



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE LA  
FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Palicourea amethystina* SOBRE  
XANTINOXIDASA Y RADICAL SUPERÓXIDO MEDIANTE  
AUTOGRAFÍA”**

**Trabajo de Titulación**

**Tipo:** Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA:** ADRIANA PAULINA CARRILLO YÁNEZ

**DIRECTOR:** BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA, M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2019

**©2019, Adriana Paulina Carrillo Yáñez**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Adriana Paulina Carrillo Yáñez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 3 de diciembre del 2019



**Adriana Paulina Carrillo Yáñez**



**060425914-3**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo Trabajo Experimental **“DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Palicourea amethystina* SOBRE XANTINOXIDASA Y RADICAL SUPERÓXIDO MEDIANTE AUTOGRAFÍA”** de responsabilidad de la señorita: **Adriana Paulina Carrillo Yáñez**, ha sido revisado minuciosamente por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación. El mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF. Diego Renato Vinueza Tapia, M.Sc <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		<u>03-12-2019</u>
Lcda. Karen Lisseth Acosta León, M.Sc <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>		<u>03-12-2019</u>

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de titulación a Dios por darme la salud y la capacidad tanto física como mental para poder culminar mi carrera académica, por permitirme tener una oportunidad de estudio y una familia con cual contar en todo momento, a mis padres quienes me apoyaron y motivaron a diario para que yo sea una profesional y sin duda alguna su esfuerzo no ha sido en vano, aquí están los resultados padres míos. Dedico a mis hermanos, familia y a todos los que fueron un granito de apoyo en mi vida para poder ser una Bioquímica Farmacéutica.

Adriana

## **AGRADECIMIENTO**

Darle gracias en primer lugar a Dios por la vida y por permitirme estar en donde estoy ahora, después darle gracias a mis padres Gonzalo Carrillo y María Elena Yáñez ya que fueron mi pilar esencial y primordial en toda la trayectoria de mis estudios, por siempre haberme apoyado económicamente y aún más por estar presentes en mis éxitos y en mis derrotas , sin dejarme de dar ánimos y decirme “ tú eres capaz” nunca me cansaré de decir que la familia que Dios me dio no es buena sino perfecta, gracias a mis hermanos Fernando y Gaby por ser el motivo que me ayudó a luchar siempre y no dejarme vencer, a mi familia en general por estar siempre, darme una mano o ver la manera de cómo ayudarme. Darles gracias a todos los maestros que a lo largo de mi carrera me impartieron sus conocimientos me ayudaron a formar una profesional en mí, por el trabajar arduo que realizan en las aulas para dar a la sociedad personas con propósito.

Por último y no menos importante dar gracias a mi persona, por cumplir una meta más, por saber afrontar los problemas y salir de ellos, decirme aquí no terminan tus esfuerzos pues apenas estás empezando.

Adriana

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	xii
SUMMARY.....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Familia Rubiaceae .....</b>	<b>7</b>
<i>1.1.1 Características .....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.2 Clasificación taxonómica.....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.3 Aspectos químicos y biológicos .....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.4 Composición de alcaloides .....</i>	<i>9</i>
<b>1.2 Genero Palicourea.....</b>	<b>9</b>
<i>1.2.1 Características del género .....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.2 Especies .....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.3 Distribución en el Ecuador .....</i>	<i>11</i>
<b>1.3 Especie Palicourea amethystina .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Xantina oxidorreductasa .....</b>	<b>12</b>
<i>1.4.1 Funciones de XOR .....</i>	<i>12</i>
<b>1.3 Xantina Oxidasa.....</b>	<b>13</b>
<i>1.3.2 Función .....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.3 Inhibidores de XO .....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.4 Enfermedades causadas por XO y RL.....</i>	<i>16</i>
<b>1.4 Hiperuricemia.....</b>	<b>18</b>
<i>1.4.1 Etiología.....</i>	<i>19</i>
<i>1.4.2 Manifestaciones clínicas .....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.3 Tratamiento .....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.4 Complicaciones con la baja excreción del ácido úrico .....</i>	<i>21</i>

<b>1.5</b>	<b>Enfermedad de la gota .....</b>	<b>22</b>
<i>1.5.1</i>	<i>Etiología.....</i>	<i>23</i>
<i>1.5.2</i>	<i>Factores de riesgo .....</i>	<i>23</i>
<i>1.5.3</i>	<i>Síntomas .....</i>	<i>24</i>
<i>1.5.5</i>	<i>Diagnostico .....</i>	<i>25</i>
<i>1.5.6</i>	<i>Tratamiento .....</i>	<i>26</i>
<b>1.6</b>	<b>Estrés oxidativo .....</b>	<b>26</b>
<i>1.6.1</i>	<i>Agentes tóxicos .....</i>	<i>27</i>
<i>1.6.2</i>	<i>Enfermedades .....</i>	<i>27</i>
<i>1.6.3</i>	<i>Radicales libres.....</i>	<i>27</i>
<b>1.6</b>	<b>Autografía.....</b>	<b>28</b>
<i>1.6.1</i>	<i>Tipos .....</i>	<i>29</i>
<b>1.7</b>	<b>Determinación de antioxidantes, inhibidores de XO y RSO .....</b>	<b>29</b>
<i>1.7.1</i>	<i>Método DPPH .....</i>	<i>30</i>
<i>1.7.2</i>	<i>Sistema Riboflavina/luz/NBT .....</i>	<i>31</i>
<i>1.7.3</i>	<i>Sistema NADH/NBT/PMS.....</i>	<i>32</i>
<b>CAPÍTULO II</b>		
<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Lugar de Investigación .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Recolección del material vegetal .....</b>	<b>34</b>
<b>2.3</b>	<b>Identificación botánica.....</b>	<b>34</b>
<b>2.4</b>	<b>Materiales, equipos y reactivos .....</b>	<b>35</b>
<b>2.5</b>	<b>Métodos y técnicas.....</b>	<b>37</b>
<i>2.5.1</i>	<i>Acondicionamiento del material vegetal .....</i>	<i>37</i>
<i>2.5.2</i>	<i>Control de calidad .....</i>	<i>37</i>
<i>2.5.3</i>	<i>Tamizaje fitoquímico .....</i>	<i>38</i>
<i>2.7.5</i>	<i>Cromatografía en capa fina .....</i>	<i>40</i>
<i>2.7.6</i>	<i>Ensayos autográficos. ....</i>	<i>40</i>



### **CAPÍTULO III**

<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Control de calidad.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Tamizaje fitoquímico .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3 Obtención del extracto alcaloideo.....</b>	<b>46</b>
<b>3.4 Cromatografía en capa fina (TLC).....</b>	<b>47</b>
<b>3.5 Ensayos autográficos.....</b>	<b>48</b>
<b>3.5.1 Captación de DPPH .....</b>	<b>48</b>
<b>3.5.2 Sistema Riboflavina + LUZ + NBT .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.3 Sistema NAD H/ PMS/ NBT.....</b>	<b>51</b>
<b>3.5.4 Inhibición XO .....</b>	<b>53</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>56</b>

### **GLOSARIO**

### **BIBLIOGRAFÍA**

### **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b> Materiales, reactivos y equipos .....	35
<b>Tabla 2-3:</b> Control de calidad de las hojas de <i>Palicourea amethystina</i> . .....	43
<b>Tabla 3-3:</b> Tamizaje fitoquímico de las hojas de <i>Palicourea amethystina</i> . .....	44
<b>Tabla 4-3:</b> Rendimiento de la extracción líquido-líquido de las hojas de <i>P. amethystina</i> . .....	46
<b>Tabla 5-3:</b> Posible compuesto identificado en el extracto EAPA mediante TLC.....	47
<b>Tabla 6-3:</b> Actividad captadora de radical DPPH de ácido ascórbico y EAPA .....	48
<b>Tabla 7-3:</b> Captación de $O_2^-$ de taxifolina y EAPA, método Riboflavina/Luz/NBT. ....	50
<b>Tabla 8-3:</b> Captación de $O_2^-$ de taxifolina y EAPA, método NADH/PMS/NBT .....	51
<b>Tabla 9-3:</b> Actividad inhibitoria de xantina oxidasa de alopurinol.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b>	Distribución de familia Rubiaceae en el mundo .....	7
<b>Figura 2-1:</b>	Especies del género <i>Palicourea</i> .....	11
<b>Figura 3-1:</b>	Distribución del género <i>Palicourea</i> en el Ecuador. ....	11
<b>Figura 4-1:</b>	Especie <i>Palicourea amethystina</i> . ....	12
<b>Figura 5-1:</b>	Estructura cristalográfica de Xantina Oxidasa. ....	14
<b>Figura 6-1:</b>	Metabolismo de las purinas por acción de XO. ....	22
<b>Figura 7-1:</b>	Múltiples nódulos en el dorso del pie .....	22
<b>Figura 8-1:</b>	Mecanismo de reacción del DPPH con captador de radical. ....	30
<b>Figura 9-1:</b>	Mecanismo de reacción del sistema Riboflavina/Luz/NBT. ....	31
<b>Figura 10-1:</b>	Mecanismo de reacción del sistema NADH/PMS/NBT. ....	32
<b>Figura 11-1:</b>	Mecanismo de reacción de xantina oxidasa. ....	33
<b>Figura 12-2:</b>	Ensayos del extracto etéreo, alcohólico y acuoso .....	39
<b>Figura 13-3:</b>	Ensayo autográfico de xantina oxidasa. ....	54

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Áreas de captación de DPPH del EAPA vs ácido ascórbico.....	49
<b>Gráfico 2-3:</b> Áreas de captación de $O_2^-$ del EAPA vs taxifolina. ....	50
<b>Gráfico 3-3:</b> Áreas de captación de $O_2^-$ del EAPA vs taxifolina. ....	52
<b>Gráfico 4-3:</b> Áreas de inhibición de xantina oxidasa del EAPA vs alopurinol.....	53

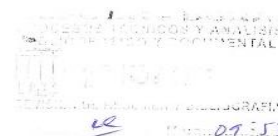
## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Control de calidad de *Palicourea amethystina*
- ANEXO B:** Tamizaje fitoquímico
- ANEXO C:** Extracción de alcaloides
- ANEXO D:** Ensayos autográficos
- ANEXO E:** Áreas del estándar (AA), método DPPH. (GelAnalyzer)
- ANEXO F:** Áreas del EAPA, método DPPH. (GelAnalyzer)
- ANEXO G:** Áreas del estándar (Taxifolina), método Riboflavina/LUZ/NBT. (GelAnalyzer)
- ANEXO H:** Áreas del EAPA, método Riboflavina/LUZ/NBT. (GelAnalyzer)
- ANEXO I:** Áreas del estándar (Taxifolina), método NADH/PMS/NBT. (GelAnalyzer)
- ANEXO J:** Áreas del EAPA, método NADH/PMS/NBT. (GelAnalyzer)
- ANEXO K:** Cromatografía del extracto alcaloideo de *P. amethystina*
- ANEXO L:** Desarrollo de la parte práctica del trabajo de titulación
- ANEXO M:** Permiso de movilización de la especie vegetal *Palicourea amethystina*

## RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad inhibitoria de xantina oxidasa (XO) y radical superóxido (RSO) por parte del extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina* (perteneciente a la familia Rubiaceae) mediante autografía. Al realizar la maceración con metanol del material vegetal se obtuvo el extracto bruto líquido, el cual se sometió a una extracción líquido-líquido con cambios de pH para obtener el extracto alcaloideo, mismo que reporto 0.05% de rendimiento de extracción de alcaloides. Para los diferentes métodos autográficos se utilizaron como soporte placas de Cromatografía de capa fina (TLC), en las cuales se sembraron muestras del extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina* a diferentes concentraciones (1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg y 100 µg) mediante la técnica "dot blot". Para evaluar la actividad antioxidante se empleó el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) utilizando ácido ascórbico como estándar, y para la actividad captadora de radical superóxido se desarrollaron dos métodos: el primero comprende riboflavina (B2), nitroazul de tetrazolio (NBT) y luz; el segundo implica nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NAD H), nitroazul de tetrazolio (NBT) y metosulfato de fenazina (PMS); siendo taxifolina el estándar para los dos métodos. Por otra parte para evaluar la actividad inhibitoria enzimática se utilizó: solución Stock enzima XO, buffer (PBS), NBT; como sustrato: xantina, solución buffer de fosfato y dimetilsulfóxido (mejorar la solubilidad 0.025%) y como estándar se usó alopurinol. Los resultados para la actividad antioxidante y radical superóxido dieron positivo, sin embargo, no exhibe una actividad inhibitoria sobre xantina oxidasa. El aporte que representa esta investigación para la especie *Palicourea amethystina* es de gran relevancia, debido a la escasa información que existe actualmente. Se recomienda realizar estudios cromatográficos más específicos para identificar el tipo de alcaloides que posee la especie.

**Palabras clave:** < BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <EXTRACTO ALCALOIDEO>, < 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)>, < RIBOFLAVINA>, < nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno (NAD H)>, < XANTINA OXIDASA>, < RADICAL SUPERÓXIDO>, < MÉTODOS AUTOGRÁFICOS>



## SUMMARY

The objective of the investigation was to determine the inhibitory activity of xanthine oxidase (XO) and superoxide radical (RSO) by the alkaloid extract of *Palicourea amethystina* (belonging to the Rubiaceae family) by autography. When carrying out the methanol maceration of the plant material, the crude liquid extract was obtained, which was subjected to liquid-liquid extraction with pH changes to obtain the alkaloid extract, which reported a 0.05% yield of alkaloid extraction. For the different autograph methods, thin layer chromatography (TLC) plates were used as support, in which samples of the alkaloid extract of *Palicourea amethystina* were seeded at different concentrations (1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg, and 100 µg) using the "dot blot" technique. To evaluate the antioxidant activity, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) method was used using ascorbic acid as standard, and for the superoxide radical scavenging activity two methods were developed: the first comprises riboflavin (B2), nitro blue tetrazolium (NBT) and light; the second involves reduced nicotine adenine dinucleotide (NAD H), tetrazolium nitro blue (NBT) and phenazine methosulfate (PMS); taxifoline being the standard for both methods. On the other hand, to evaluate the enzyme inhibitory activity was used: Stock enzyme solution XO, buffer (PBS), NBT; as substrate: xanthine, phosphate and dimethylsulfoxide buffer solution (improve 0.025% solubility) and allopurinol were used as standard. The results for antioxidant activity and superoxide radical were positive, however, it does not exhibit an inhibitory activity on xanthine oxidase. The contribution that this research represents for the species *Palicourea amethystina* is of great relevance, due to the lack of information that currently exists. It is recommended to perform more specific chromatographic studies to identify the type of alkaloids that the species possesses.

**KEYWORDS:** <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <ALKALOID EXTRACT>, <2,2-DIFENYL-1-PICRILHIDRAZIL> (DPPH), <RIBOFLAVIN>, <NICOTINE ADENIN DINUCLEOTIDE REDUCED> (NADH), <XANTINA OXIDASA>, <RADO METHODS>.



## INTRODUCCIÓN

La flora del Ecuador se reconoció desde el siglo XIX, pero no fue sino hasta el año 2000 cuando se publicó el Libro Rojo de las Plantas Vasculares del Ecuador. La diversidad de flora que posee este país ha sido fuente de diversas investigaciones, esto se debe a los componentes bioactivos que poseen las plantas ecuatorianas. En diferentes publicaciones se hacen referencia al uso que daban los indígenas a las plantas que crecen en estos territorios; sin duda el estudio de flora ecuatoriana ha ido avanzando cada día. En la actualidad la gran mayoría de especies vegetales son utilizadas por sus propiedades terapéuticas en beneficio de la salud (Añazco, 2008, pp.118).

La familia Rubiaceae se encuentra distribuida en ambientes tropicales, está conformada por diferentes géneros; de los cuales se han registrado 54 morfogéneros como: *Psychotria* (33.3%), *Faramea* (28.6%), *Coussarea* (23.8%) y *Palicourea* (19%) fueron los géneros con mayor diversidad de especies, estos géneros han llamado la atención científica por su contenido de metabolitos secundarios, siendo los alcaloides los más importantes (Valois-Cuesta, et al., 2016, pp.1275-1282).

Los alcaloides se han reportado en varias familias vegetales, pero principalmente en las *Apocinaceae*, *Loganiaceae* y *Rubiaceae*; todas del orden *Gentianales*. La gran mayoría de los alcaloides se derivaban del aminoácido triptófano, como alcaloides de tipo bisindólico por ejemplo: la vinblastina (utilizada en el tratamiento del mal de Hodgkin), vincristina (empleada en el tratamiento de leucemia), y alcaloides indólicos-monoterpénicos (ajmalicina y serpentina) utilizados como agentes antihipertensivos contra las arritmias cardíacas y el mejoramiento de la circulación cerebral (Loyola et al. 2014, pp.67-94).

El género *Palicourea* es un grupo aliado de *Psychotria*, la diferencia entre ambos géneros radica en el tipo de polinización (Taylor, 1989; citado en Cogollo et al., 2003, pp.91-94). El estudio molecular de gran importancia publicado por Nepokroeff et al. (1999) en donde indica que el subgénero *Heteropsychotria* del género *Psychotria* debe pertenecer también al género *Palicourea*. Los resultados de los estudios recientes de las especies paleotropicales fortalecieron la parecida genética existente entre los dos géneros, nombrando al género *Palicourea* de la tribu *Psychotrieae* como una tribu hermana, “*sister tribe*” autónoma bajo el nombre *Palicoureeae* (Razafimandimbison et al. 2014; citado en Borhidi et al., 2015, p.1-48).



Los géneros *Palicourea* y *Psychotria* (familia Rubiaceae), han sido demostrados como una fuente potencial de alcaloides y aproximadamente el 87% son alcaloides indólicos (De Carvalho et al.2017, p.232). De acuerdo a diversos estudios se ha comprobado que el núcleo indol posee actividades farmacológicas como: antiinflamatorio, antioxidante, antifúngico, analgésico e incluso anti-VIH (Singh, & Singh, 2017, p.9).

Algunos estudios han demostrado que ciertas especies vegetales poseen actividad inhibitoria sobre xantina oxidasa (XO) y capacidad captadora de radicales libres debido a su contenido de alcaloides. Según el estudio de Ahmad et al. (2010, p. 716) indica que los alcaloides oxindol de *Isatis costata* presentan capacidad para disminuir la hiperuricemia, reforzando este estudio Sang , et al. en el 2017 expone que los alcaloides de *Nelumbinis folium* poseen actividad inhibitoria de XO, ideal para el tratamiento de hiperuricemia e incluso de la gota. Con respecto al género *Palicourea* no existen investigaciones que reporten actividad inhibitoria de xantina oxidasa. Sin embargo, existen trabajos experimentales que reportan la actividad antioxidante y captadora de radicales superóxido, siendo responsable los compuestos fenólicos que posee este género (Giraldo, Marcela & Ramirez, 2013, pp.483-491).

Según el estudio realizado por Berger, et al. (2017, p.8) demuestra la presencia de alcaloides harmala y derivados de la triptamina en seis especies del género *Palicourea*. Los alcaloides derivados de la triptamina producen un cuadro anticolinérgico y efectos sobre el sistema nervioso central, provocando delirios o alucinaciones, razón por la cual se utilizan en ceremonias religiosas ancestrales (Burillo-Putze et al.2013, pp.505-518). Por otro lado, alcaloides derivados de la triptamina como el DMT se ha relacionado con distintos diagnósticos psiquiátricos como la esquizofrenia y con el tratamiento de la depresión, de igual manera en la producción de un potencial neurotransmisor como la serotonina (regula el estado de ánimo de una persona) (Brown et al., 2017, p.4).

## **Identificación del problema**

El metabolismo de las purinas produce hipoxantina, la cual se transforma mediante la enzima xantina oxidasa en ácido úrico. Las consecuencias clínicas de un metabolismo anormal de purinas desencadenan enfermedades como la hiperuricemia e incluso la gota (King, 2015, p2). En el catabolismo de las purinas no solo se produce ácido úrico sino también especies reactivas de oxígeno (ROS) (Maiuolo et al. , 2016, p.1) las mismas que se han relacionado con enfermedades

neurodegenerativas como: el cáncer, envejecimiento celular (ADN), inflamación y trastornos metabólicos (Bove et al., 2017, p.27). Es por ello que al lograr inhibir la actividad de la xantina oxidasa no solo sería empleada en el tratamiento terapéutico para hiperuricemia o gota sino también para otro tipo de enfermedades (Rossal et al.2003, p.123).

Las reacciones de óxido-reducción se encuentran presentes en la naturaleza e incluso en las células del organismo humano; estas permiten la degradación de alimentos en sustratos más simples aquellos que aportan a la generación de energía. En el proceso de respiración celular se consume oxígeno para generar ATP y como producto dióxido de carbono y agua, pero además de ello también se generan especies reactivas de oxígeno o radicales libres (Rossal et al.2003, p.134).

Los radicales libres son moléculas inestables, potencialmente reactivas que llega a atacar a enlaces de proteínas de los tejidos, carbohidratos, fosfolípidos e incluso a los ácidos nucleicos. La generación de radicales libres es un proceso natural y continuo, cuando el equilibrio entre la generación de RL y el sistema antioxidante se pierde, este da paso al estrés oxidativo donde se produce cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula conllevándolas a la muerte celular (San-Miguel & Martín-Gil, 2009, pp.106-113).

La muerte celular es la génesis de diversas patologías como las enfermedades neurodegenerativas, diabetes e incluso en las mujeres embarazadas con preeclampsia (Rossal et al.2003, pp.122-135).

Existe una serie de procesos patológicos atribuibles razonablemente al ataque de RL, al menos estarían implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas, varios son los procesos patológicos como varios son los descubrimientos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación, que han ligado a los RL con patologías como el envejecimiento, aterosclerosis, cáncer, catarata senil, diabetes mellitus, hipertensión arterial entre otras (Elejalde et al. 2001, pp.50-59).

En el siglo XXI, se ha observado un aumento en la incidencia y prevalencia de la gota en varios países, relacionado con los modernos hábitos alimenticios y estilos de vida que a su vez pueden desembocar en obesidad, hipertensión y síndrome metabólico (Álvarez Lario, & Alonso Valdivieso, 2014, pp.760-766).

La frecuencia de gota en América Latina y el Caribe dentro de la población masculina logra su punto máximo a los 80 años y afecta con una tasa más baja entre los 15-19 años. La gota se considera como una de las enfermedades más debilitantes del sistema musculoesquelético. La tendencia de gota se ha acrecentado en un 48% desde el año 1990 al 2015, afectando a 1.5 por 100.000 personas (Maldonado G, et al., 2017, pp. 10-15).

