición de la acción de las enzimas monoaminooxidasa, MAO, que normalmente degradan el DMT y evitan que pase a través de la barrera hematoencefálica (Trujillo, 2010).

2.3.1.6. Uso medicinal

La ciencia ha determinado que los usos biomédicos derivados de *B. caapi* y su sustancias psicoactivas, son útiles en sesiones socio-psicoterapéuticas, etnopsiquiátricas (Trujillo, 2010) y en el tratamiento de fármaco dependientes. La cocción de sus hojas, tallo y semillas sirve como laxante, estimulante de la memoria y es bueno para el tratamiento del mal de Parkinson (Yankur, 2013).

2.3.2. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos derivados del metabolismo primario, cumplen distintas funciones no vitales en las plantas, mas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente para protegerlas de los depredadores como herbívoros, virus, hongos y bacterias. Además, forman parte de un importante grupo de principios activos y nutraceuticos.

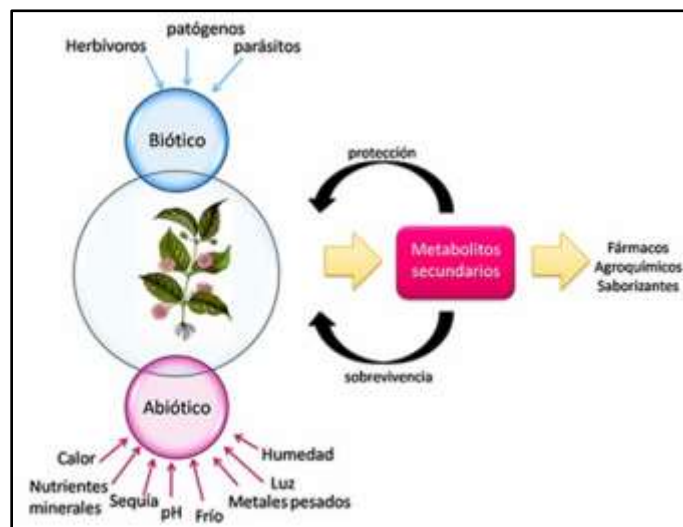


Ilustración 2. Esquema de metabolito secundario

Fuente:(García & Carril, 2011).

2.3.2.1.Funciones

Los metabolitos secundarios poseen funciones biológicas y ecológicas específicas. Ya que poseen distintas interacciones pueden actuar de diversas formas como

atrayentes o repelentes de animales, algunos son también pigmentos que dan color a flores y frutos, otros tienen función protectora frente a predadores o intervienen en los diferentes mecanismos de defensa ante distintos organismos patógenos (García & Carril, 2011).

En el caso de las interacciones que ocurren con las plantas, los metabolitos secundarios que son liberados al ambiente por una planta pueden afectar directa o indirectamente el desarrollo de otras, ya sean estas de la misma o de diferente especie, en términos más técnicos lo que se conoce como alelopatía. Algunos de los efectos que se presentan en la planta afectada, pueden ser interrupción de la respiración mitocondrial, despolarización de la membrana celular, inhibición de enzimas movilizadoras de nutrientes; interferencia con la toma de macronutrientes e incluso, la muerte (CONACYT, 2014).

2.3.2.2.Importancia industrial

En la industria son de suma importancia ya que los mismos o la mezcla de estos se utilizan como insecticidas, herbicidas, cosméticos, perfumes, colorantes, entre otros (García & Carril, 2011). Dentro del campo médico son muy estudiados ya que según las funciones biológicas que estos desempeñan se han registrado moléculas como antibióticos, fungicidas, antioxidantes y más. Pudiendo generar así principios activos para

elaborar fitofármacos y nutracéuticos. Como es el caso de paclitaxel, Taxol®, importante metabolito secundario específicamente un alcaloide, empleado por la planta para su defensa contra el ataque de hongos y por la medicina moderna para el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Por lo que cada vez se intensifica la búsqueda de este tipo de compuestos, que tengan utilidad (CONACYT, 2014).

2.3.2.3. Tipos de metabolitos

Estos compuestos se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, algunos presentan una distribución limitada dentro del reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en cualesquier grupos de plantas. Su síntesis se realiza en cantidades pequeñas y no de forma generalizada, estando incluso su producción relacionada con géneros, familias, o inclusive a algunas especies específicas (García & Carril, 2011).

Aparte de que su distribución es variada, existen también diversos tipos, por lo que según Mazid et al (2011) existen tres principales grupos de metabolitos secundarios entre ellos terpenos, fenoles y compuestos nitrogenados.

a) Terpenos

Los terpenos o también conocidos como isoprenoides o terpenoides, son un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos fitoquímicos más conocidos y

abundantes (García & Carril, 2011). Los mismos presentan un origen biosintético común y a pesar de que poseen estructuras químicas muy diferentes, todos ellos proceden de la condensación del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono (López et al, 2012). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen. Como se puede ver en la siguiente tabla.

Tabla 2. Clasificación de terpeno según sus unidades de Isopreno

Nombre	Número de carbonos	Unidades de Isopreno (C5)	Ejemplos
Monoterpenos	10 C	2	Aceites esenciales
			Resinas
Sesquiterpenos	15 C	3	Aceites esenciales
Diterpenos	20 C	4	Giberilinas
			Fitol
Triterpenos	30 C	6	Esteroides
			Saponinas
Tetraterpenos	40 C	8	Carotenoides

Fuente: (López et al., 2012)

- **Saponinas:** Estructuralmente referidas químicamente como compuestos triterpénicos, son sustancias no volátiles, formadas por agliconas no polares, unidas a una o más moléculas de monosacáridos. Esta combinación de

estructuras polares y no polares explica la fuerte actividad surfactante que caracteriza este tipo de compuestos, presentes en muchas especies de plantas su importancia está implicada con propiedades médicas y farmacéuticas, tales como disminución del colesterol, antidiabéticas y propiedades anticancerígenas (Rojas, 2015).

Los terpenoides actúan como fitohormonas, por lo que se les relaciona con procesos reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal como por ejemplo el Ácido Abscísico, Giberelinas y Citoquininas. Tienen también funciones estructurales como las de los esteroides. Tienen participación en la fotosíntesis como los carotenoides. Actúan también como moléculas de defensa, algunos son compuestos tóxicos o aromáticos como los aceites esenciales y piretrinas, pueden ser disuasores alimentarios como las lactonas sesquiterpénicas. Además, en algunos casos estos compuestos favorecen la atracción de polinizadores o de dispersores de frutos (Alves & Soares de Souza, 2014). También tienen un gran uso medicinal ya que presentan propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc. Por lo que es evidente que muchos de estos compuestos tienen un gran valor fisiológico y comercial (García & Carril, 2011).

b) Fenoles

Los polifenoles o fenoles como también son conocidos, son los nombres populares de los hidroxibencenos, comprende aproximadamente 8000 compuestos, con

uno o más grupos hidróxidos, por lo que se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza (Espinoza, 2014). Son conocidos con dicho nombre ya que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Se originan principalmente en aquellas plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son necesarios para las funciones fisiológicas vegetales, mientras que otros participan ante situaciones de estrés, acciones de defensa y distintos estímulos como hídrico, luminoso, de presión entre otros (Quiñones et al, 2012).

Su biosíntesis se realiza a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). Mientras que la ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Bravo, 1998).

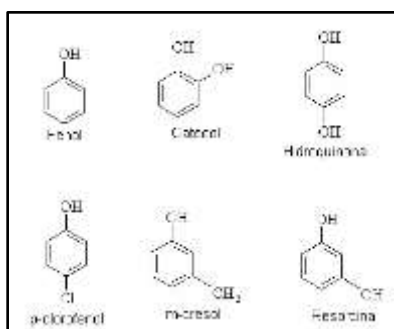


Ilustración 3. Estructura química de algunos compuesto fenólicos

Fuente: (Quiñones et al., 2012)

Entre los compuestos fenólicos más conocidos tenemos:

- **Cumarinas:** Son compuestos fenólicos simples, existen alrededor de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas. Su función está relacionada en diversos mecanismos de defensa contra los insectos herbívoros y hongos (García & Carril, 2011). Además, son un grupo de moléculas con gran actividad antimicrobiana (Brooker et al., 2008). Mientras que otras actúan como inhibidores de germinación (Mazid, Khan, & Mohammad, 2011).
- **Taninos:** estos se incluyen en la segunda categoría de polímeros fenólicos con propiedades defensivas. Se unen a proteínas desnaturalizándolas. Su nombre proviene de la ancestral práctica de utilización de extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (García & Carril, 2011). Son toxinas que reducen significativamente el crecimiento y la supervivencia de muchos herbívoros y también actúan como repelentes de una gran cantidad de animales. Tienen una amplia gama de efectos que van desde la disminución de la disponibilidad de proteínas y otros nutrientes, incluyendo aminoácidos y minerales a la protección de los rumiantes de inflamaciones, la mejora de la calidad de la carne y la disminución de la infestación por helmintos (Makkar et al., 2009). También son considerados como antioxidantes y antimicrobianos, antisépticos y astringentes

(Abasum et al., 2001). A pesar de ello, son considerados como compuestos no deseables ya que precipitan proteínas, inhiben las enzimas digestivas y afectan la utilización de vitaminas y minerales (Rojas, 2015).

- **Flavonoides:** es una de las mayores clases de fenólico vegetal. Los flavonoides realizan funciones como pigmentación y defensa de la planta (Rojas, 2015). Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos siendo los principales, antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas (García & Carril, 2011).

Actualmente hay un amplio interés enfocado en los flavonoides, puesto que se ha evidenciado su importancia en la dieta humana dada su gran variedad de actividades biológicas, tales como inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas, efectos antibacteriales, actividad antiinflamatoria y antioxidante. Estos actúan como antioxidantes ayudando a disminuir o contrarrestar el riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y el estrés oxidativo (Tovar, 2013).

c) **Compuestos nitrogenados**

Entre los compuestos nitrogenados se encuentran los alcaloides, glucósidos cianogénicos, y aminoácidos no proteicos. Gran parte de ellos son biosintetizados de aminoácidos comunes. A pesar de que todos son de gran interés debido a su papel en la defensa contra los herbívoros y la toxicidad para los seres humanos, los alcaloides son de los más nombrados debido a su gran uso en distintas ramas de la industria (Rojas, 2015).

- **Alcaloides:** Son compuestos orgánicos de origen natural, nitrogenados con un nitrógeno intracíclico en su estructura, se derivan generalmente de aminoácidos, son casi siempre incoloros, normalmente sólidos a temperatura ambiente, exceptuando algunos con bases no oxigenadas como la conina, la nicotina y la esparteína que son líquidas; la mayoría de alcaloides base son poco solubles en agua y presentan propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas (Arango, 2008).

Los podemos encontrar en el 20% de las especies de plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Rojas, 2015), están presentes en todos los órganos de la planta que los contiene, pueden estar mayoritariamente en hojas como es el caso de la cocaína, nicotina, pilocarpina. En flores (copolamina, atropina), en frutos (alcaloides del opio, peletiarina, coniina), en semilla (piperina,

arecolina), en cortezas (quinina, tubocurarina), en la raíz (emetina y cefalina) (Arango, 2008).

En humanos, los alcaloides pueden generar distintas respuestas fisiológicas y psicológicas gran parte de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos mientras que a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antioxidante, antitusivos o analgésicos. Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (García & Carril, 2011).

2.3.3. Métodos de extracción y purificación

2.3.3.1. Cromatografía

El proceso consiste en pasar una fase móvil a través de una fase estacionaria. Siendo la fase móvil la mezcla que contiene el compuesto deseado en el solvente, pudiendo ser un líquido o un gas; la estacionaria que puede ser sólida o líquida, y es aquella que retrasa el paso de los componentes de la muestra, de forma que los mismos la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en el tiempo. Las diferentes técnicas cromatográficas se basan en la variedad de afinidades que poseen las sustancias por un medio móvil gas o líquido y un medio absorbente estacionario (papel, gelatina, alúmina o sílice) a través del cual circulan (Angurell et al., 2009). La clave de la separación

cromatográfica es la velocidad con la que se mueve cada sustancia, depende de su afinidad relativa por ambas fases, lo que se conoce como equilibrio de distribución (Unam, 2007).

