



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS
EXTRACTOS CLOROFÓRMICO, ETANÓLICO Y ACUOSO DEL ARRAYÁN,
CALAGUALA, CANAYUYO, Y TIPO”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

MANUEL GUILLERMO TORRES CUBIÑA

RIOBAMBA – ECUADOR

2012

DEDICATORIA

A Dios, a mis Padres y en especial a mi Mamalita, que con sus bendiciones, su infinita paciencia, su apoyo incondicional y su amor eterno, cuando estuvieron de paso por este mundo, a quienes debo mi paso fugaz por la tierra y todo lo que alcance en esta vida.

A Adrián y a esa persona especial que me supo ayudar y guiar.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida, salud, fuerzas para continuar y sus bendiciones durante el camino recorrido.

A mis Padres y en especial a mi Mamalita por su sempiterno amor y apoyo incondicional.

Mi agradecimiento formal a mi Alma Mater porque en su seno me formé.

A mi gran amigo Diego por su perseverancia y empuje.

A los distinguidos miembros del Tribunal de Tesis por su colaboración y paciencia.

A todos quienes han sido un contrafuerte verdadero, mi familia y mis amigos, a ellos mi vehemente gratitud puesto que debido a sus propuestas se enriqueció este trabajo que sin ser impetuoso refleja el amor que siento hacia mi atesorada profesión.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICO, ETANÓLICO Y ACUOSO DEL ARRAYÁN, CALAGUALA, CANAYUYO, Y TIPO**”, de responsabilidad del señor egresado Manuel Guillermo Torres Cubiña, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

| | FIRMA | FECHA |
|--|--------------|--------------|
| Dra. Yolanda Díaz H. DECANA FACULTAD DE CIENCIAS | _____ | _____ |
| Dr. Luis Guevara I. DIRECTOR DE ESCUELA | _____ | _____ |
| BQF. Diego R. Vinueza T. DIRECTOR DE TESIS | _____ | _____ |
| BQF. Fausto F. Contero B. MIEMBRO DEL TRIBUNAL | _____ | _____ |
| Lcdo. Carlos Rodríguez. DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN | _____ | _____ |
| NOTA DE TESIS ESCRITA | _____ | |

Yo, **Manuel Guillermo Torres Cubiña**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de grado pertenecen a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

MANUEL GUILLERMO TORRES CUBIÑA

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|----|
| | INTRODUCCIÓN..... | 17 |
| | CAPÍTULO I..... | 21 |
| 1. | PARTE TEÓRICA..... | 21 |
| 1.1. | LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS PLANTA..... | 21 |
| 1.1.1. | ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS..... | 21 |
| 1.1.2 | ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS..... | 23 |
| 1.1.3. | ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FENOLES DE LOS ALIMENTOS..... | 25 |
| 1.2. | ESPECIES VEGETALES..... | 34 |
| 1.2.1. | ARRAYÁN..... | 34 |
| 1.2.1.1. | NOMBRE CIENTÍFICO | 34 |
| 1.2.1.2. | NOMBRES POPULARES..... | 34 |
| 1.2.1.3. | DESCRIPCIÓN BOTÁNICA..... | 34 |
| 1.2.1.4. | HÁBITAT..... | 35 |
| 1.2.1.5. | PARTE UTILIZADA..... | 35 |
| 1.2.1.6. | HISTORIA..... | 35 |
| 1.2.1.7. | COMPOSICIÓN QUÍMICA..... | 35 |
| 1.2.1.8. | ACCIONES FARMACOLÓGICAS..... | 36 |
| | Actividad Diurética-Antihipertensiva..... | 36 |
| | Actividad Antimicrobiana..... | 37 |
| | Actividad Antioxidante..... | 37 |
| | Oncología Experimental..... | 38 |
| | Otros..... | 38 |
| 1.2.1.9. | EFFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS..... | 39 |

| | | |
|-----------|---------------------------------------|----|
| 1.2.1.10. | CONTRAINDICACIONES..... | 39 |
| 1.2.1.11. | STATUS LEGAL..... | 39 |
| 1.4.3.2. | USOS ETNOMEDICINALES..... | 39 |
| 1.2.1.13. | FORMAS GALÉNICAS..... | 39 |
| 1.2.1.14. | OTROS USOS..... | 40 |
| 1.2.2. | CALAGUALA..... | 40 |
| 1.2.2.1. | NOMBRE CIENTÍFICO..... | 40 |
| 1.2.2.2. | NOMBRE POPULAR..... | 40 |
| 1.2.2.3. | DESCRIPCIÓN BOTÁNICA..... | 41 |
| 1.2.2.4. | HÁBITAT..... | 41 |
| 1.2.2.5. | HISTORIA..... | 41 |
| 1.2.2.6. | PARTE UTILIZADA..... | 42 |
| 1.2.2.7. | COMPOSICIÓN QUÍMICA (Del rizoma)..... | 42 |
| 1.2.2.8. | ACCIONES FARMACOLÓGICAS..... | 42 |
| | Actividad Inmunológica..... | 42 |
| | Actividad Antitumoral..... | 43 |
| | Área Dermatológica..... | 44 |
| | Otros..... | 45 |
| 1.2.2.9. | EFFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS..... | 47 |
| 1.2.2.10. | CONTRAINDICACIONES..... | 47 |
| 1.2.2.11. | INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS..... | 47 |
| 1.2.2.12. | USOS ETNOMEDICINALES..... | 47 |
| 1.2.2.13. | FORMAS GALÉNICAS..... | 48 |
| 1.2.2.14. | OTROS USOS..... | 48 |
| 1.2.3. | CANAYUYO..... | 48 |
| 1.2.3.1. | NOMBRE CIENTÍFICO..... | 49 |
| 1.2.3.2. | NOMBRES POPULARES..... | 49 |
| 1.2.3.3. | DESCRIPCIÓN BOTÁNICA..... | 49 |
| 1.2.3.4. | HÁBITAT..... | 49 |
| 1.2.3.5. | HISTORIA..... | 50 |
| 1.2.3.6. | PARTE UTILIZADA..... | 50 |
| 1.2.3.7. | COMPOSICIÓN QUÍMICA..... | 50 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 1.2.3.8. | ACCIONES FARMACOLÓGICAS..... | 50 |
| | Actividad Antimicrobiana..... | 51 |
| | Otros..... | 51 |
| 1.2.3.9. | EFFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS..... | 52 |
| 1.2.3.10. | CONTRAINDICACIONES..... | 52 |
| 1.2.3.11. | STATUS LEGAL..... | 52 |
| 1.2.3.12. | USOS ETNOMEDICINALES..... | 52 |
| 1.2.3.13. | FORMAS GALÉNICAS..... | 53 |
| 1.2.3.14. | USOS CULINARIOS..... | 53 |
| 1.2.4. | TIPO..... | 53 |
| 1.2.4.1. | NOMBRE CIENTÍFICO..... | 54 |
| 1.2.4.2. | NOMBRES POPULARES..... | 54 |
| 1.2.4.3. | DESCRIPCIÓN BOTÁNICA..... | 54 |
| 1.2.4.4. | HÁBITAT..... | 54 |
| 1.2.4.5. | PARTE UTILIZADA..... | 55 |
| 1.2.4.6. | HISTORIA..... | 55 |
| 1.2.4.7. | COMPOSICIÓN QUÍMICA..... | 55 |
| 1.2.4.8. | ACCIONES FARMACOLÓGICAS..... | 55 |
| | Actividad Antimicrobiana..... | 56 |
| | Actividad Digestiva..... | 56 |
| 1.2.4.9. | EFFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS..... | 57 |
| 1.2.4.10. | CONTRAINDICACIONES..... | 57 |
| 1.2.4.11. | STATUS LEGAL..... | 57 |
| 1.2.4.12. | ADULTERACIONES..... | 57 |
| 1.2.4.13. | USOS ETNOMEDICINALES..... | 58 |
| 1.2.4.14. | FORMAS GALÉNICAS..... | 58 |
| 1.2.4.15. | OTROS USOS..... | 58 |
| 1.3 | RADICALES LIBRES DE OXÍGENO, SUPERÓXIDO, PERÓXIDO E HIDROXILO..... | 58 |
| 1.3.1. | PROPIEDADES QUÍMICAS DEL OXÍGENO..... | 58 |
| 1.3.2. | INTERMEDIARIOS REACTIVOS DEL OXÍGENO..... | 59 |
| | CAPÍTULO II..... | 66 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2. | PARTE EXPERIMENTAL..... | 66 |
| 2.1. | LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN..... | 66 |
| 2.2. | MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS..... | 66 |
| 2.2.1. | MATERIAL VEGETAL..... | 66 |
| 2.2.2. | EQUIPOS..... | 67 |
| 2.2.3. | MATERIALES DE LABORATORIO Y OTROS..... | 67 |
| 2.2.4. | REACTIVOS..... | 68 |
| 2.3. | METODOLOGÍA..... | 68 |
| 2.3.1. | FASE DE LABORATORIO..... | 69 |
| 2.3.1.1. | Diseño Experimental..... | 69 |
| | FACTOR EN ESTUDIO..... | 69 |
| | TRATAMIENTOS..... | 69 |
| | UNIDAD EXPERIMENTAL..... | 71 |
| 2.3.1.2. | PROTOCOLO EXPERIMENTAL..... | 71 |
| | PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS..... | 71 |
| | EXTRACTO EN ETANOL..... | 71 |
| | FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS..... | 71 |
| | ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE..... | 72 |
| | ENSAYO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE SEGÚN EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA..... | 72 |
| | MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE DROGAS CRUDAS. PARÁMETROS DE CONTROL DE LA CALIDAD..... | 74 |
| | DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN ÁCIDO..... | 75 |
| | DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES..... | 75 |
| | DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA..... | 76 |
| | DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO..... | 77 |
| | DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD..... | 78 |

| | | |
|------|---|-----|
| | PÉRDIDAS POR DESECACIÓN. MÉTODO GRAVIMÉTRICO..... | 78 |
| | DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES..... | 79 |
| | ESTUDIO QUÍMICO CUALITATIVO..... | 80 |
| | TAMIZAJE FITOQUÍMICO..... | 81 |
| | CAPÍTULO III..... | 91 |
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 91 |
| 3.1. | CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA..... | 91 |
| 3.2. | TAMIZAJE FITOQUÍMICO..... | 94 |
| 3.3. | CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES..... | 96 |
| 3.4. | PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PFO (ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE).... | 97 |
| 3.5. | ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS ESTADÍSTICOS POR ESPECIE VEGETAL EN FUNCIÓN DE LA FRACCIÓN EXTRACTIVA..... | 105 |
| | CAPÍTULO IV..... | 118 |
| 4. | CONCLUSIONES..... | 118 |
| | CAPÍTULO V..... | 121 |
| 5. | RECOMENDACIONES..... | 121 |
| | CAPÍTULO VI..... | 122 |
| 6. | RESUMEN..... | 122 |
| | CAPÍTULO VII..... | 123 |
| 7. | SUMARY..... | 123 |
| | CAPITULO VIII..... | 124 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA..... | 124 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| % | Porcentaje |
| < | Menor |
| > | Mayor |
| ≤ | Menor o igual |
| °C | Grado Celsius |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| CM | Cuadrado medio |
| CYTED | Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo |
| Da | Dalton |
| <i>et. al</i> | Colaboradores |
| F | Coefficiente estadístico del ANOVA |
| g | Gramo |
| g/L | Gramo por litro |
| h. | Hora |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| k | Tratamientos |
| Kg | Kilogramo |
| mL | Mililitro |
| n | Muestra |
| nm | Nanómetro |
| p | Probabilidad de ocurrencia |
| P | Patrón |
| P/V | Relación de peso con respecto a volumen |
| pH | Potencial Hidrógeno |
| ppm | Partes por millón |
| Q | Amplitud normal estudentizada |
| trolox/g | Equivalente trolox de capacidad absorbente de radicales libres de oxígeno |
| X | Media |
| α | Nivel de significancia |
| μg/mL | Microgramo por mililitro |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|---------------|---|-----|
| CUADRO No. 1 | TRATAMIENTOS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES..... | 69 |
| CUADRO No. 2 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LA DROGA CRUDA. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012..... | 91 |
| CUADRO No. 3 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CENIZAS TOTALES DE LA DROGA CRUDA. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012..... | 92 |
| CUADRO No. 4 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA DE LA DROGA CRUDA. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012..... | 92 |
| CUADRO No. 5 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO DE LA DROGA CRUDA. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012..... | 93 |
| CUADRO No. 6 | RESULTADOS DE SUSTANCIAS SOLUBLES DEL EXTRACTO ETANÓLICO. REALIZADO EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012..... | 93 |
| CUADRO No. 7 | RESULTADOS DE LOS GRUPOS FITOQUÍMICOS ENCONTRADOS EN LOS EXTRACTOS FRACCIONADOS SEGÚN LA TÉCNICA PARA TAMIZAJE FITOQUÍMICO. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. RIOBAMBA FEBRERO DE 2012..... | 94 |
| CUADRO No. 8 | DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE FLAVONOIDES (EXPRESADOS COMO PORCENTAJE DE QUERCETINA) EN LOS EXTRACTOS TESTADOS A 258 nm. REALIZADO EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. RIOBAMBA MARZO DE 2012..... | 96 |
| CUADRO No. 9 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE PROMEDIO DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE <i>Eugenia halli</i> , Arrayán..... | 99 |
| CUADRO No. 10 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE <i>Polypodium calaguala</i> , Calaguala..... | 101 |
| CUADRO No. 11 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN | |

| | | |
|---------------|--|-----|
| | ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE <i>Sonchus oleraceus</i> , Canayuyo..... | 103 |
| CUADRO No. 12 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE <i>Mynthostachis mollis</i> , Tipo..... | 104 |
| CUADRO No. 13 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>Eugenia halli</i> , Arrayán.... | 105 |
| CUADRO No. 14 | ANÁLISIS DE VARIANIZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>Eugenia halli</i> , Arrayán..... | 105 |
| CUADRO No. 15 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE <i>Eugenia halli</i> , Arrayán..... | 106 |
| CUADRO No. 16 | ANÁLISIS DE VARIANIZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE <i>Eugenia halli</i> , Arrayán..... | 106 |
| CUADRO No. 17 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE <i>Eugenia halli</i> , Arrayán..... | 107 |
| CUADRO No. 18 | ANÁLISIS DE VARIANIZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE <i>Eugenia halli</i> , Arrayán..... | 107 |
| CUADRO No. 19 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>Polypodium calaguala</i> , <i>Calaguala</i> | 108 |
| CUADRO No. 20 | ANÁLISIS DE VARIANIZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>Polypodium calaguala</i> , <i>Calaguala</i> | 108 |
| CUADRO No. 21 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE <i>Polypodium calaguala</i> , <i>Calaguala</i> | 109 |
| CUADRO No. 22 | ANÁLISIS DE VARIANIZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE <i>Polypodium calaguala</i> , <i>Calaguala</i> | 109 |
| CUADRO No. 23 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE <i>Polypodium calaguala</i> , <i>Calaguala</i> | 110 |
| CUADRO No. 24 | ANÁLISIS DE VARIANIZA DE LOS RESULTADOS DEL | |

| | | |
|----------------|---|-----|
| | PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE <i>Polypodium calaguala</i> , <i>Calaguala</i> | 110 |
| CUADRO No. 25 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>Sonchus oleraceus</i> , <i>Canayuyo</i> | 111 |
| CUADRO No. 26 | ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>Sonchus oleraceus</i> , <i>Canayuyo</i> | 111 |
| CUADRO No. 27 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE <i>Sonchus oleraceus</i> , <i>Canayuyo</i> | 112 |
| CUADRO No. 28 | ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE <i>Sonchus oleraceus</i> , <i>Canayuyo</i> | 112 |
| CUADRO No. 29 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE <i>Sonchus oleraceus</i> , <i>Canayuyo</i> | 113 |
| CUADRO No. 30 | ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE <i>Sonchus oleraceus</i> , <i>Canayuyo</i> | 113 |
| CUADRO No. 31 | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>Mynthostachis mollis</i> , <i>Tipo</i> ... | 114 |
| CUADRO No. 32. | ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>Mynthostachis mollis</i> , <i>Tipo</i> | 114 |
| CUADRO No. 33. | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE <i>Mynthostachis mollis</i> , <i>Tipo</i> | 115 |
| CUADRO No. 34. | ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE <i>Mynthostachis mollis</i> , <i>Tipo</i> | 115 |
| CUADRO No. 35. | RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE <i>Mynthostachis mollis</i> , <i>Tipo</i> | 116 |
| CUADRO No. 36. | ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE <i>Mynthostachis mollis</i> , <i>Tipo</i> | 116 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|---------------|--|-----|
| GRÁFICO No. 1 | PORCENTAJE PROMEDIO DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE <i>Eugenia halli</i> , Arrayán. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012..... | 99 |
| GRÁFICO No. 2 | PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE <i>Polypodium calaguala</i> , Calaguala. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012..... | 101 |
| GRÁFICO No. 3 | PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE <i>Sonchus oleraceus</i> , Canayuyo. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012..... | 102 |
| GRÁFICO No. 4 | PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE <i>Mynthostachis mollis</i> , Tipo. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012..... | 104 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|--------------|--|----|
| FIGURA No. 1 | Fenol..... | 21 |
| FIGURA No. 2 | Estructura básica de los flavonoides..... | 22 |
| FIGURA No. 3 | Taninos (Polímeros de catequina)..... | 23 |
| FIGURA No. 4 | Esquema del fraccionamiento de extractos..... | 71 |
| FIGURA No. 5 | Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico. | 82 |
| FIGURA No. 6 | Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico..... | 82 |
| FIGURA No. 7 | Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso..... | 83 |

INTRODUCCIÓN

Las consecuencias del estrés oxidativo a nivel general en la población han tenido un notable incremento en los últimos años. El establecimiento de alternativas para disminuir en medida significativa los efectos nocivos de esta condición, se traducen en procesos de carácter esencial y más aún al tratarse del rescate y revalorización de especies vegetales nativas de uso ancestral por parte de las etnias de la serranía ecuatoriana portadoras de características únicas, que se han encontrado segregadas; a punto de ser conducidas a la extinción, privándonos de sus efectos benéficos para la salud. (26, 48, 50)

Desde la década de los años sesenta, se ha producido una explosión en las áreas de investigación relativas a los radicales libres y antioxidantes. (44)

Muchos esfuerzos han sido encaminados en la búsqueda de potentes antioxidantes naturales. Así, las hierbas, las especias e infusiones de té son los principales grupos en los que se centra la investigación de los antioxidantes naturales y que el hombre los ha usado desde la antigüedad no sólo para aromatizar los alimentos, sino como antisépticos y por sus propiedades medicinales. (5, 14, 27)

Un antioxidante se define como toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), inhibe, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. (47)

Un radical libre es una molécula altamente reactiva, que en su estructura atómica presenta un electrón no apareado. Bioquímicamente los radicales libres podrían ser responsables de alteraciones a nivel de ácidos nucleicos, así como de mutaciones, del inicio y desarrollo de procesos cancerígenos y degradaciones celulares. (44)

La importancia de los antioxidantes radica en las propiedades benéficas que poseen en diferentes campos. En la ciencia de alimentos juegan un rol preventivo en procesos de oxidación lipídica (rancidez).

En medicina ejercen un efecto preventivo y protector frente a los compuestos reactivos que causan enfermedades degenerativas. (44, 47)

El problema de la oxidación es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. (37, 39, 43)

En el ser humano, el estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades, como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, encefalopatía miálgica, sensibilidad química múltiple, y la enfermedad de Alzheimer y también puede ser importante en el envejecimiento. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar y matar a los patógenos. Las especies reactivas del oxígeno son también utilizadas en la señalización celular. Esta es denominada señalización redox. (1, 2, 23)

Las recomendaciones de antioxidantes para evitar el estrés oxidativo son enfocadas en especial para la población adulta mayor, la cual por lo general se limita a una dieta monótona con poca cantidad de frutas y verduras. Se trata de una población que necesita combatir el estrés oxidativo e impedir un mayor deterioro de su salud y a su vez poder mantener una buena capacidad energética (22).

También se encuentran dentro de la población con más necesidad de antioxidantes para evitar el estrés oxidativo, los trabajadores rurales ya que se encuentran la mayor cantidad de su tiempo al aire libre expuestos a la contaminación ambiental y los deportistas porque el ejercicio físico intenso se asocia con un mayor consumo de oxígeno, el cual es utilizado por las células a fin de obtener substratos metabólicos y producción de ATP.

A las personas que padecen de diabetes del tipo 1 o diabetes 2 también se les recomienda la ingesta apropiada de alimentos antioxidantes porque al presentar descompensación metabólica se producirá una mayor producción de radicales libres generando a su vez un mayor estrés oxidativo con posibilidad de mayores complicaciones de la enfermedad de base, al estar expuestos a la contaminación del tabaco.

Una ingesta adecuada de legumbres, frutas, café, hierbas medicinales y verduras aseguraría los requerimientos necesarios para evitar el estrés oxidativo. Una dieta acorde a los requerimientos diarios debería determinarse de forma individual según las necesidades propias de cada individuo (37).