Los datos del estudio de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de los Estados Unidos (NHANES) 2017-2018, estimaron una prevalencia de gota del 3.9% (5.9% para hombres, 2.0% para mujeres) y una incidencia de hiperuricemia de 21.4% (21.2% para hombres y 21.6% para mujeres) (Maldonado G, et al., 2017, pp. 10-15).

Los medicamentos comúnmente prescritos para la enfermedad de la gota son el alopurinol y febuxostat. El empleo continuo de estos fármacos presentan reacciones adversas como: hipersensibilidad, las cuales son infrecuentes, pero potencialmente graves, se presentan por erupciones en la piel y en casos más extremos el síndrome de Stevens –Johnson, reacciones anafilácticas agudas y fallo hepático. El coste del tratamiento con febuxostat es 10 veces superior al de alopurinol, es por ello que no puede considerarse como el hipouricemiante de primera línea (Iscoff Paula, et al., 2017, pp.104-110).

Es por todo estos motivos que el afán por encontrar posibles fuentes de metabolitos secundarios como: fenoles (sustancias antioxidantes) y alcaloides (compuestos bioactivos) está en auge. Debido a la taxonomía de la especie *Palicourea amethystina* podría brindar resultados positivos en esta investigación.

### **Justificación del problema**

La familia Rubiaceae está conformada por diversos géneros como: *Psychotria*, *Faramea*, *Coussarea* y *Palicourea*, y los cuales presentan mayor diversidad de especies (Valois-Cuesta et al. 2016, pp.1275-1282). El género *Palicourea* en la actualidad se ha visto inmiscuida en varias investigaciones esto se debe al paralelismo evolutivo con el género *Psychotria*, hallándose en este último género alcaloides indólicos y moterpénicos (Ikan, 1991, pp.1-69).

Sin embargo, no se ha registrado ningún estudio de especies de estos géneros como inhibidores enzimáticos de xantina oxidasa.

En el Ecuador actualmente no existe un registro estadístico de la incidencia de hiperuricemia o de gota. Sin embargo, la prevalencia de la gota oscila entre el 0,03% y el 15% en Nigeria y Taiwán respectivamente y con un valor promedio del 1-2% en los países occidentales (Ruiz , 2017, p.26).

Su incidencia se estima en aproximadamente un 1 ó 2 por 1.000 (Ruiz , 2017, p.26). Debido a la fuerte relación de estas enfermedades con el estilo de vida y con la edad, es lógico pensar que la prevalencia si puede estar en aumento en nuestro país.

Se han desarrollado medicamentos empleados en el tratamiento de la gota como es el alopurinol o febuxostat; sus usos a largo plazo han provocado efectos adversos como: hipersensibilidad y en casos más graves el síndrome de Stevens-Johnson (Ghezzi et al.2017, p.2).

Es por ello que en el campo científico existe un interés por descubrir y desarrollar nuevos inhibidores de XO. En la actualidad, aproximadamente 107 inhibidores de xantina oxidasa se encuentra en pruebas clínicas (Ghezzi et al.2017, p.2). Sin duda existe un gran interés por ampliar prototipos de fármacos para el tratamiento de la gota e hiperuricemia.

En el Ecuador el género *Palicourea* está representado por lo menos 50 especies; 28 se han registrado en los bosques andinos ecuatorianos (González et al., 2005, p.371).

Es de suma importancia desarrollar investigaciones que contribuyan a complementar lo decretado en el Plan Nacional de Desarrollo Toda una Vida en el inciso d15, que indica se debe: “Impulsar programas de investigación, formación, capacitación y actualización que respondan a las potencialidades y necesidades territoriales” (Secretaria Técnica Plan Toda Una Vida, 2018).

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el potencial inhibitorio de la fracción alcaloidal de *Palicourea amethystina* sobre xantina oxidasa y radical superóxido mediante autografía.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

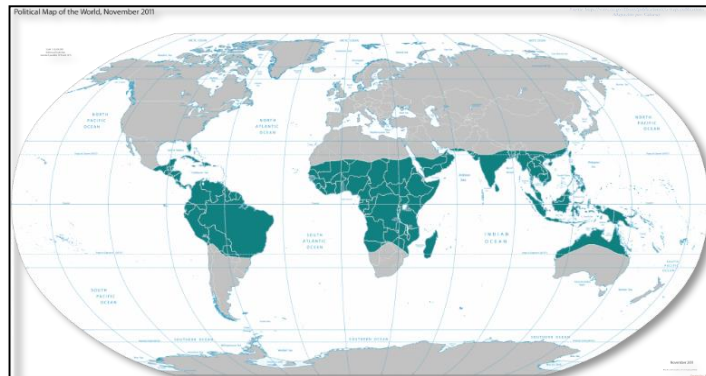
- Establecer la idoneidad de la muestra vegetal por medio del control de calidad de las hojas de *Palicourea amethystina*.
- Determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios de *Palicourea amethystina* mediante tamizaje fitoquímico.
- Obtener mediante extracción líquido-líquido con variación de pH, la fracción alcaloidal de la especie vegetal *Palicourea amethystina* y su rendimiento.
- Identificar la capacidad antioxidante del extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina* mediante el ensayo DPPH.
- Diferenciar inhibidores puros de xantina oxidasa de captadores de superóxido y agentes antioxidantes a través de la generación no enzimática de superóxido (NADH y riboflavina).

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Familia Rubiaceae

Las rubiáceas son una familia de plantas que comúnmente se las conoce como: la rubia, galio blanco o familia del café; están constituidas por unos 600 géneros y 1000 especies de herbáceas, arbustos, árboles, trepadoras y epífitas, las cuales están distribuidas en el cinturón tropical (De Carvalho et al.2017, p.146). Debido a su importancia económica, el café (*Coffea arabica*) es una especie vegetal más destacada de esta familia, es originario del África y ampliamente cultivado. Standley en el 2002 reportó 45 géneros y 178 especies en su trabajo sobre *Rubiáceas* del Ecuador. Actualmente el número de géneros se ha duplicado y quizás se ha triplicado las especies; en el Ecuador se han registrado 84 géneros y aproximadamente 557 especies, siendo una de las familias más numerosas de las angiospermas. Es de distribución muy amplia (cosmopolita), concentradas en regiones tropicales y subtropicales (Aizpuru et al , 2016, pp. 1-2).



**Figura 1-1:** Distribución de familia Rubiaceae en el mundo

Fuente: (Aizpuru et al , 2016)

#### 1.1.1 Características

La familia Rubiaceae se ha caracteriza por la presencia de metabolitos bioactivos con gran potencial farmacológico. Estos metabolitos se han llegado a usar como marcadores quimio taxonómicos incluso para géneros y subfamilias, por lo general los taxones se catalogan de

acuerdo a las diferentes características botánicas, los sistemas taxonómicos clásicos solo consideran los caracteres morfológicos de la planta, mientras que los sistemas modernos correlacionan sus diversas combinaciones incluida la composición química. Los compuestos fitoquímicos pueden ser una herramienta útil para caracterizar, describir y clasificar especies de plantas. La distribución de metabolitos secundarios en Rubiaceae sigue patrones que permiten definir el grupo botánico (subfamilia, tribu o géneros) estos patrones relativos a la quimio taxonomía con frecuencia se utilizan para establecer el origen botánico. En los últimos años, las especies de Rubiaceae se han estudiado a fondo desde el punto de vista fitoquímico. Sin embargo, muy pocos estudios han utilizado este conocimiento como herramienta en estudios taxonómicos. Al realizar estudios de bioprospección de una planta toda la información botánica y quimio taxonómica es fundamental debido a que incrementa la probabilidad de encontrar compuestos bioactivos (Bremer, 2009, p4-18).

### ***1.1.2 Clasificación taxonómica***

La clasificación taxonómica de la familia Rubiaceae es compleja y todavía hay algunos vacíos que deben llenarse. Según la clasificación de Robbrecht la familia Rubiaceae se divide en cuatro subfamilias: *Rubioideae*, *Cinchonoideae*, *Antirheoideae* e *Ixoroideae*. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que esta familia se divide en tres subfamilias: *Rubioideae*, *Cinchonoideae* e *Ixoroideae*, ya que algunos autores no reconocen a *Antirheoideae* como una subfamilia, estudios moleculares han demostrado que es una subfamilia polifilético (Verdcourt, 1958; citado en Borhidi et al., 2002).

### ***1.1.3 Aspectos químicos y biológicos***

La familia Rubiaceae presenta una gran variedad de metabolitos secundarios como: alcaloides indólicos, antraquinonas, terpenoides (diterpenos y triterpenos), flavonoides y otros derivados fenólicos. El número de productos, la diversidad estructural y las actividades farmacológicas para diversas especies de Rubiaceae demuestran que esta familia es una fuente prometedora de nuevas sustancias bioactivas; que consiguen dar lugar a nuevos productos como moléculas activas o incluso prototipos de fármacos. Diversas especies de esta familia han sido utilizadas en la medicina popular, debido a sus efectos antiinflamatorios, analgésicos, antibacterianos, antioxidantes y actividad sobre el sistema nervioso central (Mongrand et al.2005, p3-11).

En la subfamilia *Ixoroideae* el género *Coffea*, posee componentes químicos como la cafeína; esta sustancia actúa como estimulante del sistema nervioso central así como vasoconstrictor, broncodilatador y diurético, además de ser uno de los componentes de los medicamentos para la migraña, por otro lado tenemos el jenipapo brasileño (*Genipa americana*) con actividad antiinflamatoria, antiangiogénica, y antioxidante. En la subfamilia *Cinchonoideae*, el género *Cinchona* son fuente de quinina sustancia activa contra la malaria y puede considerarse responsable del desarrollo de antipalúdicos sintéticos (Martins & Nunez , 2015, p2-74). El género *Psychotria* perteneciente a la subfamilia *Rubioideae*, son plantas que producen sustancias con actividad psicodélica como *Psychotria viridis* conocida popularmente como "ayahuasca" que significa "vino del alma"; su efecto alucinógeno se debe a la sinergia que se produce entre el alcaloide N , N -dimetiltriptamina (DMT) y los alcaloides indol  $\beta$ -carbolina (harmina, harmalina y tetrahydroharmina) .Las especies de *Palicourea* se encuentra estrechamente relacionadas con el género *Psychotria* en su composición química y biológica (De Carvalho et al.2017, pp.232-234).

#### **1.1.4 Composición de alcaloides**

Los alcaloides son uno de los metabolitos secundarios más diversos encontrados en los organismos vivos. Este conjunto incluye alrededor de 12,000 productos entre los cuales se hallan los alcaloides indólicos, alcaloides derivados del triptófano (conforman alrededor de la cuarta parte de todos ellos) entre otros. Los alcaloides se encuentran en varias familias vegetales pero principalmente en las Apocinaceae, Loganiaceae y Rubiaceae. Los alcaloides indólicos mismos que pueden ser reagrupados en monoterpénicos o indol terpenos (iridoides). Los alcaloides monoterpén-indólicos (AMIs) conforman una familia de más de 3,000 miembros, las especies vegetales que contienen este tipo de alcaloides son agentes quimioterapéuticos con actividad anticancerígena, hipoglucemiantes, etc. Entre los alcaloides más importantes están los del tipo bisindólico que incluyen a la vinblastina, utilizada en el tratamiento del mal de Hodgkin, vincristina utilizada en el tratamiento de la leucemia, serpentina como agentes antihipertensivos utilizados contra las arritmias cardíacas y el mejoramiento de la circulación cerebral (Loyola Víctor Met al.2014, pp. 67-94).

#### **1.2 Genero Palicourea**

Especies de los géneros *Psychotria* y *Palicourea* son elementos prominentes pero poco conocidos en los ecosistemas forestales tropicales, ambos géneros se encuentran estrechamente relacionados



con una paralela evolución. En el género *Palicourea* su polinización es efectuada por los colibrís mientras que en el género *Psychotria* la realizan los insectos, es ahí donde radica su diferencia. Las especies de *Psychotria* y la *Palicourea* no pueden distinguirse por caracteres vegetativos o frutales. Además ambos grupos manifiestan una acumulación similar de alcaloides, flavonoides y un grupo de péptidos denominados ciclótidos. Como se define tradicionalmente ambos grupos se desvían solo en un conjunto de rasgos asociados con los síndromes de polinización (Berger, 2017, p1-8).

### **1.2.1 Características del género**

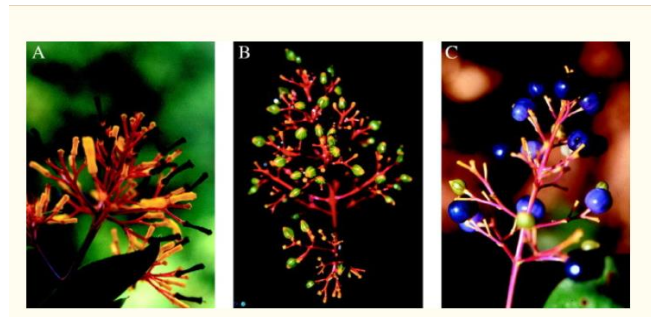
Originalmente según la delimitación clásica, la distinción entre los géneros *Palicourea* y *Psychotria* estaba basada en la morfología floral. La flor de *Palicourea* tiene corola generalmente coloreada, tubular o tubular-infundibuliforme, con tubo abultado y generalmente giboso en la base y un anillo de tricomas inmediatamente por encima de la base abultada. Al contrario la flor de *Psychotria* tiene corola blanca o amarillenta, tubular a infundibuliforme el tubo recto y glabro por dentro en la base y variadamente pubescente en o sobre la mitad del tubo. Casi desde el principio ha sido utilizado el color de la inflorescencia como un carácter secundario; en *Palicourea* la inflorescencia es coloreada en *Psychotria* es verde (Borhidi A, Oviedo R & Fernández M., 2015, pp.4-48).

El estudio que realizó Berger et al. (2017, pp.124-131) demuestra la presencia de alcaloides en especies del género *Palicourea* derivados de triptamina, los compuesto derivados de este tipo de alcaloide posee efectos alucinógenos que incluso pueden causar delirio en las personas que lo consumen. Las especies vegetales que poseen estos efectos han sido usadas en ceremonias ancestrales como puerta a la comunicación con seres supremos.

### **1.2.2 Especies**

Dentro de la familia Rubiaceae encontramos el género *Palicourea*, el cual consta de unas 280 especies distribuidas en América tropical, en especial en las regiones montañosas. En el Ecuador están representadas por lo menos 50 especies y 28 se han registrado en los bosques andinos como por ejemplo: *Palicourea angustifolia* y *Palicourea aragmatophylla* (Schumann & Krause), *Palicourea aschersonianoides* (Wernham), *Palicourea balnearia* (Standley), *Palicourea amethystina* (Ruiz & Pav) (González, et al., 2005, pp.371-378). Se ha demostrado que el género

*Palicourea* son una fuente importante de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante sin embargo se requieren más estudios para identificar estas sustancias e integrarlas a los programas de terapia antioxidante de las áreas de salud (Vásquez Giraldo , L.M. & Arisrizabal , 2013, pp.483-491).

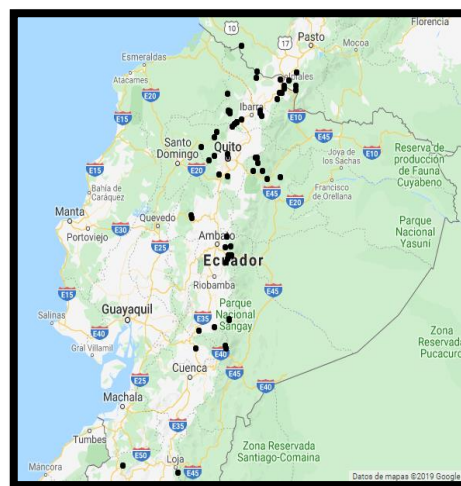


**Figura 2-1:** Especies del género *Palicourea*

**Fuente:** (Ecurnd, 2016)

### 1.2.3 Distribución en el Ecuador

Ciertas especies del género *Palicourea* se encuentra localizadas en los bosques andinos ecuatorianos, es un género con poca fuente de investigación, sin embargo se han registrado ciertas especies en el Ecuador.



**Figura 3-1:** Distribución del género

*Palicourea* en el Ecuador.

**Fuente:** (Pérez, 2018)

### 1.3 Especie *Palicourea amethystina*

Es una especie perteneciente a la familia de las Rubiaceae de la tribu *Palicoureeae* su distribución geográfica incluye Perú, Colombia (Cauca) y Ecuador (Bolívar). Coleccionista Ruiz, H y Pavón, JA. Primera descripción científica en 1830 (De Egea et al.2012, p.16-20).



**Figura 4-1:** Especie *Palicourea amethystina*.

Fuente: Daniel A. Monsalve Ortiz

### 1.4 Xantina oxidoreductasa

La xantina oxidoreductasa (XOR) es una compleja molibdoflavoenzima, que se encuentra en diferentes especies que van desde las bacterias hasta el ser humano. La enzima XOR SE encuentra de dos maneras con funciones diferentes una de ellas es: xantina deshidrogenasa que produce nicotin adenin dinucleótido reducido (NADH) y urato, que posterior se transforma a xantina oxidasa; utiliza oxígeno molecular para generar radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y urato (Coussette Ulises, 2015, pp.5-7).

#### 1.4.1 Funciones de XOR

a) Cataliza la hidroxilación de una serie de sustratos, los más específicos son: hipoxantina, que se transforma en xantina y esta a su vez en ácido úrico, los otros productos son: radical superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). Esta capacidad generadora de especies reactivas del oxígeno (ERO) despierta el interés de estudios clínicos sobre la inhibición de xantina oxidasa.

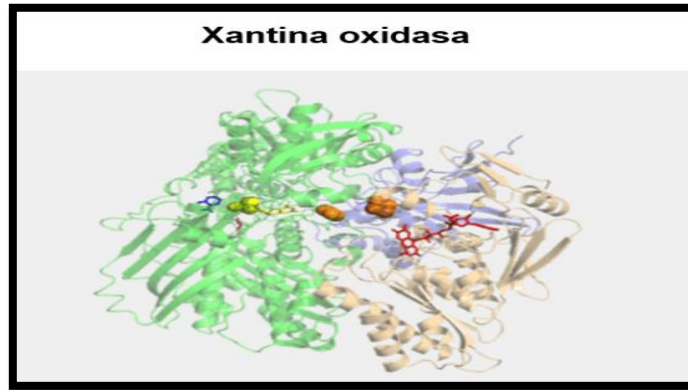
b) Recientemente se ha demostrado la capacidad de la enzima para catalizar la reducción de nitratos a nitritos y de nitritos a óxido-nítrico (NO). En estas transformaciones se ha demostrado que los nitratos son reducidos por el cofactor molibdeno, mientras que los nitritos son reducidos por el FAD (Coussette Ulises , 2015, pp.8-11).

### **1.3 Xantina Oxidasa**

La xantina oxidasa se ha relacionado con diferentes procesos patológicos, debido a que provoca daño oxidativo en los tejidos, la xantina deshidrogenasa puede lograr ser una importante defensa del organismo contra el daño que provocan los radicales libres (RL), por medio de un potente antioxidante como es el ácido úrico. Berne y Gerlach en 1963 señalaron que los productos de degradación de los nucleótidos de adenina se acumulan mientras se daba el proceso de hipoxia y como producto liberado tenemos hipoxantina, concentrándose en el papel fisiopatológico de la xantina oxidoreductasa que produce los dañinos radicales libres y el daño que relaciona los procesos de isquemia-reperfusión. Se conoce bien que la enzima xantina oxidasa cataliza la hidroxilación que va de hipoxantina a xantina y de esta a ácido úrico, esto sucede cuando xantina oxidasa utiliza hipoxantina junto con oxígeno (aceptor de electrones) para tener como producto xantina y radical superóxido. La xantina oxidasa solo puede usar el oxígeno como acepto de electrones y al momento que reacción genera los radicales libres relacionándolo así con diferentes procesos patológicos que da lugar a un daño oxidativos de los tejidos del organismo. La xantina oxidasa (XO) es una enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y puede luego catalizar la oxidación de xantina en ácido úrico. Esta enzima juega un papel importante en el catabolismo de purinas en algunas especies, incluyendo humanos. La xantina oxidasa puede ser convertida a xantina deshidrogenasa a través de una oxidación reversible con sulfhidrilo (Bove, Cicero, & Borghi, 2017, p2-6).

#### ***1.3.1 Estructura***

La enzima xantina oxidasa (XO) tiene una estructura compleja, con un gran peso molecular; posee 2 moléculas de flavina (unidas como FAD), dos átomos de molibdeno y ocho átomos de hierro por unidad enzimática. Los átomos de molibdeno se hallan como cofactores de molibdopterina y son los sitios activos de la enzima. Los átomos de hierro forman parte de la ferredoxina de los centro hierro-azufre [2Fe-2S] que participan en reacciones de transferencia de electrones (Enroth et al.2000, p.10725).

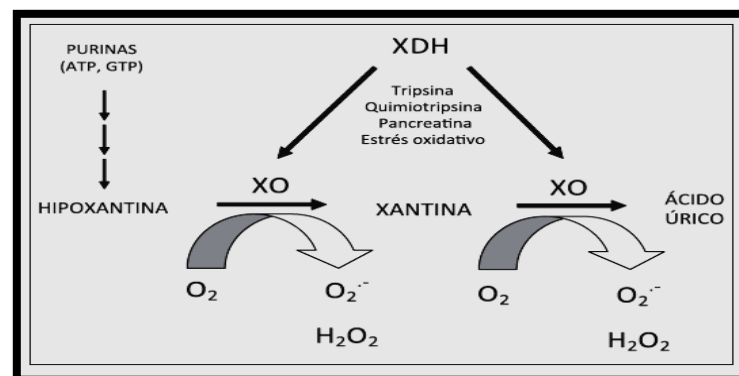


**Figura 5-1:** Estructura cristalográfica de Xantina Oxidasa.

**Fuente:** (Bove ,Cicero ,& Borghi , 2017)

### 1.3.2 Función

La xantina deshidrogenasa se reduce a xantina oxidasa por medio de enzimas como la pancreatina, la tripsina y quimiotripsina. El hígado y el intestino delgado son las mayores fuentes de xantina oxidasa, pero actualmente existe evidencia que tanto el corazón como el endotelio vascular la presencia de la xantina oxidasa. De hecho, su actividad se ha podido determinar a nivel endotelial humano, denominándose xantina oxidasa extra-celular o unida al endotelio. La principal acción enzimática de xantina oxidasa es la conversión catalítica consecutiva de hipoxantina a xantina y luego desde xantina a ácido úrico. Paralelamente como subproductos de estas reacciones, se forman potentes especies reactivas de oxígeno, moléculas que poseen alta reactividad con otros sustratos, tales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y anión superóxido ( $O_2^-$ ) (Alcaíno et al.2011, pp.505-515).