La purificación, separación y aislamiento de sustancias, es una de las aplicaciones prácticas más destacadas de la cromatografía, por lo que juega un papel importante en muchos sectores, como la química orgánica, la bioquímica, la química analítica, la química ambiental y la química alimenticia. Las técnicas más importantes son la cromatografía en capa fina, la cromatografía en columna y la cromatografía de gases (Castro, 2015).

a) Cromatografía en capa fina

Es un tipo de cromatografía que tiene como objetivo el análisis de una mezcla de componentes, en la cual la fase estacionaria es una capa delgada de un adsorbente, como por ejemplo gel de sílice, alúmina o celulosa, situada sobre un soporte plano como una placa de vidrio, o una lámina de aluminio o de plástico (Angurell et al., 2009). Por ende se presenta que la fase móvil es líquida y la fase estacionaria es en un sólido.

La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, por lo que los componentes menos polares serán lo

que se desplacen con mayor velocidad (Unam, 2007). Cuando el solvente llega a la parte superior de la placa, esta se saca de la cubeta dejando unos pocos centímetros de la placa sin correr, se seca, y los componentes separados de la mezcla se visualizan (Castro, 2015). Si los compuestos son coloreados se pueden observar las manchas del componente a simple vista. Caso contrario existen varios métodos para visualizar las manchas correspondientes a cada componente de la mezcla, como es el caso de la utilización de luz ultravioleta (UV 254nm o UV 366nm) para observar la placas, uso de reveladores como los vapores de yodo o emplear reactivos específicos para generar coloración en las manchas (Angurell et al., 2009).

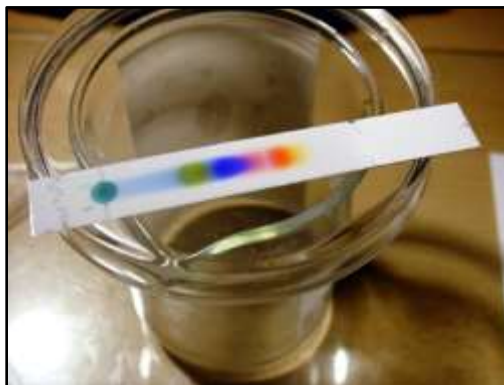


Ilustración 4. Cromatografía en capa fina

Fuente: (Angurell et al., 2009)

Esta técnica presenta una serie de ventajas ya que es más simple y los resultados son fácilmente reproducibles. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor (Unam, 2007), y se puede elegir

entre diferentes adsorbentes. Debido a su simplicidad y velocidad, es utilizada a menudo para monitorizar las reacciones químicas y también para el análisis cualitativo de los productos de una reacción, ya que permite conocer de manera rápida y sencilla cuántos componentes existen en una mezcla (Angurell et al., 2009). Lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos.

b) Cromatografía en columnas

Es una técnica que permite la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa (UGR, 2004).

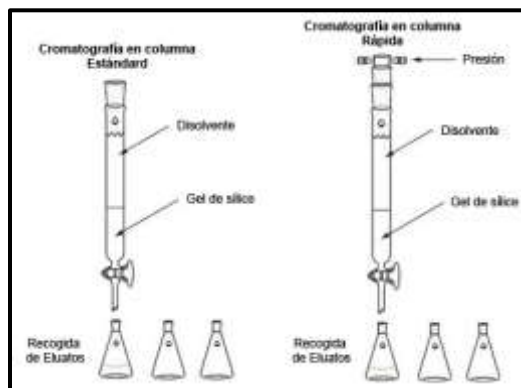


Ilustración 5. Cromatografía en columna

Fuente: (Angurell et al., 2009)

Para el proceso de cromatografía en columna, se usa una columna de vidrio vertical que se empaqueta con un sólido adsorbente, pudiendo ser este gel de sílice (SiO_2)

o alúmina (Al_2O_3), el cual constituye la fase estacionaria. Es importante recalcar que para evitar que la sílica o la alúmina queden retenidas en la columna, se rellena está, poniendo en el fondo un poco de algodón o lana de vidrio (UGR, 2004). La muestra en estudio que se requiere separar se deposita en la columna, sobre el adsorbente y el resto se llena con el eluyente, el cual es un solvente que representa la fase móvil (Angurell et al., 2009).

La elección del disolvente es transcendental para lograr una buena separación. Por lo que se utiliza solventes de mayor a menor polaridad para que la elución de compuestos sea óptima. Destacando que los solutos de mayor polaridad quedarán más retenidos puesto que se adsorben de mejor manera en los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad, sabiendo también que la polaridad del compuesto se encuentra determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes (UNAM, 2015).

Polaridad	Orden de elución	Tipo de compuesto
Menor	Menor retención	Alcanos Alquenos Eteres Derivados halogenados Aldehidos y cetonas Esteres Aminas Alcoholes Fenoles Acidos carboxilicos
Mayor	Mayor retención	

Ilustración 6. Cuadro de elución y polaridad de compuestos

Fuente: (UNAM, 2015)

Dicho solvente pasa a través de la columna por gravedad o bien por aplicación de presión, generando un equilibrio entre el soluto adsorbido en la fase estacionaria y el eluyente que se filtra a través columna. Ya que cada uno de los componentes establecen interacciones diferentes con la fase estacionaria y con la móvil, estos serán transportados a distintas velocidades y se conseguirá su separación. Y se irá recogiendo así, lo separado en fracciones diferentes (Angurell et al., 2009).

2.3.4. Métodos cuantitativos

Según Fernández (2017) el análisis cuantitativo establece la concentración numérica sobre la cantidad relativa, determinándose esta concentración en porcentaje, o masa absoluta de uno o varios analitos en una muestra.

Dependiendo las propiedades del analito, estos métodos se pueden cuantificar de la siguiente manera:

- **Métodos gravimétricos:** estas técnicas son usadas para establecer la masa de la muestra o compuestos que se obtengan de la misma.
- **Métodos volumétricos:** el fin de este es determinar el volumen de una solución que posea un reactivo que pueda reaccionar con el analito.
- **Métodos electroanalíticos:** se basa en la medición de las propiedades eléctricas que posee analito (potencial, intensidad de corriente o la carga eléctrica).

- **Métodos espectroscópicos:** usa la interacción generada de la radiación electromagnética con el analito. Pudiendo analizar la cantidad de radiación absorbida o la emitida por el analito. Las técnicas espectrofotométricas más usadas son: espectroscopía infrarroja, espectroscopía visible-ultravioleta, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Fernández, 2017).

2.3.4.1. Técnicas más usadas en detección de metabolitos secundarios

2.3.4.1.1. Espectrofotometría UV-visible

Esta técnica involucra la espectroscopía de fotones en la región de radiación UV (ultravioleta-visible). Usa la luz en rangos adyacentes y visibles, siendo estos el ultravioleta cercano y el infrarrojo cercano. Este método es usado para la cuantificación de soluciones de iones metálicos de transición y en compuestos orgánicos, especialmente aquellos que poseen un grado alto de conjugación, ya que estos son capaces de absorber luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los solventes usados en esta técnica son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o a su vez el etanol para los compuestos orgánicos solubles. El fundamento de la técnica es la ley de Beer-Lambert, la misma que establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución (Perez, 2017).

2.3.4.1.2. Cromatografía HPLC

Con el pasar del tiempo se ha investigado sobre la cuantificación de los metabolitos utilizando varias técnicas, siendo una de estas la HPLC, misma que los purifica del extracto, como un paso anterior a la cuantificación por métodos competitivos que usan proteínas ligadoras. Es una técnica capaz de separar distintos componentes presentes en una mezcla, tales como macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la más utilizada, especialmente dentro del área de bioquímica y química analítica (Castro, 2015).

Esta técnica consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase móvil en HPLC está formada por un disolvente o por una mezcla de ellos, los disolventes más utilizados son agua, metanol y acetonitrilo, cada uno de estos está contenido en un recipiente, de vidrio. Los recipientes deben disponer de tapones que impidan la contaminación por gases o partículas en suspensión presentes en el aire del laboratorio. Para evitar flujos inestables, la formación de burbujas o la interferencia de partículas extrañas los disolventes deben estar filtrados y desgasificados (Castaños, 2015).

La muestra a analizar es forzada a pasar a través de la columna por un líquido, mediante bombeo a elevada presión. Esta muestra se introduce en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. Luego pasan mediante un detector que genera una señal que indica la concentración de soluto que está saliendo. Este proceso de difusión dentro la columna comporta la aparición de picos anchos y pérdida de resolución (Castro, 2015).

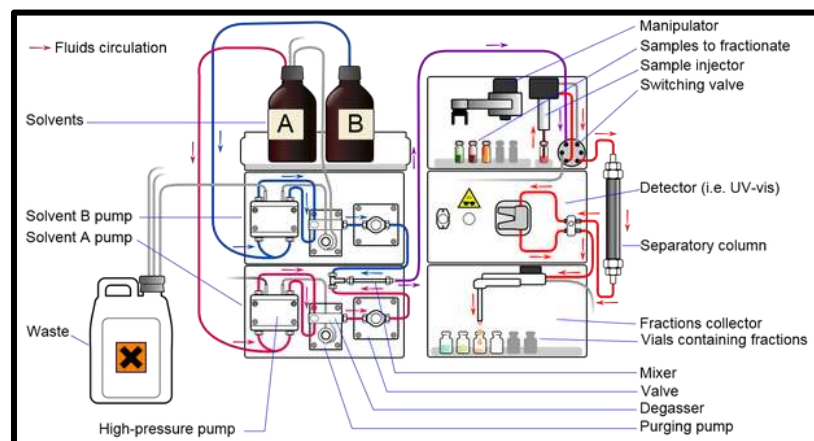


Ilustración 7. Equipo de HPLC con sus partes

Fuente: (Castaños, 2015)

2.3.5. Antioxidantes

2.3.5.1. Antioxidantes en la naturaleza

Según Colina (2016) las plantas han ido desarrollando mecanismos de defensa ante varios estímulos del ambiente; generando distintas respuestas, las mismas que se

activan ante factores bióticos como patógenos, plagas y simbiontes; o factores abióticos como temperaturas bajas o altas, radiación, salinidad y más. Entre estos sistemas de respuesta se encuentra la síntesis de fitoquímicos y antioxidantes, cumpliendo estos compuestos varias funciones importantes como:

- Atrapadores de radicales libres
- Estabilizadores
- Protectores del ADN y proteínas frente al estrés por oxidación

Los antioxidantes naturales son principalmente, los compuestos fenólicos. Los más utilizados son, el ácido ascórbico (vitamina C) y sus derivados (ascorbato sódico, ascorbato de calcio), los tocoferoles, los ácidos fenólicos y los flavonoides. Otros compuestos presentes de forma natural también con actividad antioxidante son carotenoides y compuestos nitrogenados como los alcaloides, aminoácidos, aminas y ciertas proteínas.

2.3.5.2.Radicales libres

Los radicales libres o también conocidos como especies reactivas de oxígeno, son átomos o moléculas que poseen uno o más electrones no pareados en el orbital más externo, lo que produce una gran reactividad en dicha estructura. Dando lugar a que estos

intervengan con gran eficacia y rapidez en un sinnúmero de procesos bioquímicos a nivel celular (Lima, 2004). Estos actúan como agentes oxidantes y son la causa de envejecimiento al combinarse con moléculas como el ADN y proteínas (Benavidez et al., 2009).

Los radicales libres se producen continuamente en el organismo, por las reacciones bioquímicas de óxido-reducción con el oxígeno. Y se forman mediante una ruptura homolítica y por reacciones de transferencia de electrones (Colina, 2016).

2.3.5.3.Estrés oxidativo

En los últimos años se ha venido generando una verdadera revolución dentro de las investigaciones relacionadas con el estrés oxidativo, debido a la relación que se cree existe entre éste y el envejecimiento. A pesar de que esto aún no ha podido convertirse en una ley, existe evidencia de resultados, que permiten fundamentar que la mayoría de las enfermedades crónicas están muy implicadas con el desequilibrio entre los fenómenos de oxidación y reducción del cuerpo humano (Lima, 2004).

Manifestando que “el estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio en nuestras células debido a un aumento en los radicales libres y una disminución de antioxidantes del sistema endógeno. La alteración de este equilibrio puede tener diversos grados de magnitud; en el estrés oxidativo leve, las defensas antioxidantes restablecen

dicho equilibrio, pero en el estrés oxidativo grave se llega a graves alteraciones en el metabolismo celular. El daño por estrés oxidativo puede ser reversible como irreversible, eso dependerá de la edad del organismo, el estado nutricional, la efectividad de la defensa antioxidante y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes” (Colina, 2016).