Gran parte de las plantas medicinales cultivadas por los pueblos andinos en tiempos remotos, son poco conocidas inclusive en los mismos países andinos. El denominador común para estas plantas es que no se encuentran estudiadas a profundidad y peor aún validadas sus actividades. Todas ellas son importantes en la salud y cultura del poblador andino rural, pero su aprovechamiento muchas veces se restringe a un grupo étnico cerrado, implicando una seria falta de explotación y divulgación de las propiedades de estas especies vegetales, como también la pérdida del conocimiento etnobotánico con cada día que transcurre (47).

El escojamiento de las especies vegetales fue motivado por el uso medicinal que las personas nativas del sector de Chañag dan a estas plantas, esta comunidad está ubicada al noreste del cantón Riobamba perteneciente a la provincia de Chimborazo, su abundante flora natural y la producción profusa que existe; así como el cultivo nativo de la zona, hicieron que tome como referencia de investigación para desarrollar este proyecto científico.

Ecuador ha dado origen a uno de los medicamentos más importantes para la humanidad, a través de la Cinchona, el compuesto de la cual, Quinina, fue descubierto en el siglo XVII y utilizado para la cura del paludismo.

Las plantas medicinales del Ecuador, como en otros países se utilizan de varias formas: como materia prima, en forma de extractos, en forma semipurificada o como sustancias químicas puras o semisintéticas (20, 25).

Los antioxidantes están presentes en muchos productos alimentarios. Todos, en algún momento, hemos escuchado hablar de ellos o los hemos visto enumerados como aditivos en los envases de los alimentos. Los aditivos que protegen a los alimentos de la oxidación. La oxidación es un proceso químico que, en la mayoría de los casos, ocurre debido a la exposición al aire (oxígeno), o a los efectos del calor o la luz.

Los antioxidantes desempeñan un papel fundamental garantizando que los alimentos mantengan su sabor y su color, y puedan consumirse durante más tiempo. Su uso resulta especialmente útil para evitar la oxidación de las grasas y los productos que las contienen. Cuando los antioxidantes se añaden a la grasa o aceite, se retrasa el comienzo de las últimas etapas de la autooxidación, cuando la ranciedad (el desarrollo de olores y sabores desagradables) se hace evidente (24, 51).

Otra función relevante es que ciertas vitaminas y algunos aminoácidos se destruyen con facilidad debido a la exposición al aire, y los antioxidantes sirven para protegerlos. Asimismo, contribuyen a retrasar la decoloración de las frutas y verduras (51).

Con el fin de aumentar el ámbito de acción de los antioxidantes naturales, se están realizando esfuerzos para obtener nuevas sustancias vegetales. Hasta ahora, estos han resultado bastante infructuosos ya que las sustancias naturales a menudo presentan otras características menos deseables.

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales perteneciente a la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

En cuanto a resultados se obtuvieron datos de significancia elevada, es así que las altas concentraciones de las fracciones clorofórmicas, en especial; han tenido muy buen desempeño concerniente a la inhibición enzimática de la polifenoloxidasas comparables a la actividad antioxidante del ácido ascórbico.

La hipótesis planteada fue que la capacidad antioxidante expresada como el porcentaje de inhibición enzimática, producida por los extractos de las especies vegetales motivo de estudio es superior al 70%.

CAPÍTULO I

1. PARTE TEÓRICA

1.1. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS PLANTAS

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario.

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol. (7, 11)

1.1.1. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.

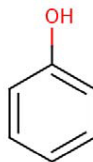


Figura 1. Fenol

Los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos. (11)

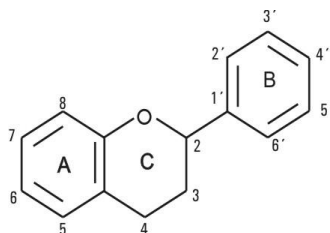


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides

Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades sustanciales por las plantas. Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados del 2-fenilbenzo- γ -pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano. Estos compuestos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres. (17)

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de hidroxilos sustituyentes, así como del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C (16).

Los taninos o polifenoles poliméricos tienen mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples. (6)

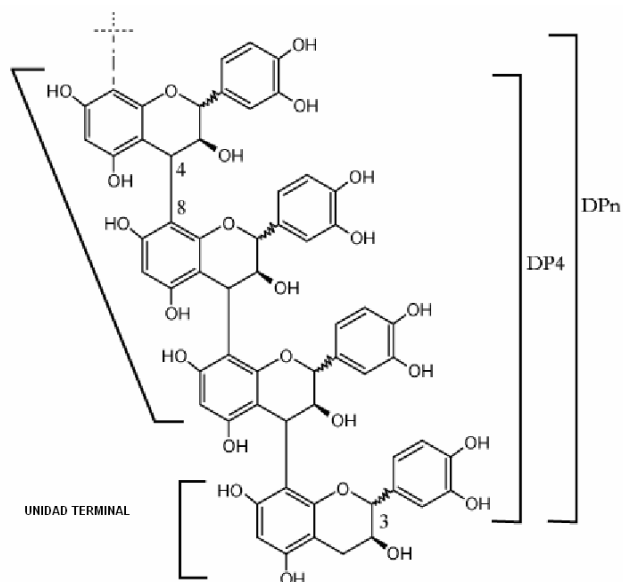


Figura 3. Taninos (Polímeros de catequina)

1.1.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlcera, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV) y del virus simplex humano (HSV), inhiben las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento. (9, 16)

Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora. (16, 20)

Existe evidencia epidemiológica acerca de los beneficios para la salud del consumo abundante de frutas y verduras en la dieta.

Altas ingestas de frutas y verduras están asociadas con el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades. El pensamiento vigente vincula el alto contenido de antioxidantes con la inhibición de las enfermedades provocadas por el daño oxidativo, tales como la enfermedad cardíaca, las hemiplejias y el cáncer. (11)

Se ha probado, tanto epidemiológica, así como experimentalmente, la relación existente entre una ingesta aumentada de antioxidantes en la dieta, así como de vitaminas C y E, y β -caroteno y la prevención de la enfermedad coronaria. Hertog (1993) determinó que la ingesta de flavonoides en la dieta, la mayoría a partir de té, se asoció con una reducción de las muertes por enfermedades coronarias. Los flavonoides de las plantas, específicamente los del té, son poderosos antioxidantes, comprobados *in vitro* en un sistema de oxidación de lipoproteínas (LDL) simulando lo que ocurre en el cuerpo humano. (18)

Las hierbas utilizadas para realzar y complementar los sabores de los alimentos son fuentes de compuestos fenólicos; el consumo de hierbas está asociado con una baja incidencia de cáncer y baja mortalidad por esta misma enfermedad. (20)

Los flavonoides y otros compuestos fenólicos actúan en forma preventiva en el desarrollo del cáncer y de la enfermedad coronaria. El consumo de dietas controladas altas en frutas y verduras incrementa significativamente la capacidad antioxidante del plasma en humanos. Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación negativa significativa entre la ingesta de frutas y verduras y la mortalidad debida a la enfermedad cardíaca. (8)

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar; y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis.

Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, cicloxigenasa, lipoxigenasa) y acción antiinflamatoria. (16)

Los flavonoides pueden explicar los efectos protectores de la dieta mediterránea (rica en vegetales, frutas y vino) contra las enfermedades cardiovasculares. La mayor concentración de (+) catequina en el plasma se observó en sujetos que consumieron frutas, verduras y vino. Su acción antioxidante y antiagregación de las plaquetas puede explicar parcialmente la protección relativa contra la enfermedad coronaria. (14)

1.1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FENOLES DE LOS ALIMENTOS

Los flavonoides son la clase predominantemente descrita de los fenoles presentes en los alimentos, porque son aproximadamente dos tercios de los fenoles consumidos en la dieta humana. Los taninos también son una fuente importante de antioxidantes. Debido a su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal, los humanos consumen compuestos fenólicos a diario. El rango de consumo es de 25 mg a 1g por día dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té, especias) (6, 11)

Existen numerosos estudios sobre la actividad antioxidante de los alimentos de consumo corriente en las diferentes culturas: las frutas, las hierbas, el té, el cacao, las verduras, los cereales, entre otros.

La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa. (21, 22, 24)

Otros enzimas capaces de producir superóxido son la xantina oxidasa, NADPH oxidasa y citocromo P450. El peróxido de hidrógeno es producido por una amplia variedad de enzimas incluidas monooxigenasas y oxidasas. Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en la señalización celular, en un proceso denominado señalización redox.

Así, para mantener la homeostasis celular, debe lograrse un equilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y su consumo. (13, 14, 20)

Los antioxidantes celulares mejor estudiados son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa.

Antioxidantes enzimáticos menos estudiados (pero probablemente muy importantes) son la peroxirredoxina y la sulfirredoxina. Otros enzimas que tienen propiedades antioxidantes (aunque esta no es su función primordial) incluyen la paraoxonasa, la glutatión S-transferasa, y la aldehído deshidrogenasa.

El estrés oxidativo contribuye a la lesión tisular después de la irradiación e hipoxia. Se sospecha (aunque no está demostrado) que es importante en las enfermedades neurodegenerativas incluida la enfermedad de Lou Gehrig, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington. También se considera que está vinculado a ciertas enfermedades cardiovasculares, ya que la oxidación de LDL en el endotelio vascular es un precursor de la formación de placas. Además desempeña un papel en la cascada isquémica debido a los daños por la reperfusión de oxígeno que sigue a la hipoxia. Esta cascada incluye tanto los accidentes cerebrovasculares como ataques cardíacos.

El sistema inmunitario utiliza los letales efectos de los oxidantes haciendo de las especies oxidantes una parte central de su mecanismo para matar a los agentes patógenos; con la producción de los fagocitos activados de ERO y las especies reactivas del nitrógeno. Estos incluyen el superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), y en particular su producto reactivo, peroxinitrito (OONO^-). Aunque el uso de estos compuestos altamente reactivos en la respuesta citotóxica de los fagocitos causa daños a los tejidos huésped, la no especificidad de estos oxidantes es una ventaja, ya que pueden dañar casi cualquier parte de la célula blanco. Esto impide que un agente patógeno escape de esta parte de la respuesta inmunitaria mediante la mutación de un único blanco molecular.

Es importante incorporar en la dieta aquellos alimentos que proveen una mayor cantidad de antioxidantes como los frutos rojos, cereales integrales en el desayuno, chocolates y dulces, productos lácteos descremados, huevos, grasas insaturadas, poliinsaturadas y aceites, pescados y mariscos, frutas y jugos de frutas, granos, hierbas medicinales, carnes variadas, frutos secos, carne de ave, sopas y setas, productos vegetales, vitaminas y suplementos dietarios y legumbres.

Las frutas, especialmente las agrupadas en lengua inglesa bajo el nombre de berries *Vaccinium myrtillus* (arándanos), *Ribes nigrum* (cassis o corintos negros), *Ribes grossularia* (uva espina o grosella), *Rubus idaeus* (frambuesa), *Ribes rubrum* (corintos rojos) y *Fragaria ananassa* (frutilla) son una fuente importante de antioxidantes en la dieta. En estas frutas se encuentran presentes derivados de los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, antocianos, flavonoles, catequinas y taninos (hidrolizables y condensados). Muchos de estos compuestos exhiben una variedad de efectos biológicos, incluyendo actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y acciones vasodilatadoras. Los extractos de las frutas antes mencionadas resultaron altamente antioxidantes, inhibieron la formación de hidroperóxidos en metil linoleato y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de los liposomas.

También tienen capacidad para capturar especies reactivas del oxígeno generadas químicamente. (7)

Las frutas en general, y en particular, las frutas pequeñas o berries, contienen una amplia gama de flavonoides y ácidos fenólicos que muestran actividad antioxidante. Los principales subgrupos en berries y frutas son los antocianos, proantocianidinas, flavonoles y catequinas. Los estudios sobre la actividad antioxidante han sido enfocados principalmente en uvas, en las cuales se ha verificado que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad humanas (LDL) en un nivel comparable con el del vino. El extracto de frutillas frescas ha actuado como un antioxidante cinco veces más activo que el trolox, en un sistema artificial que genera peróxido. Los extractos de blackberries, corintos rojos y negros, blueberries, frambuesas negras y rojas poseen una alta actividad como captores de radicales superóxido. Los ácidos hidroxinámicos típicamente presentes en las frutas han demostrado inhibir la oxidación en las LDL in vitro. Los extractos fenólicos de berries (blackberries, frambuesas, cerezas, blueberries, y frutillas) inhiben la oxidación de las LDL humanas y la oxidación de los liposomas. (8)

Los antioxidantes son los encargados de defendernos de los radicales libres, moléculas que oxidan las células y tienden a un envejecimiento prematuro, además de esto hay que añadirles las posibles enfermedades.

Por estas importantes razones hay que decirle sí a los antioxidantes y dejar a un lado la comida que no nos lleva a ningún sitio.

La vitamina C y sus distintas sales se añaden a refrescos, mermeladas, jamón, leche condensada y embutidos, para su protección. Otros antioxidantes naturales son los tocoferoles, pertenecientes a la familia de la vitamina E. Se encuentran fundamentalmente en los frutos secos, las semillas de girasol y los brotes de soja y maíz, y se utilizan esencialmente para conservar aceites vegetales, margarina y productos derivados del cacao. Dado que ambos compuestos son antioxidantes muy populares y su demanda no puede ser totalmente satisfecha mediante fuentes naturales, hace tiempo que el ácido ascórbico y los tocoferoles se producen artificialmente (17).

Los científicos han observado varias sustancias vegetales presentes en la salvia y el romero que son antioxidantes eficaces. Sin embargo, existen dos aspectos fundamentales que siempre hay que tener en cuenta en la producción de alimentos. En primer lugar, las sustancias naturales no siempre son seguras para la salud humana; en segundo lugar, las sustancias naturales de origen vegetal suelen tener un sabor propio fuerte y característico. Éste es el motivo de que las sustancias recién descubiertas no siempre se utilicen para producir alimentos. En cualquier caso, dichas sustancias deberán ser sometidas a rigurosos análisis para evaluar su seguridad, tal y como se estipula en la legislación sobre aditivos y nuevos alimentos.

Muchos radicales libres son anulados por nuestro organismo, pero hay otros que necesitaremos la presencia de los antioxidantes. Algunos hábitos propensos a generar radicales libres son por ejemplo el tabaco, un exceso de grasas en nuestra alimentación y la abundante radiación solar (28).

Los antioxidantes los podemos encontrar en alimentos con vitamina C, E, A además de minerales como zinc o el selenio. Los alimentos con vitamina D son lo que más porcentaje de antioxidantes contienen, ya que ayudan a reforzar las defensas y prevenir el envejecimiento prematuro.

El té se ha usado como bebida de consumo diario y como medicina por cientos de años en China. Posee efectos antipiréticos y diuréticos, actividad antioxidante, antimutagénica y anticancerígena, así como también capacidad para capturar los radicales libres y el oxígeno activo.

Previene el daño oxidativo sobre el DNA e inhibe la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La ingesta regular de té mejora el status antioxidante *in vivo*, y por lo tanto, disminuye la incidencia de ciertos tipos de cáncer y de enfermedades coronarias. Los antioxidantes del té protegen contra fuertes mutágenos en modelos animales. Por otra parte, en estudios epidemiológicos se ha comprobado una disminución de la incidencia de cáncer en asociación a alto consumo de té. El poder antioxidante del té se correlaciona fuertemente con el contenido de polifenoles totales, en particular epicatequina. La actividad antioxidante se incrementa con el incremento de los sustituyentes del tipo orto dihidroxi. El epigallocatequingalato tiene cuatro de estos grupos, y es el compuesto que mayor actividad presenta. Las propiedades antioxidantes y antimutagénicas del extracto de té varían con la intensidad de la fermentación del té durante el proceso de manufactura. Durante la fermentación, los flavonoles de las hojas verdes del té, principalmente catequinas y sus ésteres gálicos, sufren una polimerización oxidativa catalizada por la polifenoloxidasas, que vuelve negras las hojas (19, 22, 27).

El contenido inicial de catequina, se convierte en tearubingenina y teaflavinas, que dan al té negro su característica astringencia. El té verde contiene 30 a 42% de catequinas sobre la masa total seca, mientras que el té negro contiene 3 al 10% y el té Oolong, semifermentado, contiene 8 al 20% de catequina. Los extractos de té verde tienen fuerte acción antioxidante, debida a los compuestos activos catequina, epigallocatequingalato, epicatequingalato, epigallocatequina y epicatequina. El extracto crudo de té verde tiene mayor actividad antioxidante que una mezcla de catequina reconstituida. La actividad antioxidante de estas catequinas ha sido demostrada en aceites calentados, en emulsiones de β -caroteno/linoleato, en ensayos de actividad de captura de radicales con iniciadores de radicales, en tests de captura de superóxido, en oxidaciones aceleradas por el calor y suministro de oxígeno, y en reacciones catalizadas por enzimas. Las propiedades antioxidantes parecen explicar la acción antimutagénica. El té verde no fermentado tiene un poder antioxidante superior al del té negro fermentado. (3, 5, 13, 18)

Los granos de cacao no fermentados son ricos en polifenoles, los cuales comprenden del 12 al 18% del peso seco total del grano entero. Los polifenoles presentes son catequinas, procianidinas y antocianidinas. Luego de la fermentación y el secado, los flavonoides sufren una variedad de reacciones de oxidación y polimerización que originan taninos. Los fenoles del cacao tienen propiedades antioxidantes *in vitro*.

El café verde tiene alto contenido de polifenoles, entre ellos el ácido ferúlico y cafeico, cuya actividad antioxidante ha sido demostrada in vitro e in vivo. El grado de tostado disminuye la concentración en polifenoles. El café descafeinado no presenta diferencias con el café sin descafeinar respecto de su poder antioxidante. La protección contra la oxidación de las LDL no se debe a un solo compuesto, sino que es el resultado de la acción de varios compuestos fenólicos. La composición química de las bebidas varía grandemente: consiste en epicatequinas en el té verde, epicatequinas y taninos en el té negro, catequinas, procianidinas y antocianinas en el cacao, y en el café hay ácido clorogénico, ácido cafeico y melanoidinas. Café, cacao y té contienen polifenoles con altas actividades antioxidantes. (10)

Existe relación entre el contenido de procianidinas de las muestras de cacao y su potencial antioxidante. Las muestras que han fermentado más intensamente tienen menor poder antioxidante, y menor contenido de procianidina. El contenido de procianidina es un indicador del potencial antioxidante, ya que se correlaciona en forma directa con el poder antioxidante. (1)

En hierbas aromáticas tales como Salvia, tomillo, Ginkgo biloba, menta, artemisia, aloe, valeriana, ciboulette, diente de león, dill, lavanda, hinojo, orégano, mejorana, melisa, perejil, romero, albahaca, laurel, sauco, coriandro, perejil, azafrán, diente de león, manzanilla, tilo, tomillo, y vinca se estudió el poder antioxidante y la composición polifenólica. Cada hierba tiene una composición fenólica diferente, y el poder antioxidante de cada uno de estos compuestos también es diferente. La actividad antioxidante de los flavonoides se incrementa con el N° de grupos hidroxilo sustituyentes del anillo B, específicamente en el C-3'. Existe una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de las hierbas, en consecuencia, las hierbas son una buena fuente potencial de antioxidantes naturales. Romero y tomillo presentaron mayor concentración polifenólica y mayor poder antioxidante (9).

Se ha determinado actividad antioxidante en porotos, remolacha, maíz tierno, brócoli, ajo, cebolla, espárragos, papas, romero, salvia, orégano, tomillo, nuez moscada, avena, hojas de pino (el picnogenol se obtiene del Pinus marítima y actúa como captor de radicales libres hidroxilo y superóxido) y corteza de abedul.

No se encontró correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos de plantas en los grupos estudiados trabajando sobre la oxidación del metil linoleato.

En los berries si se encontró relación entre alto contenido de polifenoles y alta actividad antioxidante. Las verduras ensayadas mostraron baja concentración de fenoles respecto a las berries. Pero la piel de remolacha, la piel de papas color púrpura y la piel de la remolacha azucarera mostraron actividad antioxidante interesante. En los cereales, la concentración de fenoles es aún más baja que en las verduras, y el poder antioxidante es bajo. Entre las hierbas, el tomillo posee fuerte acción antioxidante. (8)

Las semillas y cáscaras de trigo sarraceno, lino, semillas y cáscaras de girasol, raíces de ginseng, raíces y flores de Echinacea, papas de carne blanca y púrpura, arándanos, cerezas, pieles de cebolla morada, raíces y aceite de rábano picante y trigo fueron estudiadas en cuanto a su actividad antioxidante. Se encontró correlación di-recta entre concentración fenólica y actividad antioxidante. (17)

Los cítricos contienen flavonoides en forma de flavonas polimetoxiladas y flavanonas glicosiladas. Tienen propiedades anticancerígenas, antivirales, antiinflamatorias, efectos sobre la fragilidad capilar y capacidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Las cáscaras y las semillas de los cítricos tienen capacidad antioxidante con respecto a la oxidación del citronelal, debida a estos compuestos fenólicos. Sus extractos pueden ser útiles para evitar la oxidación de los jugos de frutas y aceites esenciales. Generalmente, las semillas poseen mayor actividad antioxidante que las cáscaras. No siempre se verifica una relación directa entre mayor concentración fenólica y mayor actividad antioxidante en los cítricos. (4)

Moringa oleifera es un árbol nativo del noroeste de la India, se cultiva como cerco verde. Sus frutos verdes se consumen como una verdura, se comen también las flores y las hojas jóvenes. Una pasta de hojas se emplea como emplasto para heridas. El extracto metabólico ha demostrado tener actividad antiúlcera gástrica en ratas.