**Figura 6-1:** Metabolismo de las purinas por acción de XO.

**Fuente:** Alcaíno Hernán.

### ***1.3.3 Inhibidores de XO***

De acuerdo a la bibliografía la enzima xantina oxidasa es clave en la producción de ácido úrico y especies reactivas de oxígeno, es por ello el gran interés de investigar fármacos inhibitorios de la función de XO.

#### **Alopurinol**

El alopurinol (1,5-dihidro-4H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-ona) es un análogo estructural de la base púrica hipoxantina y actúa como un inhibidor de la xantina oxidasa (XO). El alopurinol fue uno de los fármacos más importantes que se desarrolló en el programa privado de la fundación dedicada a la investigación biomédica Burroughs Wellcome Fund. Este programa se inició en los años 40 y culminó con el premio Nobel en Fisiología y Medicina concedido en 1988 a los científicos Gertrude B. Elion, George H. Hitchings y James W. Black, por su descubrimiento de los principios básicos en el tratamiento farmacológico (Ferrando et al.2014, p.295).

#### **Mecanismo de acción**

Es un fármaco análogo de hipoxantina y químicamente se lo reconoce como un ácido débil, su vida media es de 1-2 horas, rápidamente se convierte en un metabolito activo denominado oxipurinol (análogo de xantina). El mecanismo básico de acción de alopurinol y su metabolito es la inhibición de la xantino-oxidasa, esto lleva a una disminución de los niveles plasmáticos de uratos y a una elevación de sus precursores, hipoxantina y xantina. La hipoxantina a través de sus metabolitos promueve la inhibición de la enzima amidofosforribosil transferasa en la síntesis de las purinas, de esta forma, el efecto primario sería el de disminuir la producción de uratos y en segunda instancia disminuir la síntesis de novo de purinas (Iscoff et al., 2017, p.1).

#### **Efectos adversos**

Este medicamento puede presentar un mayor riesgo de reacciones adversas, la dosis delegada de alopurinol es de hasta 900 mg al día repartidas en varias tomas, aunque en la práctica cotidiana con frecuencia se infra dosifica debido a las reacciones de hipersensibilidad, las cuales son

infrecuentes pero potencialmente graves como erupciones en la piel y en casos más extremos el síndrome de Stevens –Johnson, reacciones anafilácticas agudas y fallo hepático (SEFAP , 2015, p.5).

## **Febuxostat**

Febuxostat es un fármaco aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la FDA (Food and Drug Administration) en 2008 y disponible para su prescripción en España desde 2011. Es un medicamento de estructura no purínica, que inhibe de forma potente y selectiva ambas isoformas (oxidada y reducida) de la xantina oxidasa, induciendo una intensa reducción de la uricemia (Perez et al., 2012, pp.1-22).

## **Efectos adversos**

Las reacciones adversas con mayor frecuencia ( $\geq 1/100$  a  $< 1/10$ ) son alteraciones de la función hepática, diarrea, náuseas, cefalea, erupción y edema. En los ensayos realizados con febuxostat en comparación con alopurinol a dosis fijas, se observó un mayor número de eventos cardiovasculares y muertes que no alcanzaron significación estadística. Se han notificado reacciones graves de hipersensibilidad (Salud Navarra, 2013, p.2).

### ***1.3.4 Enfermedades causadas por XO y RL***

El ácido úrico y radical superóxido son productos resultantes del catabolismo de las purinas, estos al encontrarse en valores anormales en el organismo desencadenan enfermedades como la hiperuricemia y procesos como el estrés oxidativo. El oxígeno es un elemento que presenta un perfil con doble efecto fisiológico es esencial para el desarrollo de la vida aerobia y tiene efectos tóxicos inherentes a su estructura. Del oxígeno se derivan moléculas inestables designadas radicales libres que pueden producir daño a nivel celular, cuando se pierde el equilibrio entre dichas moléculas y el sistema de defensa antioxidante que poseen los seres vivos generando así lo que se denomina estrés oxidativo. Dicho mecanismo posee una estrecha relación con el progreso y evolución de una gran variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes. Su estudio se ha centrado principalmente en el conocimiento de los mecanismos de su génesis y las formas de atenuar, disminuir o contrarrestarlas por medio de los sistemas de defensa antioxidante que posee la célula y la forma de controlar los radicales libres que se generan

comúnmente y continua en el organismo resultado de algunos procesos celulares como el relacionado con el metabolismo oxidativo de la mitocondria, proceso necesario para la obtención de ATP (Corrales Lucía , 2012, pp.4-13).

La mayoría de patologías: gástricas, cardíacas, respiratorias, óseas, multiorgánicas, entre otras son resultado de la evolución de alteraciones morfofisiológicas celulares, debido a la excesiva producción por encima de los niveles fisiológicos normales de moléculas de gran inestabilidad denominadas radicales libres. Dicha condición es nombrada estrés celular y se caracteriza por presentar un desequilibrio entre la generación y eliminación de especies reactivas, situación que se puede derivar de la disminución de los niveles de las defensas antioxidantes celulares, del aumento de la velocidad de producción de las especies reactivas, o en ciertas ocasiones puede ser consecuencia de estas dos condiciones. El término especies reactivas hace referencia a dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no radicales. Este conjunto de moléculas se forma como resultado del metabolismo celular y se encuentran representados dentro de los sistemas biológicos por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y por las especies reactivas de nitrógeno (RNS), que se originan tanto en procesos fisiológicos normales como en procesos patológicos (León Milagros et al.2018, pp.5-12).

Dicho efecto nocivo involucra el proceso de reducción parcial del oxígeno, mediante el que se obtienen las especies reactivas de oxígeno (EROS). Esta moléculas pueden convertirse en peligrosos productos del metabolismo celular, debido a que cuando se pierde el equilibrio entre sustancias pro oxidantes y sustancias antioxidantes se tiene el estrés oxidativo y por ende diversos procesos patológicos (Moret et al.2014, pp.2-7).

### **Radicales libres**

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que poseen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de lograr su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido quitar el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor induciendo un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos



de hecho nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus (Avello, & Suwalsky , 2006, pp.5-12).

Los radicales más perjudiciales en sistemas biológicos son los radicales de oxígeno a veces denominados especies de oxígeno reactivas (ERO), en especial superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo (OH) y perhidroxilo ( $O_2H$ ). El daño de tejido causado por radicales de oxígeno suele llamarse daño oxidativo y los factores que protegen contra daño por radical de oxígeno se conocen como antioxidantes. Además de las células endoteliales y las mitocondrias del músculo liso, contienen varias fuentes enzimáticas de radicales libres, incluyendo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), xantina oxidasa (XO) y óxido nítrico sintasas (NOS) que, cada uno, probablemente contribuya al aumento inducido por el ejercicio de los radicales libres. De hecho, las elevaciones en el flujo sanguíneo y el estrés cortante, así como los cambios bioquímicos en el medio metabólico de la sangre que se originan con el ejercicio, aumentan la actividad de estas enzimas, lo que acrecienta la producción de radicales libres. Los estudios en animales que utilizan inhibidores enzimáticos específicos (alopurinol, apocinina) revelan funciones importantes de estas enzimas en la producción de radicales libres inducida por el ejercicio (Trinity ,Broxterman & Richardson , 2016, pp.15-43).

#### **1.4 Hiperuricemia**

Es un trastorno que se presenta cuando el metabolismo hepático de las nucleoproteínas no es el adecuado produciendo de esta manera niveles anormales de ácido úrico que llega a la sangre formando depósitos cristalinos (tofós) en las articulación y el tejido subcutáneo. Cuando las personas poseen una elevada concentración de ácido úrico en sangre por encima de lo normal (7 mg/dl hombres, 6 mg/dl mujeres y 4 mg/dL niños) puede sufrir de hiperuricemia o gota, esto suele pasar cuando los riñones no cumple con su función normalmente y por ende no elimina los niveles estándar de ácido úrico por la orina, este proceso lleva a la formación de sales insolubles (uratos) en ciertas articulaciones. La hiperuricemia es un cofactor para tener la enfermedad de la gota, aunque en ciertos casos no necesariamente por tener hiperuricemia deba tener la gota. El aumento de ácido úrico en sangre puede desarrollar cálculos renales (riñón) o nefropatía gotosa (Goicoechea et al.2012, pp. 1-22).

La hiperuricemia se considera como una enfermedad crónica que se puede controlar o aliviar mediante una dieta correcta, en hiperuricemias que no son muy graves mediante una buena

hidratación y una dieta equilibrada se logra disminuir los niveles de ácido úrico a valores normales, pero si el metabolismo purínico está defectuoso no bastará con la dieta sino que debe ir junto con un tratamiento farmacológico.

#### ***1.4.1 Etiología***

Una de las causas más relevantes son los excesos alimenticios junto con el alto consumo de alcohol, sin embargo se analizó que uno de los factores más importantes es el factor hereditario, debido a que el 1% de la población posee elevados valores de ácido úrico sin tener excesos con respecto a los alimentos ricos en purinas o el consumo de alcohol. La mayoría de las personas que posee antecedentes familiares hiperuricémicos o gotosos, tienden que ser más susceptibles en padecer esta enfermedad, por tal motivo se recomienda a estos individuos llevar un control analítico de ácido úrico.

La enfermedad de hiperuricemia no necesariamente viene acompañada de gota o litiasis renal, por lo cual se le conoce como hiperuricemia asintomática, pero el individuo que posee hiperuricemia presenta un mayor riesgo de sufrir gota, a medida que progresa esta enfermedad los signos y síntomas son más dolorosos, frecuentes y prolongados, con referencia a los ataques se conoce que está directamente relacionada con la manera de alimentarse, el consumo de bebidas (alcohólicas) y enfermedades como la obesidad (Álvarez-Lario, et al., 2014, p.765).

No necesariamente los niveles elevados de ácido úrico se deben a la dieta, al consumo del alcohol o al mal metabolismo de las purinas, sino a factores como el estrés, utilización de contrastes radiológicos iodados, medicamentos como los diuréticos tiazídicos, teofilinas, acetilsalicílico (dosis bajas), destrucción masiva de células (anemia hemolítica o leucemia), lesiones renales o nefropatías o el ejercicio muy intenso. Al eliminar estos tipos de factores se puede lograr disminuir los niveles de ácido úrico en sangre y no proceder a mayores acciones, en el caso de que nos encontremos con hiperuricemia secundaria a otras enfermedades se trata siempre que sea viable.

Existen enfermedades que aumentan las concentraciones de ácido úrico en sangre como las enfermedades renales (debido a que se ven afectados los niveles de ácido úrico que son eliminados por la orina), leucemias (debido a la masiva destrucción de las células sanguíneas que caracterizan

a esta enfermedad), psoriasis, tiroides, anemias o alteraciones de la tiroides (Álvarez-Lario, et al., 2014, pp.760-770).

#### ***1.4.2 Manifestaciones clínicas***

La hiperuricemia se ha caracterizado por ser asintomática y muchos que la padecen pasan así por muchos años, sin embargo se empiezan a presentar estos ataques cuando la enfermedad progresa, los pacientes que aunque sean asintomáticos debe recibir tratamiento si la uricosuria y la uricemia están sobre los niveles normales, por antecedentes familiares o si padece de enfermedad renal.

En la hiperuricemia la fase asintomática termina al mismo momento en que se presenta el primer ataque de artritis gotosa, el ataque artrítico agudo empieza por la precipitación del ácido úrico de modo que se llega a formar cristales de uratos en las articulaciones, tendones, cartílagos, dedos o manos, la más común es la articulación del dedo gordo del pie, se presenta como una inflamación, ocasionalmente también puede presentarse fiebre. Los pacientes que superan los episodios de gota artríticos y los cuales no son ni diagnosticados ni se los trata pueden desencadenar gota crónica acompañada de la presencia de los tofos, los mismos que van destruyendo los tejidos articulares provocando de esta manera la artritis crónica, otra manifestación clínica es la saturación de ácido úrico en la orina. Es importante recalcar que en la hiperuricemia mantenida, lo que muchas veces desencadena un episodio es la rápida variación de uricemia (aumento- disminución), es decir después de que se ingiere comida junto con alcohol, la crisis gotosa se presenta entre las 18 y las 80 horas posteriormente de que fue ingerida la comida (Aragón , 2003, pp.48-53).

#### ***1.4.3 Tratamiento***

El individuo que padece de hiperuricemia debe seguir un tratamiento, de esta manera reducirá las complicaciones renales y articulares, la terapia consiste en:

- **Dieta:** las purinas que se encuentran en alimentos como las carnes y los mariscos elevan los niveles de ácido úrico, sin embargo en nuestro organismo se sintetiza el ácido úrico (síntesis endógena de uratos) como la degradación de purinas las cuales se encuentran mínimamente influidas por la ingesta alimentaria, pero sin duda un control alimentario ayuda significativamente en la salud del paciente. También se recomienda una dieta moderada en

hidratos de carbono y baja en grasas- colesterol, debido a que aumenta y disminuye la excreción de los uratos respectivamente. Las fuentes principales de alimentos que contienen purinas son las vísceras, pescado y el marisco e incluso algunos vegetales tienen contenido moderado como son las leguminosas. Una dieta correcta contiene entre 600 – 1000 mg de purinas, en el caso de la gota avanzada y grave se prohíbe el contenido de purinas a unas 100-150 mg diarios.

- **Ejercicio:** el realizar actividad física ayuda a que el paciente se mantenga saludable y evitar a tener enfermedades que facilitan la presencia de hiperuricemia como la obesidad.
- **Hidratación:** el ácido úrico se encuentra en el plasma como urato mono sódico a un pH 7,4, al disminuir el pH, este se disocia el átomo de Na<sup>+</sup> y se convierte en ácido úrico como ocurre en la orina. Es por ello que los cristales que están en el tejido conectivo son de urato y los cristales que se encuentran en los cálculos renales son los de ácido úrico, ya que son menos solubles que el urato. Es decir se debe hidratar en grandes cantidades para elevar de diuresis y de esta manera excretar la mayor cantidad de uratos (Aragón , 2003, pp. 48-53).

#### ***1.4.4 Complicaciones con la baja excreción del ácido úrico***

Se excreta el ácido úrico del organismo mediante la orina (75%) y por el intestino y las heces (25%). El urato es filtrado en el riñón por completo y se reabsorbe en un 99% en el túbulo contorneado proximal, después es secretado en un 50% en el asa descendente y finalmente se reabsorbe en un 40% en el asa ascendente. De esta manera se logra excretar un 6-12% de lo filtrado originalmente, lo que corresponde a una uricosuria de 300-600 mg/24 h. También es excretado en el túbulo colector medular de la neurona, en el cual existe un transportador para ácidos en general (Divins Triviño , 1999, p.28).

La eliminación normal del ácido úrico se puede ver afectada por altas concentraciones de ácido láctico que bloquean al transportador, al igual que el pH ácido de la orina, el ácido úrico tiende a encontrarse en forma ácida, muy poco soluble, por lo que se llega a formar cristales que pueden precipitar en los túbulos renales provocando insuficiencia renal. Se considera que la persona tiene una excreción renal baja cuando excreta menos de 250-300 mg en 24 h con una dieta libre de purinas, su disminución en la excreción renal de ácido úrico puede corresponder a un defecto de carácter idiopático, que hace selectiva la secreción tubular de ácido úrico. Pero, regularmente, la

hiperuricemia mantenida suele deberse a la disminución del aclaramiento renal de urato, que ocurre en personas que han recibido trasplante de riñón y en pacientes con insuficiencia renal o enfermedades renales. Los diuréticos y medicamentos (ciclosporina A) aportan a padecer hiperuricemia. Los ancianos llegan a presentar varias causas de hiperuricemia (insuficiencia renal, consumo de diuréticos, hipertensión, etc.) (Divins Triviño , 1999, pp.26-36).

### 1.5 Enfermedad de la gota

Esta se caracteriza por el acumulo de cristales de urato monosódico (UMS) en las articulaciones, en zonas peri-articulares y subcutáneas. Los valores normales para hombres es menor a 7 mg/dl, para las mujeres es de 6 mg/dl y para los niños es 4mg/dl. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de tofos en la zonas articulares, comúnmente en el metatarso del pie, a veces en el talón, empeine o en el tobillo o en el tejido conjuntivo típicamente en el lóbulo de la oreja, los tofos se presentan en los casos de cronicidad. Comúnmente la gota se presenta con ataques de artritis aguda pasajeros. El intervalo entre ataques o fase intercrítica es asintomático aunque algunos pacientes suelen relatar una sensación de pesadez generalizada sin causa aparente. Tras varios ciclos de artritis aguda se debe pensar en que el proceso llevo ha estado crónico (Lozano José , 2004, pp.2-7). La gota es una forma frecuente y compleja de artritis que puede afectar a cualquiera. Se caracteriza por ataques repentinos e intensos de dolor, hinchazón, enrojecimiento y sensibilidad en las articulaciones, muchas veces en la articulación que se encuentra en la base del dedo gordo del pie (Bove et al.2017, pp.23-28).



**Figura 7-1:** Múltiples nódulos en el dorso del pie.

**Fuente:** Peña Osmer

### ***1.5.1 Etiología***

El ácido úrico está presente en nuestro organismo naturalmente, se obtiene cuando nuestro cuerpo descompone purinas, estas se encuentran presentes en algunos alimentos como el filete, la carne de órganos y los mariscos, existen otros alimentos que provocan alto contenido de ácido úrico como las bebidas alcohólicas (cerveza) y bebidas endulzantes. Habitualmente, el ácido úrico se disuelve en la sangre y pasa por los riñones a la orina pero, a veces, el cuerpo produce demasiado ácido úrico o los riñones excretan muy poco. Cuando esto sucede, el ácido úrico se acumula y forma cristales de urato con forma de aguja puntiaguda en una articulación o el tejido que la rodea causando dolor, inflamación e hinchazón (Pacios, 2017, pp.67-69).

### ***1.5.2 Factores de riesgo***

La gota se caracteriza cuando tienes elevados contenidos de ácido úrico, existen factores que aumentan estos niveles como:

- **Dieta:** alimentos como la carne, mariscos y bebidas endulzadas, la ingesta de alcohol en específico la cerveza.
- **Enfermedades:** el organismo cuando el cuerpo presenta sobrepeso produce más ácido úrico por lo que la función del riñón en excretarlo se dificulta. Otras enfermedades que aumentan el riesgo de sufrir gota son la presión arterial alta, la diabetes, el síndrome metabólico, enfermedades cardíacas y renales.
- **Fármacos:** el uso de diuréticos tiazídicos (generalmente utilizados para tratar la hipertensión) y de aspirina en dosis bajas también puede elevar los niveles de ácido úrico o el uso de medicamentos a aquellas personas que rechazaron a un trasplante de órganos.
- **Edad y sexo:** en los hombres se presenta con mayor frecuencia que en las mujeres, sin embargo en el caso de las mujeres empiezan a ser más susceptibles después de la menopausia, pero en los hombres la gota se presenta a los 30 a 50 años es decir mucho más temprano como suele suceder en las mujeres.

- **Antecedentes familiares:** si algún familiar padecer de gota, es más probable que padezcas de la enfermedad de la gota (Mayo Clinic , 2019, pp.2-5).

### *1.5.3 Síntomas*

La gota presente signos y síntomas que casualmente se presentan por la noche estos pueden llegar a ser muy dolorosos y algunos de ellos son:

- **Dolor articular intenso:** la articulación que con frecuencia afecta la gota es la del dedo gordo del pie aunque puede presentarse en cualquier articulación como las del tobillo, rodillas, codos y en los dedos de las manos el dolor llega ser más grave en las 4 a 12 primeras horas después de que comienza la enfermedad de la gota.
- **Molestias persistente:** cuando el dolor intenso desaparece es probable que el dolor que quede una molestia articular la cual permanece por unos días incluso semanas es frecuente que los ataques posteriores persistan por más tiempo y afecten más articulaciones.
- **Enrojecimiento e inflamación:** cuando el elevado contenido de ácido úrico llega a formar tofos las articulaciones y provocar tumefacción conjuntamente con dolor. Con forme avanza la gota, es posible que no se logre mover las articulaciones con normalidad (Mayo Clinic, 2019, pp.6-9).

### *1.5.4 Tipos de gota*

- **Gota recurrente:** en este caso pueden ser asintomáticos los pacientes o pueden sufrir de signos y síntomas varias veces al año, los fármacos utilizados puede ayudar a disminuir los ataques de gota recurrente, sin embargo sino es controla puede llegar a erosionar y a destruir la articulación.
- **Gota avanzada:** cuando no se trata la gota esta puede llegar a la formación de acúmulos de cristales de uratos por debajo de la piel comúnmente se le conoce como “tofos”, estos pueden afectar a varias partes del cuerpo como lo son los dedos, las manos, los pies, los codos o los

tendones (parte posterior de los tobillos), en lo general los tofos no causan dolor al menos que se inflame y la parte afectada se sensibilice durante los ataques de gota.

- **Cálculos renales:** en las vías urinarias pueden llegarse a acumular cristales de urato en las personas que padecen de la gota y provocar cálculos renales, los medicamentos ayudan a disminuir el riesgo de poseer cálculos renales (Mayo Clinic, 2019, pp.10-12).

### 1.5.5 Diagnóstico

Dentro de las pruebas para diagnosticar pacientes que padecen de la gota son:

- **Prueba de líquido sinovial.** El médico puede usar una aguja para extraer líquido de la articulación afectada. Los cristales de urato son visibles mediante la examinación del líquido en un microscopio.
- **Análisis de sangre.** El médico podría recomendarte un análisis de sangre para medir los niveles de ácido úrico y creatinina en la sangre. Algunas personas tienen niveles de ácido úrico elevados, pero nunca tienen gota mientras que otras personas tienen signos y síntomas de gota, pero no tienen niveles inusuales de ácido úrico en la sangre.
- **Radiografías.** Las radiografías de las articulaciones pueden ayudar a descartar otras causas de la inflamación articular.
- **Ecografía.** Una ecografía musculoesquelética puede detectar cristales de urato en las articulaciones o en los tofos. Esta técnica se utiliza con más frecuencia en Europa que en los Estados Unidos.
- **Tomografía computarizada de doble energía.** Este tipo de prueba por imágenes puede revelar la presencia de cristales de urato en una articulación, incluso si no está gravemente



inflamada. Esta prueba no se realiza de manera habitual en la práctica clínica debido al costo y no se encuentra ampliamente disponible (Sivera et al., 2017, pp.2-6).