2.3.5.4. Estrés oxidativo ante la salud

Según Núñez (2011) el desequilibrio del sistema oxidativo causa mucho daño y deterioro en la salud. Dada esta relación se han descrito alrededor de 100 enfermedades, algunas de ellas como, cardiovasculares, cáncer, gástricas, respiratorias, neurológicas y del sistema endocrino.

Según Coronado et al (2015) se podría decir que las enfermedades neurodegenerativas son de las más investigadas dentro del contexto del estrés oxidativo. Por lo que se ha manifestado que el aumento del deterioro de proteínas específicas viene dado por la presencia elevada de las especies reactivas de oxígeno. También, en algunas zonas del cerebro se produce una disminución de algunos metales de transición ($\text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3}$) propias del efecto oxidativo, lo cual causa o agrava estas enfermedades. El metabolismo de glutatión, también se ve afectado lo cual se asocia con enfermedades como parkinson, alzheimer u otras degenerativas del sistema neurológico.

Mientras que respecto al cáncer se señala que si los radicales libres afectan el ADN pueden ocurrir mutaciones que en su momento se transforman en células cancerosas. Las de tipo cardiovascular tienen amplia evidencia. La oxidación de las células del LDL colesterol parece representar la “llave maestra” en el desarrollo de la aterosclerosis, en tanto pueden ser citotóxicas de las células endoteliales y bajar la motilidad del tejido macrofágico (Coronado, Salvador, Gutiérrez, Vázquez, & Radilla, 2015).

2.3.5.5.Determinación de la capacidad antioxidante

Existe una gran variedad de métodos y técnicas para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia. Entre los más conocidos están:

- ✓ **Método FRAP**, que se basa en la capacidad de los polifenoles de reducir moléculas de Fe III a Fe II, el mismo que forma un complejo azul con la molécula tripidil triazina (TPTZ) que puede ser monitoreado por absorbancia a 593 nm.
- ✓ **Método ORAC**: se fundamenta en el descenso en la emisión de fluorescencia de la proteína ficoeritrina producido por el generador de radicales peróxilos, AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro). La inhibición de esta

generación por un compuesto antioxidante es una medida de su actividad antioxidante (Krishnaiah et al., 2010).

- ✓ **Método ABTS:** el mismo que monitorea la desaparición del catión ABTS*+ (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico ácido) generado previamente por la oxidación del ABTS, por el descenso de absorbancia, debido a la presencia de compuestos capaces de interactuar con el radical. Este ensayo mide la capacidad antioxidante total, tanto de sustancias lipofílicas como hidrófilas. Y como control positivo para este ensayo se utiliza Trolox, un análogo hidrosoluble a la vitamina E (Krishnaiah et al., 2010).

- ✓ **Método DPPH:** el método del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), es el más usado (Colina, 2016). Según Tobergte & Curtis (2013) este método fue propuesto por Blois, en 1958. Este demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo, es un radical libre estable ya que posee una deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, dando lugar a que la molécula no se dimerice, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. Pudiendo observar como en ensayo de DPPH, la deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical,

el cual absorbe en metanol a 517 nm. Y cuando la solución del mismo reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. Por lo que el cambio de color es analizado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros de las propiedades antioxidantes.

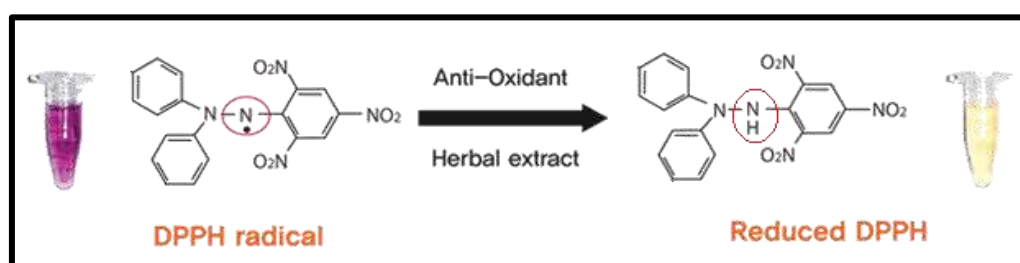


Ilustración 8. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

Fuente: Colina, 2016

La técnica ha tenido variantes, pero el principio siempre ha sido el mismo por lo que los resultados también se han representado de distintas maneras. Pero la mayoría de los estudios los expresan como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria, IC₅₀, definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. El mismo que es calculado mediante un gráfico de porcentaje de inhibición vs la concentración del extracto (Tovar, 2013).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de investigación

El presente estudio es de carácter cuantitativo, debido a que se realizó la medición de la capacidad antioxidante, variable dependiente del estudio. De acuerdo al alcance de la investigación es aplicada, mientras que en relación al nivel de investigación es de carácter descriptiva, debido a que no se aplica ningún estímulo dentro del desarrollo del estudio y se basa en un método netamente analítico ya que con los datos recopilados se realizará una comparación entre los productos antioxidantes.

En cuanto al diseño de investigación, es combinado, de carácter documental elaborado mediante la revisión bibliográfica y de campo debido a que no se altera o manipula las variables, realizando experimento alguno.

3.2. Población y muestra

Se consideró como población de estudio, el terreno de tres hectáreas de la señora Teresa Santic Tuist, ubicada en el cantón Limón-Indaza, provincia de Morona Santiago.

Esta población se caracteriza por ser homogénea dado que se encuentra en el mismo piso climático y el espacio es homogéneo de la misma propiedad.

Establecida la población se procedió a tomar una muestra estratificada, de los árboles de ayahuasca, asegurándose que posea características apropiadas para el respectivo estudio. Con este grupo seleccionado se realizó una segunda clasificación, tomando una submuestra estratificada, de hojas y tallos, descartando la materia vegetal que presentaba daños en su estructura y toda materia extraña que pudiese estar presente.

3.3. Variables

a) Independientes

- La variable independiente trabajada en este estudio son los metabolitos secundarios presentes en la muestra vegetal

b) Dependientes

- La variable dependiente identificada en la presente investigación es la capacidad antioxidante que poseen los productos del estudio

c) Intervinientes

Se da a conocer las variables controladas para no influir en los resultados de las variables dependientes:

- Tiempo de maceración aplicado en la muestra vegetal, aplicando un solo tipo de planta

- Un solo tipo de planta
- Condiciones geográficas de la recolección de la planta
- Un solo método de cromatografía en columna
- Caracterización de los metabolitos secundarios mediante una marcha fitoquímica

d) Extrañas

- Las variables extrañas se presentan como las condiciones ambientales en las cuales se desarrolló la muestra vegetal

3.4.Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Dentro de la investigación, se utilizó como técnica el análisis documental y análisis de contenido de: tesis, libros, revistas científicas etc., utilizando diversos instrumentos como bases de datos, navegadores, programas de referencia y unidades de almacenamiento. Otra técnica utilizada también fue la observación no estructurada cuyos instrumentos fueron fotografías, videos y diario de campo.

3.5.Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Para la interpretación de los datos recolectados y obtención de resultados, se utilizó un análisis estadístico descriptivo, dado que los datos fueron representados

mediante tablas y gráficas. Pero también inferencial debido a que se aplicó un diseño completamente al azar, para aprobar o rechazar la hipótesis planteada.

3.6. Procedimiento

Para el cumplimiento de los objetivos específicos, se llevó a cabo distintas actividades, las mismas que se encuentran divididas por 4 fases. Las mismas que se describen a continuación:

- **Fase 1. Recolección de la muestra**

En esta fase se describirá todas aquellas actividades realizadas para el cumplimiento del primer objetivo específico descrito en esta investigación. Por lo que esta fase abarca, la identificación de población y toma de la muestra, preparación de la misma y la obtención del extracto etanólico total mediante el proceso de maceración.

3.6.1. Identificación de población y toma de muestra

Una vez identificada la población que se estableció en una zona selvática de fácil acceso, de la propiedad perteneciente a la señora Teresa Santic Tuist, ubicada en la parroquia rural Yunganza del Cantón Limón-Indaza, provincia de Morona Santiago, la

misma que abarca un espacio territorial de 2 hectáreas, con varios cultivares en los que se encuentra una cantidad de tres árboles de ayahuasca. Se procedió a la toma de la muestra siendo esta, hojas y tallos recolectados directamente de un solo árbol de esta especie. Para este proceso de selección se tomó en cuenta lo descrito por Londoño (2015), que manifiesta que la mayor parte de metabolitos que poseen capacidad antioxidante se encuentran en las partes aéreas de la planta.



Ilustración 9. Mapa de la zona de recolección de la muestra en estudio

Fuente: La autora

3.6.2. Preparación de la muestra

Las hojas y tallos de la especie *B. caapi*, fueron lavadas y seleccionadas, mediante el método de percepción descrito por Espinoza (2015), el mismo que hace referencia a la evaluación de la muestra, mediante los órganos sensoriales teniendo en cuenta: tamaño, morfología, olor, color y fractura de los órganos vegetales. Dejando así aquellas partes

que estuvieran en mejores condiciones, desechando las afectadas por distintos factores. Posteriormente fueron lavadas con agua ultra pura y llevadas a la estufa, a una temperatura de 40 °C, por un tiempo de 48 horas, para obtener la muestra completamente seca.



Ilustración 10. Hojas y tallos de ayahuasca, lavados

Fuente: La autora

3.6.3. Obtención del extracto etanólico total

Para el proceso de extracción, se utilizó la técnica de maceración, identificando las características de la misma, para plantear un protocolo, debido a que no había uno específico para la planta, por lo que se procedió a obtener un macerado con una concentración 3:1 (peso solvente/ peso material vegetal), 510 g de etanol al 96% y 170 g de materia vegetal seca. Esto se realizó en 4 distintos frascos ámbar de vidrio y se lo dejó reposar por 7 días, con agitación constante, evitando exponer el macerado a luz directa.

Al cabo de este tiempo se realizó el proceso de obtención del extracto etanólico total, ETT, siguiendo el protocolo descrito por Castro (2015) (Figura No. 11). El mismo que se desarrolla en los siguientes pasos; **(1)** el macerado se filtró al vacío, obteniendo un filtrado líquido y un residuo de hojas y tallos (Figura No. 12a). **(2)** Se concentró el filtrado líquido en el rotavapor para extraer el solvente, obteniendo 1010 ml de ETT (Figura No. 12b) el mismo que posteriormente fue sometido a la extracción de clorofila siguiendo el protocolo descrito por Cortez et al. (2017).



Ilustración 11. ETT, previo al proceso de filtración.

Fuente: La autora

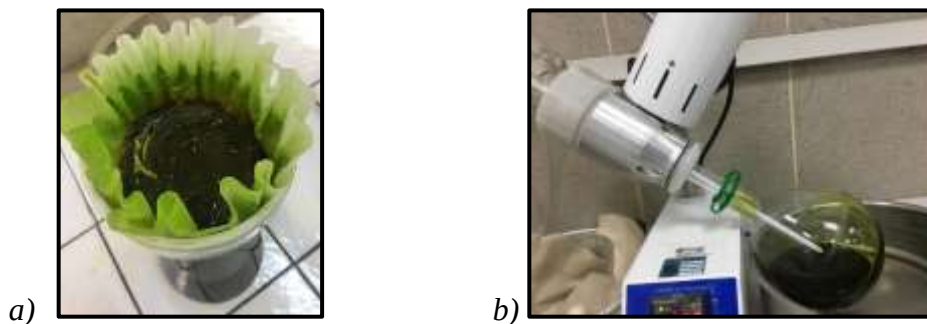


Ilustración 12. a) Filtración del extracto; b) evaporación del solvente/ rotavapor

Fuente: La autora

- **Fase 2. Caracterización cualitativa**

Esta fase de caracterización, abarca la purificación, fraccionamiento y tamizaje fitoquímico del extracto.

3.6.4. Fraccionamiento y purificación del extracto

Una vez obtenido el extracto libre de clorofila, se procedió a la purificación del mismo mediante la técnica de cromatografía en columna fase normal. Siguiendo el protocolo establecido por la autora, que es uno modificado del de Castro (2015) con, tiempos y solventes.

Para esta técnica se utilizó como fase estacionaria sílica gel de 60 MESH para CC y como fase móvil, distintos solventes en orden de polaridad ascendente: cloroformo, etanol, metanol y agua.