El jugo de hojas frescas posee acción antibacteriana contra *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

En un ensayo en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas adicionada de jugo fresco de Moringa oleifera, se observó un descenso del nivel de colesterol en el suero, en el hígado y en el riñón. Tradicionalmente, el ghee o manteca clarificada de leche de vaca o búfala se ha preparado con hojas de Moringa, lo cual retarda el deterioro oxidativo del ghee, por actuar como antioxidante natural.

El poder reductor o antioxidante de los extractos de Moringa aumenta con el aumento de concentración de polifenoles de estos extractos. Los flavonoides están entre los más potentes antioxidantes de las plantas debido a que poseen uno ó más de los siguientes componentes estructurales que están involucrados en la actividad antiradical o antioxidante: un grupo ortodifenol en el anillo B, un doble enlace conjugado en 2-3, con una función oxo en el C₄ y grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5. (15)

Los extractos crudos de frutas, hierbas, verduras, cereales y otros materiales vegetales ricos en fenoles están generando interés en la industria de los alimentos debido a que retardan la degradación oxidativa de los lípidos, y por lo tanto mejoran la calidad y el valor nutricional de los alimentos. La importancia de los constituyentes antioxidantes de los materiales vegetales en el mantenimiento de la salud y la protección contra la enfermedad coronaria y el cáncer aumenta el interés de los elaboradores de alimentos y de los consumidores. La tendencia se encamina hacia la preparación de alimentos con valores específicos para la salud

En Ecuador existen aproximadamente 500 especies de plantas medicinales conocidas; el 80% de la población ecuatoriana depende del consumo de plantas medicinales y de sus productos, para su salud y bienestar. El doble papel que juegan hoy las plantas medicinales, tanto como fuente de salud como de ingresos económicos para cultivadores, comerciantes, colectores y manufactureros de medicinas basadas en plantas, es una contribución importante al proceso de desarrollo (39).

El estudio de los recursos etnobotánicos de una población trasciende en los aspectos culturales, socioeconómicos y sanitarios por citar aquellos de mayor relevancia, los mismos que son en cierto modo prioritarios para romper con la dependencia que aqueja a los países en vías de desarrollo, incrementando de forma importante el progreso sustentable y sostenido de las comunidades.

Asimismo el bagaje del conocimiento etnobotánico forma parte de la identidad y patrimonio nacionales.

Los cambios demográficos y sociales de la población ecuatoriana, impulsan el desarrollo de productos que eleven el nivel de salud y la calidad de vida, reduciendo a largo plazo los costosos gastos del sistema sanitario.

Las actuales exigencias de los consumidores, constituyen una oportunidad para convertir especies subexplotadas en productos promisorios, inclusive con perspectivas de exportación.

Las plantas medicinales y sus productos derivados, han sido utilizados de forma milenaria en la medicina tradicional y a la vez son cada vez más valiosas como materia prima en la preparación de medicamentos modernos para la industria farmacéutica y tradicional, el mercado de las cuales, igualmente importante, sigue una tendencia en aumento muy significativa (19, 23, 43).

Numerosas plantas han dado origen a los compuestos y medicinas más importantes para la curación de enfermedades graves que han afectado a la humanidad a través de la historia. Latinoamérica ha jugado un papel muy importante a través de los compuestos y medicinas derivados de plantas originarias de Centro y Sudamérica (Diosgenina como anticonceptiva o Emetina contra las amebas) (22, 27).

Otros compuestos igualmente importantes se han derivado también de otras plantas nativas como el Curare (*Chondodendron spp.*, *Strychno ssp*) utilizados en cirugías del ojo y como anestésico, o por ejemplo el Modulador Biológico de la Respuesta Inmune (BIRM) producido de la Dulcamara (*Psychotria viridis*, *Kalanchoe pinnata* y/o *Solanum dulcamara*), que modifica la conducta biológica del tumor cancerígeno y eleva las defensas bajas proporcionando una mejor calidad de vida a pacientes con cáncer y SIDA.

1.2. ESPECIES VEGETALES



1.2.1 ARRAYÁN

1.2.1.1. NOMBRE CIENTÍFICO

Eugenia uniflora L. Sinonimias: Se citan 51 para esta especie.

1.2.1.2. NOMBRES POPULARES

Español: pitanga, ñangapiri, arrayán, ginja, cereza de Surinam.

Portugués: pitangueira

Inglés: Surinam Cherry

Otros: añangapiré (Guaraní).

1.2.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Se trata de un arbusto o árbol pequeño perteneciente a la familia de las Mirtáceas, caracterizado por presentar una altura entre 3-7 metros; corteza gris-verdosa; hojas opuestas, ovoides, de hasta 5-6 cm de largo por 2,5 cm de ancho; flores blancas, solitarias, sostenidas por débiles y largos pedúnculos de hasta 3,5 cm de largo. Su fruto es periforme, granate cuando madura, con cáliz persistente, de hasta 2 cm de diámetro y provisto de 6-8 costillas. La floración ocurre en primavera y la fructificación en verano y otoño (47).

1.2.1.4. HÁBITAT

El género *Eugenia* comprende unas 500 especies distribuidas en áreas pantropicales. La pitanga es originaria de América subtropical, en especial en territorios de Brasil, Paraguay, Uruguay (centro y oeste) y Argentina (noroeste, Mesopotamia y desde el norte de Santa Fe hasta el este de Formosa y Chaco). Es subespontánea en muchas regiones de América. Se cultiva en India, China, Sri Lanka, Argelia y Estados Unidos.

1.2.1.5. PARTE UTILIZADA

La droga está constituida por las hojas secas. Ocasionalmente se emplean los frutos. La Farmacopea Brasileña (IVª Ed., 2003) exige para las hojas secas un mínimo de 4% de taninos, 2% de flavonoides totales (expresados en quercetina) y 0,5% de aceite esencial (con un mínimo del 30% en curzerenos, en sus formas *cis* y *trans*).

1.2.1.6. HISTORIA

No existen en la literatura demasiados comentarios acerca de los usos medicinales de la pitanga. Los indios guaraníes utilizaban la decocción de los frutos en los casos de diarrea, digestiones difíciles y como tónico-estimulante. El nombre genérico *Eugenia* fue impuesto en honor del príncipe Eugenio de Saboya (1663-1736). En tanto, Pitanga proviene del guaraní y significa «fruto rojo». La denominación *ñangapiri* deriva del guaraní: *añangá*=«diablo», *piré*=«piel» y *ri*=«jugo». La denominación popular *arrayán* proviene del nombre árabe del mirto europeo (*Myrtus communis* L.), aplicado por los españoles a esta y a otras Mirtáceas sudamericanas (47).

1.2.1.7. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las hojas contienen:

Aceite esencial: Conformado principalmente por sesquiterpenos, eugenol, cineol, derivados furadiénicos, curzerenos *cis* y *trans*, ácidos fenólicos y esteroides.

Otros: flavonoides (quercitrina, quercetina, miricitrina y mirecetina), carotenos, taninos (eugeniflorinas).

1.2.1.8. ACCIONES FARMACOLÓGICAS

La pitanga es una especie muy empleada en medicina popular. Diferentes estudios han convalidado algunas de sus aplicaciones, como así también su seguridad a la hora de prescribirla. Para una mejor comprensión se dividirán los ensayos biológicos realizados de acuerdo a la actividad terapéutica propuesta (47).

Actividad Diurética-Antihipertensiva

Los flavonoides contenidos en el extracto hidroalcohólico de pitanga le proporcionan a esta especie propiedades diuréticas y tónico-estimulantes, por efecto inhibitorio de la enzima xantino-oxidasa, siendo potenciadas estas acciones por el té, café y yerba mate. Por este motivo, suelen agregarse algunas hojas a las infusiones de *Ilex paraguayensis* en el Río de la Plata. Al respecto, el extracto acuoso de las hojas secas de la pitanga, en dosis de 0,60-1,20 mg diarios, ha exhibido actividad diurética en ratas. El máximo efecto se obtiene con dosis de 0,60 mg, observándose la actividad diurética a partir de las cuatro horas de su administración. El examen de la orina demostró expoliación de potasio pero no de sodio.

En lo referente a la actividad antihipertensiva, el extracto acuoso administrado por vía intraperitoneal a ratas normotensas, demostró efectos hipotensores (de manera dosis-dependiente) en un 47.1% (+/- 8.2%) respecto al grupo control. Dicho efecto, estaría mediado por una acción vasodilatadora directa (evidenciada también por extractos hidroalcohólicos en endotelio de aorta torácica precontraída con noradrenalina) y un efecto diurético moderado comparable al amiloride (47, 48).

Recientes estudios en ratas determinaron que la administración del extracto acuoso (0,6%) bajo perfusión ventricular, ejerce en primera instancia un efecto incrementador de la presión ventricular izquierda de 1-3 minutos de duración. El hecho de ser contrareestado este efecto por propanolol, indicaría la presencia de un compuesto de tipo β -adrenérgico en el extracto. No obstante, a los 20 minutos de ser administrado el extracto acuoso, se observa un descenso de la presión intraventricular casi a un 50% de las cifras basales, lo que sugiere la presencia de un compuesto inotrópico negativo en dicho extracto.

En conclusión, el extracto acuoso de pitanga demostró producir un efecto dual en su actividad hipotensora, que determina su accionar como así también la aparición de efectos adversos en pacientes con riesgo cardíaco.

Actividad Antimicrobiana

El aceite esencial de pitanga ha exhibido a través de varios ensayos, efectos antimicrobianos frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae*. En cambio frente a *Salmonella typhi* no ha demostrado actividad (47, 51).

El análisis de los diferentes resultados observados en pruebas de difusión en Agar evidenciaron una mayor susceptibilidad de los extractos frente a bacterias Gram (+), siendo más efectivas las tinturas respecto a decocciones o infusiones. En tanto, el aceite esencial evidenció una significativa actividad antifúngica frente a dermatofitos humanos, con inhibiciones cercanas al 80% y halos inhibitorios de 10 mm. Finalmente, se pudo observar actividad tripanocida contra cepas de *Tripanosoma congolense* resistente a varias drogas.

Actividad Antioxidante

A través de métodos espectro-fotométricos basados en la reducción del 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y en el monitoreo de la pérdida de color del β -caroteno en presencia de peróxido de hidrógeno, se pudo comprobar que tanto el extracto acuoso como el alcohólico, presentan actividad depuradora del radical libre DPPH, con una $IC_{50}=1,48 \mu\text{g}$ de compuestos fenólicos/mL. Por otra parte, ambos extractos impiden la oxidación del β -caroteno en un 54% respecto al control. Estudios realizados sobre membranas microsomales de rata demostraron que el extracto metanólico de hojas de pitanga exhibe actividad antioxidante, al exhibir la peroxidación lipídica tanto enzimática como no enzimática. En un test efectuado sobre un sistema dependiente de Fe^{2+} /ascorbato, dicho extracto exhibió una potente actividad antiperoxidativa, con una $IC_{50}=6,9 \mu\text{g/mL}$ (47, 49).

Oncología Experimental

En la década del '60 se ensayó el extracto acuoso de las hojas de pitanga sobre el tumor ascítico de Ehrlich trasplantado en ratas, demostrando una actividad inhibitoria del 40%. Entre los taninos presentes en esta especie, las *eugeniflorinas D1 Y D2* demostraron poseer actividad inhibitoria sobre la ADN polimerasa del virus de Epstein Barr, generalmente asociado al carcinoma de nasofaringe, un tumor de alta frecuencia en el sur de Asia.

Otros

De los primeros estudios efectuados en animales, el licor obtenido por maceración de los frutos maduros en caña de azúcar, provocó una mayor actividad secretoria a nivel salival, gástrico y pancreático.

El *eugenol* del aceite esencial presenta propiedades carminativas, eupépticas, antisépticas y anestésicas (47, 51).

El extracto crudo acuoso de hojas de pitanga, evidenció en ratas infectadas con agentes enteropatógenos, propiedades antidiarreicas por incremento la absorción de agua y reducción de los movimientos propulsivos en tracto intestinal.

En el área metabólica, diferentes fracciones del extracto etanólico al 70% de las hojas de pitanga, demostraron en ratas propiedades hipoglucemiantes en el test de tolerancia a la sucrosa, e inhibición del incremento de triglicéridos, aparentemente debido a una inhibición en la descomposición de hidratos de carbono y grasas (respectivamente) en el tracto intestinal. La administración oral de infusiones de hojas de pitanga en ratas, una hora antes de una inyección subplantar de carragenina, demostró poseer propiedades antiinflamatorias significativas, a la vez que evidenció prolongar el tiempo de sueño del pentobarbital.

Por otra parte los extractos acuoso y alcohólico de pitanga demostraron *in vitro* inhibir la actividad de la enzima hialuronidasa (endoglicosidasa), implicada en procesos inflamatorios, reacciones alérgicas y fotosensibilizantes. En el área nutricional, los frutos de pitanga presentan un aceptable tenor en micronutrientes y una buena concentración de pro-vitamina A (47, 49).

1.2.1.9. EFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS

Por lo general las infusiones de hojas de pitanga son muy bien toleradas. El extracto hidroalcohólico de las hojas, en dosis de 4.200 mg/k por vía oral, no produjo señales de toxicidad aguda ni subaguda en ratas. La DL_{50} del extracto en ratas fue calculado en 220 mg/k vía i.p. A través del test de Artemia salina, también se ha observado una muy baja toxicidad de los extractos de pitanga, siendo la LC_{50} para todos los preparados superior a 1.000 ppm. De todo ello se desprende que los extractos de pitanga en dosis usuales son atóxicos.

1.2.1.10. CONTRAINDICACIONES

Se desconoce su seguridad durante el embarazo y la lactancia. Por lo tanto no se recomienda su administración en estas circunstancias, hasta tanto obtener datos fehacientes sobre su inocuidad (47, 51).

1.2.1.11. STATUS LEGAL

Esta especie se encuentra registrada en el fascículo III de la Farmacopea Brasileira.

1.2.1.12. USOS ETNOMEDICINALES

La infusión de las hojas es empleada como eupéptico, caminativo, antidiarreico, diurético, antifebril, astringente, tónico-estimulante y antirreumático. En el noroeste argentino también se emplea como diurético y antihipertensivo (1,5-3 g/L). En Paraguay emplean la infusión de los frutos en casos de «empacho», colitis, hipercolesterolemia, hiperuricemia, obesidad, diabetes y acidez. El cocimiento de hojas y corteza, en forma de gargarismos, se emplea en casos de anginas, faringitis y amigdalitis. Las hojas machacadas se usa como repelente (47, 48).

1.2.1.13. FORMAS GALÉNICAS

Infusión: De las hojas al 1%. Los frutos se emplean en una concentración del 20 por mil. Se recomiendan 2-3 tazas diarias después de las comidas.

1.2.1.14. OTROS USOS

Se cultiva en varios países como ornamental. Los frutos son comestibles, ingiriéndose crudos o también se elaboran con ellos dulces regionales y aromatizantes para licores. La madera es pesada y dura, empleándose en la fabricación de estacas, mangos de herramienta y utensilios (47, 50).

1.2.2. CALAGUALA



1.2.2.1. NOMBRE CIENTÍFICO

Polypodium leucotomos Poir.

1.2.2.2. NOMBRE POPULAR

Español: calahuala, calaguala, polipodio.

Portugués: avenca dourada.

Inglés: fern.

Francés: calaguala.

1.2.2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Se trata de un helecho perenne epífita (rara vez terrestre), perteneciente a la familia de las Polipodiáceas, caracterizado por presentar un rizoma rastrero cilíndrico y densamente escamoso, de 8-15 mm. de grosor, cubierto de una pilosidad marrón-amarillenta; hojas ovado-oblongas, verde brillantes (la mayoría de las veces), amarillentas o azul-verdosas, de 30-120 cm de largo por 18-50 cm de ancho, divididas en varios segmentos lanciformes, oblongos de 10-30 cm de largo por 2-5 cm de ancho. Al pertenecer al grupo de plantas primitivas, no posee floración (46).

Nota: Con el nombre de calahuala se conoce varias especies de *Polypodium*, tal es el caso de *Polypodium aureum* L. (*Phlebodium aureum* L.) o *Polypodium decumanum* Willd., entre las cuales existen mínimas diferencias desde el punto de vista botánico. Por su importancia económica y medicinal se tomará como representativa de este grupo a *Polypodium leucotomos* Poir.

1.2.2.4. HÁBITAT

La calahuala es oriunda de Centroamérica; extendiéndose desde México hasta Sudamérica (Bolivia y Brasil).

Crece silvestre en sitios sombreados y húmedos, sobre troncos de palmeras, árboles de encino, en el suelo o sobre rocas cubiertas de musgo, en una altitud comprendida entre los 1.200-2.200 metros s.n.m (46).

En la actualidad existen extensas plantaciones de calaguala en la región centro-norte de Honduras (Lago de Yojoa) y otras en Guatemala.

1.2.2.5. HISTORIA

Estos helechos tienen una larga tradición de uso, especialmente en Honduras y Guatemala donde se cultivan. El nombre *calaguala* es una voz quechua que significa «adorno juvenil» en alusión a un probable uso ornamental por parte de los jóvenes indígenas cuando iban a bailar o danzar ceremonialmente. Una de las primeras descripciones correspondió a *Polypodium decumanum*, la cual fue descrita por Willd en 1810.

En 1967 Horvath y col. lograron aislar del rizoma de *P.leucotomos* un heterósido al cual denominaron *calagualina* (posteriormente se le dio el nombre de anapsos) (46, 47).

1.2.2.6. PARTE UTILIZADA

Rizoma (principalmente) y hojas (secundariamente). El rizoma tiene un sabor muy dulce (por la presencia de osladina), ligeramente agrio, y sin aroma.

1.2.2.7. COMPOSICIÓN QUÍMICA (Del rizoma)

Esteroides: ecdisterona, ecdisonas (una de ellas conocida como polipodoaureína). La α -ecdisona es un esteroide aislado inicialmente en palomillas de gusanos de seda.

Saponinas: calagualina (heterósido compuesto por glucosa fructosa y una aglicona triterpénica), polipodinas A y B.

Otros: mucílago (desoxihexosa), oleorresina, nitrato de potasio, osladina y almidón.

1.2.2.8. ACCIONES FARMACOLÓGICAS

El conocimiento del comportamiento del sistema inmunológico en procesos tales como artritis reumatóidea, vitíligo, psoriasis, esclerosis múltiple o esclerodermia, ha puesto en foco el papel que juegan en el curso de dichos procesos los linfocitos, linfoquinas y demás componentes inmunológicos (46).

El rizoma de calaguala, por medio de una actividad incrementadora de los linfocitos T supresores, parece atenuar el curso de enfermedades inmunológicas de manera favorable. Para una mejor comprensión se dividirá los ensayos biológicos realizados de acuerdo al área estudiada.

Actividad Inmunológica

La estomatitis aftosa recidivante es un proceso que afecta a tejidos mucosos en ocasiones de una alteración o disminución de la inmunidad. En estos casos se ha observado en la fase preulcerosa un notable incremento en la población linfocitaria OKT-4 en una proporción 2/1 frente a las OKT-8.

Cuando ocurre la fase ulcerativa la relación linfocitaria OKT-4/OKT-8 se invierte a 1/10. Durante el proceso de resolución, la relación vuelve a invertirse transformándose en 10/1. Al respecto, la *calagualina* demostró en ensayos *in vitro* incrementar el número de linfocitos OKT-8, sin alterar la producción de OKT-4 y OKT-3 (46,47, 51).

En un estudio clínico realizado sobre 20 pacientes con estomatitis aftosa recidivante los extractos de calaguala demostraron detener el proceso en la etapa preulcerativa. Por otra parte, el extracto acuoso del rizoma de calaguala evidenció prolongar la sobrevida de aloinjertos cutáneos en ratones, al retrasar en varios días los cambios histológicos a nivel epitelial y conectivo referidos al rechazo de injertos. En un estudio sobre fenotipos celulares en sangre periférica de individuos sanos, la administración de Anapsos® (extracto acuoso obtenido del rizoma de calaguala) ejerce un efecto estimulante en la proliferación y/o activación de linfocitos T y en las células NK (Natural Killers). Este resultado ayuda a comprender la probable actividad antitumoral y antiviral del producto tanto *in vitro* como *in vivo* (46).

En otro estudio, el producto Anapsos® demostró poseer *in vitro*, un efecto modulador en la producción y en la liberación de citoquinas sobre las células mononucleares de individuos sanos. Por un lado evidenció un efecto inhibitorio sobre monocitos (principales células secretoras de interleukina 1 α) y por el otro demostró estimular a diversos clones de linfocitos T y probablemente IL-2, IL-10, para que produzcan y/o secreten sus respectivas citoquinas (46, 47).