### ***1.5.6 Tratamiento***

Los medicamentos empleados en la gota se usan para disminuir la inflamación y el dolor dentro de estos tenemos:

- **Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE):** ayudan a disminuir el dolor y la inflamación, dentro de estos encontramos al ibuprofeno y el naproxeno sódico. Si la persona no puede consumir este tipo de medicamentos se emplea los corticoides (inyectables o comprimidos) para lograr el mismo fin que los AINE.
- **Alopurinol:** se emplea en paciente que padece de gota crónica, su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima xantina oxidasa la cual degrada de hipoxantina a ácido úrico y con esto reduce los niveles de ácido úrico en sangre.
- **Febuxostat:** se utiliza en pacientes que producen elevado contenido de ácido úrico y por ende disminuir el ácido úrico en la sangre y reducir el riesgo de gota.
- **Medicamentos que facilitan la eliminación de ácido úrico:** se les conoce comúnmente como úricosúricos y dentro de estos encontramos a fármacos como probenecid y lesinurad, estos mejoran la capacidad de los riñones en excretar el ácido úrico del cuerpo.

### **1.6 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo representa uno de los procesos más comunes de toxicidad. Todos los tipos de agentes (químicos, físicos y microbianos) pueden provocar estrés mediado por oxidación en tejidos y células. El oxígeno molecular es fundamental para diversos procesos vitales, como: la respiración celular (mitocondrias), la síntesis de lípidos, el metabolismo de los metales, los lisosomas, la fagocitosis de cuerpos extraños (inmunidad e inflamación) y la biotransformación xenobiótica de compuestos orgánicos. La liberación de especies reactivas de oxígeno durante

estos procesos es neutralizada por un conjunto de compuestos antioxidantes (tioles reducidos, vitaminas C y E y catecolaminas) y sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y glutatión reductasa) en un intento de proteger la integridad de las células o tejidos (Gagné, 2014, p.105).

### ***1.6.1 Agentes tóxicos***

El delicado equilibrio entre los antioxidantes y la producción de especies reactivas de oxígeno podría verse comprometido por la exposición a agentes tóxicos. Por ejemplo, la liberación de precursores de inflamación (anión hidroxilo, anión superóxido) durante la fagocitosis de partículas / microbios invasores podría exceder los mecanismos de protección antioxidante y provocar daños oxidativos (inflamatorios) como el ADN, las proteínas o la oxidación de lípidos (Gagné , 2014, p.110).

### ***1.6.2 Enfermedades***

El estrés oxidativo ha sido estudiado fundamentalmente en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrofia. En estas enfermedades se ha encontrado daño oxidativo incluso en etapas tempranas de la enfermedad, lo que indica que los radicales libres están relacionados con la etiología de estas (Díaz-Hung & González Fraguela , 2014, p.451).

### ***1.6.3 Radicales libres***

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) son los términos que describen colectivamente a los radicales libres y otros derivados reactivos no radicales también llamados oxidantes. Los radicales son menos estables que las especies no radicales, aunque su reactividad es generalmente más fuerte. Una molécula con uno o más electrones desapareados en su capa externa se llama radical libre .Los radicales libres se forman a partir de moléculas a través de la ruptura de un enlace químico de manera que cada fragmento mantiene un electrón, mediante la división de un radical para dar otro radical. Los radicales libres incluyen hidroxilo, superóxido, óxido nítrico, además, peróxido de hidrógeno, ozono, ácido hipocloroso, ácido nitroso, estos últimos no son radicales libres sino son sustancias oxidantes que pueden conducir fácilmente a reacciones de radicales libres en organismos vivos (Pham et al. , 2008, p.92).

## **Generación enzimática y no enzimática**

La formación de ROS y RNS puede ocurrir en las células de dos maneras: reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas que generan radicales libres incluyen los implicados en la cadena respiratoria, la fagocitosis, la síntesis de prostaglandinas y el sistema del citocromo P450. Por ejemplo, el radical anión superóxido, se genera a través de varios sistemas de oxidasa celular tales como: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), xantina oxidasa, peroxidasas. Los radicales libres se pueden producir a partir de reacciones no enzimáticas de oxígeno con compuestos orgánicos, así como de las iniciadas por radiaciones ionizantes. El proceso no enzimático también puede ocurrir durante la fosforilación oxidativa (es decir, la respiración aeróbica) en las mitocondrias (Pham-Huy & Pham-Huy , 2008, p.92).

## **Generación endógena y exógena**

Los ROS y RNS se generan a partir de fuentes endógenas o exógenas. Los radicales libres endógenos se generan a partir de la activación de las células inmunes, inflamación, estrés mental, ejercicio excesivo, isquemia, infección, cáncer, envejecimiento. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno exógenos son el resultado de la contaminación del aire y el agua, el humo del cigarrillo, el alcohol, los metales pesados o de transición (Cd, Hg, Pb, Fe, As), ciertas drogas (ciclosporina, tacrolimus, gentamicina, bleomicina), solventes industriales, cocina (ahumado carne, aceite usado, grasa), radiación. Después de la penetración en el cuerpo por diferentes rutas, estos compuestos exógenos se descomponen o metabolizan en radicales libres ( Huy et al. , 2008, p.95).

### **1.6 Autografía**

El fundamento de la autografía consiste en la separación de compuestos por medio de técnicas de cromatografía plana como: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en papel (PC) son técnicas efectivas y económicas para el análisis fitoquímico de extractos de plantas. El método de detección puede mejorar mediante la aplicación de herramientas cromatográficas avanzadas como: cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), cromatografía de capa sobre presionada (OPLC) y electrocromatografía plana (PLC). Las principales aplicaciones de autografía son la detección rápida de una gran cantidad de muestras para la bio-actividad, a saber,

antibacteriana, antifúngico, antioxidante, inhibición enzimática, el aislamiento dirigido al objetivo de compuestos activos (Dewanjee et al.2015, P.76).

### **1.6.1 Tipos**

La cromatografía en capa fina es una herramienta para la detección de compuestos bioactivos, mediante autografía. Se conoce tres métodos autográficos siendo estos: difusión de agar o autografía de contacto, detección autográfica directa por TLC y autografía de inmersión o superposición de agar. Para comprender cada uno de estos tipo autográficos se revisa el estudio de (Dewanjee et al., 2015).

- **Autografía de contacto:** se utiliza como base cromatográfica la placa de TLC para la separación de compuestos, se coloca la placa sobre el agar gelificado y funcional por determinado tiempo, de esta manera se consigue la transferencia por difusión de los compuestos existentes en la placa TLC. Los compuestos que son bioactivos al estar en contacto con la capa de agar presentan zonas de inhibición (cambio de color) (Dewanjee et al.2015, p.15).
- **Autografía directa:** en una placa de TLC se siembra lo posible compuestos bioactivos, luego se coloca sobre la placa una suspensión de reactivos. Los sitios donde presente actividad biológica se forma manchas de inhibición.
- **Autografía de inmersión:** en la placa de TLC se coloca agar simple y al salificarse se siembra las enzimas o microorganismos para posterior incubación. Tanto la autografía de contacto como la directa son parte de este método, debido a que los compuestos pasan de la placa al medio de agar y la capa de agar se encuentra sobre la placa de TLC mientras se incuba y se observa (Dewanjee et al.2015, p.15).

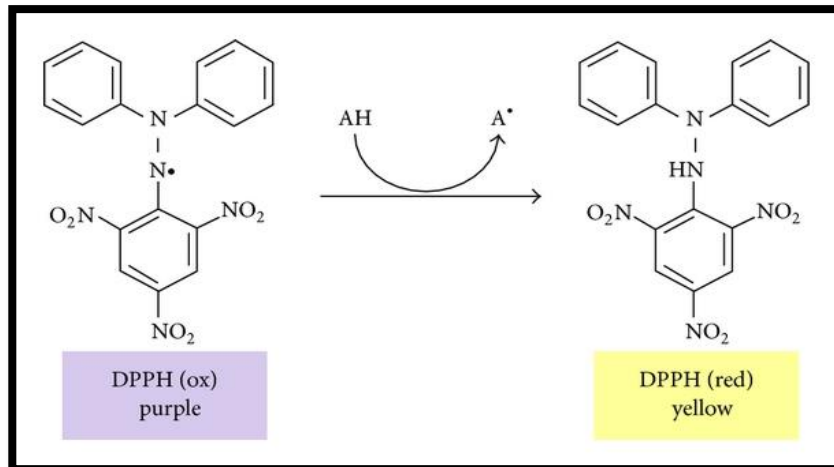
### **1.7 Determinación de antioxidantes, inhibidores de XO y RSO**

La xantina oxidasa es otra fuente potencial de ROS en la enfermedad vascular. La enzima se genera a partir de la xantina deshidrogenasa por proteólisis. La xantina oxidasa dona fácilmente electrones al oxígeno molecular, produciendo así RSO y peróxido de hidrógeno. En la actualidad

la búsqueda por compuestos antioxidantes e inhibidores enzimáticos y especies reactivas de oxígeno, ha incrementado (Förstermann, 2010, p.140).

### 1.7.1 Método DPPH

Brand-Williams desarrollo el método DPPH con el fin de determinar la capacidad antioxidante de compuestos de alimentos o de especies vegetales, catalogados como un método rápido y poco dificultoso, se utiliza el radical estable 2,2-difenil 1picril-hidrazilo (DPPH). La principal característica que presenta la reacción es que el radical DPPH se decolora de azul- violeta a amarillo. Una inhibición que se encuentre por lo menos 50% de la concentración de DPPH representa una buena actividad antioxidante. De forma cualitativa se coloca las muestras del posible antioxidante (extracto de planta o alimento), se espera por unos minutos en condiciones normales este posee un color violeta al tener efecto antioxidante este se va decolorando a un color amarillo entre más actividad antioxidante posea más intenso se decolora (Guija Emilio, 2015, pp.57-60).



**Figura 8-1:** Mecanismo de reacción del DPPH con captador de radical.

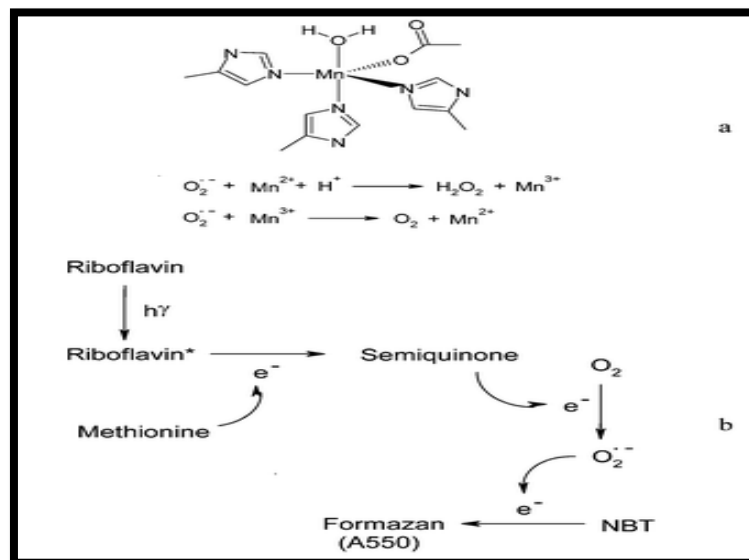
Fuente: (Santos Carlos, 2013)

El fundamento de este método se basa en determinar la capacidad antioxidante de una muestra vegetal. Cuando el electrón del átomo de Nitrógeno del radical DPPH recibe un átomo de hidrogeno del agente antioxidante este se reduce para dar lugar a al hidracina. El color

característico de la solución de DPPH es purpura al reducirse este radical este se torna en amarillo claro (Guija Emilio , 2015, p1-4).

### 1.7.2 Sistema Riboflavina/luz/NBT

La riboflavina es una vitamina soluble en agua que pertenece al complejo de vitamina B2, es de color amarillo y fluorescente. La riboflavina contribuye en la inhibición del estrés oxidativo a través de su doble capacidad de producir superóxido mientras está involucrado en la reducción del hidropéroxido. Estudios recientes han correlacionado la riboflavina con el mecanismo de transducción de señales de las células apoptóticas, así como con la regulación del reloj biológico (Santos De Souza et al.2005, pp.887-891). En el ensayo de riboflavina/ luz, en las ubicaciones que carecen de radical superóxido aparecen zonas claras contra un fondo morado oscuro. Es un sistema de captador de superóxido realizados en la capa de TLC.



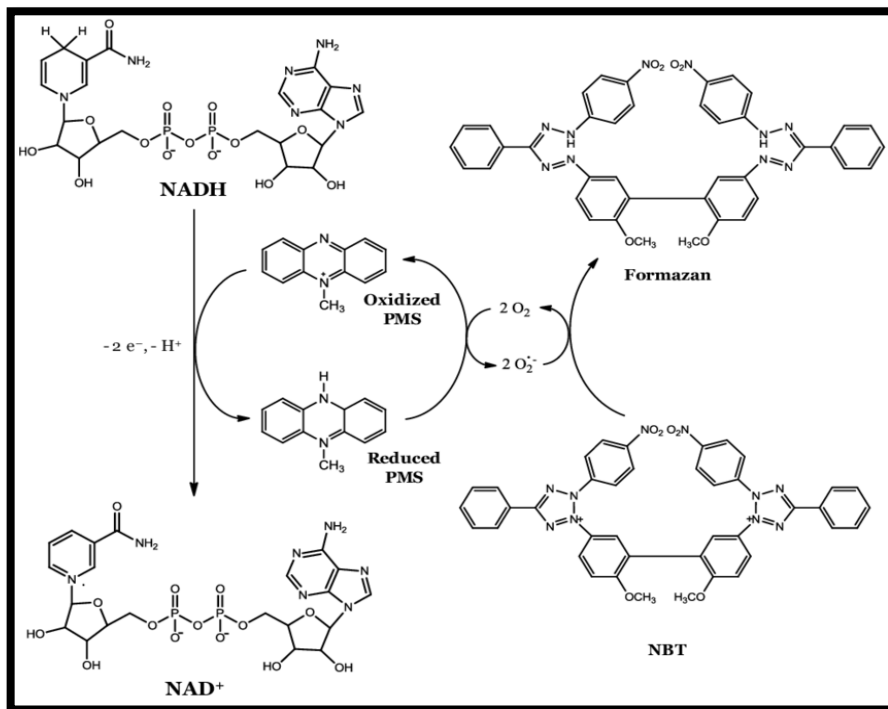
**Figura 9-1:** Mecanismo de reacción del sistema B2/luz/NBT.

Fuente: (Piacham et al.2003)

El fundamento de este método consiste en la reducción fotoquímica de la vitamina B2 (Riboflavina) formando el radical semiquinona que al estar en contacto con el oxígeno se generan radicales superóxido que llegan a reducir al NBT. Cuando se da la fotólisis de la riboflavina produce un radical semiquinona que reacciona con el oxígeno que forma radical superóxido el mismo que reduce al NBT a formazan (color azul-violeta) (Bueno-Solano et al.2009, pp136-142).

### 1.7.3 Sistema NADH/NBT/PMS

El británico A. Pearse en 1957 desarrolló el método para la detección histoquímica de la actividad de la deshidrogenasa. Sin embargo, en base a este método se han desarrollado nuevas aplicaciones de esta técnica para la detección de compuestos antioxidantes. Para cuantificar la actividad captadora de especies reactivas de oxígeno, este sistema utiliza metosulfato de fenazina y nicotin adenin dinucleótido para la producción de radical superóxido el cual reduce al nitroazul de tetrazolio a formazán de color violeta (Mandel et al.. 2011, p.3).

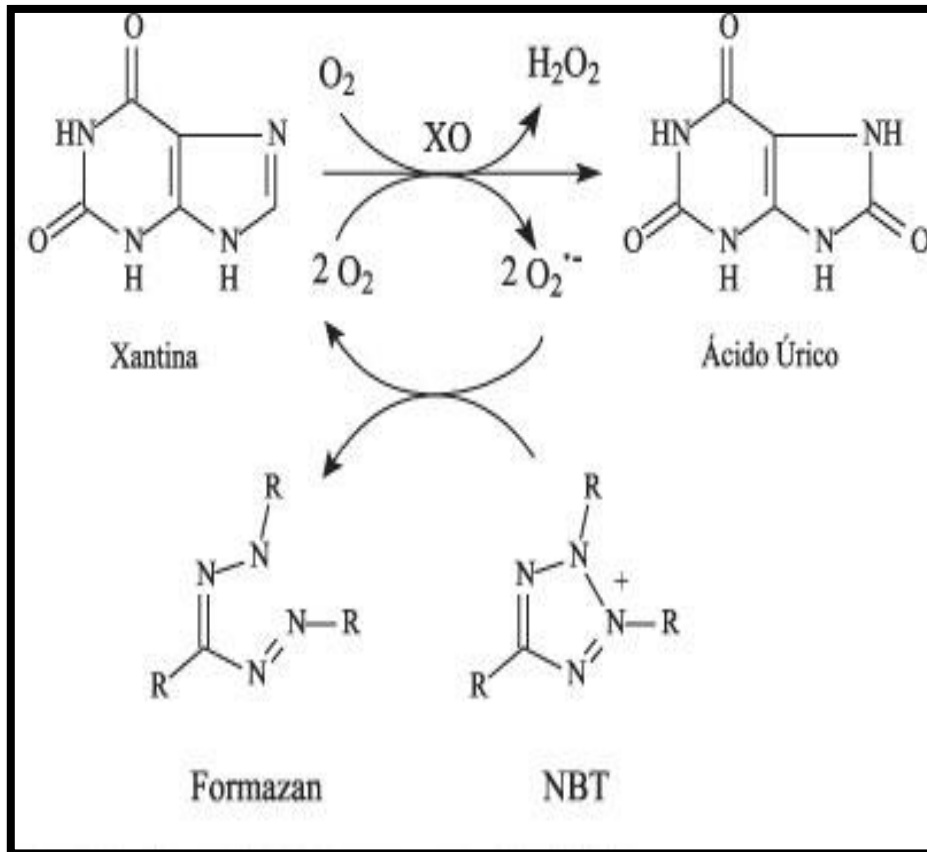


**Figura 10-1:** Mecanismo de reacción del sistema NADH/PMS/NBT.

Fuente:(Lopes Galiciana. 2014

El fundamento de este método consiste en que la coenzima NADH reduce al metosulfato de fenazina (PMS), mecanismo que genera radical superóxido de esta manera el NBT se reduce hasta llegar a formazan mismo que posee un color característico azul-violeta (Martínez , 2018, pp.2-9)

### 1.7.4 Sistema xantina/xantina oxidasa/NBT



**Figura 11-1:** Mecanismo de reacción de XO.

Fuente: (Alves et al.2010)

El Dr. Irwin Fridovich en colaboración con su estudiante graduado Joe McCord descubrieron la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y demostraron que esta es solo una de varias estrategias por las cuales las células evitan el estrés oxidativo (Imlay, 2011, pp.335-340). La SOD es un método que se emplea xantina y xantina oxidasa (XO) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) para formar un colorante formazán azul-violeta (Blanco et al., 2004, pp118-125).



## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Lugar de Investigación

El estudio de la especie vegetal se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.2 Recolección del material vegetal

Se recolectaron las hojas de *Palicourea amethystina* en el cantón San Miguel, provincia de Bolívar; alrededor de las 16h00 del mes de mayo 2019.

La recolección se realizó una vez que se obtuvo la Guía de Movilización de Especímenes de Flora y Fauna Silvestre Nro. MAE-DPAB-2019-0968-O. La investigación se realizó bajo los términos del Convenio Marco de Acceso a Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2018-0086 denominado “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGIA, CONSERVACIÓN Y SU USO POTENCIAL USO SOSTENIBLE”, suscrito entre la ESPOCH y el Ministerio de Ambiente del Ecuador.

#### 2.3 Identificación botánica

La identificación de la especie vegetal en investigación se llevó a cabo por el Ing. Jorge Caranqui, botánico responsable del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

## 2.4 Materiales, equipos y reactivos

Para realizar la investigación y cumplir con los objetivos se utilizaron diferentes materiales, equipos y reactivos que se describen a continuación:

**Tabla 1-2:** Materiales, reactivos y equipos

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Cajas Petri	Sorbona	Alopurinol
Matraz	Balanza analítica HDM	Agua bi destilada
Pipetas graduadas (1mL-5mL - 10 mL)	Rotavapor Heidolph®	Etanol 96%
Pipetas automáticas (200 µg-1000 µg)	Estufa Memmert SNB400	Éter de petróleo
Probetas (25mL y 50mL)	Bortex	Nitroazul de tetrazolio (NBT)
Lámpara fluorescente de 20W	Mufla	EDTA
Pinza para tubos	Termómetro digital	Cloroformo
Pinza para capsulas	Lámpara fluorescente de 20W	Acido fórmico
Soportes	Sonicador	Hidróxido de Amonio
Capsulas	Molino de cuchillas Arthur H. Thomas C.O	Ácido Sulfúrico
Vasos de precipitación 500mL-250mL	Cámara UV	Cloroformo o acetato de etilo
Tubos	Refrigerador General Electric®	Éter dietílico
Reverbero	Congelador General Electric®	Goma arábica
Gradilla	pH-metro	Sulfato de sodio anhidro
Piceta	Termoagitador magnético Thermo Scientific™	Metanol absoluto

---

Placas TLC Silicagel 60 RP-2 F254

(Sigma Aldrich®)

Espátula

Placas de sílice

Tubos eppendorf

Balón aforado 500mL

Frasco ámbar 90mL y 250mL

Embudo de separación

Regla

Estilete

Lápiz

Aluminio

Servilletas absorbentes

Trietilamina

PMS

2,2-difenil-  
1picrylhydrazyl  
(DPPH)

Riboflavina

NADH

Agar (cenizas 2-  
4.5%)

Metosulfato de  
fenazina (PBS)

EDTA

Solución Stock  
enzima XO

Fosfato dipotásico  
( $K_2HPO_4$ )

Fosfato  
monopotásico  
( $KH_2PO_4$ )

---

**Fuente:** Sigma Aldrich Chemical Co. (USA).

**Elaborado por:** Adriana Carrillo

## **2.5 Métodos y técnicas**

### ***2.5.1 Acondicionamiento del material vegetal***

Se recolecto una muestra significativa para el estudio de *Palicourea amethystina* a la cual se realizó una limpieza y una desecación a temperatura de 35°C en una estufa por 48 horas. Una vez desecada se trituro la muestra vegetal en un molino de cuchillas hasta obtener partículas de tamaño 2 o 3mm.