Se usó una columna de vidrio para cromatografía, colocando al fondo de esta, una pieza delgada de algodón seguida de 1cm de arena fina, para ayudar a dar mejor compactación en el proceso. Posterior a esto se introdujo 15g de sílica gel, seguida de 30g de solvente, y se dejó caer el eluyente para que el adsorbente (fase estacionaria) quede hidratado y bien empaquetado (Figura No. 13a). Una vez preparada la columna se

colocó 10 ml de ETT, con solvente (Figura No. 13b). El extracto pasa a través de la columna debido al efecto de la gravedad, estableciendo un equilibrio entre el soluto adsorbido en la fase estacionaria y el solvente que fluye por la columna, obteniendo así las fracciones respectivas (Figura No. 13c).

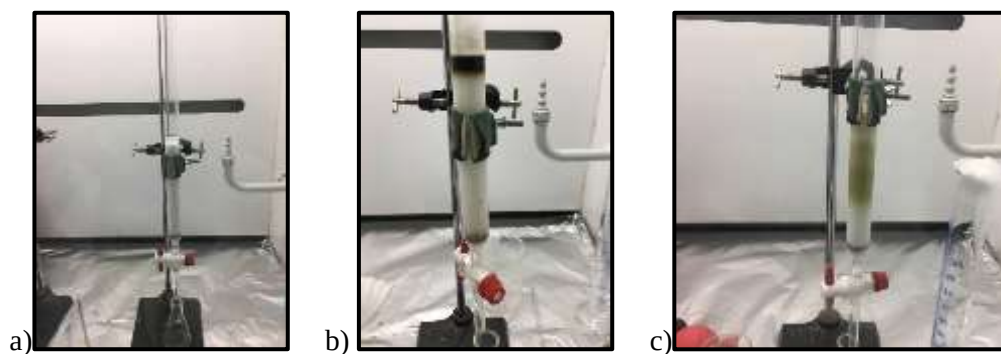


Ilustración 13. a) Preparación de la columna; b) Columna con ETT; c) Purificación

Fuente: La autora

3.6.5. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Con cada una de las 4 fracciones obtenidas tras la cromatografía en columna (Figura No.14) se realizó la respectiva marcha fitoquímica tomada del protocolo de Castro (2015) para determinar la presencia de metabolitos secundarios.



Ilustración 14. ETT y fracciones clorofórmica, metanólica, etanólica y acuosa

Fuente: La autora

3.6.5.1. Prueba de alcaloides/Ensayo de Dragendorff

Para la identificación de alcaloides se realizó el ensayo de Dragendorff con el reactivo de tetrayodo bismuto de potasio. Esta prueba según Palacios (2012), está basada en la capacidad que tienen los alcaloides de mezclarse con metales pesados (bismuto, mercurio, tungsteno) y formar precipitados.

Para el proceso de cualificación se colocó 1 ml de extracto en un tubo de ensayo, evaporando el solvente a 55°C en baño María se añadió 1 ml de HCl al 1% y finalmente se adicionó 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Considerando la prueba positiva con la formación de un precipitado rojo o anaranjado.

3.6.5.2. Identificación de flavonoides/ Prueba de Shinoda

Para la identificación de flavonoides se realiza la prueba de Shinoda, la misma que se fundamenta en el cambio de coloración que se da tras la reacción del metal con el HCl, formando un hidrógeno y reduciendo el ion flavilio (UNP, 2009).

Siguiendo el protocolo, se colocó 1 ml de extracto en un tubo de ensayo, 1 ml de HCl concentrado y un pedazo de cinta de Mg metálico, al pasar 5 minutos se agitó con 1 ml de alcohol amílico y se dejó reposar hasta observar una separación de fases.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja o rojo.

3.6.5.3. Identificación de saponinas/ Prueba de espuma

Para la identificación de saponinas se utilizó la prueba de espuma, la misma que se fundamenta con el poder tensoactivo que tienen algunos compuestos, que al ser disueltos en agua disminuyen su tensión superficial, y al ser agitados, forman una espuma abundante, relativamente estable (UNP, 2009).

Para el proceso, se colocó 1 ml de extracto en un tubo de ensayo y se diluyó con 5 ml de agua destilada y agitó fuertemente.

La prueba se considera positiva con la formación de espuma sobre la superficie del líquido, de 0,5 cm de altura aproximadamente que permanece por un tiempo de 2 minutos.

3.6.5.4. Identificación de taninos/ Prueba de tricloruro férrico

El fundamento de esta prueba lo establece Guerrero (2013) manifestando que la prueba de fenoles con tricloruro férrico, forma un complejo con Fe (III), generando una coloración intensa.

Para esta prueba se colocó 2 ml del extracto en un tubo de ensayo y se adicionó tres gotas de tricloruro férrico al 5%.

Un ensayo positivo genera la siguiente información, coloración verde intenso taninos del tipo pirocatecólicos mientras una coloración azul manifiesta la presencia de taninos pirogalactánicos.

- **Fase 3. Cuantificación de metabolitos**

De los metabolitos revelados en la marcha fitoquímica, se realizó la cuantificación de cuatro de ellos, sobre todo aquellos que pudieran poseer capacidad antioxidante, como alcaloides, saponinas, taninos y flavonoides. Recalcando que todos los procesos analíticos fueron realizados por triplicado.

3.6.6. Cuantificación de saponinas

Para el análisis de saponinas se cuantificó la fracción tanto etanólica como metanólica, dado que en el tamizaje fitoquímico esas fracciones eran las que poseían este metabolito.

Se cuantificó utilizando la técnica de columna invertida con metanol y acetonitrilo en HPLC, siguiendo el presente protocolo:

3.6.6.1. Preparación de las muestras

Se prepararon disoluciones 1:10 de cada fracción, tanto para la etanólica y la metanólica, con una mezcla de acetonitrilo y metanol puro. Se colocó 150 µL del extracto fraccionado, y 1350 µL de la mezcla en tubos cónicos.

3.6.6.2. Análisis de las saponinas en la fracción etanólica y metanólica

Para el análisis, se utilizó un cromatógrafo HPLC (Waters 1525 Binary HPLC Pump). Se evaluó la solución metanol: acetonitrilo como fase móvil para obtener una mejor separación, y con el estándar de saponinas al 30% de S 452, perteneciente a la saponaria quillaja, en concentraciones de 10, 20,25 y 50 ppm, se comparó tiempos de retención y áreas, recolectando los picos de interés para la interpretación de resultados.

El monitoreo de la cromatografía en todos los casos fue realizado con un detector UV a una longitud de onda de 207 nm.

3.6.6.3. Cálculos

Par los cálculos se utilizó la fórmula descrita por Lozano et al. (2012).

$$x = \frac{A}{B} * E$$

En donde:

x= % de saponinas presentes en el extracto

A= área total de la muestra

B=área total del estándar

E= % de pureza del estándar

3.6.7. Cuantificación de Alcaloides

La cuantificación de alcaloides se realizó a partir de las fracciones clorofórmica y etanólica, siguiendo el método planteado por Shamsa et al. (2008), el mismo que se basa en la reacción de alcaloides nitrogenados, con el reactivo de BCG (verde de bromocresol), resultando de esto, la formación de un complejo alcaloide-BCG, susceptible a espectrofotometría a 470 nm.

3.6.7.1. Formulación de la curva de calibración

Para la preparación de la curva de calibración se elaboró 6 distintos patrones de análisis, con alícuotas de la solución estándar de atropina y un blanco, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3. Preparación de estándares para la curva de calibración

	Solución atropina	Solución Na ₂ HPO ₄	BCG
Blanco	-	5 ml	5 ml
Patrón 1	0,5 ml	5 ml	5 ml
Patrón 2	0,8 ml	5 ml	5 ml
Patrón 3	1,0 ml	5 ml	5 ml
Patrón 4	1,2 ml	5 ml	5 ml
Patrón 5	1,5 ml	5 ml	5 ml
Patrón 6	2,0 ml	5 ml	5 ml

Fuente: (Shamsa et al. 2008)

Cada solución fue analizada en el espectrofotómetro de UV – VIS (Jasco V- 630), y se midió la absorbancia a 470 nm, del complejo formado y disuelto en cloroformo frente al blanco preparado.

3.6.7.2. Análisis de la muestra

Para la cuantificación de las muestras, se empleó el mismo procedimiento anterior, sustituyendo el volumen del estándar de atropina por 5 ml del extracto a analizar.

3.6.7.3. Cálculos

Los cálculos e interpretación de resultados, fueron realizados a través de la curva de calibración que posee un coeficiente de correlación de 0.9898, obtenida con las absorbancias y las cantidades de atropina en cada estándar.

3.6.8. Cuantificación de flavonoides

De las fracciones etanólica y metanólica se procedió a cuantificar los flavonoides por medio del método de Feltrin et al., (2012) con modificaciones de Rojas, Jaramillo, & Lemus (2015) en su libro “Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas”, el fundamento de esta metodología está basado en la reacción de los iones aluminio con los flavonoides en medio alcalino y en presencia de nitrito de sodio, formándose un complejo de color rojo.

3.6.8.1.1. Preparación de la curva de calibración

A partir de una solución de quercetina de 200 mg/l, se elaboran soluciones estándares, las mismas que tienen concentraciones de 10, 20, 25, 40, 50, 80 y 100 mg/l.

3.6.8.1.2. Análisis de la muestra

Se colocó 0,5 ml del extracto a analizar en un tubo de ensayo, agregando 1 ml de AlCl_3 al 2% y 1,5 ml de metanol. Esta solución se dejó en reposo por 1 hora, para su posterior lectura en el espectrofotómetro de UV – VIS (Jasco V- 630), a 420nm.

3.6.8.1.3. Cálculos

Para realizar los cálculos correspondientes se utilizó las concentraciones de flavonoides en las muestras, utilizando la ecuación de la curva de calibración con un coeficiente de correlación de 0.9984. Y con la expresión matemática extraída del método usado por Venegas (2012), se expresó las concentraciones como mg equivalentes a quercetina/g de tejido seco de la especie vegetal.

$$X = \frac{A_m \times P_R \times 5}{A_R} \times 100$$

Donde:

X= Contenido de flavonoides totales expresados como quercetina (%).

A_m = Absorbancia de la solución muestra (nm)

P_R = Peso de la sustancia de referencia (g)

A_R = Absorbancia de la solución de referencia (nm)

3.6.8.2. Cuantificación de taninos

Para la cuantificación de taninos en las fracciones; clorofórmica, etanólica y metanólica de *B. caapi*, se utilizó el método Folin-Ciocalteu, el mismo que es usado como medida de la concentración de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Este se fundamenta en que los compuestos fenólicos, en este caso los taninos, reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a un pH básico, formando un cambio de coloración, la misma que es susceptible de determinación espectrofotométrica a 750 nm. La reacción se da ya que este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos, que poseen grupos OH, presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico, el mismo que se encuentra formado por las dos sales en el medio ácido, de color amarillo, se reduce por los grupos fenólicos, lo que da lugar a un complejo azul intenso (García, et al 2015).

3.6.8.2.1. Elaboración de la curva de calibración

- **Solución Blanco:** Se mezcló 4 ml de agua destilada, con 250 µL de reactivo Folin – Ciocalteu, dejando reposar por un lapso de dos minutos, seguido se añadió 750 µL de carbonato de sodio al 20% v/v.

- **Solucione madre:** Se preparó 100ml de una solución de ácido gálico en etanol al 96%, con una concentración de 200 ppm, a partir de la cual se obtuvo 6 soluciones de 25 ml con concentraciones de 2, 25, 50, 100, 150, 200 ppm.
- **Soluciones patrón:** Se colocó 50 μL de cada solución preparada, 3950 μL de agua ultra pura, 250 μL de reactivo Folin-Ciocalteu, dejando en reposo por dos minutos, añadiendo posteriormente 750 μL de carbonato de sodio al 20% v/v.

3.6.8.2.2. Análisis de la muestra

Siguiendo el procedimiento antes descrito, se llevó a cabo la preparación de las muestras agregando 150 μL de cada fracción y dejando reposar mediante una hora con agitaciones contantes de cada 15 minutos, fueron llevadas al espectrofotómetro UV – VIS (Jasco V- 630), para medir su absorbancia.

3.6.8.2.3. Cálculos

Para realizar los cálculos correspondientes se utilizó la ecuación de la curva de calibración de ácido gálico, la misma que posee un con coeficiente de correlación de 0.9986.