A nivel experimental se pudo observar que el producto exhibe una actividad antiangiogénica *in vivo* sobre ratas, a la vez que estimula la proliferación y activación de linfocitos natural killer junto a una inhibición en la producción de TFN-alfa e IL-6.

Actividad Antitumoral

A partir del aislamiento del heterósido *calagualina* (conocido como *anapsos*) y su constatación *in vitro* y en humanos de su actividad inhibitoria frente a una amplia gama de tumores, comenzó a despertar gran interés científico esta especie: En principio dicha sustancia demostró reducir la incorporación de nucleoproteínas y precursores en cultivos de tejidos tumorales por un mecanismo anabolizante opuesto a la acción de los citostáticos.

Ya en la década del '60 se habían publicado unos pocos casos de remisión de leucemias linfáticas a partir del empleo de tisanas con calahuala.

Fue así que el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos inició los primeros ensayos con el rizoma de calahuala en diferentes tipos de tumores, los cuales no arrojaron resultados positivos. Tampoco en los laboratorios Merck se lograron resultados satisfactorios. No obstante la comprensión de mecanismos inmunitarios puesto de manifiesto en años posteriores (ver ítem anterior) por la acción de esta especie, pueden abrir la puerta a nuevas investigaciones en este campo (47, 48).

Área Dermatológica

En varios estudios randomizados, a doble ciego versus placebo, el extracto del rizoma de calahuala (Anapsos®) administrado por vía oral en dosis que variaron entre 80-720 mg/día, evidenció a lo largo de seis meses de tratamiento mejorar el curso clínico-estético de pacientes con psoriasis respecto a tratamientos convencionales. Cuando se administran extractos acuosos de *P. leucotomos* se observa un incremento del número de células CD8+ (linfocitos supresores/citotóxicos) en sangre periférica. Estos cambios, observados en pacientes psoriásicos, podían explicar la mejoría clínica evidenciada en esos casos.

Ensayos clínicos realizados a partir de la administración de Anapsos® (extractos del rizoma de calahuala) en forma oral, a razón de cinco cápsulas diarias sobre 36 pacientes portadores de psoriasis, demostraron que el producto produce una regulación del cociente CD4/CD8, así como de las catequinas alteradas (INF- α e IL-1 β), en particular en la psoriasis vulgar, psoriasis palmo-plantar y psoriasis invertida, procesos en los cuales estos factores juegan un papel inflamatorio/proliferativo muy acentuado (47, 48).

A su vez, el producto normalizó la maduración de los queratinocitos hiperactivados. En otro orden de cosas, la administración tanto oral y tópica de un producto que contiene extractos del rizoma de calahuala demostró una inducción melanocítica en pacientes portadores de vitíligo.

Por otra parte, la administración oral y tópica de extractos del rizoma de calahuala demostró en 21 voluntarios con vitíligo tomadores de 8-MOP prevenir quemaduras agudas y fototoxicidad inducidas por ese psoraleno, a la vez que evidenció disminuir células de Langerhans en piel humana. Ello indica que la administración conjunta de calahuala con tratamiento PUVA (Psoralen + Ultra Violeta - A) logra efectos protectores frente a una probable fototoxicidad yatrogénica en este tipo de tratamientos (47, 51).

Estudios *in vitro* sobre cultivos de queratinocitos y fibroblastos humanos demostraron que los extractos de calaguala (<0.1%) protegen la integridad de las membranas celulares frente a la exposición UVA y UVB, lo cual estaría determinado por inhibición de la peroxidación lipídica, incremento en la producción de elastina y descenso en la tasa de metaloproteasas.

Otros

La decocción del rizoma de calaguala demostró una ligera actividad diurética en ratas. Por su parte, el extracto acuoso de las hojas resultó ser activo frente a bacterias fitopatógenas tales como *Xanthomonas campestris*. En tanto, frente a gérmenes patógenos humanos los resultados son controvertido. La administración oral del extracto acuoso del rizoma de calaguala a ratas produjo hipoactividad cerebral de manera dosis-dependiente, al actuar probablemente sobre los niveles de IL-1 β hipotalámica (46, 48).

La administración de extractos crudos y fraccionados de las hojas de la especie emparentada *Polypodium decumanum* ha demostrado disminuir la liberación de la enzima proteolítica elastasa por parte de los neutrófilos polimorfonucleares (CI₅₀ de 0,1 mg/mL) como así también inhibición del Factor de Agregación Plaquetario en neutrófilos (CI₅₀ de 0,2 mg/mL) de manera dosis dependiente. A través de técnicas de fraccionamiento bioguiado empleando la actividad inhibidora sobre células liberadoras de PAF, se pudo aislar del extracto metanólico *adenosina*, la cual sería responsable de esta última actividad (46, 47).

Hay que tener en cuenta que la *adenosina* es un nucleótido ampliamente distribuido en el reino vegetal, con actividad antiarrítmica, en especial en taquicardias supraventriculares. Se han documentados fenotipos inmunológicos anormales en la Esclerosis múltiple, relacionados con un déficit de función supresora.

En ese sentido, se ensayó durante un año el producto Anapsos® basado en un extracto del rizoma de calahuala sobre 12 pacientes portadores de esclerosis múltiple.

Al finalizar el estudio, se midieron las subpoblaciones linfocitarias, observándose que el tratamiento pudo restablecer en el 100% de los casos las anomalías linfocitarias más frecuentes como ser el incremento patológico de linfocitos CD4 inductores de LB y el descenso de linfocitos CD8 supresores (47, 49).

El producto Anapsos® demostró *in vitro* un aumento en la producción de las citoquinas IL-2, IL-10 y INF- α en células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos. Estos cambios podrían explicar las mejorías clínicas observadas en 8 de 13 pacientes portadores de artritis psoriásica tratados con dicho producto.

En otro orden de cosas, el producto Anapsos® ha demostrado en modelos animales de degeneración neuronal, un efecto protector al incrementar los niveles de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en la corteza cerebral, lo cual habla de una actividad antioxidante por parte de la calahuala.

Un ensayo clínico, randomizado, a doble ciego, sobre 45 pacientes portadores de demencia senil (escala de deterioro global: 3-5), demostró que el producto Anapsos® (360 mg/día/oral) mejora significativamente las funciones cognitivas luego de 4 semanas de tratamiento. Mejorías notables en el flujo de las arterias cerebrales media y en los patrones EEG fueron también demostrados (46,48).

En ese sentido, un extracto del rizoma de calahuala ha demostrado frenar el proceso de envejecimiento cutáneo e inducción de cáncer dérmico en ratas expuestas a altas radiaciones de luz UV-B por espacio de 8 semanas continuas, en donde la actividad antioxidante de la calahuala jugaría un rol fundamental. El producto Anapsos® demostró modular la respuesta de IgG-3 frente al germen. En un modelo experimental de trichomoniasis, dicho producto demostró disminuir en un 10-20% el grado de infectación del parásito (47, 48).

1.2.2.9. EFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS

Los extractos del rizoma de calahuala son generalmente bien tolerados. Los estudios de toxicidad aguda evidenciaron una respuesta inocua en peces del género *Mollinesia* a partir del suministro de extractos acuosos y etanólicos del rizoma en dosis de 500mg/k.

1.2.2.10. CONTRAINDICACIONES

Diabetes (la calahuala puede inducir ligeras hiperglucemias en diabéticos) y úlceras gastroduodenal. No se han realizado estudios sobre seguridad en embarazo y lactancia.

1.2.2.11. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS

La composición de heterósidos del rizoma puede interferir con el empleo simultáneo de heterósidos cardiotónicos (47).

1.2.2.12. USOS ETNOMEDICINALES

La infusión o decocción del rizoma se emplea en forma oral para el abordaje de enfermedades gastrointestinales (gastritis, diarreas, dolores, cólicos) y enfermedades respiratorias (asma, bronquitis, tos). Otros usos se refieren a dolencias cardíacas, osteoarticulares, metabólicas (diabetes, gota), hipertensión arterial edemas, enfermedades venéreas y afecciones renales (cálculos, nefritis). La decocción de las hojas se recomienda para detener hemorragias. La infusión se emplea como emplasto en dolores articulares, quemaduras, psoriasis, eczemas, tumores y quemaduras (46, 47, 48).

De acuerdo con algunos estudios etnobotánicos llevados a cabo en Honduras, en casos de hipertensión arterial emplean del rizoma macerado fermentado en vasija de barro, arazón de tres tazas diarias. En casos de artritis el mismo rizoma macerado y secado al sol es puesto a hervir, administrándose una copita tres veces al día. En cáncer emplean la decocción del rizoma por vía oral las veces que sea necesario. En Brasil utilizan el rizoma en decocción como tenífugo, en enfermedades respiratorias y en casos de afonía.

En Cuba lo recomiendan como remedio para tratar caídas y golpes. Los indígenas Kofanes del Amazonas lo utilizan para tratar dolores de garganta y mordeduras de serpiente (47, 48, 49).

1.2.2.13. FORMAS GALÉNICAS

Decocción: 1-4 g/taza, a partir del rizoma desecado. Tomar 3 tazas diarias.

Infusión: 20 g del rizoma en medio litro de agua hirviendo. Tomar 2-3 tazas al día.

Tintura: Relación 1:10, se administran 3-5 mL en etanol 35%.

Extracto Fluido: Relación 1:1, se administra 1 mL, 2 veces al día.

Anapsos: Es el extracto lípido-hidrosoluble del rizoma. Se administran 300-1000 mg/día, repartidos en 3 tomas.

1.2.2.14. OTROS USOS

El follaje se cultiva y comercializa como adorno para macetas de interior. En ciertas zonas de Colombia consumen el rizoma de *Polypodium aureum* como alimento (48).

1.2.3. CANAYUYO



1.2.3.1. NOMBRE CIENTÍFICO

Sonchus oleraceus L. Sinonimia: *S. ciliatus* Lam., *S. mairei* H. Lév.

1.2.3.2. NOMBRES POPULARES

Español: cerraja, lechecillo, lechuguilla, canapaco (Bolivia).

Portugués: serralha, leitaruga.

Inglés: sowthistle.

Otros: lactucella (Italiano), rauriki (Maorí), qarasaoui (Quechua), llamp'u (Aymará), nilhue (Mapuche).

1.2.3.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Se trata de una hierba anual, perteneciente a la familia de las Compuestas (Asteraceae), caracterizada por presentar una altura de 40-90 cm; tallo redondo, hueco, con savia lechosa en su interior; poco ramosa, con hojas alternas, runcinadas y con lóbulos dentados las inferiores, y sésiles las superiores, auriculadas en la base.

Las flores son liguladas, de color amarillo, se agrupan en cimas unbeliformes, con involucreo acampanado de 10-12 mm de alto. El fruto es un aquenio lanceolado, comprimido, glabro, de 3,5 mm de largo. Florece en verano y fructifica en otoño (46, 47, 51).

1.2.3.4. HÁBITAT

La cerraja es una especie de origen norafricano, europeo y del oeste asiático. Actualmente es adventicia en todo el mundo. Crece en terrenos modificados de zonas templadas del planeta, entre los 760 y 1880 metros s.n.m.

1.2.3.5. HISTORIA

La denominación genérica *Sonchus* provendría del latín y sería el nombre que le asignó Teofrasto a esta planta por su similitud con el cardo.

Para otros el término derivaría del griego cuyo significado es «hueco», en alusión al tallo. En tanto *oleraceus* hace referencia a su carácter perfumado. Dioscórides le designó el nombre de *Sonco*, recomendándola para dolores de estómago y para estimular la secreción de leche. Los italianos la denominan *lactucella* ya que si se le corta el tallo, emana un látex lechoso.

Existen referencias que el navegante inglés J. Cook llevaba esta planta en sus navíos para evitar el escorbuto. Se piensa que fue introducida en América a partir de los primeros años de la conquista, de acuerdo con escritos sobre la flora chilena de Gerónimo de Bibar de 1558 (51).

1.2.3.6. PARTE UTILIZADA

En Europa emplean la parte aérea. En Sudamérica preferentemente la planta entera incluyendo el látex.

1.2.3.7. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Látex: fitosterina.

Flavonoides: apigenina, kaempferol, luteolina.

Otros: oxidasas, terpenoides, linarina, orisanthemina, cinarina, isocinarina, cosmosiína, crepidiásido A., vitamina C, glucosaluzanina C, pirísidos B y C, taraxasterol, macroclinísido A.

1.2.3.8. ACCIONES FARMACOLÓGICAS

Si bien es una planta muy empleada popularmente en los cinco continentes, hasta la fecha no se han realizado trabajos clínicos en humanos en ningún tópico.

Las supuestas bondades antimicrobianas y diuréticas señaladas por el uso popular no han encontrado aún suficiente sustento desde el punto de vista científico (49, 50).

Actividad Antimicrobiana

Distintos extractos (etanólico, acuoso y hexánico) elaborados con las hojas de cerraja no evidenciaros actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Diplococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella sp.* y *Candida albicans*. La actividad antifúngica frente a hongos productores de micosis superficiales y dermatomicosis tales como *Piedraia hortae*, *Microsporum canis* y *Trichophyton mentagrophytes* resultó moderada, señalándose al *taraxasterol* como el elemento inhibitorio principal. En tanto frente a hongos productores de micosis subcutáneos como *Phialophora jeanselmei* resultó negativa (46).

Otros

Extractos de la planta entera de cerraja no evidenciaron actividad diurética en modelos animales. El extracto acuoso ácido de la planta entera ha demostrado actividad antitumoral en el modelo animal de sarcoma 37, con la administración subcutánea de 0,015 g/k.

La presencia de *cinarina* (presente también en *Cynara scolymus* y aislada en 1931 por el francés C. Chabrol) e *isocinarina* le confiere a esta planta propiedades coleréticas, colagogas, hepatoprotectoras e hipocolesteromiantes. La infusión oral de las partes aéreas de *S. oleraceus* demostró en conejos que tanto esta planta como la tolbutamida disminuyen de manera significativa ($P < 0.05$) el pico hiperglucémico y el área bajo la curva de tolerancia a la glucosa con respecto al grupo de animales control que recibieron únicamente agua.

Finalmente, dentro del plano agronómico, la cerraja presenta una resistencia natural a algunos tipos de herbicidas como el clorsulfuron, a la vez que también presenta resistencia cruzadas a herbicidas conocidos como *ALS inhibitors* (inhibidores de la acetolactato-sintetasa).

El mecanismo de acción por el cual ofrece esta resistencia es aún desconocido (50).

1.2.3.9. EFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS

El látex de la planta fresca puede ocasionar dermatitis de contacto.

1.2.3.10. CONTRAINDICACIONES

No existen referencias sobre su inocuidad durante el embarazo y lactancia, por lo que no se recomienda su empleo en estas circunstancias hasta tanto se obtengan datos fidedignos de seguridad.

1.2.3.11. STATUS LEGAL

Esta especie cuenta con el reconocimiento del Ministerio de Sanidad de España para ser empleada medicinalmente en humanos.

1.2.3.12. USOS ETNOMEDICINALES

En Brasil emplean la planta entera en infusión como digestivo y diurético. Con la misma infusión se hacen aplicaciones externas para el lavado de heridas. En Bolivia emplean el cocimiento de la planta entera (o las hojas y tallos) para tratar cólicos hepáticos y alteraciones de la menstruación. También como depurador del organismo, sedante, colagogo y diurético. En menor medida como analgésico y antiinflamatorio en caso de gota (tanto por vía interna como externa). Las hojas frescas aplicadas en forma de cataplasma, como antiséptico en casos de heridas de piel. En tanto las hojas en decocción se recomiendan durante episodios de cefalea y constipación (46, 48,51).

En Guatemala las hojas en infusión se emplean como depurativo y antiséptico urinario. La infusión de la planta entera como febrífuga, antirreumática y hepatoprotectora. Por vía externa en casos de erisipela, urticaria y heridas de piel. En Perú la infusión de las hojas se recomienda en casos de úlceras, como digestivo, antiflatulento, antiespasmódico hepático e intestinal y como depurador sanguíneo.

En Argentina el cocimiento de las hojas se bebe durante accesos de tos, e inflamaciones renales y hepáticas, y por vía externa en la cura y cicatrización de úlceras varicosas (51).

Los Mapuches emplean la infusión de la raíz como refrescante y digestiva. En Tobago utilizan la infusión de las hojas en casos de gripe y resfríos. En Europa, además de su empleo como digestivo, también se le recomienda en presencia de ascitis.

En India las hojas en decocción se emplean como antiinflamatorias. En Tanzania utilizan la infusión en forma oral para tratar parásitos.

1.2.3.13 FORMAS GALÉNICAS

Infusión: 1 cucharada de postre por taza, Infundir 10 minutos. Tomar 3 tazas diarias, preferentemente después de las principales comidas.

1.2.3.14. USOS CULINARIOS

Se emplean los brotes tiernos y las hojas para ser ingeridos en ensaladas o sopas.

1.2.4. TIPO



1.2.4.1. NOMBRE CIENTÍFICO

Minthostachis mollis (H.B.K.) Gris.

Sinonimia: *Bytospogon mollis* Kunth.

1.2.4.2. NOMBRES POPULARES

Español: peperina, peperita, piperina, martin muña (Bolivia), burrito (Paraguay), muña, poleo silvestre (Perú, Ecuador).

Portugués: peperina.

1.2.4.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Se trata de un subarbusto aromático, perteneciente a la familia de las Lamiáceas (Labiadas), caracterizado por presentar una altura variable entre 0,30- 2 metros; tallos cuadrangulares pubescentes muy ramificados; hojas aovadas, obtusas, con bordes festoneados, de 1-5 cm de largo; flores pequeñas blancuecinas ubicadas densamente en las axilas de las hojas, que hacen su aparición en el verano. El fruto está compuesto por 4 núculas lisas (49, 51).

1.2.4.4. HÁBITAT

La peperina es originaria de las zonas templadas y soleadas de Sudamérica (Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina). En Argentina crece en la provincia de Córdoba y en menor medida en San Luis, Tucumán, Catamarca, Salta y Jujuy. Se encuentra silvestre en suelos ligeros, arenosos-arcillosos y levemente alcalinos. La recolección desmedida e irracional de esta especie en las zonas serranas de Argentina para la elaboración de bebidas aperitivas amargas ha puesto a esta hierba en peligro de extinción. En ese sentido la Facultad de Ciencias Agrarias de Córdoba, Argentina, está llevando a cabo tareas docentes sobre conservación, domesticación y mejoras en los rendimientos de los cultivos de peperina.

1.2.4.5. PARTE UTILIZADA

Hojas y sumidades floridas desecadas.

1.2.4.6. HISTORIA

La peperina fue y sigue siendo una planta muy empleada por las comunidades nativas y campesinados de Sudamérica. Fue descrita por vez primera en el siglo XVII como una planta semejante al orégano. Los indígenas del Perú la empleaban como resolutive de tumores, y sus hojas mezcladas con chilca eran recomendadas en fracturas de huesos. Hieronymus en 1882 descubrió que su aceite volátil podía ser de utilidad en casos de dolores reumáticos y debilidad crónica ocular (48).

1.2.4.7. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Aceite esencial (2-5 %): Compuesto principalmente por mentona (82%), pulegona (15,5%), d-isomentona, 1,8-cineol, carvona, α,β,γ -pineno, 1-limoneno, piperitona, ácidopiperínico. No contiene mentol. La composición de la esencia varía según las zonas geográficas. Por ejemplo en la provincia argentina de Córdoba el porcentaje de pulegona es del 35-64,3% (>verano) y el de mentona 21,6-52% (> otoño), careciendo de carvona (49).

Otros: flavonoides.

1.2.4.8. ACCIONES FARMACOLÓGICAS

La peperina es una especie ampliamente empleada en la elaboración de bebidas aperitivas-amargas en Argentina. En el resto de Sudamérica tiene empleo como eupéptico, y debido a la composición de su aceite esencial, como antimicrobiano de amplio espectro. Para una mejor comprensión se dividirán los ensayos biológicos realizados de acuerdo a la actividad terapéutica propuesta (50).

Actividad Antimicrobiana

Algunos ensayos preliminares indicaron una actividad inhibitoria de bacterias Gram (-) y del *Vibrio cholerae*, a partir de los componentes *mentona* y *pulegona* del aceite esencial (Mandrile E. et al., 1985). Diferentes extractos de peperina demostraron ser efectivos frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella Flexneri*, *Shigella enteritidis* (con una actividad similar a gentamicina y tetraciclina) frente a hongos de la familia *Trichophyton sp.* En cambio no se detectó actividad frente a *Salmonella typhi*. La actividad antimicrobiana sería patrimonio de la presencia de *pulegona* principalmente. Por otra parte se ha detectado actividad antiviral frente al HSV-1 (herpes simplex virus tipo 1) y virus pseudorrabia. En ambos casos se constató la atoxicidad celular del preparado.

El aceite esencial de la especie relacionada *Minthostachis andina*, debido a su contenido en *mentona*, ha resultado eficaz como insecticida frente a larvas de *Aedes aegypti* y larvas de huevos de *Triatoma infestans*, vector de la enfermedad de Chagas.

Por su parte, el extracto diclorometánico de la especie emparentada *Minthostachys setosa* ha demostrado *in vitro* actividad larvicida frente a *Aedes aegypti* con una $LC_{50}=9,2 \mu\text{g/mL}$ y una $LC_{100} = 25,2 \mu\text{g/mL}$. Esta actividad si bien se consideró como muy activa, resultó algo menor a la evidencia por extractos de *Abuta grandifolia* (46).