En esta investigación se desarrollaron métodos de acuerdo ROSSI , 2015 para realizar un control de calidad de la especie vegetal *Palicourea amethystina* como: determinación del contenido de humedad, contenido de cenizas totales, cenizas solubles en agua, solidos insolubles en ácido y tamizaje fitoquímico , dichas técnicas se describen a continuación.

### ***2.5.2 Control de calidad***

En esta investigación se desarrollaron métodos de acuerdo ROSSI , 2015 para realizar un control de calidad de la especie vegetal *Palicourea amethystina* como: determinación del contenido de humedad, contenido de cenizas totales, cenizas solubles en agua, solidos insolubles en ácido y tamizaje fitoquímico , dichas técnicas se describen a continuación.

#### **Contenido de humedad**

Se pesan 2 gramos de muestra del material seco y pulverizado, luego se transfiere a una cápsula previamente tarada, después se deseca a 105 °C durante 3h en la estufa. Se colocó la capsula en el desecador donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa. Repetir el proceso hasta tener un peso constante.

#### **Determinación del contenido de cenizas totales**

Se pesan aproximadamente entre 2 gramos de muestra pulverizada y secada, luego se calienta dicha muestra hasta carbonizarla después de incinerarla en una mufla a una temperatura de 700

a 750°C, por un tiempo de dos horas. Una vez finalizado esto colocar la capsula en el desecador para dejar enfriar y pesar. Repetir el procedimiento hasta tener peso constante.

#### **Determinación del contenido de cenizas solubles en agua.**

Se pesan las cenizas totales y se agrega de 15 a 20 mL de agua, tapar con el crisol y hervir con el mechero por cinco minutos. La solución se filtra con papel filtro posterior a ello se coloca el papel filtro en el crisol se carboniza y luego se incinera en una mufla de 700-750 °C, durante 2 horas. Finalmente se coloca en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente. Repetir el proceso hasta tener un peso constante.

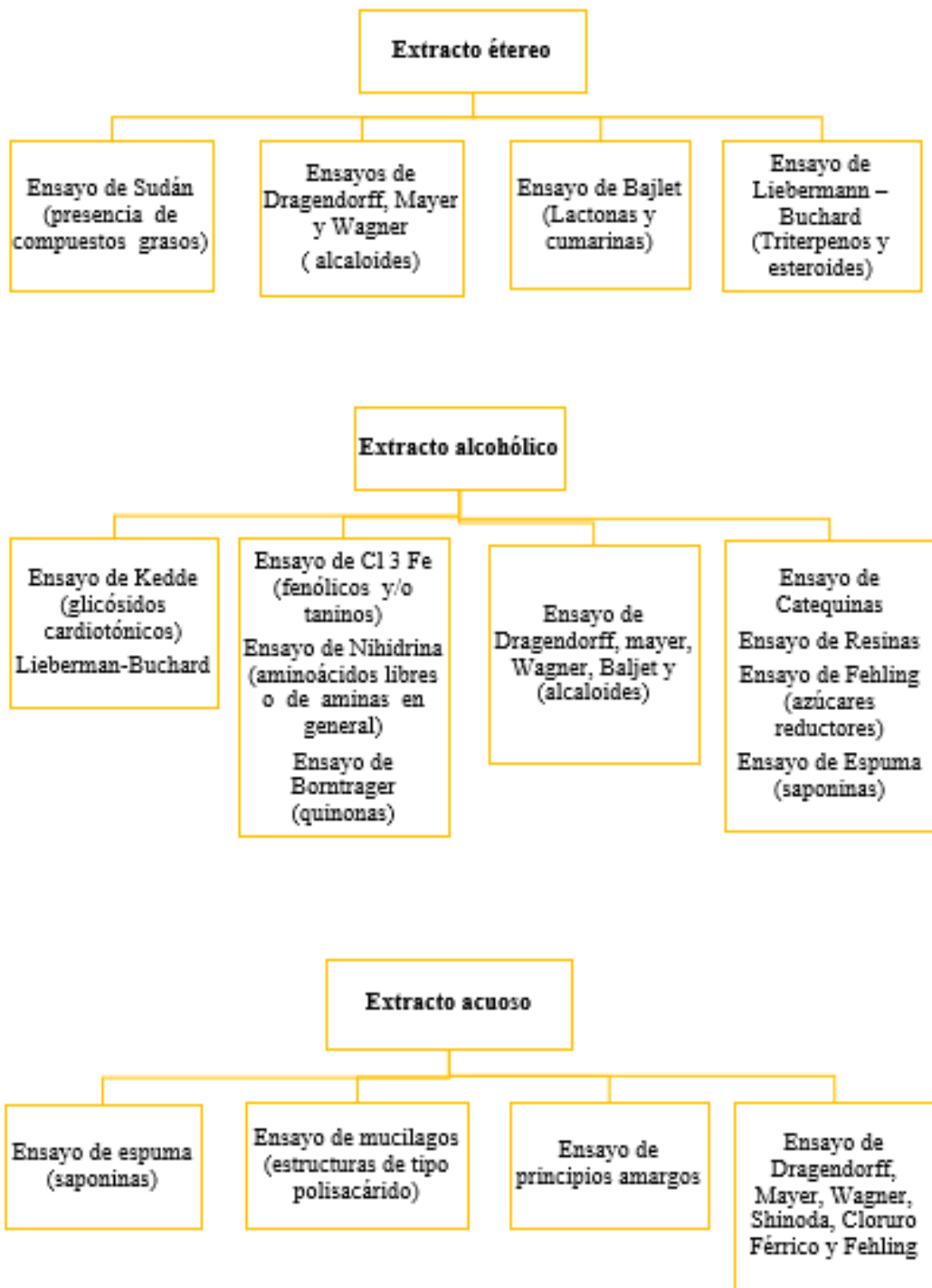
#### **Sólidos insolubles en acido.**

A las cenizas totales se añade entre 2 o 3 mL de HCl al 10%, cubrir el crisol con un vidrio reloj y colocar a baño maría por diez minutos luego lavar el vidrio reloj con 5mL con agua caliente y unir al contenido del crisol, se filtra la solución a través de un papel de filtro y finalmente se coloca en el desecador hasta que llegue a temperatura ambiente se pesa, repetir el procedimiento hasta obtener un peso constante

#### **2.5.3 Tamizaje fitoquímico**

Se pesó 50 gramos del material vegetal, luego se colocó éter etílico 100 mL, después se dejó macerar durante 48 horas a temperatura ambiente, se filtra la solución y se obtiene el extracto etéreo. El residuo sólido se deja secar y pesar, luego se coloca etanol (100 mL) se deja en maceración por 48 horas, y se obtiene el extracto alcohólico, el residuo sólido se deja secar y pesar. Luego se filtra, con agua destilada (100 mL) y se deja en maceración por 48 horas para obtener el extracto acuoso.

### 2.5.3.1 Identificación de metabolitos.



Los resultados se reportan si presenta: opalescencia (+), turbidez (++) o precipitado (+++)

**Figura 12-2:** Ensayos del extracto etéreo, alcohólico y acuoso

Elaborado por: Adriana Carrillo

#### **2.7.4 Obtención de alcaloides.**

La muestra vegetal desecada y molida se coloca en metanol durante 2 días, se lleva al sonicador durante 1 hora para mejorar la maceración, posterior a ello se filtra y se obtiene el extracto crudo, el mismo que se concentra en el rotavapor y al finalizar este proceso se obtiene el extracto seco (Rodas , 2016, p.16).

El extracto seco se acidifica con 25mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2% en el extracto crudo acidificado se coloca éter para obtener dos fases la una es la fase etérea y lo restante es la fase acuosa ácida, se agita levemente si la fase superior se torna de un color amarillo se debe desengrasar con éter hasta conseguir un color claro en la fase superior, luego se filtra y se gasifica la fase acuosa ácida se pone a pH 10 utilizando hidróxido de amonio y se obtiene la fase básica.

A la fase alcalina se coloca cloroformo/éter para separar en fases una es la fase orgánica y la otra es la fase acuosa, la fase organiza resultante se añade sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y goma arábica con el fin de eliminar los restos de agua, se filtra y se concentra por medio del rotavapor para obtener el extracto alcaloideo (Rodas, 2016, p.16).

#### **2.7.5 Cromatografía en capa fina**

Para separar los alcaloides se utilizó la placas de TLC 7x2 cm, en la cual se sembró aproximadamente 10 µL de una solución de alcaloides de *Palicourea amethystina*. Para eludir, se preparó una fase móvil que constan de cloroformo, metanol y trietilamina (6: 0.6: 0.5; v/v/v). Para visualizar la placa se empleó una cámara UV a 254nm. Mediante el programa GelAnalyzer® se obtuvo los R<sub>f</sub> (factor de retardo) los mismos que al comparar con fuentes bibliográficas se puede conocer qué tipo de compuestos bioactivos posee la planta (UNOCD , 2012, p.32).

#### **2.7.6 Ensayos autográficos.**

En la investigación de Ramallo et al... (2005, pp.16-9), explica el desarrollo de los métodos autográficos como: inhibición de xantina oxidasa mediante inmersión en agar y la captación de radical superóxido, estos métodos se han empleado en esta investigación con pequeñas

modificaciones. La captación de radicales DPPH se realizó con referencia al estudio de Brand-Williams et al. (1995, p.25).

Para los ensayos autográficos, se colocaron 10µL de cada una de las diluciones (1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg y 100 µg) tanto del extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina* como de los compuestos de referencia en una placa de TLC de forma ascendente aplicando la técnica “dot-blot”. Finalmente los resultados se analizaron en el software GelAnalyzer ®.

### **Método DPPH**

En la placa TLC se colocaron cinco muestras de 10µL de las diferentes concentraciones empleando la técnica “dot-blot”, se deja secar por unos minutos y luego se coloca el reactivo DPPH se esperó por 5 minutos para observar. Si el lugar en donde se encuentra la muestra se torna de un color amarillo el ensayo es positivo, es decir el material vegetal posee actividad antioxidante. El estándar de esta prueba es el ácido ascórbico realizando diluciones en las mismas concentraciones que el extracto alcaloideo.

### **Sistema Riboflavina + luz + NBT**

El agar fue disuelto a 80 ° C en una mezcla de EDTA, tampón fosfato y agua destilada. La solución se deja enfriar a 60 ° C y se coloca la solución NBT. Luego se agrega la solución de riboflavina.

Se realiza el procedimiento típico para la riboflavina / tinción ligera, aproximadamente 5 mL de la solución de tinción de riboflavina, se distribuye sobre una capa de TLC de 7 × 2 cm, en la cual previamente se colocaron 5 muestras de 10µL del extracto alcaloidal de la planta *Palicourea amethystina* en concentraciones de 1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg y 100 µg, se deja solidificar en la oscuridad. Para dar paso a la reacción se colocó la placa debajo de una lámpara fluorescente de 20W.

Las muestras que poseen actividad captadora de radical superóxido se aparecían como zonas claras sobre un fondo morado oscuro. El estándar de captador de radicales libres es la taxifolina realizando diluciones al igual del extracto alcaloideo.



### **Sistema NADH + fenofosfato de fenazina + NBT**

El agar se disolvió a 80°C en una mezcla de EDTA, tampón fosfato (pH 7.9) y agua destilada, la solución se deja enfriar a 60 ° C, luego se coloca la solución NBT y la solución NADH.

Alrededor de 5 mL de solución de tinción NADH se distribuyen sobre una capa de TLC de 7 × 2 cm, en la cual previamente se colocaron cinco muestras de 10µL del extracto alcaloidal de *Palicourea amethystina* en concentraciones de 1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg y 100 µg, después de la solidificación (en la oscuridad), la placa se sumergió en 2,7 µM de PMS en tampón fosfato a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad.

En los lugares donde se aprecia la actividad captadora de radical superóxido se forman manchas claras contra un fondo púrpura oscuro. El estándar de captador de radicales libres es la taxifolina realizando diluciones al igual del extracto alcaloideo.

### **Inhibición de XO**

El agar se disuelve a 80 ° C en una mezcla de EDTA, tampón fosfato y agua destilada. La solución se dejó enfriar a 55 ° C y se agrega solución de NBT. Después de un nuevo enfriamiento a 50 ° C, se agregó solución XO (34.2 U/mL).

Después aproximadamente 5 mL de la solución de tinción XO se distribuyen sobre una capa de TLC de 7×2 cm, en la cual previamente se colocaron 5 muestras de 10uL del extracto alcaloidal de la planta *Palicourea amethystina* en concentraciones de 1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg y 100 µg, después de la solidificación (en la oscuridad), la placa se sumerge en 3 mM de xantina a 38° C durante 20 minutos en la oscuridad.

Las ubicaciones que carecen de actividad de XO aparecen machas claras (zonas) sobre un fondo púrpura oscuro. El estándar de inhibición de xantina oxidasa fue alopurinol realizándole diluciones al igual del extracto alcaloideo.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se detallan a continuación los resultados de la investigación que se ejecutaron a través de los métodos y técnica mencionados en el capítulo anterior.

#### 3.1 Control de calidad

Para realizar estudios de especies vegetales es necesario realizar un control de la calidad a las mismas, con el fin de asegurar que la planta se encuentra óptima para ensayos más específicos y que los resultados de los mismos sean correctos.

**Tabla 2-3:** Control de calidad de las hojas de *Palicourea amethystina*.

Ensayo	Hojas (%)	Límites de referencia Farmacopea Británica
Contenido de humedad	10.3%	7-14%
Cenizas totales	9.30%	12%
Cenizas solubles en agua	5.98%	7%
Cenizas insolubles en ácido	4.05%	5%

Elaborado por: Adriana Carrillo

Se entiende por humedad al agua libre que contiene la planta, la misma que se debe encontrar inferior al 14%, a fin de evitar un deterioro de la muestra vegetal ya se por crecimiento

microbiano, insectos, hongos o procesos enzimáticos. Con respecto a las cenizas totales, este análisis nos permite conocer la cantidad total de materia que se obtiene al incinerar la muestra vegetal. Se obtiene cenizas fisiológicas que provienen de los tejidos del vegetal y las cenizas no fisiológicas que son la materia inorgánica adherida a la superficie de la planta como arena o tierra, la cenizas solubles nos indica la cantidad de sales solubles que se encuentran en la materia vegetal y las cenizas insolubles en ácido permite conocer la cantidad de sílice que posee el vegetal, principalmente como tierra silíceo y arena. En la tabla 2-3 se observan los resultados del control de calidad de las hojas de *Palicourea amethystina*, mismos que se encuentra dentro de los límites de referencia establecidos por la Farmacopea Británica, por lo que se puede indicar que la planta se encuentra apta para posteriores análisis (WHO, 1998, pp.36-48).

### 3.2 Tamizaje fitoquímico

El screening fitoquímico nos permite identificar los metabolitos secundarios que posee las hojas de *Palicourea amethystina*.

**Tabla 3-3:** Tamizaje fitoquímico de las hojas de *Palicourea amethystina*.

Ensayo	Metabolito	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
<b>Sudan</b>	Compuestos grasos	Positivo (+)	N/A	Positivo (+)
<b>Baljet</b>	Compuestos lactónicos	Positivo (+)	Positivo (++)	N/A
<b>Libermann-buchard</b>	Triterpenos y/o esteroides	Positivo Verde oscuro	Positivo (+)	N/A
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	Negativo	Positivo (++)	Positivo (+)
<b>Mayer</b>	Alcaloides	Negativo	Positivo (+)	Positivo (+)
<b>Wagner</b>	Alcaloides	Negativo	Positivo (++)	Positivo (+)

<b>Catequinas</b>	Catequinas	N/A	Negativo	N/A
<b>Resinas</b>	Resinas	N/A	Negativo	N/A
<b>Espuma</b>	Saponinas	N/A	Negativo	Negativo
<b>Cloruro férrico (Cl<sub>3</sub>Fe)</b>	Compuestos fenólicos  y/o taninos	N/A	Positivo (++)  Verde intenso	Positivo (+)  Verde intenso
<b>Nihidrina</b>	Aminoácidos libres o aminas	N/A	Negativo	N/A
<b>Boritrager</b>	Quinonas	N/A	Positivo (+)	N/A
<b>Kedde</b>	Glicósidos cardiotónicos	N/A	N/A	N/A
<b>Shinoda</b>	Flavonoides	N/A	Positivo (+)	N/A
<b>Antocianidina</b>	Estructuras de secuencia  C6-C3-C6 del grupo  de los flavonoides	N/A	Positivo (+)	N/A
<b>Fehling</b>	Azúcares reductores	N/A	Positivo (+)	Positivo (+)
<b>Mucílagos</b>	Estructura tipo polisacárido	N/A	N/A	Positivo
<b>Principios amargos</b>		N/A	N/A	Positivo

---

N/A (No aplica), +++ (Abundante), ++ (Moderado), + (Escaso)

**Elaborado por:** Adriana Carrillo, 2019

El tamizaje fitoquímico constituye una serie de ensayos que nos permiten determinar la presencia o ausencia de compuestos bioactivos que posee una muestra vegetal, esto nos ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de la muestra vegetal y así aprovechar científicamente su uso. En la

tabla 3-3 se observa los resultados del screening fitoquímico de las hojas de *Palicourea amethystina* en los diferentes extractos (etéreo, alcohólico y acuoso) en los cuales se identificó compuestos lactónicos, compuestos grasos, triterpenos/esteroides, compuestos fenólicos, quinonas, alcaloides, azúcares reductores, flavonoides y estructuras tipo polisacárido, compuestos de estructura tipo polisacárido (mucilagos) y principios amargos.

En la investigación de Neto et al. (2015, p.5) reportaron la presencia de taninos, alcaloides y flavonoides presentes en una especie del género *Palicourea*, de esta manera se sustenta el resultado del screening fitoquímico de las hojas de *Palicourea amethystina*.

### 3.3 Obtención del extracto alcaloideo

Los alcaloides al encontrarse en su forma básica su aislamiento se realizó por cambios de pH, estos son compuestos heterocíclicos con un nitrógeno básico la gran mayoría de ellos son poco solubles o insolubles en agua y reaccionan con los ácidos para formar sales (Rojas et al., 2015, p15-20), esto permite que solventes que son polares sean capaces de solubilizarlos como el metanol.

**Tabla 4-3:** Rendimiento de la extracción líquido-líquido de las hojas de *P. amethystina*.

Planta	Peso del material vegetal (g)	Solvente (mL)	Extracto total de alcaloides (mg)	Rendimiento
Hojas de <i>P. amethystina</i>	50	Metanol	22.6	0.005%

**Elaborado por:** Adriana Carrillo

A partir de las hojas de *Palicourea amethystina* se obtuvo 22.6 mg de extracto alcaloideo con un porcentaje de rendimiento de 0.005%. Un estudio del género *Palicourea* reportaron que el rendimiento del extracto alcaloideo fue de 0.77% (Arteaga et al., 1997, pp.1-3). El rendimiento del extracto alcaloideo de *P. amethystina* es bajo esto puede deberse a diferentes factores medio

ambientales como: altitud, estación en que se recolecto la muestra o el paisaje bioclimático (Chaverri , 2015, pp.2-6).

### 3.4 Cromatografía en capa fina (TLC)

TLC es una técnica cromatográfica sencilla, que permite separar e identificar compuestos bioactivos de muestras vegetal.

**Tabla 5-3:** Posible compuesto identificado del EAPA en TLC.

Especie en investigación				
Fase sólida: Sílica gel con indicador de fluorescencia a 254nm				
Fase móvil: cloroformo: metanol: trietilamina (6:0,6, 0,5 ; v/v/v)				
Extracto	Dr (cm)	DFM (cm)	RF	Posible compuesto identificado
Extracto alcaloideo de hojas de <i>P. amethystina</i>	3.4	4.4	0.51	Alcaloides derivados de la triptamina-iridoides

**Dr:** Distancia recorrida por el soluto; **DFM:** Distancia recorrida por la fase móvil; **Rf:** Factor de retardo

**Elaborado por:** Adriana Carrillo, 2019

Existen escasos reportes de cromatografía capa fina para el género *Palicourea*, sin embargo existen géneros de la familia Rubiaceae que han reportado la presencia de alcaloides, cumarinas en ciertas especies. El estudio de Bullain (2014, pp.2-11) reporta la presencia de alcaloides en especies vegetales de la familia Rubiaceae a través de TLC y nos demuestra que este tipo de alcaloides de acuerdo a su estructura molecular son compuestos que fluorescen mostrando manchas cuyos colores van de violeta al azul.

En el estudio “Quimiversidad de alcaloides derivados de triptamina en seis especies de *Palicourea* costarricense (Rubiaceae – Palicoureeae)” de Berger et al. . (2017, pp.124-131) nos indica que a través de su investigación encontró 14 alcaloides harmala y triptamina-iridoides con varios núcleos tri-, tetra- y pentacíclicos de las hojas y la corteza del tallo de seis especies del gran y complejo género neotropical *Palicourea*. Sin duda alguna existe un amplio campo de investigación para este género y más aún para la especie *Palicourea amethystina*, sin embargo no se descarta que esta especie posee este tipo de alcaloides.