- **Fase 4. Capacidad antioxidante**

3.6.8. DPPH

Se analizó la capacidad antioxidante de los 4 metabolitos estudiados posterior a su aislamiento por medio de ultrasonido (flavonoides y taninos) y liofilización (alcaloides y saponinas), además del extracto etanólico total y una solución de N – acetil cisteína, fármaco antioxidante comercial, mediante el método de Brand-Williams et al. (1995) el mismo que establece la acción inhibidora del radical libre 1,1-difenil-2-picril hidracilo, más conocido como DPPH. Dado que el radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, cuando reacciona con una sustancia antioxidante cambia su coloración hacia amarillo pálido. Para este ensayo se mide la absorbancia mediante espectrofotometría a 517 nm (Rojas et al., 2015).

3.6.8.1. Curva de calibración:

Posterior a la preparación de las soluciones de DPPH a 200 ppm, vitamina C a 400 ppm y N – acetil cisteína 400 ppm. Se procede a realizar la curva de calibración, se utiliza al ácido ascórbico como patrón, se preparan soluciones de las siguientes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 80 y 100 ppm, a partir de la solución de vitamina C

de 400 ppm, la lectura de estas soluciones en el espectrofotómetro UV – VIS (Jasco V-630) se lo realiza a una longitud de onda de 517 nm.

3.6.8.2.Preparación de soluciones de las fracciones:

Para preparar las soluciones patrones de las diferentes fracciones, extracto etanólico total y de la solución N- acetil cisteína, se utilizó las siguientes diluciones:

Tabla 4. Preparación de soluciones patrones

Frascos	Muestra (µl)	DPPH (ml)	Etanol 96% (µl)
Blanco	-	2,9	100
1	1	2,9	99
2	5	2,9	95
3	10	2,9	90
4	20	2,9	80
5	50	2,9	50
6	80	2,9	20
7	100	2,9	0

Fuente: La autora

3.6.8.3. Análisis de la muestra:

Se protege de la luz con papel aluminio, se deja en reposo por 30 minutos en constante movimiento. Se leen las absorbancias a 517 nm. También se leen las absorbancias de los blancos y el patrón de referencia.

- **Preparación del blanco de patrón:** El blanco se prepara adicionando en un tubo de ensayo una mezcla de etanol: agua 2:1.
- **Preparación del patrón de referencia:** Se prepara con 1,5 ml de DPPH y 0,5ml de agua destilada,

3.6.8.4. Cálculos

Con las absorbancias recopiladas y la concentración de cada solución ensayada, se genera una ecuación mediante regresión lineal, que nos permite calcular el porcentaje captación de radicales libres, el mismo que es calculado mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Capacidad Antioxidante} = \left[1 - \frac{(A2 - A3)}{A1} \right] \times 100$$

% Captación de Radical Libre

Donde:

A1= Absorbancia del patrón de referencia

A2= Absorbancia de la muestra

A3= Absorbancia del blanco de muestra

CAPÍTULO 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Fase 1. Recolección de la muestra**

4.1. Obtención del extracto etanólico total

Tabla 5. % rendimiento de extracción

Muestra Vegetal seca (g)	Solvente (ml)	Macerado (ml)	ETT (ml)	% rendimiento
680	2040	1840	1010	36.95

Fuente: La autora

En la Tabla 5, se puede evidenciar que tras el proceso de maceración de la muestra vegetal, con etanol al 96%, la filtración y evaporación del solvente, se obtuvo un extracto etanólico total de 1010 ml con un rendimiento de extracción del 36.95 %. Siendo este resultado corroborable con lo descrito por Escoto et al. (2016) que manifiesta que se da un mejor rendimiento de extracción con la maceración etanólica cuando se desea obtener extractos vegetales a partir de las partes aéreas de la planta.

- **Fase 2. Caracterización cualitativa**

4.2. Fraccionamiento y purificación del extracto

Tras el proceso de purificación del ETT, se obtuvo cuatro distintas fracciones siendo estas clorofórmica, etanólica, metanólica y acuosa. Con un volumen de 25, 35, 35 y 40 ml respectivamente, a partir de 15 ml de extracto. Se escogió estos solventes teniendo en cuenta lo descrito por Chang et al. (2013) en donde propone que la selección de los mismos es de vital importancia para una buena separación y purificación de los compuestos. Por lo que dadas sus distintas polaridades, arrastran diferentes metabolitos como lo manifiesta Castro (2015), determinando que los alcaloides tienen gran afinidad con compuestos de menor polaridad como cloroformo, éter y acetona, los fenoles con alcoholes, mientras que las saponinas con agua, metanol y etanol.

4.3. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Tras las pruebas colorimétricas realizadas en el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total y las cuatro fracciones purificadas, se determinó que la planta *B. caapi* muestra una gran diversidad de metabolitos secundarios siendo estos flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides, triterpenos y cumarinas, los mismos que se encuentran presentes en las distintas fracciones etanólica, metanólica, clorofórmica y acuosa. Como se puede evidenciar en la siguiente tabla.

Tabla 6. Caracterización cualitativa de la planta *B. caapi*

Metabolito	ETT	Fracción clorofórmica	Fracción etanólica	Fracción metanólica	Fracción acuosa
Alcaloides	+	+	+	+	-
Flavonoides	+	-	+	+	-
Saponinas	+	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	-
Lactonas	+	+	+	+	-
Cumarinas	+	+	+	+	+
Triterpenos	+	-	+	+	+

(+) Presencia; (-) ausencia.

Fuente: La autora

La caracterización cualitativa se corroboró con el estudio realizado por Castro et al. (2016) “EFECTO DE LA INGESTIÓN DE *BANISTERIOPSIS CAAPI* Y *PSYCHOTRIA VIRIDIS*, BINOMIO AYAHUASCA, EN EL HIPOCAMPO DEL CEREBRO DE RATAS”, siendo este el único estudio de la planta, que determina la presencia de otros metabolitos que no sean los alcaloides. Destacando que el autor además de identificar los metabolitos encontrados en el presente análisis, también manifiesta la presencia de antraquinonas.

- **Fase 3. Cuantificación de metabolitos secundarios**

4.4.Determinación cuantitativa de metabolitos secundarios

4.4.1. Cuantificación de alcaloides

Tabla 7. *Cuantificación de alcaloides en la fracción etanólica y clorofórmica*

Fracción	Absorbancia			Promedio	mg atropina/ mL	mg/g de droga cruda	Desviación ±
Etanólica	1,562	1,501	1,525	1,529	0,753	11,21	0,03
Clorofórmica	1,689	1,701	1,756	1,715	1,035	20,69	0,04

Fuente: La autora

En la Tabla 7, se presenta los resultados de la cuantificación de alcaloides totales en las fracciones etanólica y clorofórmica, manifestados como mg/ g de droga seca, concluyendo que en comparación a la fracción etanólica la clorofórmica es la que más contenido de alcaloides presenta, siendo 20,69 mg/g. Incluso más que en una fracción etérea como lo presenta Chuquimarca (2015) en su estudio “DISEÑO, ELABORACIÓN, Y CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE SEMDDS (SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS AUTOMICROEMULSIONABLES) CARGADAS CON LOS ALCALOIDES TOTALES DE *Banisteriopsis caapi*”. Realizado en la ciudad

de Riobamba, el mismo que cuantifica los alcaloides de la ayahuasca en un extracto etéreo dando como resultado 13.02 mg/ g de droga seca. Actualmente no se registran reportes sobre la cuantificación de alcaloides totales en *B. caapi*, pero si varios sobre alcaloides específicos como la harmina, la misma que esta descrita en el estudio de Gibbons (2013) titulado “Natural Product (Fungal and Herbal) Novel Psychoactive Substances” en el que presenta que la planta posee 5.01 mg/g de droga seca de harmina.

4.4.2. Cuantificación de flavonoides

Tabla 8 . Cuantificación de flavonoides en la fracción etanólica y metanólica

Fracción	Absorbancia 420 nm			Promedio	Desviación ±	mg/L de quercetina	mg/g de droga seca
Etanólica	0,95	0,95	0,99	0,96	0,00	3,91	11,27
Metanólica	0,48	0,50	0,48	0,49	0,00	1,97	6,78

Fuente: La autora

Se puede observar en la Tabla 7 la descripción de los resultados obtenidos tras la cuantificación espectrofotométrica de flavonoides, dando a conocer que la fracción etanólica es la que mayor cantidad posee con 3.91 mg/ L de quercetina, en comparación con la fracción metanólica. Pudiendo recalcar que los flavonoides tienen mayor afinidad con este compuesto. Dado esto se tomó esta fracción como parámetro de comparación con otra especie vegetal siendo esta *Thea sinensis L*, ya que no se registra cuantificación

de flavonoides en la planta de estudio. Venegas (2012), define el té verde, *Thea sinensis* L, como una especie rica en flavonoides por lo que la cuantificación de este metabolito en extracto etanólico identificó que este tiene un contenido de 1.6 mg/ L de quercetina pudiendo concluir que la planta amazónica ayahuasca posee mayor contenido de flavonoides que el té verde.

Cuantificación de taninos

Tabla 9. Datos obtenidos de la cuantificación de taninos

Fracción	Absorbancia a 750			Promedio	Desviación ±	mg Acido gálico/ ml	mg/g droga seca
Etanólica	0,18	0,32	0,23	0,244	0,010	129,89	12,989
Metanólica	0,15	0,16	0,17	0,166	0,000	90,05	9,005
Clorofórmica	0,15	0,12	0,09	0,126	0,002	69,52	6,952

Fuente: La autora

A partir de la ecuación de la curva de calibración se obtuvo la identificación de resultados sobre la cuantificación de taninos como se muestra en la Tabla 9, la misma que expresa la cantidad de estos metabolitos en g de ácido gálico y mg/g de droga seca para las tres fracciones que fueron cuantificadas; etanólica, metanólica y clorofórmica. Siendo la etanólica la que mejor resultado presente en cuanto a composición de taninos,

comparando este hecho con el estudio realizado por Colina (2016), en el que obtuvo un mejor rendimiento de los mismos en el extracto etanólico, por lo que la autora manifiesta que “los taninos al ser metabolitos polares son mejor extraídos por solventes de la misma polaridad”.

Dado el caso anterior en donde no se describe presencia alguna de la cuantificación de estos metabolitos se comparó este resultado con la planta *Taraxacum officinalis*, dado que se reporta en la misma un gran contenido de taninos, determinando así que en el estudio realizado por Jaramillo et al. (2016) “Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*”, se cuantificó los taninos en un extracto etanólico determinando la presencia de 11.70 mg/g de droga seca, mientras que la ayahuasca tiene 12.98 mg/g de droga seca, teniendo una concentración similar.

4.4.3. Cuantificación de saponinas

Tabla 10. Datos obtenidos tras la cuantificación de saponinas

Estándar	Área total de la muestra			Etanol	Metanol
25ppm	10652333	10653133	10653169	4,76	5,4257
50ppm	338614	338234	333484	3,474	5,738

Fuente: La autora

Basándose que Lozano et al. (2012), manifiesta que la mejor manera de cuantificar saponinas es mediante el método analítico de HPLC, siendo anteriormente comparado este, con el método espectrofotométrico Uv-vis y la técnica de prueba de espuma. Se interpretó los resultados obtenidos tras este método realizado en las fracciones tanto etanólica como metanólica, siendo la etanólica la que mayor concentración de saponinas presenta corroborando este hecho con el estudio realizado por Jaramillo et al. (2016) en el cual tras el análisis de seis plantas de su investigación, obtiene mayor concentración de saponinas en este extracto que en el metanólico. O como es el caso del estudio “Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo)”, descrito por Mena (2015) que presenta el mismo hecho. Pudiendo también comparar la planta de esta investigación llamada jaboncillo por su alto contenido de saponinas, determinando una concentración mayor de este metabolito siendo de 15.05 mg/ g de droga seca a comparación de la ayahuasca que presenta 5.88 mg/ g de droga seca.