Actividad Digestiva

Una de las principales actividades terapéuticas de esta especie se encuadra dentro de las funciones digestivas actuando principalmente como estomáquico, antiespasmódico y antidiarreico.

En modelos animales de lesión gástrica inducida por etanol, la administración de una infusión al 10% de peperina evidenció actividad citoprotectora en el 68% de los casos. La especie *M. setosa* (oriunda del Perú) también demostró por medio de su aceite esencial, propiedades digestivas y antifatulentas.

1.2.4.9. EFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS

Las infusiones de peperina en dosis adecuadas por lo general son muy bien toleradas. Los efectos adversos y/o tóxicos están relacionados al contenido en cetonas terpénicas (*mentona* y *pulegona*) del aceite esencial, el cual en altas dosis puede ser convulsivante y hepatotóxico. También se ha reportado actividad mutagénica del aceite esencial de las hojas sobre cultivos de linfoblastos AHH-I en una concentración de 10 mg/mL (46).

1.2.4.10. CONTRAINDICACIONES

El aceite esencial está contraindicado en el embarazo y lactancia.

1.2.4.11. STATUS LEGAL

La peperina se encuentra registrada en la 5ª Edición de la Farmacopea Nacional Argentina. A su vez, las hojas de peperina figuran en el anexo III de la Resolución n° 2673, referido a aquellas plantas que no deben acompañar estudios de toxicidad para su riesgo comercial.

1.2.4.12. ADULTERACIONES

Existen confusiones en la identificación de productos que se venden en algunas herboristerías y dietéticas de Argentina. Frecuentemente se ofrece la hierba como *menta piperina*, lo cual puede traer confusiones con *Mentha x piperita* o incluso con *Mentha pulegium*. A su vez, la especie *Satureja odora* (de propiedades digestivas) también recibe el nombre de peperina en el noroeste de Argentina, lo cual lleva a confusiones. El análisis micrográfico permite identificar correctamente cada una de estas especies.

1.2.4.13. USOS ETNOMEDICINALES

Las hojas y sumidades de peperina son muy empleadas en forma de infusión como eupépticas, antiespasmódicas y antidiarreicas. En atención primaria de salud en el noroeste de Argentina fue empleada para combatir el cólera.

En Bolivia, aparte de los usos arriba señalados, se emplea como antiflatulento (igual que en Perú), emenagogo, antiácido, contra temblores nerviosos y palpitaciones cardíacas.

También como insecticida para erradicar el vector de la Enfermedad de Chagas. Las hojas aplicadas sobre heridas sangrantes presentan efecto hemostático (47, 48).

1.2.4.14. FORMAS GALÉNICAS

Infusión – Decocción: 10g/L. Se recomiendan 2 tazas diarias después de las comidas.

Tintura: A razón de 25-30 gotas, 3-4 veces al día.

1.2.4.15. OTROS USOS

La peperina se emplea como saborizante y aromatizante en la elaboración de licores y bebidas amargas. El aceite esencial tiene propiedades conservantes. (2)

1.3 RADICALES LIBRES DE OXÍGENO, SUPERÓXIDO, PERÓXIDO E HIDROXILO

1.3.1. PROPIEDADES QUÍMICAS DEL OXÍGENO

La importancia del oxígeno, del agua y de los alimentos (energía) para el bienestar de los seres humanos es bastante reconocida. De estos tres componentes esenciales, la falta de oxígeno es la que lleva más rápidamente a la muerte.

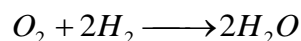
El deterioro de la disponibilidad de oxígeno por oclusión patológica de vasos sanguíneos produce enfermedades graves. A menudo los seres humanos sufren daño cerebral o muerte debido a ataques, e incapacidad o muerte debido a oclusión de las arterias coronarias. Las células cerebrales sólo sobreviven entre 3 y 5 minutos sin oxígeno, y mueren cuando las condiciones de anoxia duran más tiempo (35, 46).

Las células del corazón, del hígado y del riñón pueden sobrevivir de 30 minutos a dos horas sin oxígeno. En contraste, los fibroblastos del músculo esquelético y las células de la piel pueden sobrevivir varias horas sin oxígeno.

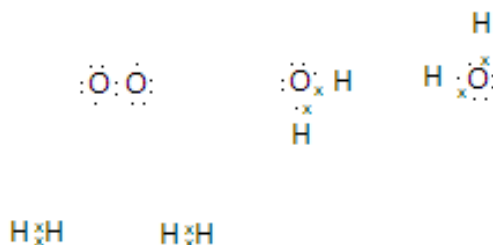
Considérense las propiedades del oxígeno que le permiten sustraer electrones de otras sustancias con facilidad. El oxígeno molecular tiene deficiencia de electrones y puede ilustrarse como se muestra enseguida, donde los puntos representan electrones.



Cada átomo de oxígeno carece de un octeto completo de electrones. Además, la molécula de oxígeno contiene dos electrones no compartidos. La reducción completa del oxígeno para formar agua puede indicarse formalmente como en la ecuación que se ilustra a continuación.



Las x indican electrones derivados del hidrógeno. La reducción del oxígeno molecular a agua incluye cuatro electrones y cuatro protones.



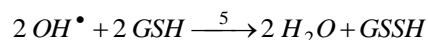
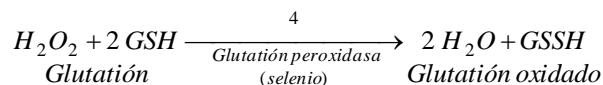
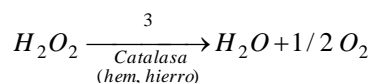
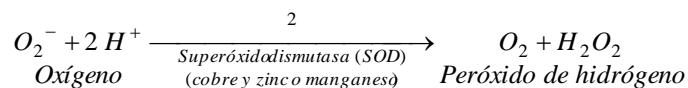
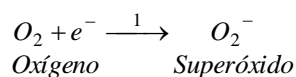
El oxígeno es un buen agente oxidante porque está deficiente en electrones. Además, es electronegativo y tiene gran tendencia a atraer electrones hacia sí mismo (a oxidar a otras sustancias), pero poca tendencia a dar sus electrones. La oxidación del agua para formar oxígeno molecular es altamente endergónica (35, 37).

1.3.2. INTERMEDIARIOS REACTIVOS DEL OXÍGENO

La reacción del oxígeno con un solo electrón ocasiona la formación del radical aniónico superóxido. La formación del superóxido puede ocurrir por una reacción espontánea (no enzimática) del oxígeno con el ión ferroso, otros metales o metabolitos de oxidorreducción reactivos.

El superóxido es una sustancia reactiva tóxica que puede causar la modificación de proteínas celulares, ácidos nucleicos y lípidos en las membranas. La superóxido dismutasa cataliza la conversión de dos aniones superóxido (y dos protones) a oxígeno y peróxido de hidrógeno.

Una dismutación es una reacción en la cual dos moléculas idénticas son convertidas a sustancias diferentes. Aquí, una molécula de superóxido es oxidada y la otra es reducida. Los peróxidos resultan de la reacción del oxígeno con dos electrones (36, 37).



Metabolismo del superóxido y del peróxido. El glutatión es un tripéptido constituido por γ -glutamilcisteinilglicina. El grupo $-SH$ contribuido por la cisteína sirve como reductor.

La superóxido dismutasa juega un papel clave en la protección contra la toxicidad del oxígeno. Las superóxido dismutasas se encuentran en todos los organismos aerobios y están ausentes en los anaerobios obligados. Las células humanas contienen dos tipos de dismutasa. La enzima del citoplasma consiste en dos subunidades idénticas, las cuales tienen ambas un átomo de cobre y un átomo de zinc. La enzima mitocondrial contiene dos átomos de manganeso por proteína monomérica. Las superóxido dismutasas de las bacterias también poseen dos átomos de manganeso (36).

Se ha informado de una forma familiar de esclerosis amiotrófica lateral (enfermedad de Lou Gehrig), trastorno encefálico degenerativo, que al parecer se debe a una anomalía de la superóxido dismutasa del citoplasma o de cobre y zinc.

El superóxido se forma en las células y tejidos después de isquemia y reperfusión. La inyección intravenosa de superóxido dismutasa se está probando clínicamente después de oclusión coronaria con el fin de disminuir la posible toxicidad del superóxido después de esos daños patológicos (38).

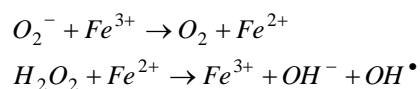
La reducción de dos electrones del oxígeno molecular produce peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es una sustancia reactiva que puede modificar macromoléculas celulares y es tóxica. El peróxido de hidrógeno se convierte a oxígeno y agua por la catalasa o por la glutatión peroxidasa.

Las soluciones de peróxido de hidrógeno se usan como desinfectantes y para el tratamiento de infecciones de heridas. El peróxido de hidrógeno también es producido por los leucocitos y macrófagos que matan a las bacterias invasoras.

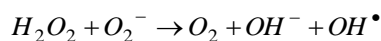
Un tercer derivado de oxígeno tóxico es el radical libre hidroxilo, el cual es más reactivo y tóxico que el superóxido y que el peróxido.

El radical libre hidroxilo se puede formar a través de una reacción del peróxido de hidrógeno con hierro ferroso por la reacción de Fenton. También se forma por la reacción del superóxido con el peróxido de hidrógeno por la reacción de Haber-Weiss (39).

Secuencia de la reacción de Fenton



Secuencia de la reacción de Haber-Weiss



Además, el radical libre de hidroxilo puede formarse por radiólisis del agua producida por rayos cósmicos, rayos X y otras radiaciones electromagnéticas. El radical libre de hidroxilo reacciona con macromoléculas celulares y las modifica. Puede ser destruido por su reacción con ascorbato, β -caroteno o vitamina E. Estas acciones pueden participar en los efectos antioxidantes benéficos y protectores de estas vitaminas. El radical libre de hidroxilo también puede ser destruido por su reacción con el glutatión. (12)

En la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se han llevado a cabo múltiples investigaciones a cerca de la actividad antioxidante, citando aquellas de mayor relevancia, tenemos;

El “Estudio Etnobotánico y de Actividad Biológica de 10 Plantas de San Pablo Pulingui, Reserva Faunística de Chimborazo”, de autoría de: Vásquez Costales Héctor Rubén; cuyo resumen es el siguiente:

La Reserva de Producción Faunística de Chimborazo es sumamente rica en especies florísticas. Nuestro interés fue el de estudiar el potencial medicinal de algunas de estas plantas, se realizó un estudio etnobotánico para obtener una base de datos de 58 especies vegetales; las mismas que fueron debidamente identificadas taxonómicamente. De estas plantas se escogieron a las 10 más promisorias para proseguir con el estudio de la actividad biológica *in vitro*, así tenemos: *Perezia multiflora*, *Bidens andicola*, *Hypochoeris sessiliflora*, *Astragalus geminiflorus*, *Loricaria ilinissae*, *Werneria nubigena*, *Chaqui raga jussieui*, *Culcitium canescens*, *Valeriana microphylla* y *Calceolaria ferruginea*. En la evaluación de la actividad biológica de las plantas seleccionadas se utilizó, para la determinación de la actividad antioxidante, el Método Enzimático de Inhibición de la Polifenoloxidasas extraída de la manzana.

La “Determinación del Potencial Nutritivo y Nutraceutico de Cuatro Cultivares de Tomate de Arbol (*Solanum betaceum Cav*)”, de autoría de; Torres Basantes Nelly Rocío, que en su parte medular describe:

La presente investigación tiene como propósito determinar el potencial nutritivo - nutraceutico y establece índices de calidad para cuatro cultivares de tomate de árbol (*S. betaceum Cav*), así como la caracterización química de la pared celular de dos cultivares comerciales. Se utilizó los cultivares: Anaranjado gigante, Morado gigante, Mora ecuatoriano y Amarillo pintón, en su estado de madurez comestible cosechadas en las zonas productoras. En los cuales se evaluaron: peso, relación largo/diámetro, firmeza, rendimientos, color interno y externo, humedad, cenizas, pH, acidez titulable, vitamina C, sólidos solubles, azúcares totales y reductores, polifenoles y carotenoides totales, antocianinas, minerales, ácidos orgánicos y azúcares por HPLC, y el poder antioxidante.

La vitamina C, carotenoides, antocianinas y polifenoles, establecen el aporte de compuestos antioxidantes presentes en el tomate de árbol, resultados que orientan a esta fruta con una gran importancia nutracéutica.

El poder antioxidante total obtenido mediante la metodología del Oxygen Radical Absorbance Capacity, presenta un contenido de 7,2 μmol trolox/g muestra para el cultivar Amarillo pintón.

El “Estudio de la Actividad Biológica (quimioprevención), en Extracto Acuoso y Acetato Etilico de Diez Plantas del Oriente Ecuatoriano” cuya autora es; Freire Celleri Mónica Patricia, el resumen de su trabajo de investigación es:

Con el objeto de encontrar sustancias biológicamente activas en la quimioprevención del cáncer, fueron seleccionadas diez plantas en la Estación Experimental Pastaza de la ESPOCH, Puyo, provincia de Pastaza: *Heisteria acuminata*, *Gonzalagunia bunclosoides*, *Leonia glydicarpa*, *Campsonera capitellata*, *Ocotea albigemma*, *Duroia hirsuta*, *Lazania klugii*, *Licania intrapetiolaris*, *Gonzalagunia diccoca* y *Pleurothyrium poeppigii*. Los ejemplares de herbario fueron recolectados, herborizados e identificados en el Herbario Nacional y confirmados en el Museo de Chicago, 36 extractos de 10 plantas: 18 acuosos y 18 en acetato de etilo, fueron analizados en 6 bioensayos; 4 plantas presentaron actividad antioxidante: *H. acuminata*; *C. capitellata*; *O. albigemma*; *D. hirsuta*; *L. klugii*; *L. intrapetiolaris*. Se realizó el fraccionamiento y subfraccionamiento de la muestra activa, *H. acuminata*, reportando y confirmando su actividad antioxidante y de inhibición de la ciclooxigenasa (IC 50 = 9.4 y 95% de inhibición respectivamente). La muestra de la especie seleccionada *H. acuminata*, fue analizada utilizando el método del electrospray-HPLC/MS, estableciéndose la presencia de posibles compuestos, probables responsables de su actividad antioxidante (+) Catequina o (-) Epicatequina y un glicósido de la Naringenina.

La “Producción de Néctares de Tres Variedades de Manzana Cultivadas en el Cantón Penipe” del autor Lara Padilla Luis Rubén. El resumen del trabajo versa:

La presente investigación tiene por objetivo producir néctares de 3 variedades de manzana (*Pirus malus*) con el propósito de dar un valor agregado a esta fruta e incrementar el nivel socio económico de la población del cantón Penipe. Se elaboraron néctares de tres variedades de manzana producidas en el cantón: Granny Smith, Emilia y Delicia.

Los néctares fueron elaborados según los procedimientos de: selección, lavado, pelado, escaldado, pulpeado, refinado, estandarizado, homogenizado, pasteurizado y envasado.

Una vez elaborados los néctares se buscó encontrar las mejores condiciones de estabilidad del néctar para lo cual se han combinando variables como: pH, acidez, estabilizante y grados Brix hasta encontrar un producto estable y de buena apariencia para cada una de las tres variedades, la calidad de los productos se determinó mediante los siguientes análisis: sensorial mediante test de catación; físico, realizado en su mayoría mediante técnicas instrumentales; químico, usando técnicas convencionales e instrumentales; la calidad del néctar se determina cuando no forman capas, los valores apropiados resultan a un pH de 3.11 a 3.6, una concentración de estabilizante de 0.07% de CMC, una concentración de 16° Brix de sólidos solubles, como antioxidante: ácido ascórbico al 2% y no hay presencia de microorganismos.

La “Determinación del Potencial Nutritivo y Nutracéutico de Dos Ecotipos de Uvilla (*Physalis peruviana* L.) y Granadilla (*Passiflora ligularis* L.)” de autoría de Medina Villegas Gioconda Aracely, la síntesis del contenido es:

El objetivo de la investigación es Caracterizar Física, Química y Nutricionalmente, el ecotipo Golden Keniana de Uvilla (*P. peruviana* L.) cultivadas en Ecuador y Colombia, y la Granadilla (*P. ligularis* L.) de los ecotipos Nacional y Colombiana cultivadas en Ecuador, se evaluaron los siguientes parámetros en las frutas: firmeza, peso, relación largo/diámetro, rendimientos, color interno y externo, pH, acidez titulable, humedad, cenizas, sólidos solubles, azúcares totales y reductores, vitamina C, macro y micro elementos, ácidos orgánicos y azúcares por HPLC, polifenoles y carotenoides totales y el poder antioxidante. Con los resultados obtenidos se confirma la calidad organoléptica, el valor nutritivo y nutracéutico que proporcionan estas frutas, cuyas características se ven reflejadas en el contenido de minerales y en su poder antioxidante, parámetros de importancia para su consumo en fresco o procesado.

La “Evaluación Nutritiva y Nutraceutica de la Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) Deshidratada a Tres Potencias por el Método de Microondas”, su autora fue la señorita Villarroel Badillo Verónica Paulina; la sinopsis de su trabajo es:

El objetivo de la investigación es desarrollar un estudio extensivo del proceso de secado para evaluar la acción nutritiva y nutracéutica de la mora de castilla (*R. glaucus*) por el método de microondas, en el tratamiento de deshidratación se aplico un equipo sencillo y doméstico como es el microondas.

Determinando la eficiencia por medio de dos factores importantes como son la vitamina C y los antocianos componentes con propiedades excelentes y sobre todo poderosos antioxidantes, se recomienda que el estudio de secado por el método de microondas, se realice con otros productos perecederos, al mejorar la técnica se estará obteniendo un nuevo método de conservación útil para todo el sector alimenticio, por ser rápida y de fácil aplicación, beneficiándonos de sus bondades y nutrientes aún fuera de temporada.

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación ha sido llevada a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.2. MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1. MATERIAL VEGETAL

En la experimentación se usaron muestras de las especies vegetales procedentes de la comunidad Chañag, que se encuentra al noreste, a una hora y media de la cabecera cantonal, perteneciente a la parroquia Quimiag, del cantón Riobamba, provincia de Chimborazo; a continuación se exponen las características del material vegetal objeto de estudio.

| | | | |
|--|---|--|---|
| Familia: Myrtaceae Género: <i>Eugenia</i> Especies: <i>Eugenia halli</i> | Familia: Polypodiaceae Género: <i>Polypodium</i> Especies: <i>Polypodium calaguala</i> | Familia: Compositae (Asteraceae) Género: <i>Sonchus</i> Especies: <i>Sonchus oleraceus</i> | Familia: Lamiaceae (Labiatae) Género: <i>Mynthostachis</i> Especies: <i>Mynthostachis mollis</i> |
| Descripción: Parte utilizada para el ensayo: parte aérea (hojas). Peso Promedio de las muestras vegetales secas: 200±25 g Edad: 30 años | Descripción: Parte utilizada para el ensayo: parte aérea (hojas). Peso Promedio de las muestras vegetales secas: 200±25 g Edad: 2 años | Descripción: Parte utilizada para el ensayo: parte aérea (hojas, tallos, flores). Peso Promedio de las muestras vegetales secas: 200±25 g Edad: 1 año | Descripción: Parte utilizada para el ensayo: parte aérea (hojas, tallos, flores). Peso Promedio de las muestras vegetales secas: 200±25 g Edad: 2 años |

Condiciones:

Humedad Relativa promedio: $55\% \pm 10$

Temperatura promedio: $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$

Presión atmosférica promedio: $748\text{ mm Hg} \pm 4$

Latitud: $1^{\circ} 39' 58''$ S

Longitud: $78^{\circ} 39' 33''$ O

Clima: 14° C a 23° C (38)

2.2.2. EQUIPOS

Balanza analítica (BOEHCO), Balanza técnica (BOEHCO), Estufa (MEMMERT) para secado de material, Colorímetro (SPECTRONIC 20D), Motor rotatorio, Centrífuga (CLAY ADAMS), Mufla (SNOL), Evaporador rotatorio (HEIDOLPH), Bomba de vacío (GAST), Espectrofotómetro (HELYOS β).

2.2.3. MATERIALES DE LABORATORIO Y OTROS

Balones esmerilados para destilación de 25, 50 y 250 mL

Balones aforados con tapa de 10, 25, 50 y 100 mL marca PYREX

Vasos de Precipitación de 25, 50, 100 y 250 mL marca PYREX

Matraces Erlenmeyer de 250 mL

Probetas de 50 y 100 mL marca PYREX

Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10 mL

Pipetas 1, 5, 10 mL

Picetas

Embudos de separación

Embudos

Crisoles de porcelana

Cápsulas de porcelana

Tubos de ensayo

Pinza para crisoles

Pinzas universales

Reverbero

Trípodes

Espátulas

Papel filtrante analítico

Papel aluminio

Jeringas de 3 mL marca NYPRO

Mangueras

Material de escritorio

Técnicas y preparación de reactivos documentado

2.2.4. REACTIVOS

Pirocatecol 99% marca MERCK

Sodio acetato 99% marca MERCK

Ácido acético glacial 99.9% marca MERCK

Dimetilsulfóxido marca MERCK

Cloroformo MERCK

Éter MERCK

Etanol potable 95%

Reactivos para tamizaje fitoquímico

2.3. METODOLOGÍA

El método general utilizado se basó en la valoración *in vitro* de la dosis efectiva de las fracciones: clorofórmica, etanólica y acuosa; contenidas en cada uno de los extractos de arrayán, calaguala, canayuyo y tipo; para apreciar el efecto inhibitorio a la oxidación causado por un agente enzimático activo extraído de la pulpa de manzana (polifenoloxidasas), sobre un sustrato específico (catecol), a su vez empleando ácido ascórbico, como patrón antioxidante. La técnica usada para la preparación y fraccionamiento de los extractos es la descrita en el Manual de Técnicas de Investigación del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) de 1995.