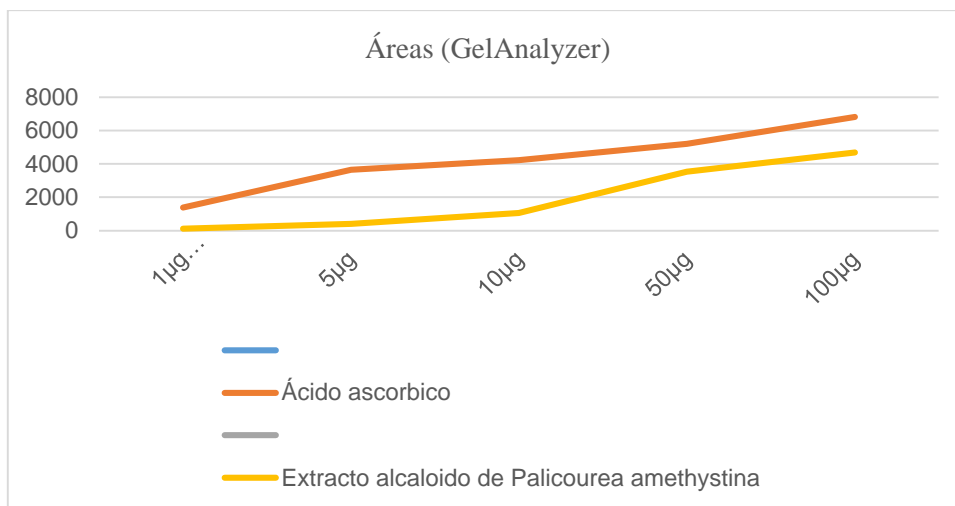
### 3.5 Ensayos autográficos

#### 3.5.1 Captación de DPPH

**Tabla 6-3:** Actividad captadora de radical DPPPH de ácido ascórbico y EAPA.

Muestra/ Áreas	Áreas calculadas con el programa GelAnalyzer				
	1 µg	5 µg	10 µg	50 µg	100 µg
Ácido ascórbico	1386	3658	4224	5213	6819
Extracto alcaloideo de <i>Palicourea amethystina</i>	124	410	1053	3530	4683

Elaborado por: Adriana Carrillo. 2019



**Gráfico 1-3:** Áreas de captación de DPPH del EAPA vs ácido ascórbico.

**Elaborado por:** Adriana carrillo. 2019

En la tabla 6-3, se observa las áreas del extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina* y ácido ascórbico (estándar) adquiridas de la prueba autográfica para actividad antioxidante, al comparar estos resultados se visualiza que las dos últimas concentraciones del EAPA reportan mayor actividad de captación de radical DPPH (gráfico 1-3).

Neto et al. (2015, p.5) en su estudio nos indica que la actividad antioxidante de una especie vegetal especialmente se debe a sustancias nucleares fenólicas como flavonoides y ácidos fenólicos, debido a que actúan como secuestradores de especies reactivas de oxígeno (ROS), además de reducir y quelar iones férricos que catalizan la peroxidación lipídica.

### 3.5.2 Sistema Riboflavina + LUZ + NBT

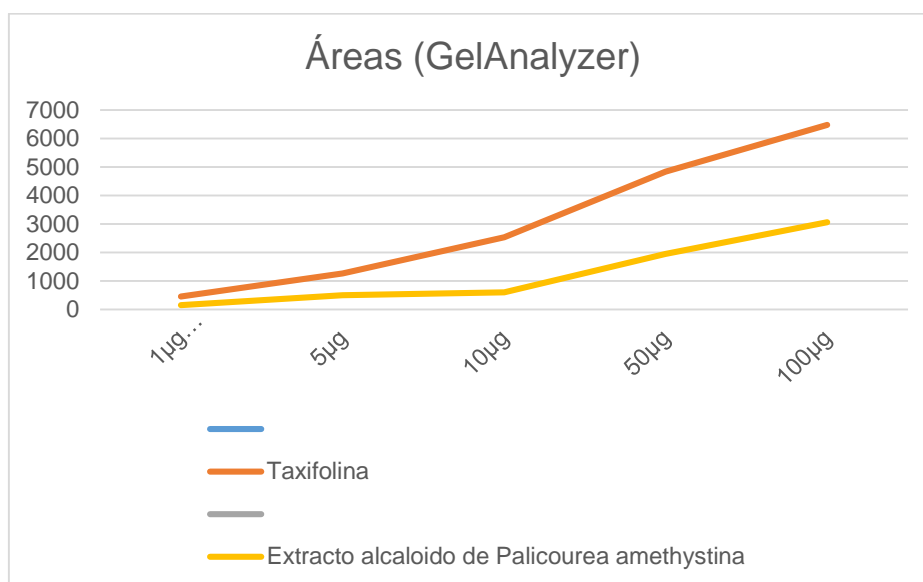
El ensayo autográfico de Riboflavina dio como resultado que en las concentraciones de 50 µg y 100 µg del extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina* existe una mayor capacidad de captación de radical superóxido con respecto a las otras concentraciones. En la placa de TLC se visualizaron manchas blancas en el fondo morado, siendo más notable en las muestras de mayor concentración, véase en el anexo G. Mediante el programa GelAnalyzer se obtuvo las áreas de las muestras tanto del EAPA como del estándar (taxifolina), como se puede observar en la tabla 7-3.



**Tabla 7-3:** Captación de  $O_2^-$  de taxifolina y EAPA, método Riboflavina/Luz/NBT.

Muestra/ Áreas	Áreas calculadas con el programa GelAnalyzer				
	1 µg	5 µg	10 µg	50 µg	100 µg
<b>Taxifolina</b>	451	1262	2535	4832	6480
<b>Extracto alcaloideo de <i>Palicourea amethystina</i></b>	153	500	593	1942	3056

Elaborado por: Adriana Carrillo. 2019



**Gráfico 2-3:** Áreas de captación de  $O_2^-$  del EAPA vs taxifolina. Sistema B2/luz/NBT.

Elaborado por: Adriana Carrillo.2019

Como se observa el resultado del ensayo autográfico de Riboflavina/luz/NBT del extracto alcaloideo de *P. amethystina* es positivo, es decir que presentan una actividad captadora de radical superóxido.

Según la literatura no existen reportes de actividad inhibitoria de radicales libres de la especie *Palicourea amethystina*. Sin embargo se conoce que los alcaloides de  $\beta$ -carbolina derivados del

triptófano, la triptamina y la serotonina, pueden considerarse moléculas con propiedades antioxidantes. Por un lado, químicamente consumen radicales debido a la reactividad de la parte del indol hacia los radicales derivados del oxígeno (donación de hidrógeno o electrones), por otro lado enzimáticamente debido a la inhibición de la monoaminoxidasa. Algunos estudios concluyen que la actividad antioxidante de las  $\beta$ -carbolinas podría dar lugar a acciones protectoras de células y tejidos, incluida la neuroprotección (Lehmann, 2012, pp.133-144).

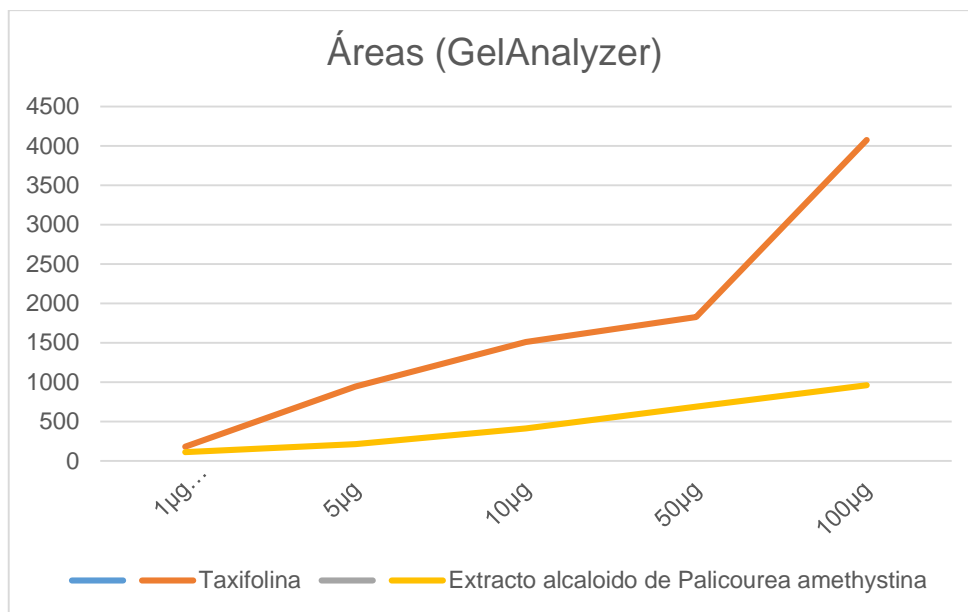
### 3.5.3 Sistema NAD H/ PMS/ NBT

El ensayo autográfico de NAD-H realizado en el extracto alcaloide de *P. amethystina* obtuvo un resultado positivo, como se observa en la placa de TLC las concentraciones de 50  $\mu\text{g}$  y de 100  $\mu\text{g}$  presencian mayor actividad al observar zonas claras en un fondo morado (anexo I). Por otro lado se analizó la placa cromatográfica en el programa GelAnalyzer para obtener las áreas tanto del extracto alcaloide de *P. amethystina* como del estándar (taxifolina) detallándose en la tabla 8-3.

**Tabla 8-3:** Capacidad de  $\text{O}_2^-$  de taxifolina y EAPA, método NADH/PMS/NBT.

Muestra/ Áreas	Áreas calculadas por el programa GelAnalyzer					
	Concentraciones	1 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$
Taxifolina		179	944	1508	1824	4075
Extracto alcaloide de <i>Palicourea amethystina</i>		109	214	413	487	559

Elaborado por: Adriana Carrillo.2019



**Gráfico 3-3:** Áreas de captación de  $O_2^{\cdot-}$  del EAPA vs taxifolina.

Sistema NADH/NNT/PMS.

Elaborado por: Adriana Carrillo.2019

Por medio del gráfico 3-3 podemos visualizar la capacidad captadora de radical superóxido del extracto alcaloide de *Palicourea amethystina* al relacionarle con su estándar (taxifolina), obteniendo mejores resultados en las ultimas concentraciones del EAPA.

Para investigar más a fondo el papel de las relaciones estructura-actividad antioxidante. Spadoni et al. (2006, pp.259-269) en su estudio, ha modificado sistemáticamente estructuras conocidas para diseñar nuevas series de compuestos, tal es el caso de la 5-metoxi- N, N- diisopropiltriptamina (triptamina-núcleo indol), donde se cambió del grupo 5-metoxi a la posición 4 del núcleo indol dando como resultado un eliminador de radicales más activo, más potente que el compuesto original, pero mucho menos efectivo como citoprotector.

Sin embargo, este tipo de modificaciones podrían emplearse como herramientas para investigaciones farmacológicas *in vivo* sobre la eficacia neuroprotectora de los alcaloides indólicos.

### 3.5.4 Inhibición XO

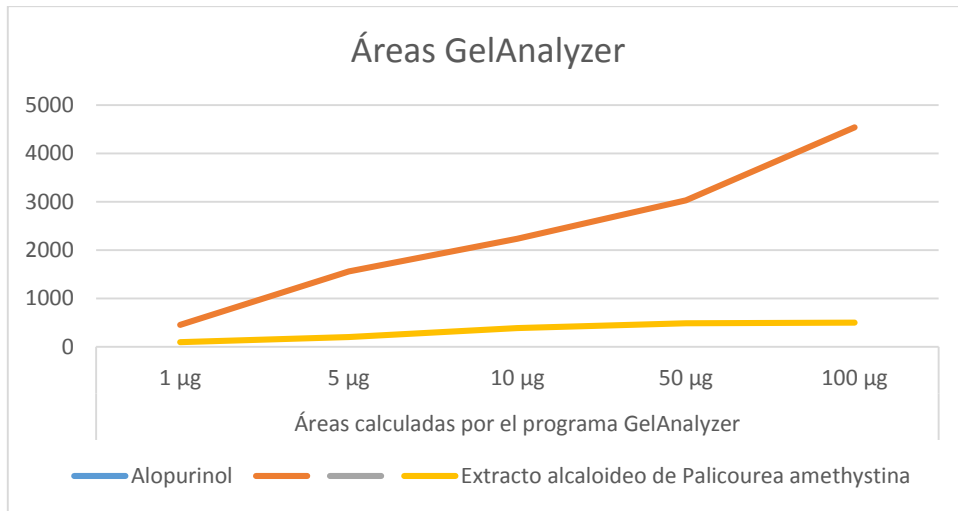
La prueba autográfica para inhibición de xantina oxidasa nos indica que, el alopurinol como control positivo posee una actividad inhibitoria muy superior a la del extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina*.

Sin embargo, los resultados positivos para actividad captadora de radical DPPH y radical superóxido; nos indican que los alcaloides de *P. amethystina* deben enfocarse a su potencial antioxidante, mas no a su actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa.

**Tabla 9-3:** Actividad inhibitoria de xantina oxidasa de alopurinol.

Muestra/ Áreas	Áreas calculadas por el programa GelAnalyzer				
	1 µg	5 µg	10 µg	50 µg	100 µg
Concentraciones					
Alopurinol	454	1558	2239	3029	4540
Extracto alcaloideo de <i>Palicourea amethystina</i>	100	205	386	485	502

Elaborado por: Adriana Carrillo



**Gráfico 4-3:** Áreas de inhibición de xantina oxidasa del EAPA vs alopurinol.

Elaborado por: Adriana Carrillo



**Figura 13-3:** Ensayo autográfico de xantina oxidasa.

## CONCLUSIONES

- Por medio de las técnicas autográficas se logró determinar que el extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina* presenta actividad captadora de radical superóxido, mediante la aplicación de los métodos Riboflavina/luz/NBT y NADH/PMS/NBT; sin embargo no presenta actividad inhibitoria sobre xantina oxidasa.
- Al realizarse el control de calidad de las hojas de *Palicourea amethystina*, los resultados de los parámetros de humedad, cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido se encuentran dentro de los rangos establecidos, por lo que se puede indicar que la materia prima vegetal se encuentra en óptimas condiciones.
- El tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de la materia vegetal de *P. amethystina* indicó la presencia de compuestos fenólicos, quinonas, azúcares reductores, flavonoides, estructuras tipo polisacárido, mucílagos, principios amargos y alcaloides.
- Al obtener el extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina* mediante la extracción líquido-líquido, se reportó un rendimiento de 0.005% de alcaloides totales.
- Se demostró por medio del ensayo DPPH que el extracto alcaloideo de *P. amethystina* posee actividad antioxidante. Los compuestos antioxidantes son estudiados actualmente con mayor frecuencia debido a que previenen o reducen el daño celular causado por los radicales libres, los mismo que se relacionan con enfermedades degenerativas específicamente cerebrales y nerviosas.
- Se logró identificar la capacidad captadora de radical superóxido del extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina* a través de la generación no enzimática de superóxido en los sistemas Riboflavina/LUZ/NBT y NADH/PMS/NBT.

## RECOMENDACIONES

Realizar técnicas cromatográficas más específicas para conocer qué tipo de alcaloide presenta la planta *Palicourea amethystina*, para así aportar con bases científicas de este género que hoy en día es limitada

Se recomienda realizar más estudios de la especie, debido a la presencia de metabolitos secundarios como son los fenoles que poseen actividad antioxidante.

Promover el estudio de especies del género *Palicourea*, debido a su taxonomía pueden llegar a tener potentes compuestos bioactivos.

Realizar pruebas de toxicidad de la especie *Palicourea amethystina*, para conocer si el uso de la especie puede llegar a ser perjudicial para el ser humano.

## GLOSARIO

### Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
AA	Ácido ascórbico
AINE	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
ALI	Alcaloides indólicos
AMIs	Alcaloides monoterpén-indólicos
ATP	Trifosfato de adenosina
B <sub>2</sub>	Riboflavina
B <sub>2</sub> /L/N	Riboflavina/luz/NBT
cm	Centímetro
DMT	Dimetiltryptamina
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
EAPA	Extracto alcaloideo de <i>Palicourea amethystina</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ROS	especies reactivas de oxígeno
GIPRONAF	Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
m	Metro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
N/N/P	NADH/NBT/PMS



<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazolio
<b>NHANES</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutricion de los Estados Unidos
<b>O<sub>2</sub>H<sup>•</sup></b>	Radical Perhidroxilo
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical Hidroxilo
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PMS</b>	Metosulfato de fenazina
<b>Rf</b>	Factor de retardo
<b>RL</b>	Radicales libres
<b>NS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RSO</b>	Radical superóxido
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TA</b>	Triptamina
<b>Tx</b>	Taxifolina
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>UMS</b>	Urato monosódico
<b>XDH</b>	Xantina deshidrogenasa
<b>XOR</b>	Xantina oxidorreductasa
<b>O<sub>2</sub> •-</b>	Radical superóxido

## BIBLIOGRAFÍA

**AHMAD, I., et.al.** 2010. Xanthine oxidase/tyrosinase inhibiting, antioxidant, and antifungal oxindole alkaloids from *Isatis costata*. *Pharmaceutical Biology* [en línea], vol. 48, no. 6, pp. 716-721. [Consulta: 16 noviembre 2019]. ISSN 1388-0209. DOI 10.3109/13880200903271298. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880200903271298>

**AIZPURU., et al.** 2016. Rubiaceae. [en línea]. [Consulta: 15 febrero 2019]. Disponible en: <http://www.unavarra.es/herbario/htm/Rubiaceae.htm>

**ALCAÍNO, H., et.al.** 2011. *Ácido úrico: Una molécula con acciones paradójicas en la insuficiencia cardiaca*. abril 2011. S.l.: s.n.

**ÁLVAREZ-LARIO, B. y ALONSO-VALDIVIELSO, J.L.,** 2014. *Hiperuricemia y gota: El papel de la dieta*. 2014. S.l.: Grupo Aula Medica S.A.

**ALVES, et.al.,** 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quimica Nova*, vol. 33, no. 10, pp. 2202-2210. ISSN 16787064. DOI 10.1590/S0100-40422010001000033

**AÑAZCO, M.,** 2008. Usos medioambientales de las plantas. *Enciclopedia De Plantas Utiles Del Ecuador*. ISBN 978-9978-77-135-8

**ARAGÓN SAGRARIO MARTÍN,** 2003. El paciente hiperuricémico | Farmacia Profesional. [en línea], vol. 20, no. 11, pp. 48-53. [Consulta: 8 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-el-paciente-hiperuricemico-13096651>

**ARTEAGA-GARCIA L. TOBON C. & MORA C.,** 1997. Citotoxicidad de los componentes de *palicourea ovalis*. *Revista colombiana de ciencias quimico-farmacéuticas* [en línea], Disponible en: revista cowmbiana de ciencias quimico-farmacéuticas

**AVELLO, M. y SUWALSKY, M.,** 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, no. 494. DOI 10.4067/s0718-04622006000200010

**BERGER, A.,** 2017. Two new combinations, lectotypifications and a new name for Costa Rican *Palicourea* s.l. *PhytoKeys*, vol. 80, no. 1, pp. 53-63. ISSN 13142003. DOI 10.3897/phytokeys.80.13330

**BLANCO-HERNANDEZ, et.al.** 2004. Lipoperóxidos, actividad antioxidante y factores prooxidantes en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2\*. [en línea]. S.l.: [Consulta: 10

noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2004/bq044c.pdf>

**BORHIDI A, OVIEDO R, P. y Y FERNÁNDEZ M.**, 2015. Nuevos resultados de la revisión taxonómica de los géneros *palicourea* y *psychotria* (Rubiaceae, psychotrieae) en cuba. [en línea], [Consulta: 13 septiembre 2019]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/42945229.pdf>

**BOVE, M., CICERO, A.F.G. y BORGHI, C.**, 2017. The Effect of Xanthine Oxidase Inhibitors on Blood Pressure and Renal Function. *Current Hypertension Reports* [en línea], vol. 19, no. 12, pp. 95. [Consulta: 15 febrero 2019]. ISSN 1522-6417. DOI 10.1007/s11906-017-0793-3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29071435>

**BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. y BERSET, C.**, 1995. *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. 1 enero 1995. S.l.: s.n.

**BREMER, B.**, 2009. A Review of Molecular Phylogenetic Studies of Rubiaceae 1 . *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 96, no. 1, pp. 4-26. ISSN 0026-6493. DOI 10.3417/2006197

**BROWN, T., et.al.** 2017. A Physician's Attempt to Self-Medicare Bipolar Depression with N,N-Dimethyltryptamine (DMT). *Journal of Psychoactive Drugs*, vol. 49, no. 4, pp. 294-296. ISSN 21599777. DOI 10.1080/02791072.2017.1344898

**BUENO-SOLANO, et.al.** 2009. Cuantificación de riboflavina (vitamina B2) en productos lácteos por HPLC. *Revista Chilena de Nutricion*, vol. 36, no. 2, pp. 136-142. ISSN 07177518. DOI 10.4067/s0717-75182009000200005

**BULLAIN, M.**, 2014. Phytochemical screening of e xtracts from *F aramea occidentalis* (L.) A. Rich. (nabaco). *Revista Cubana de Farmacia* [en línea], vol. 19, no. 4. Disponible en: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/rt/printerFriendly/164/101>

**BURILLO-PUTZE, et.al.** 2013. *Drogas emergentes (III): Plantas y hongos alucino'genos*. 2013. S.l.: s.n.

**CHAVERRI, P.**, 2015. Las montañas, la diversidad biológica y su conservación. [en línea]. [Consulta: 10 noviembre 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/w9300s/w9300s09.htm>

**COGOLLO, et.al.** 2003. *Caldasia* 19(1-2): 91-9. . S.l.:

**COIFFIER, G.**, 2017. Gota tratamiento y prevención. , vol. 50, no. 17, pp. 1-21. DOI 10.1016/S1286-935X(17)87224-5

**CORRALES LUCÍA, M.M.**, 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. [en línea], [Consulta: 14 septiembre 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>

**COUSSETTE ULISES**, 2015. Xantina oxidorreductasa, propiedades, funciones y regulación de su expresión genética. *24* [en línea], vol. 2. [Consulta: 24 septiembre 2019]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v24n2/ibi07205.pdf>

**DE CARVALHO, et.al.** 2017. *<sup>13</sup>C-NMR spectral data of alkaloids isolated from psychotria species* (Rubiaceae). 1 enero 2017. S.l.: MDPI AG

**DE EGEA, et.al.** 2012. Checklist of vascular plants of the Department of Ñeembucú, Paraguay. *PhytoKeys*, vol. 9, no. 0, pp. 15. ISSN 1314-2011. DOI 10.3897/phytokeys.9.2279

**DEWANJEE, et.al.** 2015. *Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry*. 1 abril 2015. S.l.: Xi'an Jiaotong University

**DÍAZ-HUNG, M.L. y GONZÁLEZ FRAGUELA, M.E.**, 2014. Oxidative stress in neurological diseases: Cause or effect? *Neurologia*, vol. 29, no. 8, pp. 451-452. ISSN 15781968. DOI 10.1016/j.nrl.2013.06.022

**DIVINS TRIVIÑO, M.-J.**, 1999. Antimicóticos: en guardia. *Farmacia profesional*, vol. 13, no. 6, pp. 26-36. ISSN 0213-9324

**ELEJALDE, GUERRA, J.**, 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. [en línea], vol. 1, no. 0212-7199, pp. 50-59. [Consulta: 16 noviembre 2019]. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-71992001000600010&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-71992001000600010&script=sci_arttext&tlng=pt)

**ENROTH, C., et.al.**2000. Crystal structures of bovinemilk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 20, pp. 10723-10728. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.97.20.10723

**FERRANDO, B. et.al.** 2014. *Alopurinol y su papel en el tratamiento de la sarcopenia*. 2014. S.l.: Ediciones Doyma, S.L

**FÖRSTERMANN, U.**, 2010. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cardiovascular Disease and its Pharmacological Reversal. *Nitric Oxide*. S.l.: Elsevier Inc., pp. 139-167. ISBN 9780123738660

**GAGNÉ, F.**, 2014. Oxidative Stress. *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods*. S.l.: Elsevier Inc., pp. 103-115. ISBN 9780124116238

**GHEZZI, P.**, et.al. 2017. *The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects*. 2017. S.l.: John Wiley and Sons Inc

**GIRALDO, MARCELA & RAMIREZ, M.**, 2013. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae). [en línea], vol. 47, no. 0034-7515, pp. 483-491.