- **Resultados generales de la cuantificación de los 4 metabolitos en las distintas fracciones**

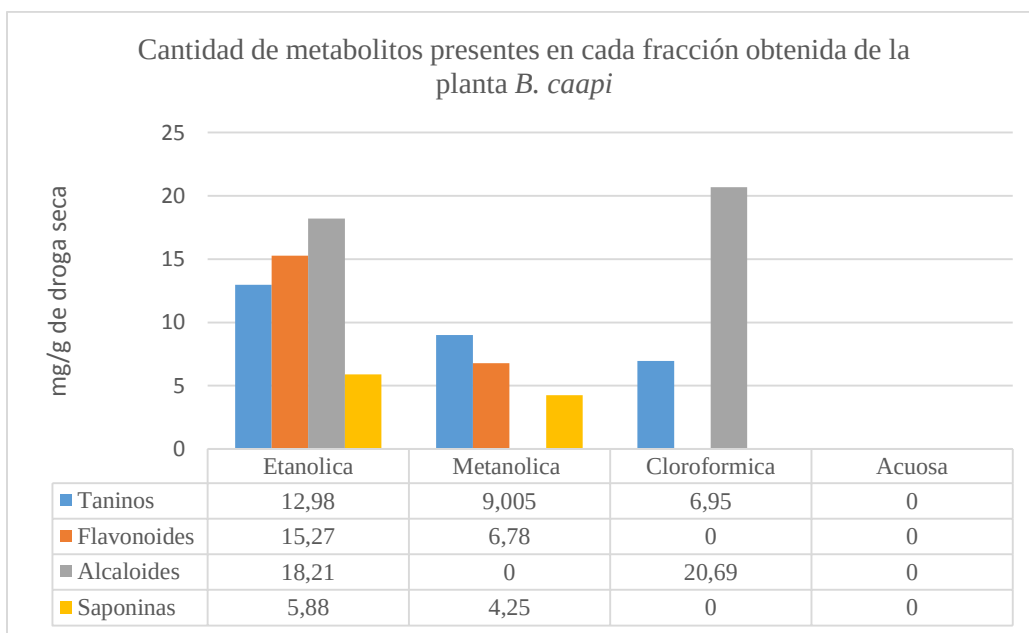


Ilustración 15. Histograma de la cantidad de metabolitos presentes en cada fracción obtenida de la planta *B. caapi*

Fuente: La autora

Como se puede observar en el presente histograma, la fracción que más metabolitos presentó fue la etanólica seguida de la metanólica mientras que la fracción acuosa no tuvo presencia alguna de metabolitos. También se puede observar que en la planta existe una gran cantidad de alcaloides en comparación con los otros metabolitos secundarios, siendo las saponinas el compuesto de menor representación, encontrándose también flavonoides y taninos como elementos presentes en cantidades considerables.

4.5.Determinación de la capacidad antioxidante

Posterior a la validación del método de DPPH, se obtuvo la capacidad antioxidante de cada metabolito secundario, así también como el del extracto etanólico total, y la del patrón de comparación, N-acetil cisteína. Obteniendo el siguiente histograma (las tablas de resultados de DPPH, de cada metabolito se pueden observar en el Anexo D).

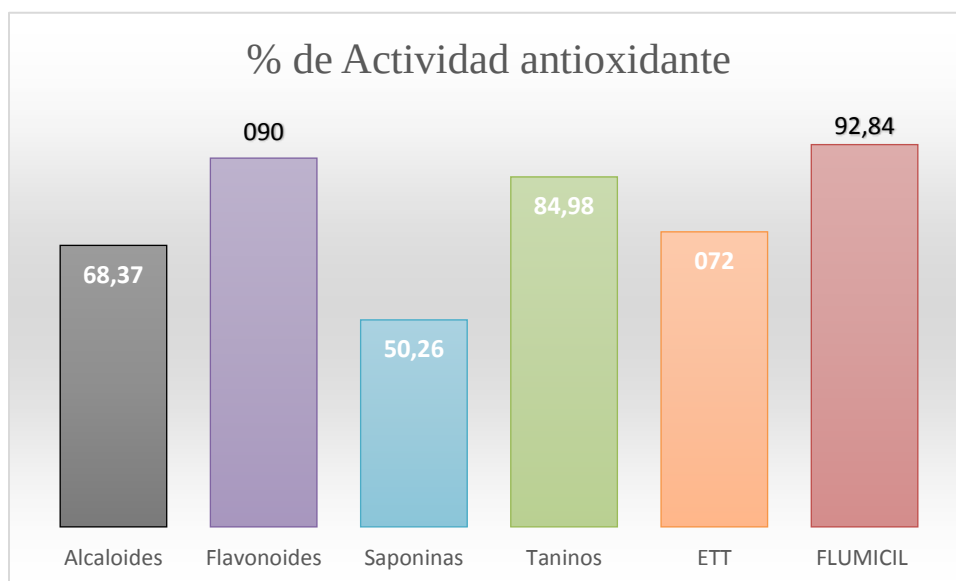


Ilustración 16. Histograma del porcentaje de la capacidad antioxidante de los metabolitos de interés y ETT

Fuente: La autora

En la determinación de la capacidad antioxidante, se demuestra que los flavonoides son aquellos que poseen mayor captación de radicales libres en comparación a los otros metabolitos analizados, teniendo un 89,56% de actividad antioxidante,

mientras que los taninos presentan un 84,98 %, los alcaloides 68,37%, el extracto etanólico total 71,65% , las saponinas con 50,26%, y finalmente el patrón de estudio con 92,84% recalcando que todos estos presentan una actividad mayor en la concentración de 100ppm.

Para aprobar lo analizado se validó los resultados obtenidos, con el estudio de Cabrera et al (2017) “VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES, FENOLES, FLAVONOIDES Y TANINOS EN *Moringa oleifera* Lam. EN FUNCIÓN DE SU EDAD Y ALTURA” el mismo que realiza la determinación de la capacidad antioxidante, empleando el método del radical DPPH, en los metabolitos secundarios de la moringa, teniendo como grupo de mayor captación de radicales libres los flavonoides. Los mismos que poseen esta acción debido a la facilidad que tiene de unirse con polímeros biológicos, siendo estos enzimas, ADN y transportadores de hormonas, de quelar iones metálicos transitorios, como Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , capturar radicales libres y catalizar el transporte de electrones (Culebras, Tuñón, Martínez, & Gonzalez, 2002).

4.6.Comparación de la capacidad antioxidante

4.6.1. Comparación de la capacidad antioxidante de los metabolitos de interés, frente al extracto etanólico total

Para cumplir con el objetivo planteado se realizó una comparación estadística entre los metabolitos de interés y el extracto etanólico total, elaborando un análisis estadístico inferencial y uno descriptivo, con la ayuda del software IBM SPSS Statistics.

Para realizar el diseño experimental planteado, se procede a determinar si la distribución de los datos es normal a través de la prueba de Shapiro-Wilks, debido a que el tamaño de la muestra a analizar es menor a 50 datos.

Por lo que para esta prueba se planteó las siguientes hipótesis, las cuales serán aceptadas o rechazadas según los resultados del análisis, que se podrá evidenciar en la Tabla 11.

H0: los datos poseen una distribución normal

H1: los datos no poseen una distribución normal

Como se podrá apreciar en la columna grados de significancia, los valores alcanzados son mayores a los valores de α (0.05) por lo tanto se concluye que, se acepta la hipótesis nula, determinando que los datos tienen un comportamiento normal.

Tabla 11. Prueba de normalidad con Shapiro-Wilks

	Metabolito	Shapiro-Wilks		
		Estadístico	gl	Sig.
Antioxidante	Alcaloides	0,880	3	0,324
	ETT	0,942	3	0,537
	Flavonoides	0,986	3	0,775
	Saponina	0,937	3	0,516
	Taninos	0,999	3	0,934

Fuente: La autora

Una vez determinado que se cumple el supuesto de normalidad, se procedió a realizar un análisis inferencial aplicando un diseño completamente al azar (DCA) con un nivel de confianza de 95%, considerando el factor de entrada a los metabolitos analizados el mismo que posee 4 niveles más un testigo, cada uno de ellos con tres repeticiones, y teniendo como factor de salida la capacidad antioxidante, se establece las siguientes hipótesis:

H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots$ (Las medias de los tratamientos son iguales)

H_1 : Al menos dos medias de los tratamientos son distintas

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 12, donde se puede apreciar el estadístico p, en relación con el factor de variabilidad (metabolitos), con un valor de 0,00 de significancia, determinando que $p < 0,05$, por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas (H_0), concluyendo que existen diferencias significativas entre todos los diferentes niveles analizados de la variable de entrada.

Tabla 12. ANOVA

ANOVA					
Origen	Tipo I de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Metabolitos	86170,957	5	17234,191	164553,068	,000
Error	1,047	10	,105		
Total	86172,004	15			
a. R al cuadrado = 1,000 (R al cuadrado ajustada = 1,000)					

Fuente: La autora

Dado que las diferencias entre los tratamientos son significativas se presentó una nueva inquietud (los metabolitos analizados son menores o mayores que el extracto etanólico total), por lo que se procedió a realizar la prueba de Dunnett, a partir de un intervalo de confianza de 95% como se muestra en la Tabla 13, donde se deduce que según el límite superior obtenido en la prueba, los taninos y flavonoides tienen mayor

capacidad antioxidante que el extracto etanólico total, mientras que las saponinas y alcaloides poseen una menor capacidad antioxidante que el mismo.

Tabla 13. Prueba de Dunnett

Comparaciones múltiples Variable dependiente: Antioxidante T de Dunnett (<control) ^a					
(I) Metabolito	(J) Analito	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite superior
Alcaloides	ETT	-3,9933*	,63576	,000	-2,4258
Flavonoide	ETT	17,5700	,63576	1,000	19,1375
Saponinas	ETT	-20,9167*	,63576	,000	-19,3492
Taninos	ETT	12,6333	,63576	1,000	14,2008
Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = ,606. *. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05. a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.					

Fuente: La autora

4.6.2. Comparación de la capacidad antioxidante de los metabolitos de interés, frente al patrón de estudio, N acetil – cistatina

De igual manera que en el caso anterior, se procedió a comparar los cuatro metabolitos analizados frente al patrón de estudio, siendo este N-acetil cistatina,

utilizando la prueba de Shapiro-Wilks, para comprobar el supuesto de normalidad a partir de las siguientes hipótesis:

H0: los datos poseen una distribución normal

H1: los datos no poseen una distribución normal

Como se evidencia en la tabla 14, dentro de la columna grados de significancia, los valores alcanzados son mayores a los de α (0.05), por lo que se acepta la hipótesis nula, determinando que los datos poseen un comportamiento normal.

Tabla 14. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilks

	Metabolito	Shapiro-Wilks		
		Estadístico	gl	Sig.
Antioxidante	Alcaloides	0,880	3	0,324
	Flavonoides	0,998	3	0,908
	Saponinas	0,937	3	0,516
	Taninos	0,934	3	0,505
	N-a c	0,800	3	0,114

Fuente: La autora

Con el cumplimiento del supuesto de normalidad, se procedió a realizar un análisis inferencial de igual manera que el caso anterior, aplicando un diseño completamente al azar (DCA) con un nivel de confianza de 95%, siendo el factor de entrada los metabolitos analizados el mismo que posee 4 niveles más un testigo, cada uno

de ellos con tres repeticiones, y teniendo como factor de salida la capacidad antioxidante.

Por lo que dentro del DCA, se plantean las siguientes hipótesis:

H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots$ (Las medias de los tratamientos son iguales)

H_1 : Al menos dos medias de los tratamientos son distintas

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 14, donde se puede apreciar el estadístico p, en relación con el factor de variabilidad (metabolitos), con un valor de 0,00 de significancia, determinando que $p < 0,05$, por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas (H_0), concluyendo que existen diferencias significativas entre todos los diferentes niveles analizados de la variable de entrada.

Tabla 15. ANOVA

ANOVA					
Origen	Tipo I de suma de cuadrad os	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Metabolitos	93020,789	5	18604,158	14693,293	,000
Error	12,662	10	1,266		
Total	93033,451	15			
a. R al cuadrado = 1,000 (R al cuadrado ajustada = 1,000)					

Fuente: La autora

Por otro lado, ya que existen diferencias significativas entre los grupos, se generó varias interrogantes siendo una de estas, si uno de los cuatro metabolitos analizados, posee mayor capacidad antioxidante que el patrón de comparación, (N-acetil cisteína), se procedió a realizar la prueba estadística de Dunnett, la misma que a partir del intervalo de confianza del 95%, determinó que dentro de los límites superiores, existen valores negativos menores a 0, lo que nos lleva a la conclusión que todos los metabolitos analizados tienen menor capacidad antioxidante que N- acetil cisteína.