2.3.1. FASE DE LABORATORIO

Determinación de la actividad antioxidante de los extractos clorofórmico, etanólico y acuoso de arrayán (*E. halli*), calaguala (*P. calaguala*), canayuyo (*S. oleraceus*) y tipo (*M. mollis*).

2.3.1.1. Diseño Experimental

En el experimento se trabajó con tres concentraciones por cada fracción, es decir; que para cuatro especies vegetales propuestas se obtuvieron un total de treinta y seis variantes por lote experimental. Además se realizaron tres réplicas para la verificación de los resultados obtenidos.

FACTOR EN ESTUDIO

Dosis efectiva de extracto (fracciones: clorofórmica, etanólica y acuosa), contenidos en la parte aérea de arrayán (*E. halli*), calaguala (*P. calaguala*), canayuyo (*S. oleraceus*) y tipo (*M. mollis*).

TRATAMIENTOS

CUADRO No. 1 TRATAMIENTOS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

| VARIABLES DE PROCESO | ESPECIE VEGETAL | SOLVENTE DE EXTRACCIÓN | CONCENTRACIÓN DE ESPECIE VEGETAL EN LOS EXTRACTOS |
|----------------------|----------------------------------|------------------------|---|
| | Arrayán (<i>Eugenia halli</i>) | Cloroformo | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |
| | | Etanol | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |

| | | | |
|---------|---|------------|------------|
| NIVELES | | Agua | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |
| | Calaguala (<i>Polypodium calaguala</i>) | Cloroformo | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |
| | | Etanol | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |
| | | Agua | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |
| | Canayuyo (<i>Sonchus oleraceus</i>) | Cloroformo | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |
| | | Etanol | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |
| | | Agua | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |
| | Tipo (<i>Mythostachis mollis</i>) | Cloroformo | 1000 µg/mL |
| | | | 100 µg/mL |
| | | | 10 µg/mL |
| Etanol | | 1000 µg/mL | |
| | | 100 µg/mL | |
| | | 10 µg/mL | |
| Agua | | 1000 µg/mL | |
| | | 100 µg/mL | |
| | | 10 µg/mL | |

UNIDAD EXPERIMENTAL:

QUÍMICA:

CANTIDAD POR CADA ESPECIE VEGETAL PULVERIZADA = 200 g \pm 25

CANTIDAD DE CATECOL = 5 g \pm 1

2.3.1.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para los ensayos de actividad biológica se preparan en general dos extractos, a partir del material seco y molido (40-60 mesh).

EXTRACTO EN ETANOL

Se prepara por maceración, con agitación frecuente durante 12 horas a temperatura ambiente; repetir dos veces más la misma operación, o bien someter el material a percolación con etanol de 95% (o metanol). Se filtra y el filtrado se concentra a sequedad en evaporador rotatorio a $<40^{\circ}\text{C}$.

FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS

Para el fraccionamiento del extracto alcohólico, se recomienda una partición entre agua y diclorometano (o cloroformo).

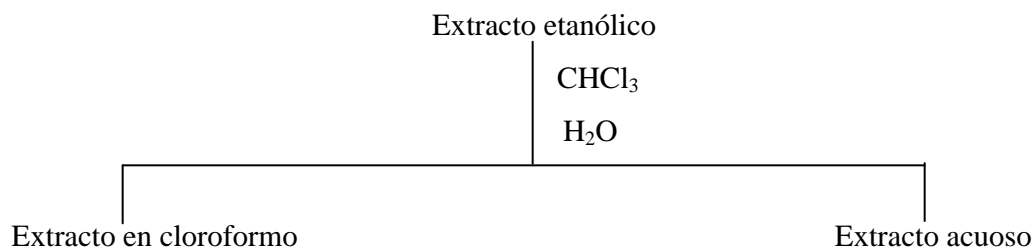


Fig. 4 Esquema del fraccionamiento de extractos.

Alternativamente, se puede preparar un extracto acuoso según la metodología empleada en la medicina popular, en una proporción no mayor del 10% P/V. Se filtra al vacío, lavando el residuo vegetal. Se concentra parcialmente el filtrado en evaporador rotatorio y se liofiliza posteriormente. El extracto liofilizado debe conservarse a 4°C (17).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

ENSAYO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE SEGÚN EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA

-Reactivos y técnica

-Extracto Enzimático

Se homogeneiza 10g de pulpa de manzana en 20mL de buffer acetato de sodio/ácido acético 20mM (pH 5). Se centrifuga a 20.000rev/min y se utiliza el sobrenadante como solución enzimática.

-BUFFER

Acetato de sodio/ácido acético 20mM pH 5. Se prepara primeramente las soluciones de acetato de sodio y ácido acético de la siguiente manera:

Solución concentrada A: Se diluye 11,55mL de ácido acético glacial (CH_3COOH) en un litro de agua destilada (solución 0.2M).

Solución concentrada B: Se diluye 16,41g de acetato de sodio anhidro (CH_3COONa) ó 27,22g de acetato de sodio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada (solución 0.2M también).

Se mezclan los volúmenes de soluciones concentradas presentadas a continuación, y se aforó a 100mL con agua destilada para obtener los valores mencionados de pH.

| mL A | mL B | pH final |
|------|------|----------|
| 14,8 | 35,2 | 5,0 |

SUSTRATO:

Catecol 0,5M preparado en el buffer acetato. Para lo cual se pesa exactamente 0,2752g de catecol (peso molecular 110,06g/mol) y se diluye con 5mL de buffer acetato de sodio/ácido acético cantidad que es suficiente para los análisis. Cabe destacar que el catecol se prepara para cada análisis ya que se degrada fácilmente por factores ambientales tales como la luz y el oxígeno del aire.

MUESTRA A ENSAYAR:

Las muestras de las que se mide la capacidad antioxidante son preparadas a tres diferentes concentraciones: 10.000µg/mL, 1000 µg/mL y 100 µg/mL, de manera que al ser agregadas las otras sustancias las concentraciones finales son de: 1000 µg/mL y 100 µg/mL y 10 µg/mL.

A estas muestras se las prepara pesando 0,0500g del extracto de la planta (se anota en el libro record la cantidad exacta) se pasa a un vial limpio y seco diluyéndola con 5mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) lo que da como resultado tener una solución con una concentración de 10.000µg/mL.

Sucesivamente se realiza diluciones al décimo para obtener las concentraciones de 1000 µg/mL y 100 µg/mL. Al agregar las otras soluciones como son el catecol, el extracto enzimático y el buffer se obtiene las siguientes concentraciones: 1000 µg/mL y 100 µg/mL y 10 µg/mL que se considerarán responsables de la actividad antioxidante.

EL ANTIOXIDANTE:

Como agente antioxidante positivo se utiliza la vitamina C a una concentración de 1000 µg/mL que al final de la dilución con el catecol, el extracto enzimático y el buffer resulta ser de 100 µg/mL. Dicha solución se la prepara diluyendo 0,0500g de vitamina C en 5mL de buffer 10.000µg/mL; se la diluye al décimo con buffer y se obtiene la solución de 1000 µg/mL.

La adición del solvente, la muestra, el sustrato, y las enzimas se realiza directamente a la cubeta en la cual se llega a un volumen final de 1mL. Se da inicio a la reacción mediante la adición de extracto enzimático y se comienza inmediatamente a leer y anotar la absorbancia.

Se anotaran las lecturas que da el fotómetro cada 15 segundos desde el inicio del experimento hasta que hayan transcurrido 120 segundos. Es decir se realizan ocho lecturas.

Primeramente se lleva a cero el aparato con buffer acetato, ya que este es el solvente que interviene en mayor volumen dentro del experimento. Se lee primeramente el blanco, luego las diluciones de muestra de menor a mayor concentración y por último un testigo positivo; la vitamina C a 100 µg/mL que efectivamente tiene poder antioxidante. Este procedimiento se repite por dos ocasiones más en cada muestra.

A continuación se expone el esquema del procedimiento a seguir:

| Volumen en mL | Blanco | Muestra 1° dilución | Muestra 2° dilución | Muestra 3° dilución | Antioxidante Vitamina C |
|------------------------|--------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| Buffer Acetato | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 |
| Sustrato catecol | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Muestra | - | 0.1 | 0.1 | 0.1 | - |
| Extracto enzimático | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Antioxidante | - | - | - | - | 0.1 |

Se considera como inhibición nula la absorbancia correspondiente al blanco, en el que las enzimas actuaron libremente sobre el catecol. Asimismo, se toma como inhibición absoluta la que presenta la cubeta con el antioxidante de poder previamente probado. El porcentaje de inhibición se determina relacionando la lectura del blanco con la lectura de cada uno de los extractos.

MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE DROGAS CRUDAS. PARÁMETROS DE CONTROL DE LA CALIDAD

Mediante el empleo de los métodos físico-químicos de análisis puede determinarse y establecerse la calidad de una droga, así como, completar su identificación.

La evaluación físico-química de las drogas comprende diferentes métodos, algunos de los cuales se describen a continuación.

DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN ÁCIDO.

Se denominan cenizas totales al residuo inorgánico que se obtiene al incinerar una droga, fundamentalmente en su determinación gravimétrica.

Las cenizas solubles en agua son aquella parte de las cenizas totales que se disuelven en agua y las ácido insolubles, el residuo que se obtiene después de la disolución de las cenizas totales en ácido clorhídrico al 10%.

DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES.

Se determina la masa de no menos de 2,0 g ni más de 3,0 g de la porción de ensayo pulverizada y tamizada con una desviación permisible de 0.5mg en un crisol de porcelana o platino (en dependencia de la sustancia analizada) previamente tarado. Caliente suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente incinere en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, si no se señala otra temperatura en la norma específica, durante 2h.

Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5mg por g (masa constante)

Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco.

Expresión de los resultados:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA.

A las cenizas totales obtenidas en A, se le añaden de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapa y se hierve suavemente a la llama del mechero durante 5min. La solución se filtra a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla de 700-750 °C, durante 2h. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante.

Expresión de los resultados.

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100$$

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M₂ = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M₁ = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO.

Procedimiento.

A las cenizas totales obtenidas según la técnica, se le añaden de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviente durante 10min. Se lava el vidrio reloj con 5mL de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel de filtro libre de cenizas; se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico p.a; al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L, no muestre presencia de cloruros. El filtrado con el residuo se deseca de 100 a 105 °C, se transfiere al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700-750 °C durante 2h (si no se señala otra temperatura en la norma específica) Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante.

Expresión de los resultados

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

M₂= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Introducción.

La presencia de exceso de agua en las drogas vegetales, puede promover el crecimiento de hongos, insectos y la hidrólisis de constituyentes que pueden provocar el deterioro de la droga.

Es por ello, que los límites en el contenido de agua deben ser determinados para las drogas vegetales, especialmente para aquellas que absorben fácilmente la humedad o en las cuales el deterioro puede ser promovido por la presencia de un exceso de agua.

Los límites de agua usualmente establecidos en las farmacopeas oscilan entre 8 y 14% con pocas excepciones. Los dos métodos más usados para determinar el contenido de agua en las drogas vegetales son el gravimétrico (pérdida por desecación) y el azeotrópico (destilación con tolueno). El método gravimétrico es el más fácil, pero no es aplicable a drogas que contengan sustancias volátiles. El método azeotrópico requiere de un equipo especial, lo cual comparativamente dificulta su uso, pero es aplicable a drogas que contengan sustancias volátiles.

PÉRDIDAS POR DESECACIÓN. MÉTODO GRAVIMÉTRICO.

Se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida en masa que muestra una droga después de ser desecada en la estufa.

Procedimiento.

De la muestra de laboratorio, con el grado de trituración que determine la norma específica, se pesan 2g con desviación permisible de 0.5 mg y se transfieren a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C hasta masa constante; seguidamente se deseca a 105 °C durante 3h. La cápsula se coloca en la desecadora donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa, colocándose nuevamente en la estufa durante 1h, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante.

Expresión de los resultados:

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Hg = pérdida en peso por desecación (%).

M₂ = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M₁ = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES.

Se basa en la extracción de las sustancias solubles en agua, alcohol o mezclas hidroalcohólicas, mediante maceración y evaporación hasta sequedad de una alícuota del extracto.

Procedimiento.

De la muestra de ensayo previamente pulverizada y tamizada, se pesan exactamente 5 g y se transfieren a un erlenmeyer de 250 mL; se añaden 100 mL del disolvente, se tapa y se agita durante 6 h, dejándose en reposo hasta el día siguiente; se agita 30 min, se deja reposar alrededor de media hora más y se filtra por papel. Se toma una alícuota de 20 mL que se transfiere a una cápsula previamente tarada. Se evapora sobre baño de agua, se deseca en estufa a 105 °C durante 3h, se enfría y se pesa.

Expresión de los resultados.

$$Ss = \frac{R.500.100}{M(100-H)}$$

Ss = sustancias solubles (%).

H = humedad de la muestra (%)

500 y 100 = factores matemáticos para los cálculos.

R = residuo de la muestra (g)

M = masa de la muestra (g).

ESTUDIO QUÍMICO CUALITATIVO.

Antes de realizar la extracción completa de la muestra a ser analizada, es necesario llevar a cabo pruebas preliminares sencillas y rápidas que permitan detectar cualitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos. Esto se logra mediante las técnicas de "screening" (tamizaje), que se ayudan de la microquímica para evidenciar estos grupos de constituyentes mediante formación de precipitados, coloraciones.

Estas reacciones se caracterizan porque son selectivas para las clases o grupos de compuestos que se investigan, son simples y rápidas, detectan la mínima cantidad posible y utilizan un mínimo de equipo de laboratorio.

No debe olvidarse que cuando se obtiene un resultado negativo, este puede deberse a la ausencia de la clase de compuestos buscada, a la selección errónea del solvente para extraer, a la presencia de sustancias extrañas que interfieran o a una concentración en el orden de trazas del compuesto ensayado. Con relación a la selección del disolvente, este da lugar a diferentes métodos o esquemas de trabajo para el tamizaje fitoquímico.

TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Introducción.

En el desarrollo de esta actividad se persigue el aprendizaje y aplicación de técnicas de tamizaje al material vegetal fresco, seco o en forma de extracto blando o seco.

En este caso se emplea un esquema general que utiliza la extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente.

Para el desarrollo de esta actividad es necesario recordar las reacciones químicas estudiadas en las asignaturas precedentes y revisar otras reacciones de mayor especificidad para cada grupo en su libro de texto.

Parte experimental.

Materiales y reactivos.

- Gradillas
- Éter etílico
- Tubos de ensayo
- Etanol.
- Agua destilada
- Reactivos del tamizaje.

Procedimiento:

La planta fresca, seca o el residuo de una extracción; es sometida a tres extracciones sucesivas según el esquema de la Fig. 21, a cada extracto I, II y III, se le mide el volumen obtenido y se le calcula su concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto.

Para ello tome una alícuota de 5 mL y páselo a una cápsula previamente tarada, evapore a sequedad en baño de agua y pese nuevamente. Se procede de igual forma que la técnica descrita para la determinación de sustancias solubles.

Ensayo de Sudan: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.

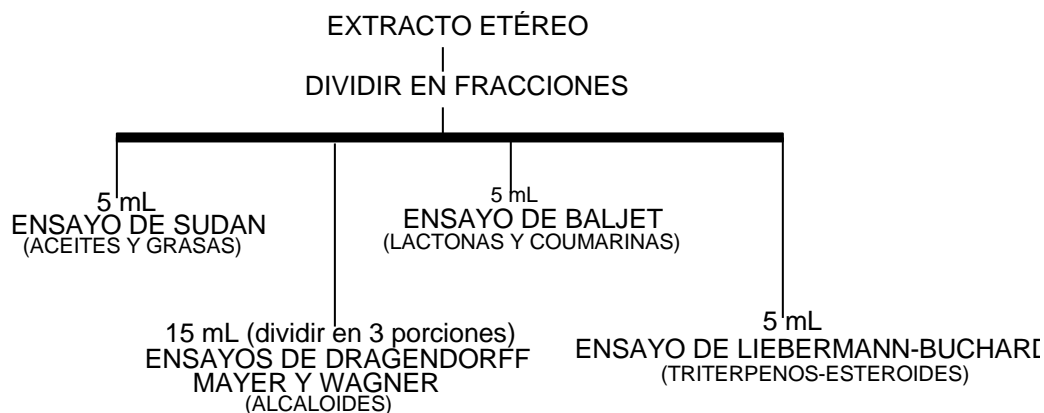


Fig. 5 Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico.

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente.

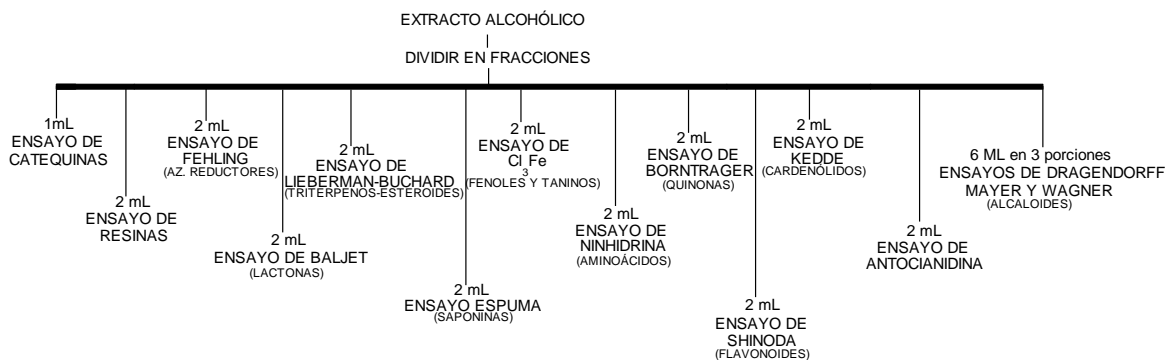


Fig. 6 Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.

Ensayo de Dragendorff: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez).

Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

Ensayo de Mayer: Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

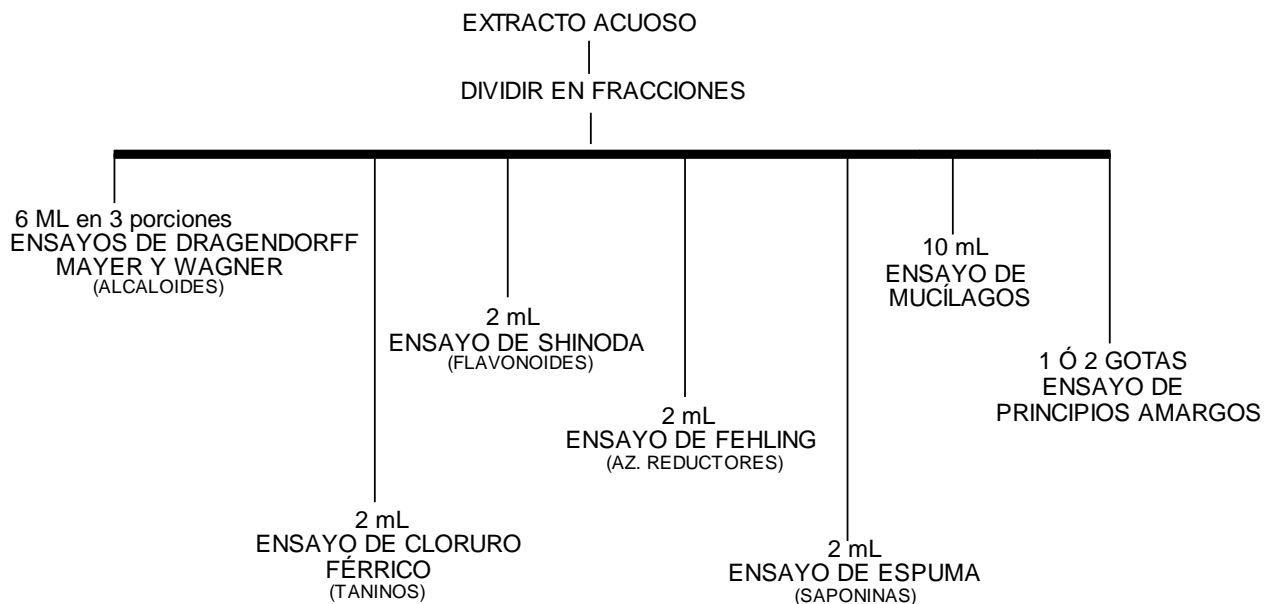


Fig. 7 Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.