[Consulta: 16 noviembre 2019]. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152013000400008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152013000400008)

**GOICOECHEA, M. et.al.** 2012. Hiperuricemia , gota y enfermedad renal crónica. *Nefrología*, vol. 3, no. 2, pp. 8-15. DOI 10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2012.Mar.11444

**GONZÁLEZ, C., ORNELAS, J.F. y JIMÉNEZ, L.**, 2005. Between-year changes in functional gender expression of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated shrub. *Annals of botany* [en línea], vol. 95, no. 2, pp. 371-8. [Consulta: 15 febrero 2019]. ISSN 0305-7364. DOI 10.1093/aob/mci026. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546929>

**GUIJA EMILIO**, 2015. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. . S.l.:

**IKAN, R.**, 1991. Acetogenins. *Natural Products*. S.l.: Elsevier, pp. 1-69.

**IMLAY, J.A.**, 2011. Redox pioneer: professor Irwin Fridovich. *Antioxidants & redox signaling*, vol. 14, no. 3, pp. 335-340. ISSN 15577716. DOI 10.1089/ars.2010.3264

**ISCOFF PAULA, et.al.** 2017. Tratamiento de las hiperuricemias. [en línea], vol. 2, pp. 37. DOI 104-14. Disponible en: [www.renal.org.ar](http://www.renal.org.ar)

**KING, M.P.**, 2015. Metabolismo de Nucleótidos. [en línea]. [Consulta: 16 noviembre 2019]. Disponible en: <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/nucleotide-metabolism-sp.php>

**LEHMANN, J.**, 2012. Antioxidant properties of  $\beta$ -carbolines. *Isoquinolines And Beta-Carbolines As Neurotoxins And Neuroprotectants: New Vistas In Parkinson's Disease Therapy*. S.l.: Springer US, pp. 133-144. ISBN 9781461415428

**LEÓN MILAGROS, et.al.** 2018. The theory of oxidative stress as a direct cause of cell aging. [en línea], [Consulta: 14 septiembre 2019]. Disponible en:  
<http://scielo.sld.cu/pdf/ms/v16n5/ms12516.pdf>

**LOPES GRACILIANA**, 2014. Schematic representation of the reduction of NBT induced by O<sub>2</sub> •-,... | Download Scientific Diagram. [en línea]. [Consulta: 8 noviembre 2019]. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-reduction-of-NBT-induced-by-O2-generated-by-the\\_fig16\\_262499205](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-reduction-of-NBT-induced-by-O2-generated-by-the_fig16_262499205)

**LOYOLA VÍCTOR M, et.al.**, 2014. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. [en línea], vol. 48. [Consulta: 13 septiembre 2019]. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0583-76932004000100013](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0583-76932004000100013)

**LOZANO JOSÉ**, 2004. Hiperuricemia y gota Clasificación, clínica y tratamiento. [en línea], vol. 23, pp. 15. [Consulta: 20 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13061799>

**MAIUOLO, J., et.al.** 2016. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, vol. 213, pp. 8-14. ISSN 18741754. DOI 10.1016/j.ijcard.2015.08.109

**MALDONADO G, et.al.**, 2017. Reumatología al día: Nuevas perspectivas y alternativas terapéuticas. [en línea], [Consulta: 4 septiembre 2019]. Disponible en: <http://www.serecuador.com.ec/wp-content/uploads/2018/08/revista-ser-13-gota-Nuevas-perspectivas-y-alternativas-terapeuticas.pdf>

**MARTÍNEZ, J.**, 2018. Síntesis, caracterización fisicoquímica, determinaciones biológicas (in vitro) y estudios teóricos de complejos de Cu(II) y VO(IV) con ligandos antioxidantes y/o antimicrobianos [en línea]. S.l.: s.n. Disponible en: [c:/Users/Lenovo/Downloads/CONICET\\_Digital\\_Nro.59629553-d414-4a91-abc0-d4a437299315\\_A \(1\).pdf](c:/Users/Lenovo/Downloads/CONICET_Digital_Nro.59629553-d414-4a91-abc0-d4a437299315_A (1).pdf)

**MARTINS, D. y NUNEZ, C.V.**, 2015. *Secondary metabolites from Rubiaceae species*. 1 julio 2015. S.l.: MDPI AG.

**MAYO CLINIC**, 2019. Gota - Síntomas y causas. [en línea]. [Consulta: 8 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/gout/symptoms-causes/syc-20372897>.

**MONGRAND S., et.al.** 2005. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry*, vol. 66, no. 5, pp. 549-559. ISSN 00319422. DOI 10.1016/j.phytochem.2004.12.021

**MORET, I., et.al.** 2014. Estrés oxidativo en la enfermedad de Crohn. *Gastroenterología y Hepatología*, vol. 37, no. 1, pp. 28-34. ISSN 02105705. DOI 10.1016/j.gastrohep.2013.01.008

**NETO, L., et.al.**, 2015. Campinas, v.17, n.4, supl. III. 2015. *Rev. Bras. Pl. Med*, pp. 1069-1077. DOI 10.1590/1983-084X/14\_161

**PACIOS, E.**, 2017. *Hyperuricemia and gout: The impact of ultrasonography*. 21 julio 2017. S.l.: Ediciones Doyma, S.L

**PEREZ-RUIZ F**, 2012. Febuxostat: nuevo tratamiento para la gota. *Nefrología Suplemento Extraordinario* [en línea], vol. 3, pp. 16-32. [Consulta: 16 noviembre 2019]. DOI 10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2012.Mar.11445. Disponible en: <http://www.revistanefrologia.com/es-publicacion-nefrologia-imprimir-articulo-febuxostat-nuevo-tratamiento-gota-X2013757512000806>

**PÉREZ, A.J.**, 2018. Mapa de *Palicourea amethystina*. [en línea]. [Consulta: 8 noviembre 2019]. Disponible en: [https://bioweb.bio/floraweb/arbolesyasuni/FichaEspecie/Palicourea amethystina](https://bioweb.bio/floraweb/arbolesyasuni/FichaEspecie/Palicourea%20amethystina)

**PHAM-HUY, et.al.** 2008. *Free radicals, antioxidants in disease and health*. junio 2008. S.l.: s.n.

**PIACHAM T.**, et.al.2003. A polymer supported manganese catalyst useful as a superoxide dismutase mimic. *Chemical Communications*, vol. 3, no. 11, pp. 1254-1255. ISSN 1364548X. DOI 10.1039/b301683h

**RAMALLO et al.**, 2005. A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochemical analysis : PCA* [en línea], vol. 17, no. 1, pp. 15-9. [Consulta: 24 septiembre 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16454471>

**RODAS**, 2016. Extracción líquido-líquido. [en línea]. [Consulta: 9 noviembre 2019]. Disponible en:[https://rodas5.us.es/file/23a16560-123f-bec5-ec5b44a3042a281d/2/laboratotio\\_quimica\\_organica\\_SCORM.zip/pagina\\_16.htm](https://rodas5.us.es/file/23a16560-123f-bec5-ec5b44a3042a281d/2/laboratotio_quimica_organica_SCORM.zip/pagina_16.htm)

**ROJAS, et.al.**, 2015. Métodos Analíticos para la Determinación de Metabolitos Secundarios de Plantas. [en línea], Disponible en: [file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/20 metodos analiticos para la determinacion de metabolitos secundarios de plantas.pdf](file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/20%20metodos%20analiticos%20para%20la%20determinacion%20de%20metabolitos%20secundarios%20de%20plantas.pdf)

**ROSSAL, et.al.**, 2003. Radicales libres de oxígeno y su relación con enfermedades específicas del embarazo. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, vol. 46, no. 3, pp. 122-135. ISSN 03045013. DOI 10.1016/s0304-5013(03)75868-3

**ROSSI, R.R.T.**, 2015. *Analisis de drogas crudas*. 2015. S.l.: s.n.

**RUIZ, F.P.**, 2017. GPC para el manejo de la gota guía de práctica clínica para el manejo de la gota. [en línea]. S.l.: [Consulta: 15 febrero 2019]. Disponible en: <https://www.ser.es/wp-content/uploads/2015/09/GPCGota13.pdf>

**SALUD NAVARRA**, 2013. ( Adenuric ® ) en hiperuricemia. [en línea]. S.l.: [Consulta: 16 noviembre 2019]. Disponible en: [https://www.navarra.es/NR/rdonlyres/94DE5E67-AE0B-4BE7-B5CE-0987DCB14121/260479/FET\\_2013\\_4.pdf](https://www.navarra.es/NR/rdonlyres/94DE5E67-AE0B-4BE7-B5CE-0987DCB14121/260479/FET_2013_4.pdf)

**SAN-MIGUEL, A. y MARTIN-GIL, F.J.**, 2009. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, vol. 106, no. 3, pp. 106-113. ISSN 03044858. DOI 10.1016/s0304-4858(09)74661-x

**SANG, M., et.al.** 2017. Modeling and optimizing inhibitory activities of *Nelumbinis folium* extract on xanthine oxidase using response surface methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 139, pp. 37-43. ISSN 1873264X. DOI 10.1016/j.jpba.2017.02.048

**SANTOS CARLOS**, 2013. Principle of DPPH radical scavenging capacity assay. | Download Scientific Diagram. [en línea]. [Consulta: 8 noviembre 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-DPPH-radical-scavenging-capacity-assay\\_fig4\\_255976992](https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-DPPH-radical-scavenging-capacity-assay_fig4_255976992)

**SANTOS DE SOUZA, et.al.**, 2005. Riboflavin: A multifunctional vitamin. *Quimica Nova*, vol. 28, no. 5, pp. 887-891. ISSN 0100-4042. DOI 10.1590/S0100-40422005000500028

**SEFAP, S.E. et.al.**, 2015. Tratamiento de la hiperuricemia: cuándo y con qué. [en línea]. [Consulta: 16 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.sefap.org/2014/07/02/tratamiento-de-la-hiperuricemia-cuando-y-con-que/>

**SINGH, T.P. y SINGH, O.M.**, 2017. Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [en línea], vol. 18, no. 1. [Consulta: 16 noviembre 2019]. ISSN 13895575. DOI 10.2174/1389557517666170807123201. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/154723/article>

**SIVERA, F., ANDRÉS, M. y QUILIS, N.**, 2017. Gout: Diagnosis and treatment. *Medicina Clinica*, vol. 148, no. 6, pp. 271-276. ISSN 15788989. DOI 10.1016/j.medcli.2016.10.019

**SUZUMURA KUNIHARU**, 2014. Superoxide Anion Scavenging Properties of Fluvastatin and Its Metabolites. [en línea], [Consulta: 24 septiembre 2019]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/4438/a81b57fd3ae60f6de412b2ae8fab969f26c6.pdf>

**TRINITY, J.D., BROXTERMAN, R.M. y RICHARDSON, R.S.**, 2016. Regulation of exercise blood flow: Role of free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 98, pp. 90-102. ISSN 18734596. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.017

**UNOCD**, 2012. Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados Manual para el uso de los laboratorios nacionales de análisis de estupefacientes. [en línea]. S.l.: [Consulta: 17 noviembre 2019]. Disponible en: [https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine\\_S.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_S.pdf)

**VALOIS-CUESTA, H., CÓRDOBA-ARIAS, J.A. y RENTERÍA-ARRIAGA, E.**, 2016. Patrones de diversidad de plantas en un gradiente de baja elevación en el Chocó, Colombia, usando especies indicadoras (Rubiaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, vol. 87, no. 4, pp. 1275-1282. ISSN 18703453. DOI 10.1016/j.rmb.2016.10.001

**VÁSQUEZ GIRALDO, et.al.** 2013. Evaluation of antioxidant activity of *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) extracts. *Revista Cubana de Farmacia* [en línea], Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/283518048\\_Evaluation\\_of\\_antioxidant\\_activity\\_of\\_Palicourea\\_guianensis\\_Rubiaceae\\_extracts](https://www.researchgate.net/publication/283518048_Evaluation_of_antioxidant_activity_of_Palicourea_guianensis_Rubiaceae_extracts)



**VERDCOURT, B.**, 1958. Remarks on the Classification of the Rubiaceae. *Bulletin du Jardin botanique de l'État a Bruxelles*, vol. 28, no. 3, pp. 209. ISSN 03746313. DOI 10.2307/3667090

**WHO**, 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. [en línea], [Consulta: 15 octubre 2019]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>

## ANEXOS

### ANEXO A: Control de calidad de *Palicourea amethystina*



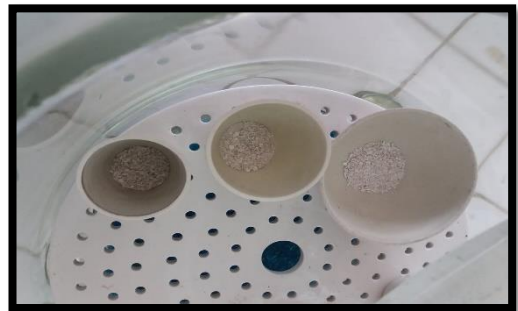
Hojas de *Palicourea amethystina*  
secadas y molidas.



Contenido de humedad



Incineración de las hojas de  
*Palicourea amethystina*



Cenizas totales



Cenizas solubles en agua

## ANEXO B: Tamizaje fitoquímico



Ensayos del extracto etéreo



Ensayos del extracto alcohólico

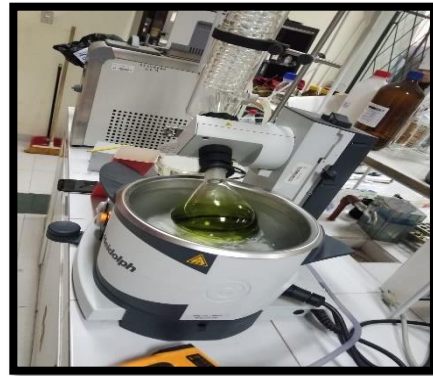


Ensayos del extracto acuoso

**ANEXO C: Extracción de alcaloides**



Control de pH del extracto bruto líquido



Concentración del extracto bruto de alcaloides; Rotavapor

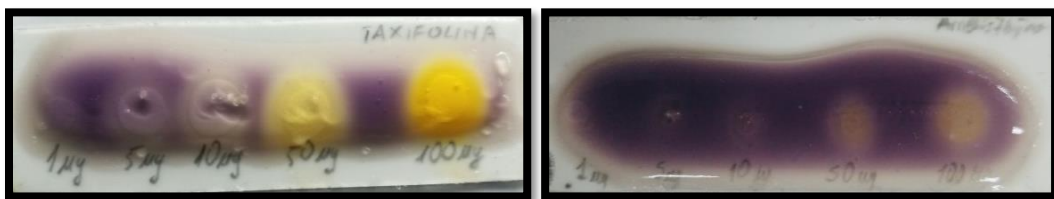


Extracto alcaloideo de *Palicourea amethystina*

**ANEXO D: Ensayos autográficos**



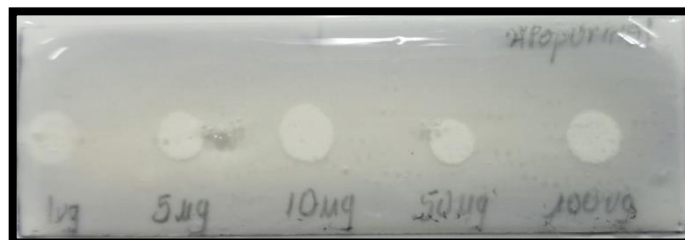
Ensayo de DPPH; Ácido ascórbico (Izq.) y P. amethystina (Dcha.)



Sistema NADH/PMS/NBT; Taxifolina (Izq.) y P. amethystina (Dcha.)

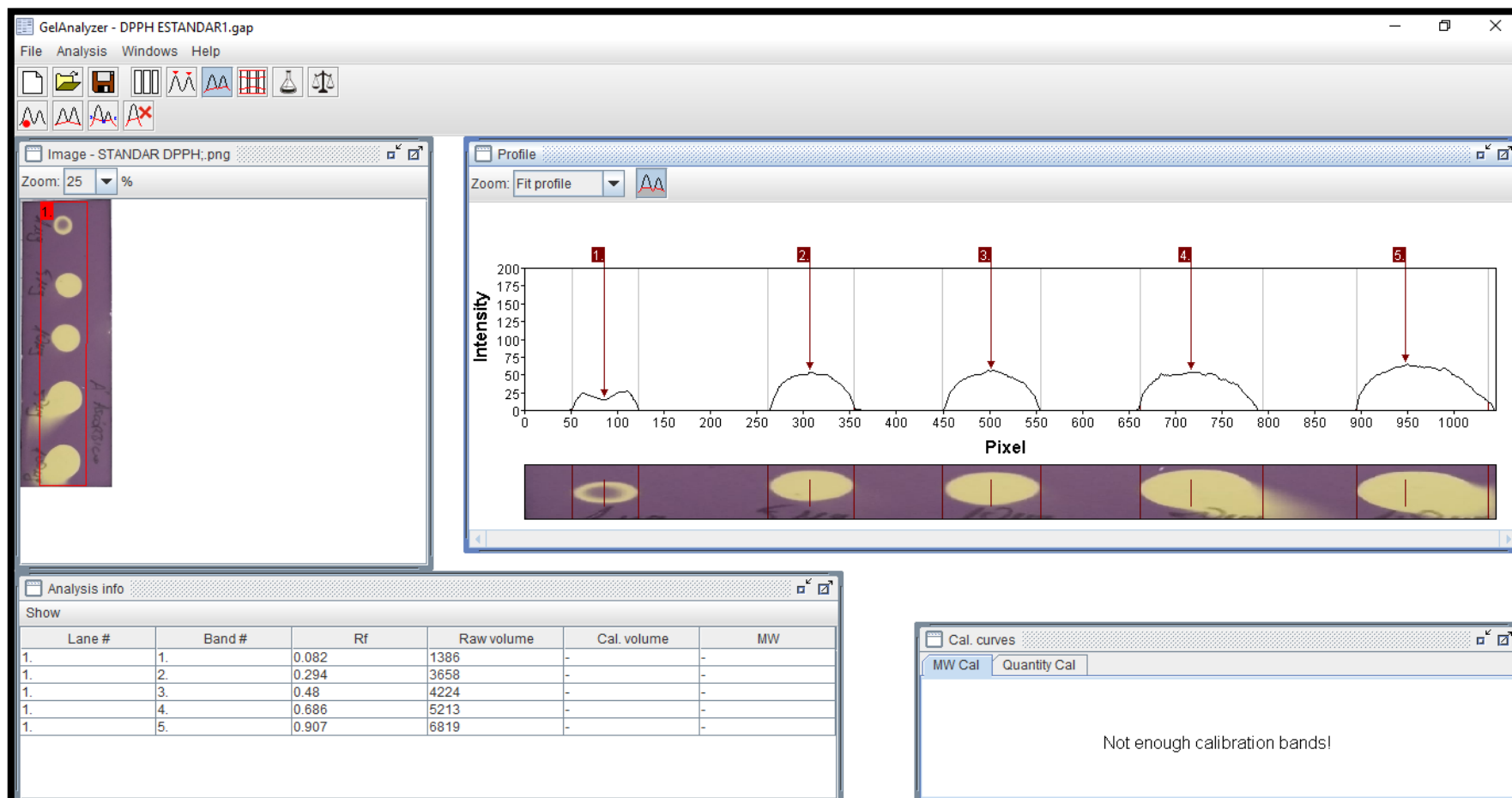


Sistema B2/luz/NBT; Taxifolina (Izq.) y P. amethystina (Dcha.)