Tabla 16. Prueba de Dunnett

Comparaciones múltiples Variable dependiente: Antioxidante T de Dunnett					
(I) Metabolito	(J) Analito	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite superior
Alcaloides	N ac	-25,1867*	,87247	,000	-22,6554
Flavonoide	N ac	-3,9900*	,87247	,003	-1,4587
Saponinas	N ac	-41,3800*	,87247	,000	-38,8487
Taninos	N ac	-7,3900*	,87247	,000	-4,8587
El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,142. *. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05. a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.					

Fuente: La autora

Finalmente, para corroborar los resultados obtenidos se realizó un análisis descriptivo, planteándose un diagrama de caja y bigotes, el mismo que representa gráficamente que N acetil-cisteína posee mayor capacidad antioxidante que los metabolitos de interés y el extracto etanólico total, diferenciando al metabolito flavonoide como uno de los metabolitos con capacidad antioxidante casi similar al de N-acetil-cisteína

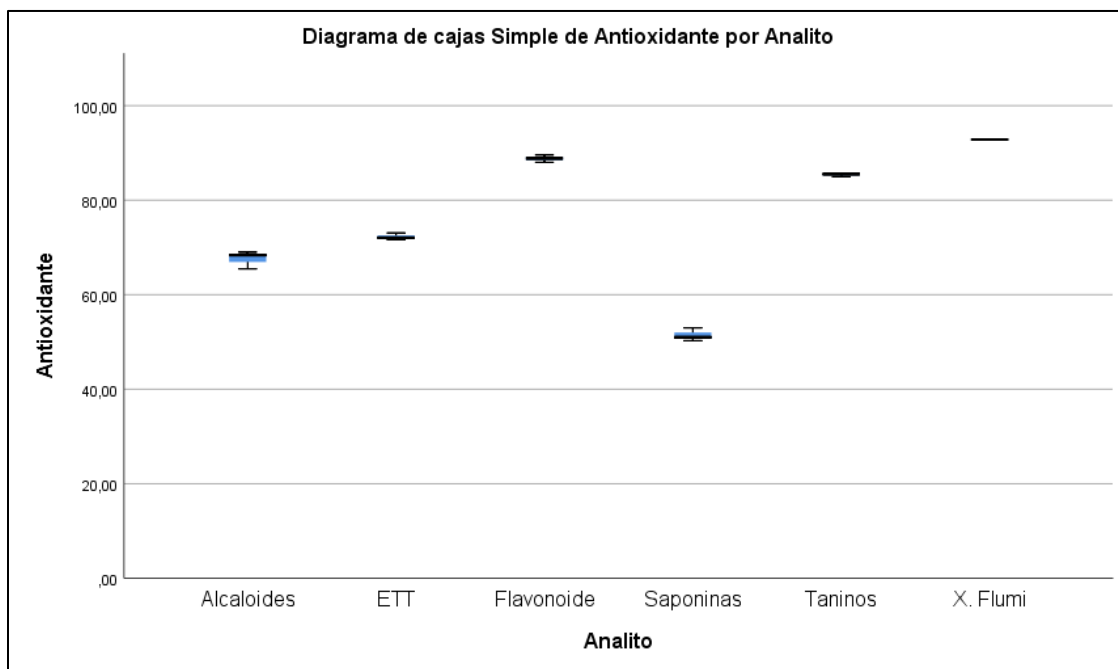


Ilustración 17. Diagrama de caja y bigotes

Fuente: La autora

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se obtuvo un extracto etanólico total, mediante la maceración con etanol al 95%, evidenciando que el porcentaje de rendimiento de extracción de la planta *B. Caapi* es de 36.95 % considerando este un porcentaje alto dentro de los rangos descritos por otros autores.
- En el tamizaje fitoquímico de los metabolitos secundarios analizados en las distintas fracciones purificadas del ETT, de *B. caapi* se determinó la presencia de varios metabolitos como alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, lactonas, cumarinas y triterpenos.
- Cualificadas las fracciones se observó que en la clorofórmica hay presencia de alcaloides, saponinas, taninos, lactonas y cumarinas, en la fracción acusa, se determinó la presencia de saponinas, cumarinas y triterpenos mientras que en la metanólica y la etanólica se evidenció la presencia de todos los metabolitos cualificados, determinando que estas fracciones son las más óptimas tras la extracción y purificación.

- Dentro de la cuantificación de los cuatro metabolitos con actividad antioxidante, se define que *B. caapi* posee una gran cantidad de alcaloides en comparación con otros metabolitos secundarios, siendo las saponinas el compuesto de menor representación, encontrándose también flavonoides y taninos como elementos presentes en cantidades considerables.
- Dados los resultados del análisis de la capacidad antioxidante, realizado por el método DPPH, se determinó que los flavonoides en fracción etanólica, son los que poseen mayor captación de radicales libres en comparación con los otros analizados, teniendo 89,56% de actividad antioxidante.
- Los taninos presentan un 84,98 %, los alcaloides 68,37% captación de radicales libres y las saponinas 50,26%, mientras que N-acetil cisteína presenta 92, 84%, recalando que todos estos presentan una actividad mayor en la concentración de 100ppm.
- Mediante el análisis estadístico con un nivel de confianza de 95% se determinó, que se rechaza la hipótesis planteada en el estudio, ya que ningún metabolito posee mayor capacidad antioxidante que N – acetil cisteína.

- Finalizando con el estudio, mediante el análisis estadístico, se declara que ninguno de los cuatro metabolitos secundarios analizados de la planta *Banisteriopsis caapi* (ayahuasca), posee una actividad antioxidante mayor a N-acetil cisteína, rechazando así la hipótesis planteada al inicio de la investigación.
- A pesar de que la hipótesis fue rechazada se manifiesta que el metabolito secundario flavonoide puede ser considerado como una alternativa natural para remplazar a N- acetil cisteína como antioxidante en la industria farmacéutica en el país, ya que los resultados sobre capacidad antioxidante no son muy diferentes.

5.2. Recomendaciones

- Por la diversidad de contenido de metabolitos se recomienda realizar una investigación más detallada del componente químico y sus posibles acciones terapéuticas que la planta *B. caapi* pudiera tener.
- Evaluar otros tipos de métodos de purificación y extracción que permitan el aislamiento metabolitos presentes en la especie.
- Se recomienda realizar estudios de caracterización cualitativa y cuantitativa de metabolitos secundarios de la misma especie en diferentes pisos climáticos.
- Se recomienda seguir cuantificando metabolitos secundarios de las plantas que posee el Ecuador, ya que en este tema es muy escaso la bibliografía generada en el país.
- Por último se recomienda evaluar la actividad antioxidante por otros métodos, para corroborar lo resultados obtenidos dentro de esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, W. (2004). Malpighiaceae. Flowering Plants of the Neotropics. Princeton. Pp. 229–232.
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinarés, I., Llor, N., Muñoz, D., Nicolas, E., Pérez, M.L., Pujol, M.D., Rosel, G., Seco, M., Velasco, D. (2009). Operaciones básicas en el laboratorio de química.
- Arango, G. J. (2008). Universidad de antioquia alcaloides y compuestos nitrogenados, 2–10.
- Benavidez, A., Ramirez, H., Robledo, V. (2009). “Antioxidantes en las Plantas: Algunos Factores Edáficos y Ambientales que los Modifican”, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
- Buitrago, D., Mosquera, M., Niño, J., Correa, Y. (2005). Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. Scientia Et Technica; 27: 231 – 234.
- Castaños, E. (2015). *Lida con la Química* . Obtenido de <https://lidiaconlaquimica.wordpress.com/2015/08/10/instrumentacion-en-hplc/>
- Castro, M. (2015). caracterizacion de metabolitos secundarios y evaluacion del potencial citotóxico de Iresine spiculigera seubert, 1–228.
- Chuquimarca, H. (2015). Diseño, elaboración, y caracterización de Micropartículas de SEMDDS (sistemas de liberación de fármacos auto-microemulsionables) cargadas

con los alcaloides totales de BANISTERIOPSIS CAAPI.

Cleversley, K. (2002). Banisteriopsis caapi – Ayahuasca.

Colina, A. C. (2016). *Análisis fitoquímico , determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos , actividad antioxidante , antimicrobiana de las hojas de “ Muehlenbeckia hastulata (J . E . Sm) I . M . Johnst ” de la Para optar el Título Profesional de Químico. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.*

CONACYT. (2014). Obtenido de <http://www.cienciaydesarrollo.mx/?p=articulo&id=227>

Coronado, M., Salvador, V., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015).
Antioxidantes : perspectiva actual para la salud humana. *Chil Nutr*, 42(7).

Culebras, J. M., Tuñón, M. J., Martínez, S., & Gonzalez, J. (2002). Los flavonoides :
propiedades y acciones antioxidantes, 271–278.

Espinoza, J. (2014). DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES EN
DOCE PLANTAS MEDICINALES Y SU ACTIVIDAD EXPECTORANTE

Feltrin, A., Boligon, V., Janovik, M. (2012). Antioxidant potential, total phenolic and
flavonoid contents from the stem bark of Guazum aulmifolia Lam. *Asian. Journal of
Biological Sciences* 5(5):1-5.

Fericgla, J. (2000). Breve Informe Sobre La Ayahuasca.

García, A. (2011). Reduca. Biología. *REDUCA (Biología)*, 2(3), 119–145.

Guerrero, C. (2013). Principios de química orgánica. Guía de laboratorio. Universidad
Nacional de Colombia.

- Gibbon, A. (2013). Natural Product (Fungal and Herbal) Novel Psychoactive Substances. Novel Psychoactive Substances Classification, Pharmacology and Toxicology. 2013, Pages 345-36
- Guiterrez, A. et al. (2009). Relevancia De Los Productos Naturales En El Descubrimiento De Nuevos Fármacos En El S. Xxi. *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 103(2), 409–419.
- Jaramillo, C., Espinoza, A., D'Armas, H., Troccoli, L., & De Astudillo, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1171–1184. <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i3.19537>
- Lima, L. (2004). Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. *Medicina*, 7.
- López, A. (2008). Producción de bebida alcohólica de alta calidad. *Universidad de Las Americas de Puebla*, 2(25–30). Retrieved from http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/lopez_a_e/capitulo_1.html
- López Carreras, N., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutricion Clinica y Dietetica Hospitalaria*, 32(3), 81–91.
- Magalhães, L., Santos , F., Segundo , M., Reis , S., & Lima , J. (2010). *Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity*. Portugal : REQUIMTE.

- Martínez, Y., Soto, F., Almeida, F., Hermosilla, R., Martínez, O. (2012). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. *Rev Cubana Plant Med.* 17(4):320-329.
- Mashinkias, M. (2012). *La Etno-educación shuar y aplicación del Modelo de Educación Intercultural Bilingüe en la nacionalidad shuar*. Cuenca.
- Makkar, H., Norvsambuu, T., Lkhagvatseren, S., Becker, K. (2009). Plant Secondary Metabolites in some Medicinal Plants of Mongolia Used for Enhancing Animal Health and Production. *Tropicultura*, 27 (3): 159-167.
- Mazid, M., Khan, T, & Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2 SPECIALISSUE), 232–249. <https://doi.org/citeulike-article-id:10435815>
- Morales, J. Sanabria, G. Vásquez, A. (2013). *Actividad antioxidante*.
- Navarro , C., Nuñez, M., & Cebrián, J. (2012). *Libro de la cosmética natural*. Barcelona: N.E.ED ediciones.
- Pedraza, R. (2008). Metabolitos secundarios no fenólicos en el follaje de árboles y arbustos Efecto en la fisiología digestiva de rumiantes. *Revi. Prod. Anim.*, 20(2), 97–101.
- Perez, G. (2017). *Espectrometria*. Obtenido de https://www.espectrometria.com/espectrometria_ultravioleta-visible
- Roginsky, V., Lissi, E. (2005) Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food. *Food Chemistry*, 92, 235-254.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de

- origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria : Organó Oficial de La Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Radice, M., & Vidari, G. (2005). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes . y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja*, (Figura 1), 3–11. Retrieved from <http://lagranja.ups.edu.ec/index.php/granja/article/viewFile/523/378>
- Rogério dos Santos Alves; Alex Soares de Souza, et all. (2014). Isoprenoides. *Igarss* 2014, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Rojas, L. (2015). Caracterización química cuantitativa de metabolitos secundarios en plantas medicinales., 54.
- Rojas, L., Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas., 108. Retrieved from <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6653>
- Savithramma, N., Linga, R., & Suhrulatha, D. (2011). Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. *Middle-East Journal of Scientific*, 8(3), 579–584. Retrieved from [http://idosi.org/mejsr/mejsr8\(3\)11/6.pdf](http://idosi.org/mejsr/mejsr8(3)11/6.pdf)
- Trujillo, E. (2010). EL USO DE LA AYAHUASCA EN LA AMAZONIA. *Universidad de la Amazonía*.
- Tovar, J. (2013). *Determinación De La Actividad Antioxidante Por Dpph Y Abts De 30 Plantas Recolectadas En La Ecoregion Cafetera Jennifer*. *Journal of Chemical*

Information and Modeling (Vol. 53).