Ensayo de Wagner: Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

Ensayo de Baljet: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.

Ensayo de Hidroxamato férrico para coumarinas: Una gota del extracto se coloca en una placa de porcelana y se añade una gota de clorhidrato de hidroxilamina disuelto en etanol al 10 %. Se añaden unas gotas de hidróxido de potasio al 10% en etanol y se calienta a la llama hasta burbujeo, se añaden unas gotas de ácido clorhídrico 0.5 mol/L y una gota de cloruro férrico al 1% en agua. El desarrollo de una coloración violeta (+), claro (++) , intenso (+++).

El reactivo de Baljet se prepara de la siguiente forma:

Solución 1: Hidróxido de sodio al 10 % en agua.

Solución 2: Ácido pícrico al 1 % en etanol.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

Ensayo de Borntrager: Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.

Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++), coloración roja (+++).

Ensayo de Liebermann-Burchard: Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado *sin agitar*. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

IMPORTANTE : *Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.*

La reacción de Liebermann-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroideas de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

Ensayo de catequinas: Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro.

Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.

Ensayo de resinas: Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.

Ensayo de Fehling: Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: Se pesan 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Solución B: Se pesan 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

Ensayo de la espuma: Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

Ensayo del cloruro férrico: Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

1. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
2. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
3. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

Ensayo de la ninhidrina: Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2 % de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.

Ensayo de Shinoda: Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

Ensayo de Kedde: Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos.

Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas. El reactivo de Kedde se prepara de la siguiente forma:

- Solución 1: Ácido 3,5 dinitrobenzónico al 2 % en metanol.
- Solución 2: Hidróxido de potasio al 5.7 % en agua.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

Ensayo de antocianidinas: Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 min. con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.

Ensayo de mucílagos: Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.

Ensayo de principios amargos y astringentes: El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar.

También pueden realizarse otros ensayos no comprendidos en este esquema de tamizaje, para la detección de otros compuestos. A continuación expondremos algunos de estos ensayos.

Glicósidos cianogenéticos: Coloque unos 5 g de material vegetal en un erlenmeyer de 125 mL y adicione suficiente agua para humedecer la muestra.

Prepare un papel de picrato de sodio sumergiendo una tira de papel de filtro en una solución recién preparada de picrato de sodio (5 g de carbonato de sodio + 0.5 g de ácido pícrico y cantidad suficiente de agua para 1000 mL); conserve esta solución en frasco seco.

Aproximadamente 1 mL de cloroformo se añade a la muestra humedecida para resaltar la actividad enzimática. Inserte el papel de picrato de sodio en el recipiente con la muestra, colocándolo de forma tal que no toque las paredes del mismo. Tape el recipiente y caliente a 35 °C por unas 3 horas.

Observe los cambios de coloración del papel, si en 3 h no se produce variación, puede afirmarse la ausencia de los glicósidos cianogénicos, pero si en 15 min. el papel cambia de amarillo a diferentes tonos rojos, indica la presencia de HCN en cantidades apreciables.

1. **Aceites, hidrocarburos y carotenos:** En un embudo de separación al cual se le coloca un pedacito de algodón en el orificio interior, se adicionan 5 g de droga en polvo y 15 mL de solvente de baja polaridad (éter de petróleo o tetracloruro de carbono). Tape el embudo para evitar la evaporación del disolvente y déjelo en reposo 6 h como mínimo. Abra la llave del embudo y obtenga de esta forma el extracto.
2. **Ensayo de aceite fijo, secante o esencial:** Tome 5 mL del extracto y déjelo evaporar sobre un vidrio reloj o placa petri a temperatura ambiente. La aparición de un líquido oleoso después de la evaporación, si deja mancha de grasa sobre el papel de filtro indica presencia de **aceite fijo**. Si al evaporarse el disolvente aparece una película fina resinosa, indica presencia de **aceite secante**. Si al evaporarse el disolvente aparece un líquido oleoso aromático que no deja mancha de grasa sobre el papel de filtro indica la presencia de **aceite esencial**.
3. **Ensayo de hidrocarburos:** Tome 10 mL del extracto y déjelo evaporar al aire, disuelva el residuo obtenido en acetona calentando suavemente sobre baño de agua si fuera necesario. Deje algunas horas en el refrigerador. La aparición de un precipitado, indica la presencia de **hidrocarburos**.

4. **Ensayo de carotenos:** Si el ensayo de hidrocarburos descrito en II, resultara positivo, filtre el precipitado obtenido y disuelva el residuo en 2 mL de cloroformo. Tome la solución clorofónica y adicione reactivo de Carr-Price. La aparición de una coloración verde-azulada indica presencia de **carotenos**.

Los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico son tabulados de la siguiente forma:

| METABOLITO ENSAYADO | TIPO DE EXTRACTO | | | |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------|-------------|
| | ETEREO | ALCOHOLICO | ACUOSO | OTRO |
| | | | | |

Aclarando además:

- Nombre de la especie botánica.
- Órgano ensayado.
- Peso del material seco.
- Fecha de la realización del ensayo.

Análisis y discusión de sus resultados con relación a lo planteado por la literatura.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA

Se realizó el control de calidad de la droga cruda, como un análisis complementario, pero a su vez; de importancia crítica para garantizar la calidad de la misma, y determinar su aptitud y posible influencia sobre el ensayo de actividad antioxidante.

CUADRO No. 2. RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LA DROGA CRUDA. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012

| | <i>E. halli</i> | <i>P. calaguala</i> | <i>S. oleraceus</i> | <i>M. mollis</i> | LÍMITES |
|----------------|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|----------------|
| % | 10,10 | 11,40 | 11,10 | 10,37 | 8 – 14 % |
| DE | 10,08 | 11,43 | 11,13 | 10,35 | |
| HUMEDAD | 10,08 | 11,39 | 11,08 | 10,38 | |
| | 10,09±0,012 | 11,41±0,021 | 11,10±0,025 | 10,37±0,015 | |

En el cuadro No 2, se indica que el contenido de humedad, de las cuatro muestras vegetales, se encuentran dentro de los límites establecidos por la Real Farmacopea Española para productos naturales.

CUADRO No. 3. RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CENIZAS TOTALES DE LA DROGA CRUDA. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012.

| <i>E. halli</i> | <i>P. calaguala</i> | <i>S. oleraceus</i> | <i>M. mollis</i> | LÍMITE |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|--------|
| 2,095 | 1,465 | 1,195 | 0,625 | ≤ 12 |
| 2,105 | 1,472 | 1,204 | 0,622 | |
| 2,099 | 1,468 | 1,201 | 0,63 | |
| 2,10±0,005 | 1,47±0,004 | 1,20±0,005 | 0,63±0,004 | |

En el cuadro No. 3. Se indica el porcentaje de cenizas totales presentes en la droga cruda, que representa el contenido de minerales, los valores obtenidos están dentro de los límites establecidos de acuerdo a la Real Farmacopea Española.

CUADRO No. 4 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA DE LA DROGA CRUDA. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012.

| <i>E. halli</i> | <i>P. calaguala</i> | <i>S. oleraceus</i> | <i>M. mollis</i> | LÍMITE |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|--------|
| 0,419 | 0,293 | 0,239 | 0,125 | ≤ 7 |
| 0,463 | 0,323 | 0,264 | 0,136 | |
| 0,398 | 0,278 | 0,228 | 0,119 | |
| 0,426±0,03 | 0,298±0,02 | 0,244±0,02 | 0,127±0,01 | |

En el cuadro No. 4. Se indica el porcentaje de cenizas solubles en agua presentes en la especie vegetal, obteniéndose valores que están dentro de los límites establecidos de acuerdo a la Real Farmacopea Española.

CUADRO No. 5. RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO DE LA DROGA CRUDA. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012.

| <i>E. halli</i> | <i>P. calaguala</i> | <i>S. oleraceus</i> | <i>M. mollis</i> | LÍMITES |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|---------|
| 1,676 | 1,172 | 0,956 | 0,500 | ≤ 5 |
| 1,641 | 1,148 | 0,939 | 0,485 | |
| 1,700 | 1,189 | 0,972 | 0,510 | |
| 1,672±0,03 | 1,169±0,02 | 0,955±0,02 | 0,498±0,01 | |

En el cuadro No. 5, se indica el porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico presentes en la especie vegetal representado por el contenido de material inorgánico extraño (tierra, arena), determinándose valores que están dentro de los límites establecidos de acuerdo a la Real Farmacopea Española.

CUADRO No. 6. RESULTADOS DE SUSTANCIAS SOLUBLES DEL EXTRACTO ETANÓLICO. REALIZADO EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012.

| <i>E. halli</i> | <i>P. calaguala</i> | <i>S. oleraceus</i> | <i>M. mollis</i> |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 0.838 | 0.586 | 0.478 | 0.250 |
| 0.835 | 0.588 | 0.480 | 0.253 |
| 0.836 | 0.589 | 0.477 | 0.256 |
| 0.836±0,002 | 0.588±0,002 | 0.478±0,002 | 0,253±0,003 |

En el cuadro No. 6. Se indican los resultados de sólidos totales, en los que se tiene que el extracto de *E. halli* es el que presenta una mayor cantidad de materia seca y el correspondiente a *M. mollis* el que presenta la menor cantidad de materia seca.

3.2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

CUADRO No. 7. RESULTADOS DE LOS GRUPOS FITOQUÍMICOS ENCONTRADOS EN LOS EXTRACTOS FRACCIONADOS SEGÚN LA TÉCNICA PARA TAMIZAJE FITOQUÍMICO. REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. RIOBAMBA FEBRERO DE 2012.

| EXTRACTO ETÉREO | | | | |
|----------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|
| REACTIVO | <i>E. halli</i> | <i>P. calaguala</i> | <i>S. oleraceus</i> | <i>M. mollis</i> |
| Sudán III | ++ | + | + | + |
| Dragendorff | - | - | - | - |
| Wagner | - | - | - | - |
| Baljet | +++ | ++ | - | - |
| Liebermann-Burchard | ++ | ++ | ++ | ++ |
| EXTRACTO ETANÓLICO | | | | |
| REACTIVO | <i>E. halli</i> | <i>P. calaguala</i> | <i>S. oleraceus</i> | <i>M. mollis</i> |
| Catequinas | - | - | - | - |
| Resinas | + | - | - | - |
| Fehling | + | + | - | - |
| Espuma | ++ | ++ | + | - |
| Cloruro férrico | ++ | ++ | - | ++ |
| Ninhidrina | - | - | - | - |
| Shinoda | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Börntrager | ++ | ++ | - | ++ |
| Antocianidinas | ++ | ++ | - | - |
| Dragendorff | - | - | - | - |
| Wagner | - | - | - | - |
| Baljet | + | + | - | - |
| Liebermann-burchrad | ++ | ++ | ++ | ++ |

| EXTRACTO ACUOSO | | | | |
|---------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|
| REACTIVO | <i>E. halli</i> | <i>P. calaguala</i> | <i>S. oleraceus</i> | <i>M. mollis</i> |
| Dragendorff | - | - | - | - |
| Wagner | - | - | - | - |
| Cloruro férrico | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Shinoda | ++ | ++ | ++ | - |
| Fehling | +++ | + | ++ | - |
| Espuma | ++ | - | - | + |
| Mucílagos | - | - | - | - |
| Principios amargos | + | + | + | - |

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia

En el cuadro No. 7, se sistematiza que en el extracto etéreo para la muestra vegetal de *E. halli* predomina la presencia de: coumarinas u otros compuestos lactónicos, grasas, y triterpenos y/o esteroides. Para la muestra de *P. calaguala* los compuestos presentes son: coumarinas u otros compuestos lactónicos, triterpenos y/o esteroides así como grasas. En la muestra vegetal de *S. oleraceus* se estableció la presencia de: coumarinas u otros compuestos lactónicos y grasas. Y para la muestra de *M. mollis* se destacó la presencia de triterpenos y/o esteroides y grasas y, se denota la ausencia de alcaloides.

Asímismo en el ensayo del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico. Para la muestra de *E. halli* se notó la presencia de: resinas, azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, quinonas, estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides, coumarinas y triterpenos y/o esteroides. Con la muestra de *P. calaguala* se evidenció la presencia de: azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, quinonas, estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides, coumarinas y triterpenos y/o esteroides. De igual manera para la muestra de *S. oleraceus* se vió la presencia de saponinas, flavonoides, y triterpenos y/o esteroides. Finalmente en la muestra de *M. mollis* se notó la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, quinonas, y triterpenos y/o esteroides.

Se pudo notar la ausencia de catequinas, aminoácidos libres o animas en general del grupo de los flavonoides y alcaloides.

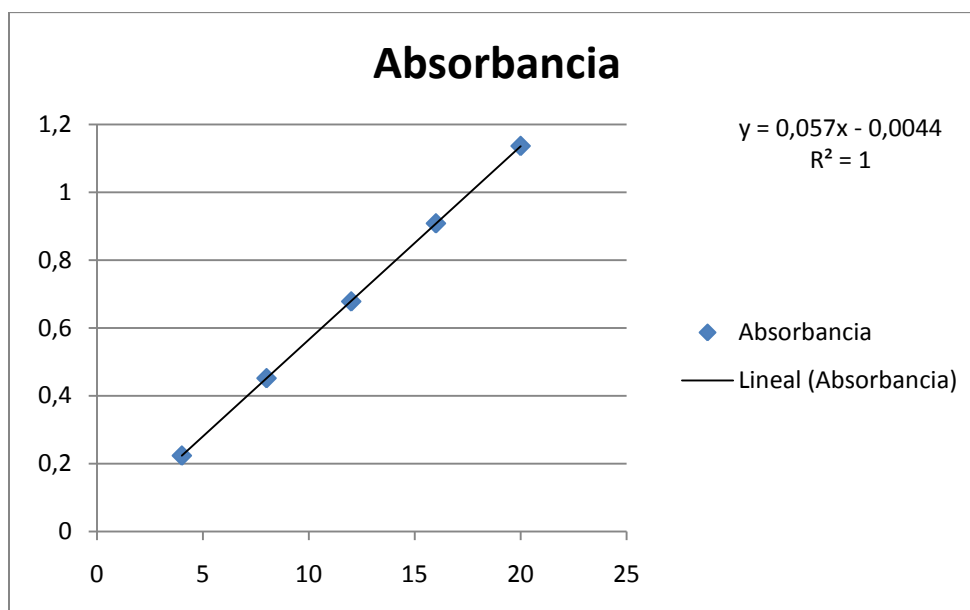
Con el extracto acuoso los resultados fueron: para la muestra de *E. halli* se evidenció la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, azúcares reductores, saponinas, y su respectivo principio amargo; con la muestra de *P. calaguala* se notó la presencia de: compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, azúcares reductores, y su concerniente principio amargo; de igual manera la muestra de *S. oleraceus* presentó compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, azúcares reductores, y su pertinente principio amargo; para finalizar con la muestra de *M. mollis* sólo se notó la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos y saponinas. No presentaron ninguno de los vegetales en estudio alcaloides y polisacáridos.

3.3. CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES.

CUADRO N° 8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE FLAVONOIDES (EXPRESADOS COMO PORCENTAJE DE QUERCETINA) EN LOS EXTRACTOS TESTADOS A 258 nm. REALIZADO EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. RIOBAMBA MARZO DE 2012.

| ESPECIE VEGETAL | CONCENTRACIÓN , ppm | ABSORBANCIA | FT EXPRESADOS COMO QUERCETINA A, % | VALORES DE REFERENCIA, % |
|------------------------|----------------------------|--------------------|---|---------------------------------|
| Arrayán | 22.49 | 1.278 | 0.450 | 2 |
| Calaguala | 17.23 | 0.978 | 0.345 | - |
| Canayuyo | 8.98 | 0.508 | 0.180 | - |
| Tipo | 14.35 | 0.814 | 0.287 | - |

Se realizó una curva de calibración con el estándar de quercetina partiendo de 1 gramo disuelto en 1000 mL de etanol para tomar alícuotas y obtener concentraciones de 4, 8, 12,16 y 20 ppm y posteriormente medir la absorbancia obteniendo la siguiente ecuación.



La muestra de *E. halli* tiene un porcentaje de 0.45% de flavonoides totales presentes en las hojas, valor que a pesar de no encontrarse dentro de los límites establecidos por la Farmacopea Brasileira IV^a Edición del año 2003, posee la mayor concentración de éstas moléculas en comparación con las tres especies vegetales restantes, por lo que los resultados en cuanto a su actividad antioxidante pueden asociarse con este valor.

3.4. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PFO (ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE)

La actividad antioxidante pronunciada del extracto clorofórmico de *E. halli*, se explica porque éste posee en su composición, según se verifica en la bibliografía (6, 7, 11, 16, 17) sesquiterpenos, eugenol, cineol, derivados furadiénicos, curzerenos *cis* y *trans*, ácidos fenólicos y esteroides; al igual que flavonoides (quercitrina, quercetina, miricitrina y mirecetina), carotenos y taninos (eugeniflorinas), que se enlistan como los principios antioxidantes más importantes en esta especie vegetal.

Igualmente, para el extracto etanólico, derivados fenilpropánicos y ácidos fenólicos; el Eugenol, aunque, poco soluble en agua y soluble en alcohol inhibe la ciclooxigenasa, favoreciendo el efecto analgésico y anestésico al lograr la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas.

Son múltiples los estudios que han demostrado la capacidad antioxidante del eugenol y compuestos relacionados (como el isoeugenol), de inhibir la peroxidación lipídica inducida por especies reactivas de oxígeno (41, 47). Igualmente inhibe la formación radical superóxido en el sistema xantina-xantina oxidasa, así como la generación del radical hidroxilo, previniendo la oxidación de Fe²⁺ en la reacción de Fenton, la cual genera este radical que es uno de los más agresivos a los tejidos, por todas las reacciones que desencadena. Toda esta propiedad quimiopreventiva puede estar dada por una actividad *scavenger* de radicales libres (35,51).

También contiene taninos que le dan propiedades astringentes. A partir de estos (taninos), se aísla el mirtol, compuesto por eucaliptol y d-pineno, vitamina C, y ácidos cítrico y málico.

Se utiliza por sus propiedades astringentes, en tisanas, decocciones y productos cosméticos. Se ha comprobado que los extractos acuosos de arrayán tienen efectos hipoglucemiantes en las ratas diabéticas por estreptozotocina, sin actuar sobre los niveles de glucosa de los animales normales (51).

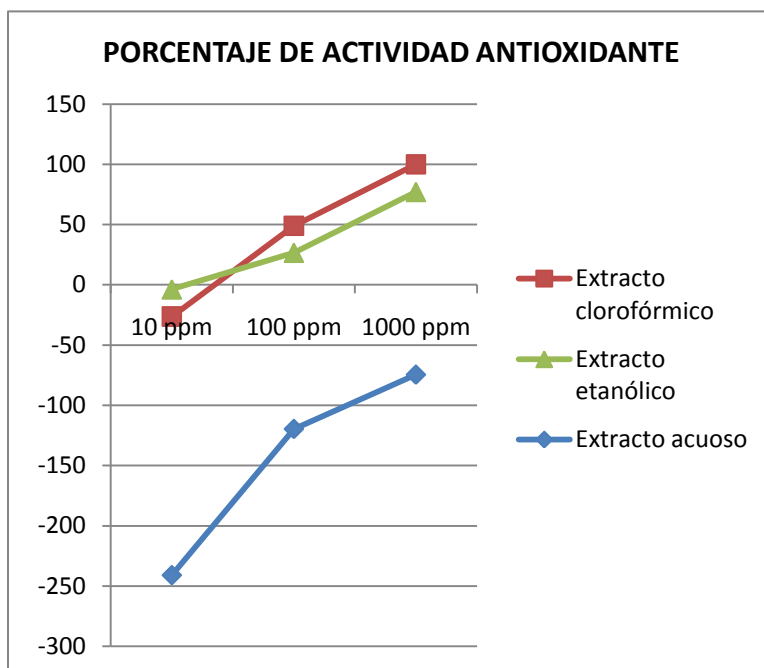


GRÁFICO No. 1 PORCENTAJE PROMEDIO DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE *Eugenia halli*, Arrayán. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012

CUADRO No. 9 RESULTADOS DEL PORCENTAJE PROMEDIO DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE *Eugenia halli*, Arrayán

| | <i>Eugenia halli</i> , Arrayán | | |
|-----------------------|--------------------------------|--------------|-------------|
| | Concentraciones, µg/mL | | |
| | 10 | 100 | 1000 |
| Extracto clorofórmico | -26,33±0,74 | 49,04±1,27 | 100±0 |
| Extracto etanólico | -3,70±1,28 | 26,67±2,22 | 77,04±1,28 |
| Extracto acuoso | -241±5,88 | -119,61±3,40 | -74,51±3,40 |

De los resultados descritos en el cuadro anterior se puede establecer que los valores negativos suponen una inducción de tipo alostérico sobre la enzima, ya sea por uno o varios de los componentes presentes en el extracto particular del cual forman parte; a su vez a medida que se incrementa la concentración de cada tipo de extracto la inducción disminuye y la inhibición enzimática (actividad antioxidante) aumenta; proponiéndose concomitantemente una relación inversamente proporcional entre inducción alostérica e inhibición enzimática. Asimismo en el caso de la concentración de metabolitos en cada fracción, ésta guarda una relación directamente proporcional a la actividad antioxidante.