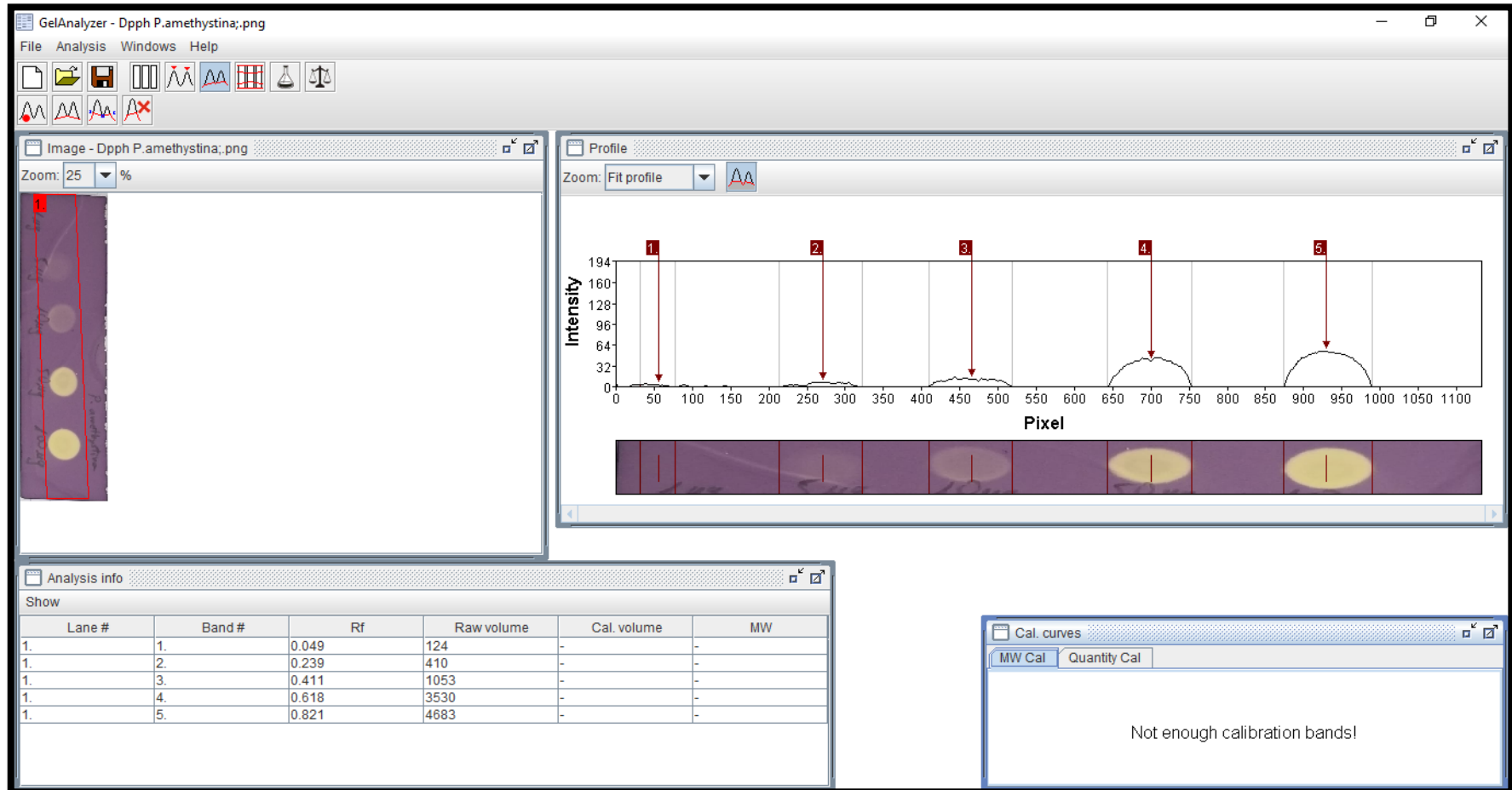


Control positivo para inhibición de XO

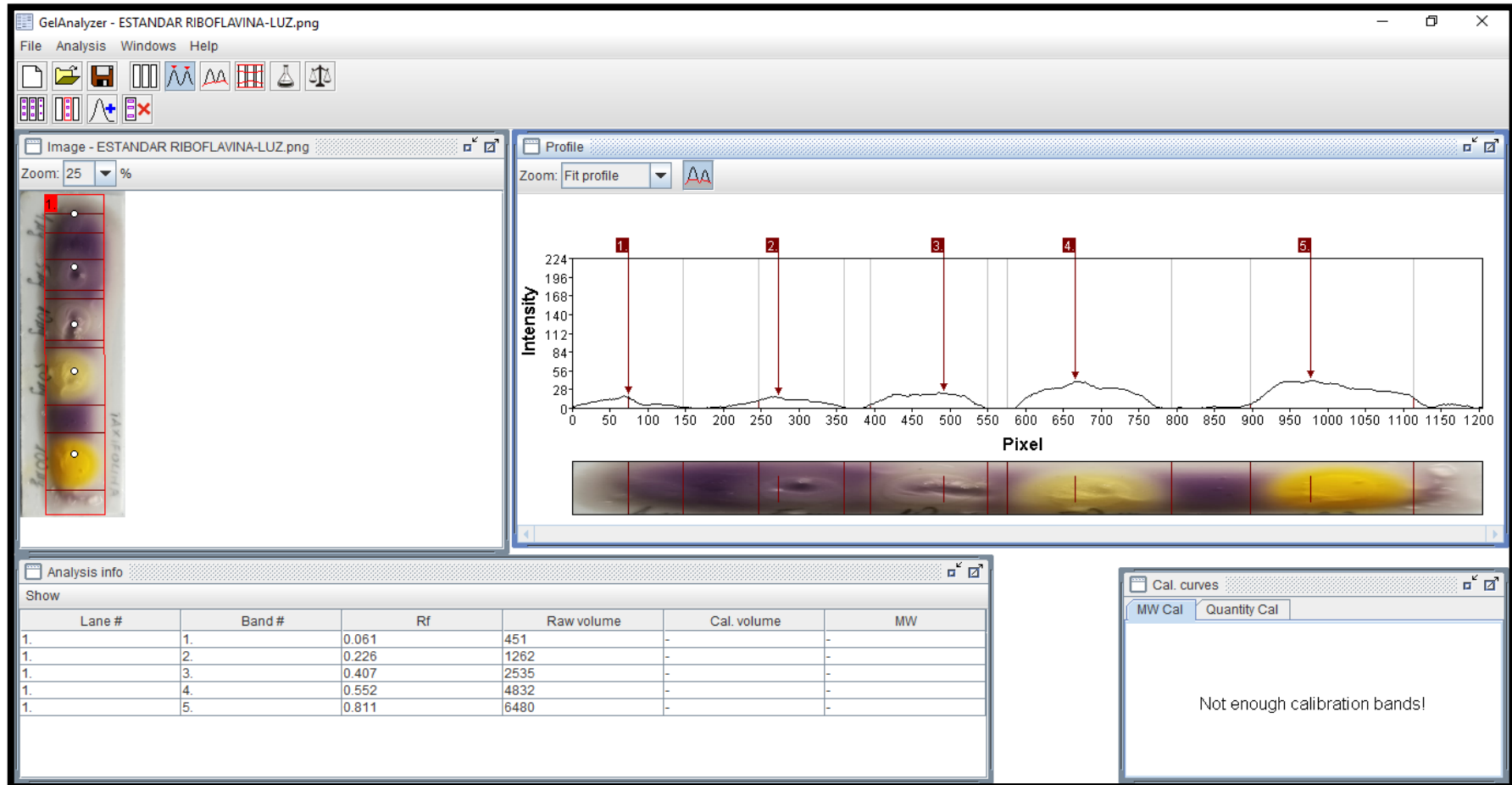
**ANEXO E: Áreas del estándar (AA), método DPPH. (GelAnalyzer).**



ANEXO F: Áreas del EAPA, método DPPH. (GelAnalyzer).



ANEXO G: Áreas del estándar (Taxifolina), método Riboflavina/LUZ/NBT. (GelAnalyzer).





ANEXO H: Áreas del EAPA, método Riboflavina/LUZ/NBT. (GelAnalyzer).

The screenshot displays the GelAnalyzer software interface. The main window shows a gel image with a red box highlighting a lane. The 'Profile' window shows a plot of Intensity versus Pixel, with five peaks labeled 1 through 5. The 'Analysis info' window shows a table of analysis data. The 'Cal. curves' window shows a message: 'Not enough calibration bands!'.

**Image - Riboflavina-luz P.amethystina.png**  
Zoom: 25 %

**Profile**  
Zoom: Fit profile

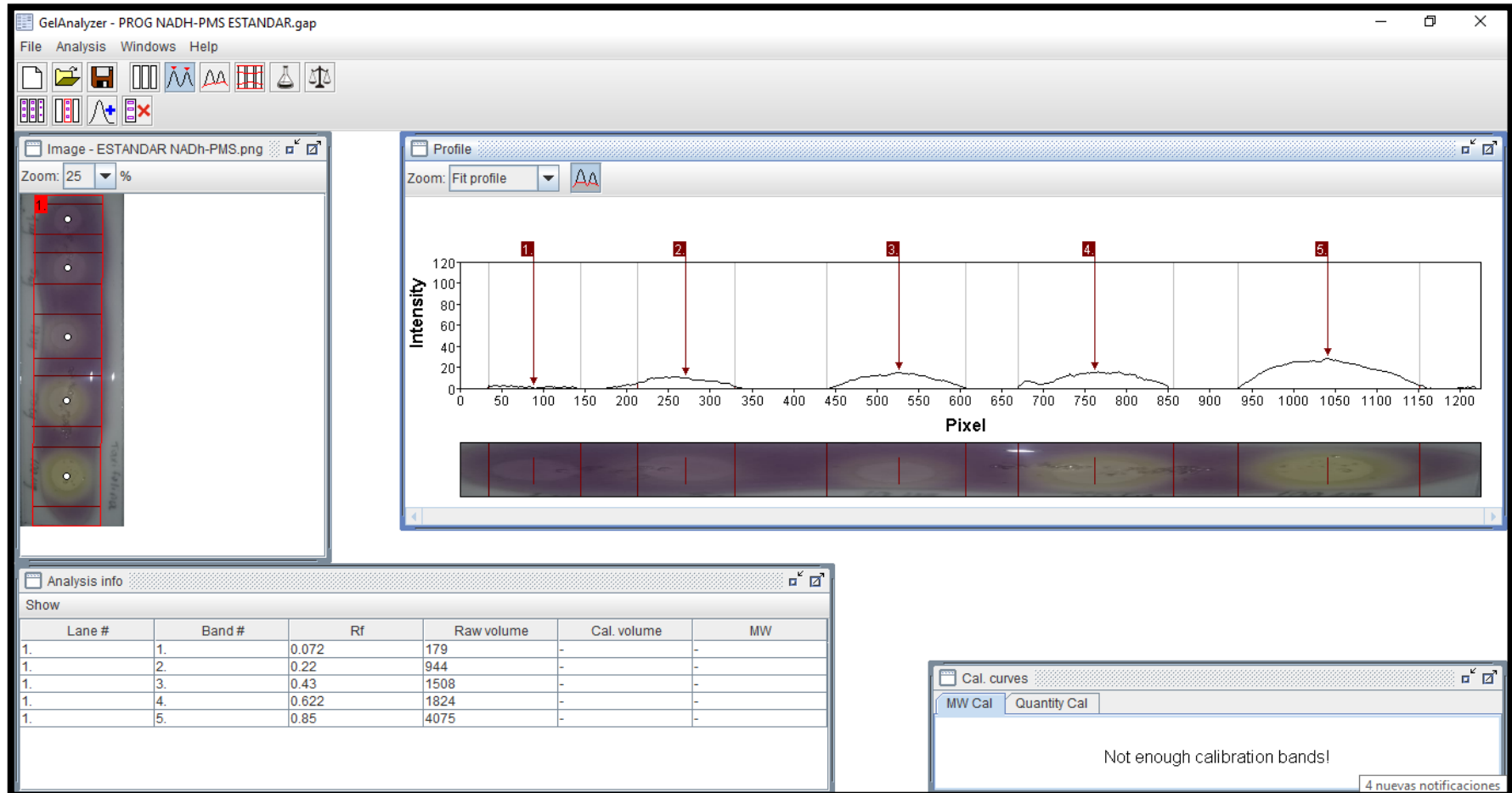
**Analysis info**

Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
1.	1.	0.043	153	-	-
1.	2.	0.259	500	-	-
1.	3.	0.405	593	-	-
1.	4.	0.632	1942	-	-
1.	5.	0.846	1756	-	-

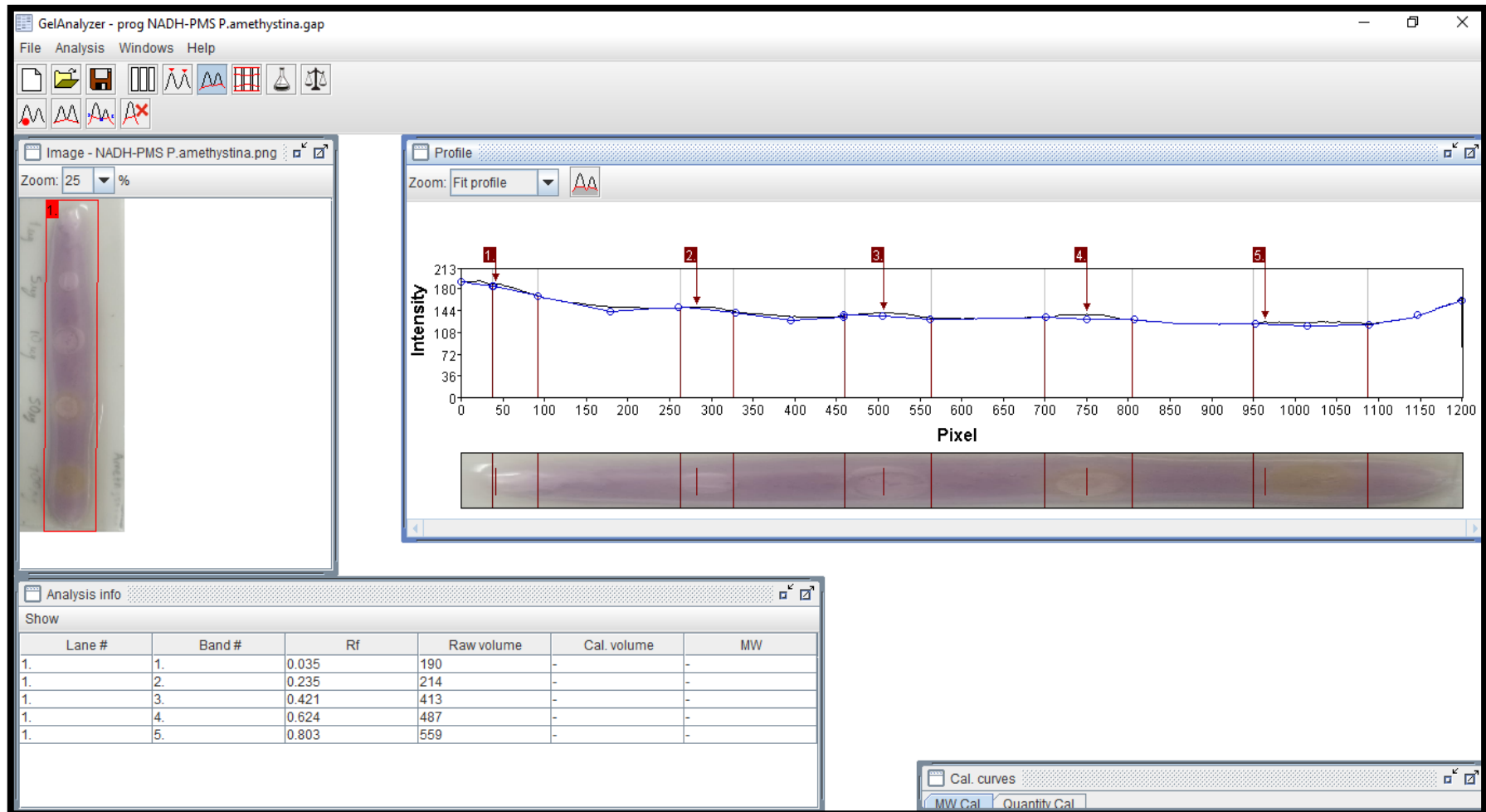
**Cal. curves**  
MW Cal | Quantity Cal

Not enough calibration bands!

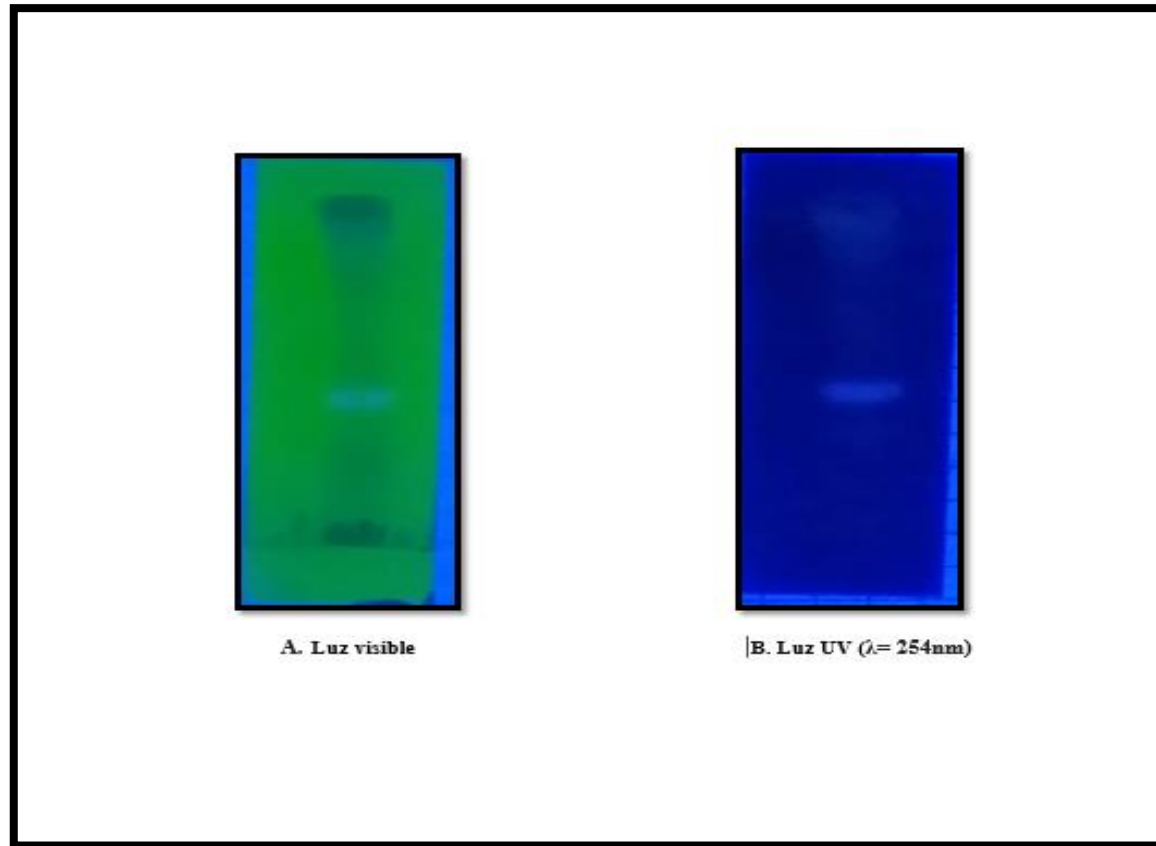
ANEXO I: Áreas del estándar (Tx), método NADH/PMS/NBT. (GelAnalyzer).



ANEXO J: Áreas del EAPA, método NADH/PMS/NBT. (GelAnalyzer).



**ANEXO K:** Cromatografía del extracto alcaloideo de *P. amethystina*.




**ANEXO L:** Desarrollo de la parte práctica del trabajo de titulación.



**ANEXO M:** Permiso de movilización de la especie vegetal *Palicourea amethystina*.

MINISTERIO DEL AMBIENTE



**Oficio Nro. MAE-DPAB-2019-0968-O**  
**Guaranda, 24 de septiembre de 2019**

**Asunto:** Autorización para realizar la movilización de flora silvestre en referencia al proyecto de investigación "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" referente a la autorización No. MAE-DNB-CM-2018-0086

Señor  
Diego Renato Vinueza Tapia  
En su Despacho

De mi consideración:


Mediante oficio s/n del 19 de septiembre de 2019 ingresado mediante registro MAE-DPAB-2019-0649-E, el Msc. Diego Vinueza con cedula de identidad No. 0603187154, solicita la autorización para realizar la movilización de muestras (colecta) de flora silvestre, referente al permiso de investigación científica del proyecto "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" correspondiente a la autorización No. MAE-DNB-CM-2018-0086. Ante lo cual debo manifestar que esta Cartera de Estado emite la *autorización de movilización No. 004-UPN-DPAB-MAE-2019* al Investigador, Msc. Diego Vinueza como responsable de la movilización de las muestras de flora, desde el cantón Guaranda provincia Bolívar hasta el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicado en el cantón Robamba, provincia Chimborazo para su investigación correspondiente.

Se responsabiliza al investigad. Msc. Diego Vinueza como titular de la investigación sobre el cumplimiento de las disposiciones y compromisos adquiridos en los mencionados documentos.

**Nota:** Se adjunta guía de circulación con el detalle de las muestras que serán transportadas.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

  
Ministerio  
del Ambiente  
**DIRECCION**  
Arq. Vicente Mauricio López Verdugo  
**DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE BOLIVAR**

Referencias:  
- MAE-DPAB-2019-0649-E

Anexos:  
- scanned-image-810361454001568989390.pdf  
- guía\_de\_movilización\_no\_004-2019-mov-flor-dpab-mae\_diego\_vinueza-esPOCH.pdf

Copia:  
Señorita Licenciada  
Elsa del Rocío Aguiar Lombeida  
Secretaria - Dirección Provincial del Ambiente de Bolívar

Dirección Provincial de Bolívar • Código Postal: 020102 / Guaranda - Ecuador • Teléfono: (593 3) 2981874 / 2985165  
Dirección: Jhonson City s/n entre Sucre y Convención de 1884

Documento generado por Quijus

1/2

MINISTERIO DEL AMBIENTE



Oficio Nro. MAE-DPAB-2019-0968-O

Guaranda, 24 de septiembre de 2019

aj





DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE BOLÍVAR  
 GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE FLORA SILVESTRE  
 No. 004-2019-MOV-FLO-DPAB-MAE

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Ley en aplicación al Código Orgánico Ambiental (COA), **autoriza** la movilización de muestras (colecta) de flora silvestre en referencia al Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del proyecto de investigación "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE", referente a la autorización No. MAE-DNB-CM-2018-0086.

**Fecha de emisión:** 24-09-2019

**Fecha de movilización:** 24/09/2019 a las 06:00 AM **Válido hasta:** 24/09/2019 a las 20:00 PM

La Dirección Provincial del Ambiente Bolívar, **autoriza** al Msc. Diego Vinueza con cedula de identidad No. 0603187154 la movilización de: Fauna silvestre **Desde:** el cantón Guaranda pertenecientes a la provincia Bolívar **Hacia:** el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicado en el cantón Riobamba, provincia Chimborazo, para su investigación correspondiente.

Los especímenes se movilizaran via:

TERRESTRE (Transporte particular)  
 Marca del vehículo: MITSUBISHI  
 Placas: PYM-0745  
 Fecha de salida: 24-09-2019  
 Hora: 06:00 AM

Los especímenes serán movilizados bajo el siguiente detalle:

Familia	Genero	Nombre Común	Nativa/ endémica/ introducida	Apéndice CITES	Lista roja UICN	Lista roja en Ecuador	Elementos constitutivos	No	Estado	Observaciones/ procedencia
Rubiaceae	Palicourea	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1	n/e	Preservado en periódico y funda de vivero

**Los especímenes van en calidad de:** INVESTIGACIÓN

**Nombre del Proyecto:** "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE"

Autorización (Guía de circulación) **No. 004-2019-MOV-FLO-DPAB-MAE**



MINISTERIO DEL AMBIENTE



Ministerio  
del Ambiente

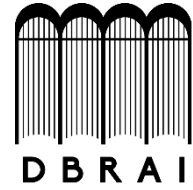
~~DIRECCION~~  
Arq. Mauricio López Verdezoto  
DIRECTOR PROVINCIAL DE BOLÍVAR



Scanned with  
CamScanner



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE  
CHIMBORAZO**



**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS  
PARA EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS  
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

**Fecha de entrega:** 4 / 12 / 2019

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Adriana Paulina Carrillo Yáñez
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias
<b>Carrera:</b> Bioquímica y Farmacia
<b>Título a optar:</b> Bioquímica Farmacéutica
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b>