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

UGR. (2004). www.ugr.es. Obtenido de

http://www.ugr.es/~quiorred/lab/oper_bas/crom.htm#cabecera

Unam. (2007). Técnicas Cromatográficas. *Química Analítica Instrumental II*, 1–123.

UNAM. (2015). Cromatografía en placa fina, 3.

UNP. (2009). UNP. Obtenido de http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads/2009/04/tp5_glicosidos_2009.pdf

Valderrama, M. (2008). Capítulo ii antecedentes, 11–13.

Valentão , P., Fernandes , E., Carvalho , F., & Andrade , P. (2002). Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Agric. Food Chem.*

Varas, D. (2014). *Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica Hplc*.

Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A., & Zoltan, T. (2007). Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances En Química*, 2(2), 3–15.

Venegas, E. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *Ucv-Scientia*, 4(2), 161–174.

Yankur, Y. (2013). *PLANTAS SAGRADAS Y VISIONARIAS DE LA NACIONALIDAD*

SHUAR EN LA ASOCIACION SHUAR NANKAIS.

ANEXOS

ANEXO A. Reacciones positivas tras las prueba de caracterización cualitativa de las fracciones más representativas.

Prueba para saponinas (Prueba de espuma)	 Fuente: La autora
Prueba de flavonoides (Prueba de Shinoda)	 Fuente: La autora
Prueba para alcaloides (Ensayo de Dragendorff)	

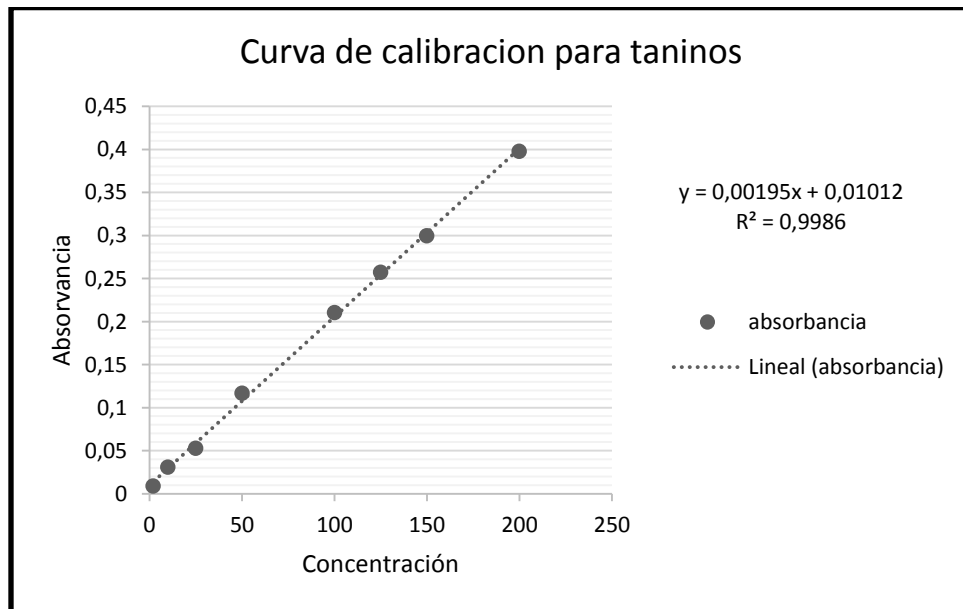
	 Fuente: La autora
Prueba de taninos (Ensayo de Cloruro férrico)	 Fuente: La autora

ANEXO B. Equipos utilizados a lo largo de la investigación

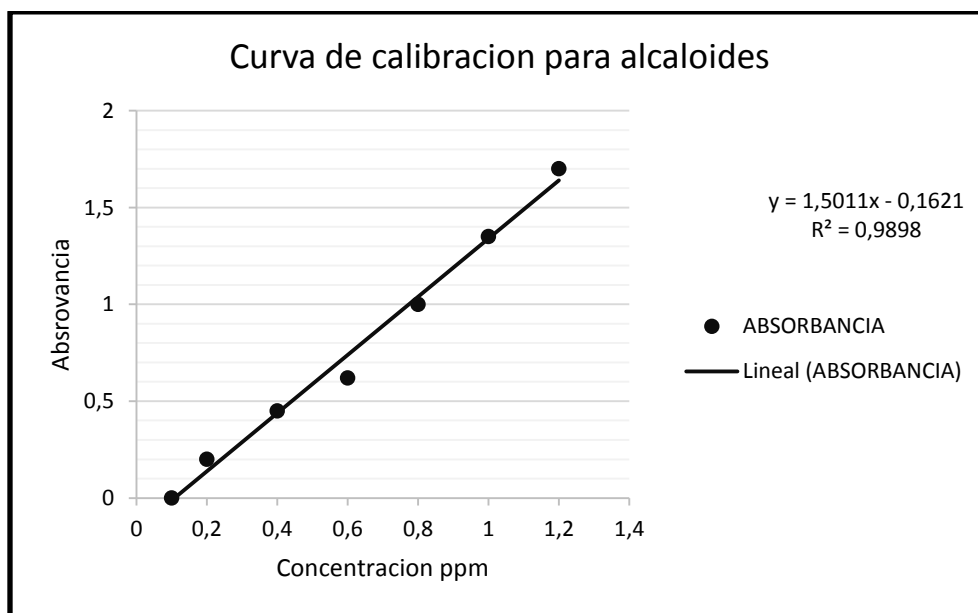
Evaporador Rotativo <i>Tecnal TE-2II</i>	 Fuente: La autora
Limpiador Ultrasónico <i>Fisher Scientific FS20D</i>	

	 Fuente: La autora
Espectofotómetro <i>V-630 Jasco</i>	 Fuente: La autora
Binary HPLC Pump <i>Waters 1525</i>	 Fuente: La autora

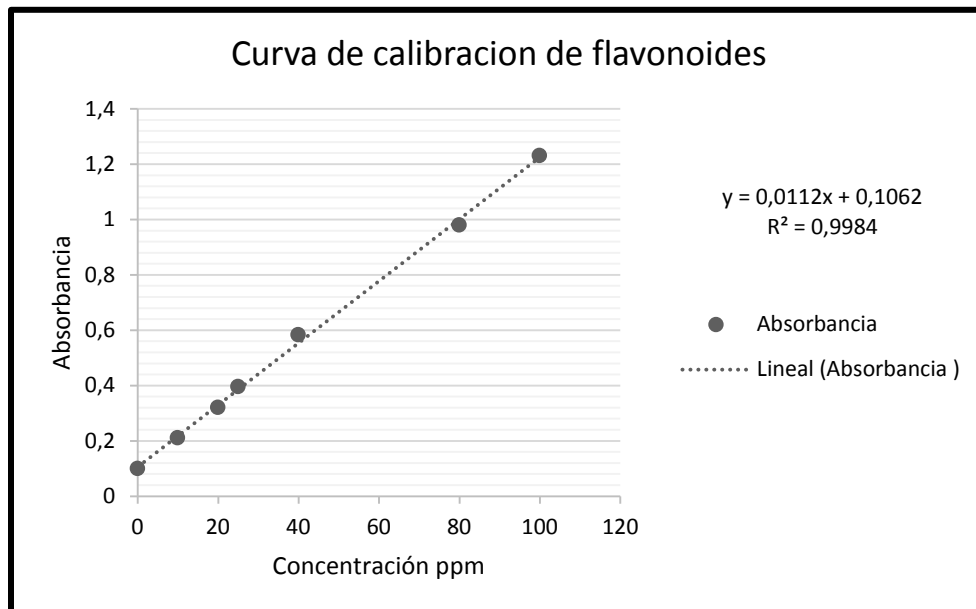
ANEXO C. Curvas de calibración



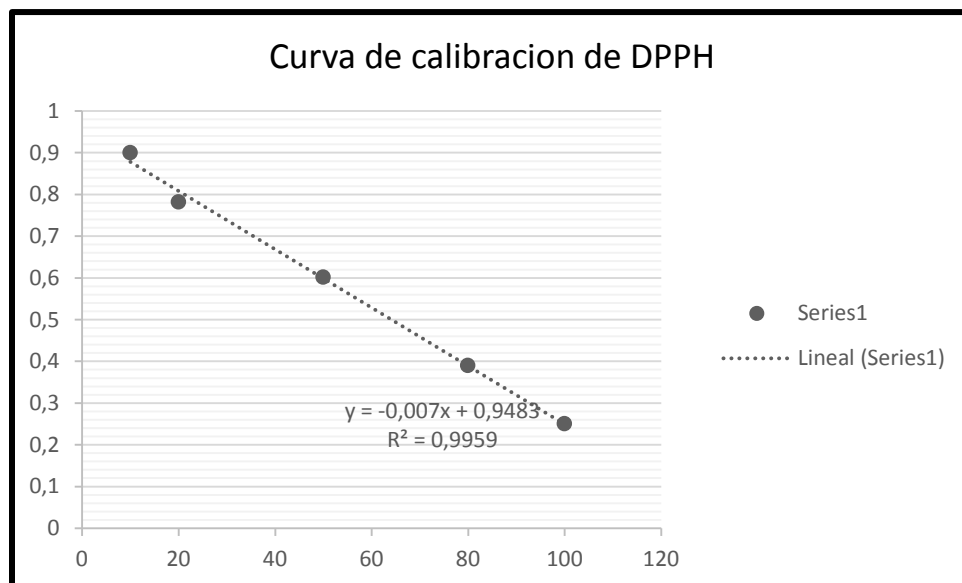
Fuente: La autora



Fuente: La autora



Fuente: La autora



Fuente: La autora

ANEXO D. Tablas de concentraciones de DPPH

DPPH Extracto Etanólico Total					
Concentración	Absorbancia			Promedio	%Captacion
10	2,06	2,05	2,01	2,040	59,06
20	2,01	2,03	2,02	2,020	59,84
50	1,98	1,96	1,86	1,933	63,25
80	1,9	1,45	1,99	1,780	69,29
100	1,75	1,85	1,56	1,720	71,65

Fuente: La autora

DPPH Flavonoides					
Concentración	Absorbancia			Promedio	%Captacion
10	2,572	2,584	2,65	2,602	36,93
20	1,812	1,813	2,6	2,750	31,10
50	0,996	0,997	2,582	1,580	77,17
80	0,9	1,3	2,01	1,403	84,12
100	1,75	0,9	1,01	1,220	91,34

Fuente: La autora

DPPH Alcaloides					
Concentración	Absorbancia			Promedio	%Captacion
10	2,45	2,584	2,46	2,498	41,02
20	2,2	2,68	2,15	2,343	47,11
50	2,23	2,35	2,24	2,273	49,87
80	1,89	1,85	1,86	1,867	65,88
100	1,890	1,95	1,57	1,803	68,37

Fuente: La autora

DPPH Saponinas					
Concentración	Absorbancia			Promedio	%Captacion
10	2,57	2,58	2,6	2,583	37,66
20	2,49	2,56	2,45	2,500	40,94
50	2,35	2,35	2,45	2,383	45,54
80	2,25	2,3	2,45	2,333	47,51
100	2,21	2,35	2,23	2,263	50,26

Fuente: La autora

DPPH Taninos					
Concentración	Absorbancia			Promedio	%Captacion
10	2,76	2,65	2,12	2,510	40,55
20	2,01	2,65	2,6	2,420	44,09
50	2,28	2,01	2,3	2,197	52,89
80	2,18	0,949	2,535	1,888	65,04
100	1,500	1,45	0,9	1,283	88,85

Fuente: La autora

DPPH N acetil cisteína					
Concentración	Absorbancia			Promedio	%Captacion
10	0,9	2,05	2,54	1,830	67,32
20	0,8	0,9	2,5	1,400	84,25
50	0,9	1,998	1	1,299	88,22
80	1,5	1,05	1,06	1,203	91,99
100	1,500	0,75	0,89	1,047	98,16

Fuente: La autora