No obstante las cualidades medicinales de la calaguala son muy superiores. Diversos estudios científicos han demostrado el efecto antioxidante, antiinflamatorio y antiespasmódico de sus principios activos, como la calagualina, la polipodina y los ácidos grasos que contiene el rizoma.

En el siguiente gráfico se puede notar que el porcentaje de inhibición enzimática en el extracto clorofórmico es mejor sin desmerecer que el extracto etanólico, los compuestos más relevantes, según la bibliografía, son la ecdisterona y la calagualina; dichos compuestos tienen potentes efectos antioxidantes, así como efectos positivos sobre la piel: mejoran la queratinización y diferenciación celular, diversos estudios científicos han demostrado el efecto antioxidante, antiinflamatorio y antiespasmódico de los principios activos presentes en la calaguala, contenidos en el rizoma.

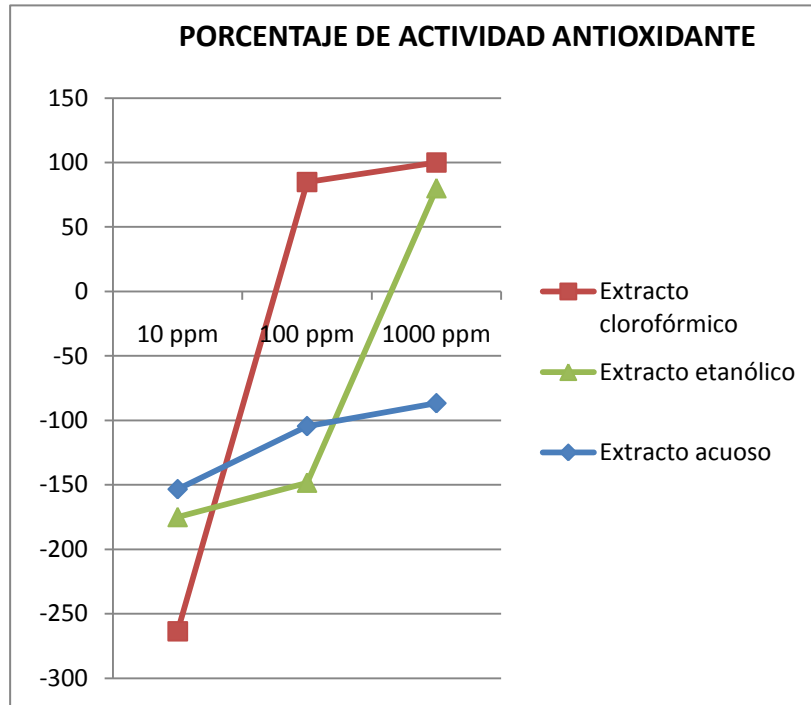


GRÁFICO No. 2 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE *Polypodium calaguala*, Calaguala. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012

CUADRO No. 10 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE *Polypodium calaguala*, Calaguala

| | <i>Polypodium calaguala</i> , Calaguala | | |
|-----------------------|---|--------------|-------------|
| | Concentraciones, µg/mL | | |
| | 10 | 100 | 1000 |
| Extracto clorofórmico | -263,64±9,09 | 84,84±5,24 | 100±0 |
| Extracto etanólico | -175±5,00 | -148,33±2,89 | 80±5,00 |
| Extracto acuoso | -153,33±6,67 | -104,44±3,85 | -86,67±6,67 |

De los resultados obtenidos se puede argumentar que si se aumenta la cantidad de sustrato que tiene que transformar la enzima su cinética disminuye.

En función de la solubilidad se puede determinar que en el extracto clorofórmico se encuentran en mayor medida las moléculas más relevantes en cuanto a la capacidad antioxidante; y lo anterior se ratifica por cuanto la concentración de 100 µg/mL de su par etanólico.

Asímismo de acuerdo con la gráfica siguiente es notorio que el porcentaje de actividad antioxidante es mucho mejor en el extracto clorofórmico para la muestra de *Sonchus oleraceus*, Canayuyo. Por otro lado, el efecto antioxidante de los flavonoides, fitosterina y los demás componentes presentes en su composición, protegen la pared de las venas y los capilares, siendo los responsables de dicha actividad

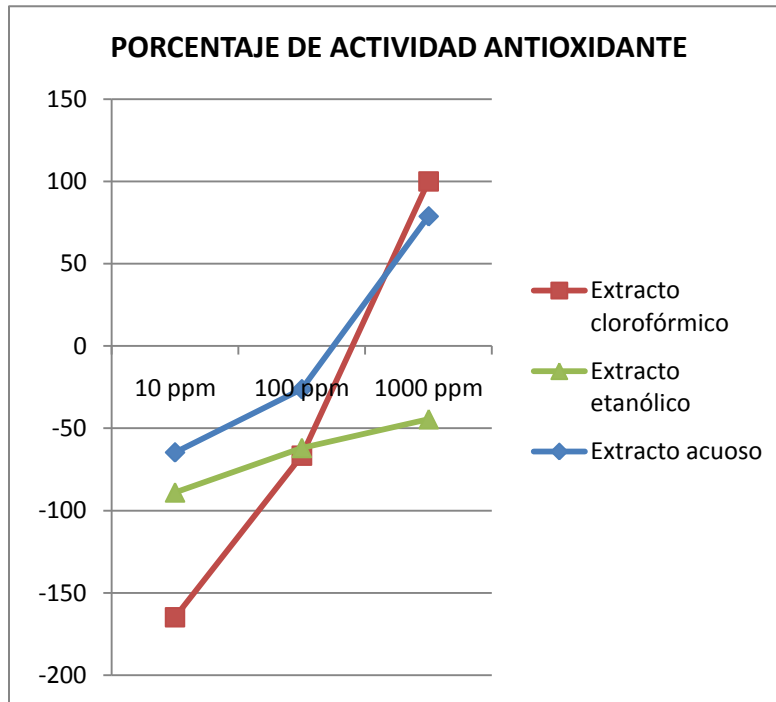


GRÁFICO No. 3 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE *Sonchus oleraceus*, Canayuyo. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012

CUADRO No. 11 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE *Sonchus oleraceus*, Canayuyo

| | <i>Sonchus oleraceus</i> , Canayuyo | | |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| | Concentraciones, µg/mL | | |
| | 10 | 100 | 1000 |
| Extracto clorofórmico | -164,81±3,21 | -66,67±5,56 | 100±0 |
| Extracto etanólico | -88,89±2,75 | -61,90±4,76 | -44,44±5,50 |
| Extracto acuoso | -64,64±3,50 | -26,26±1,75 | 78,79±3,03 |

Se puede apreciar, del cuadro anterior, que los valores aumentan hacia la escala positiva y que la cinética enzimática disminuye por la cantidad de sustratos, esto hace presumir que este vegetal tanto en el extracto clorofórmico como en el acuoso podría presentar en su composición flavonoides metoxilados insolubles en agua, solubles en solventes apolares u orgánicos, así como flavonoides glicosilados solubles en agua o en solventes polares.

En el siguiente gráfico se puede ver claramente el comportamiento del porcentaje de actividad antioxidante para la muestra del vegetal *Mythostachis mollis*, Tipo, lo que ratifica nuevamente que dicha actividad es mejor en los extractosclorofórmicos, sin desmerecer la actividad que presentan los extractos etanólicos, esto es explicable porque los compuestos presentes como son la mentona (en mayor porcentaje), pulegona, cineol, carvona y flavonoides son los responsables de la actividad antioxidante.

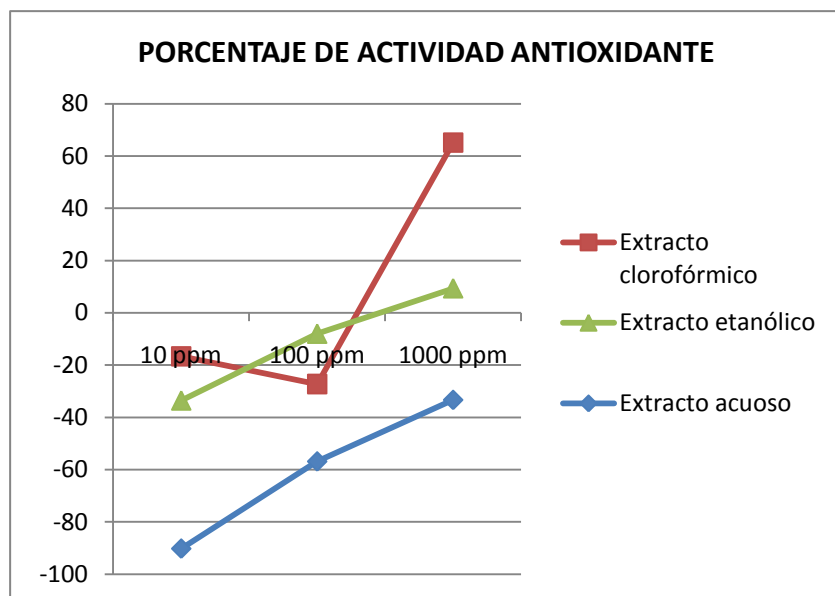


GRÁFICO No. 4 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE *Mynthostachis mollis*, Tipo. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO – MARZO DE 2012

CUADRO No. 12 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES CLOROFÓRMICA, ETANÓLICA Y ACUOSA DE *Mynthostachis mollis*, Tipo

| | <i>Mynthostachis mollis</i> , Tipo | | |
|-----------------------|------------------------------------|-------------|-------------|
| | Concentraciones, µg/mL | | |
| | 10 | 100 | 1000 |
| Extracto clorofórmico | -16,67±2,62 | -27,27±4,55 | 65,15±2,62 |
| Extracto etanólico | -33,52±1,22 | -7,99±0,89 | 9,16±0,68 |
| Extracto acuoso | -90,20±6,79 | -56,86±2,40 | -33,33±3,40 |

Con los resultados obtenidos en el cuadro N° 4 hipotéticamente se puede decir que el *Mythostachis mollis*, tanto en el extracto clorofórmico así como en el extracto etanólico presenta actividad antioxidante, dicha actividad aunque no es muy elevada, tampoco es nula; por lo tanto se asume que en su composición química contiene flavonoides solubles en solventes orgánicos y en solventes medianamente polares.

3.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS ESTADÍSTICOS POR ESPECIE VEGETAL EN FUNCIÓN DE LA FRACCIÓN EXTRACTIVA

3.5.1. *Eugenia halli*, Arrayán

CUADRO No. 13 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *Eugenia halli*, Arrayán

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -26,75 | 49,04 | 100 |
| BLOQUE 2 | -26,75 | 50,31 | 100 |
| BLOQUE 3 | -25,47 | 47,77 | 100 |

CUADRO No. 14 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *Eugenia halli*, Arrayán

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Bloques | 0,36061864 | 2 | 0,18030932 | 0,18181818 | 0,84027778 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 24235,8266 | 2 | 12117,9133 | 12219,3182 | 2,6781E-08 | 6,94427191 |
| Error | 3,96680505 | 4 | 0,99170126 | | | |
| Total | 24240,154 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de la dosis de 1000 µg/mL, no difiere del promedio del control (ácido ascórbico).

CUADRO No. 15 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE *Eugenia halli*, Arrayán

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -4,44 | 24,44 | 77,77 |
| BLOQUE 2 | -2,22 | 26,66 | 75,55 |
| BLOQUE 3 | -4,44 | 28,88 | 77,77 |

CUADRO No. 16 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE *Eugenia halli*, Arrayán

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Bloques | 3,2856 | 2 | 1,6428 | 0,5 | 0,64 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 9976,1994 | 2 | 4988,0997 | 1518,17011 | 1,7309E-06 | 6,94427191 |
| Error | 13,1424 | 4 | 3,2856 | | | |
| Total | 9992,6274 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las tres dosis evaluadas de la fracción etanólica, difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

CUADRO No. 17 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE *Eugenia halli*, Arrayán

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -247,06 | -123,52 | -76,47 |
| BLOQUE 2 | -241,17 | -117,64 | -76,47 |
| BLOQUE 3 | -235,29 | -117,65 | -70,58 |

CUADRO No. 18 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE *Eugenia halli*, Arrayán

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-----------|--------------|----------------------|
| Bloques | 92,2768222 | 2 | 46,1384111 | 7,9796016 | 0,04016369 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 44590,752 | 2 | 22295,376 | 3855,9676 | 2,6875E-07 | 6,94427191 |
| Error | 23,1281778 | 4 | 5,78204444 | | | |
| Total | 44706,157 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las tres dosis evaluadas de la fracción acuosa, difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

3.5.2. *Polypodium calaguala*, Calaguala

CUADRO No. 19 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *Polypodium calaguala*, *Calaguala*

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -263,63 | 81,81 | 100 |
| BLOQUE 2 | -254,54 | 81,81 | 100 |
| BLOQUE 3 | -272,72 | 90,90 | 100 |

CUADRO No. 20 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *Polypodium calaguala*, *Calaguala*

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Bloques | 18,3654729 | 2 | 9,18273646 | 0,18181818 | 0,84027778 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 253902,663 | 2 | 126951,331 | 2513,63636 | 6,3207E-07 | 6,94427191 |
| Error | 202,020202 | 4 | 50,5050505 | | | |
| Total | 254123,049 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que los promedios de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las dosis de 100 µg/mL y 1000 µg/mL, no difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

CUADRO No. 21 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE *Polypodium calaguala*, *Calaguala*

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -175 | -150 | 80 |
| BLOQUE 2 | -170 | -145 | 75 |
| BLOQUE 3 | -180 | -150 | 85 |

CUADRO No. 22 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE *Polypodium calaguala*, *Calaguala*

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|--------|--------------|----------------------|
| Bloques | 5,55555556 | 2 | 2,77777778 | 0,1 | 0,90702948 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 117872,222 | 2 | 58936,1111 | 2121,7 | 8,869E-07 | 6,94427191 |
| Error | 111,111111 | 4 | 27,7777778 | | | |
| Total | 117988,889 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las tres dosis evaluadas de la fracción etanólica, difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

CUADRO No. 23 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE *Polypodium calaguala*, *Calaguala*

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -247,06 | -123,52 | -76,47 |
| BLOQUE 2 | -241,17 | -117,64 | -76,47 |
| BLOQUE 3 | -235,29 | -117,65 | -70,58 |

CUADRO No. 24 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE *Polypodium calaguala*, *Calaguala*

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Bloques | 39,5061728 | 2 | 19,7530864 | 0,47058824 | 0,6553288 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 7150,61728 | 2 | 3575,30864 | 85,1764706 | 0,00052633 | 6,94427191 |
| Error | 167,901235 | 4 | 41,9753086 | | | |
| Total | 7358,02469 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las tres dosis evaluadas de la fracción acuosa, difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

3.5.3. *Sonchus oleraceus*, Canayuyo

CUADRO No. 25 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *Sonchus oleraceus*, Canayuyo

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -166,66 | -72,22 | 100 |
| BLOQUE 2 | -161,11 | -66,66 | 100 |
| BLOQUE 3 | -166,66 | -61,11 | 100 |

CUADRO No. 26 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *Sonchus oleraceus*, Canayuyo

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|---------|--------------|----------------------|
| Bloques | 27,4348422 | 2 | 13,7174211 | 1 | 0,44444444 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 107537,723 | 2 | 53768,8615 | 3919,75 | 2,6008E-07 | 6,94427191 |
| Error | 54,8696845 | 4 | 13,7174211 | | | |
| Total | 107620,027 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de la dosis de 1000 µg/mL, no difiere del promedio del control (ácido ascórbico).

CUADRO No. 27 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE *Sonchus oleraceus*, Canayuyo

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -90,47 | -61,90 | -47,61 |
| BLOQUE 2 | -85,71 | -57,14 | -38,09 |
| BLOQUE 3 | -90,47 | -66,66 | -47,61 |

CUADRO No. 28 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE *Sonchus oleraceus*, Canayuyo

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-----|--------------|----------------------|
| Bloques | 105,820106 | 2 | 52,9100529 | 14 | 0,015625 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 3008,31444 | 2 | 1504,15722 | 398 | 2,5E-05 | 6,94427191 |
| Error | 15,117158 | 4 | 3,77928949 | | | |
| Total | 3129,2517 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las tres dosis evaluadas de la fracción etanólica, difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

CUADRO No. 29 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE *Sonchus oleraceus*, Canayuyo

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -66,66 | -27,27 | 75,75 |
| BLOQUE 2 | -60,60 | -24,24 | 78,78 |
| BLOQUE 3 | -66,66 | -27,27 | 81,81 |

CUADRO No. 30 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE *Sonchus oleraceus*, Canayuyo

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------|--------------|----------------------|
| Bloques | 24,4872972 | 2 | 12,2436486 | 2 | 0,25 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 33082,3385 | 2 | 16541,1693 | 2702 | 5,4707E-07 | 6,94427191 |
| Error | 24,4872972 | 4 | 6,1218243 | | | |
| Total | 33131,3131 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las tres dosis evaluadas de la fracción acuosa, difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

3.5.4. *Mynthostachis mollis*, Tipo

CUADRO No. 31 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *Mynthostachis mollis*, Tipo

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -18,18 | -27,27 | 63,63 |
| BLOQUE 2 | -13,63 | -22,72 | 63,63 |
| BLOQUE 3 | -18,18 | -31,81 | 68,18 |

CUADRO No. 32 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *Mynthostachis mollis*, Tipo

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Bloques | 18,3654729 | 2 | 9,18273646 | 0,72727273 | 0,53777778 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 15348,944 | 2 | 7674,47199 | 607,818182 | 1,0756E-05 | 6,94427191 |
| Error | 50,5050505 | 4 | 12,6262626 | | | |
| Total | 15417,8145 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las tres dosis evaluadas de la fracción clorofórmica, difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

CUADRO No. 33 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE *Mynthostachis mollis*, Tipo

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -33,91 | -8,18 | 8,77 |
| BLOQUE 2 | -34,50 | -7,01 | 9,94 |
| BLOQUE 3 | -32,16 | -8,77 | 8,77 |

CUADRO No. 34 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ETANÓLICA DE *Mynthostachis mollis*, Tipo

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Bloques | 0,53197755 | 2 | 0,26598878 | 0,21538462 | 0,81500772 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 2768,79116 | 2 | 1384,39558 | 1121,01538 | 3,1717E-06 | 6,94427191 |
| Error | 4,93979154 | 4 | 1,23494789 | | | |
| Total | 2774,26293 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las tres dosis evaluadas de la fracción etanólica, difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

CUADRO No. 35 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE *Mynthostachis mollis*, Tipo

| | TRATAMIENTOS | | |
|----------|--------------|---------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| BLOQUE 1 | -94,11 | -58,82 | -35,29 |
| BLOQUE 2 | -82,35 | -52,94 | -29,41 |
| BLOQUE 3 | -94,11 | -58,82 | -35,29 |

CUADRO No. 36 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE *Mynthostachis mollis*, Tipo

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-----|--------------|----------------------|
| Bloques | 123,029604 | 2 | 61,514802 | 16 | 0,01234568 | 6,94427191 |
| Tratamientos, Concentraciones, µg/mL | 4898,11611 | 2 | 2449,05805 | 637 | 9,7962E-06 | 6,94427191 |
| Error | 15,3787005 | 4 | 3,84467512 | | | |
| Total | 5036,52441 | 8 | | | | |

La probabilidad de variación entre los promedios de los porcentajes de inhibición enzimática es altamente significativa, de lo cual se establece que al menos uno de los promedios de los grupos tratados difiere con respecto de los demás.

TEST DE TUKEY MODIFICADO

De la aplicación de esta prueba se llegó a establecer que el promedio de inhibición enzimática (actividad antioxidante) de las tres dosis evaluadas de la fracción acuosa, difieren del promedio del control (ácido ascórbico).

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Entre las cuatro muestras vegetales motivo de estudio se concluye que la planta nativa con mayor actividad antioxidante es el arrayán (*E. halli*); la calaguala (*P. calaguala*) y el canayuyo (*S. oleraceus*); el tipo (*M. mollis*) presenta poca actividad antioxidante, esto se lo puede deberse a varios factores como la época de recolección, tiempo de maduración, etc.
2. Todas estas muestras cumplen con la norma de calidad exigidas para la realización de la investigación; por lo que los resultados obtenidos son confiables.
3. Se sistematiza que en el extracto etéreo para la muestra vegetal de *E. halli* predomina la presencia de: coumarinas, compuestos lactónicos, grasas, y triterpenos y/o esteroides. Para la muestra de *P. calaguala* los compuestos presentes son: coumarinas, compuestos lactónicos, triterpenos y/o esteroides así como grasas. En la muestra vegetal de *S. oleraceus* se estableció la presencia de: coumarinas, compuestos lactónicos y grasas. Y para la muestra de *M. mollis* se destacó la presencia de triterpenos y/o esteroides y grasas. Asimismo en el ensayo del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico. Para la muestra de *E. halli* se notó la presencia de: resinas, azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, quinonas, estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides, coumarinas y triterpenos y/o esteroides. Con la muestra de *P. calaguala* se evidenció la presencia de: azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, quinonas, estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides, coumarinas y triterpenos y/o esteroides. De igual manera para la muestra de *S. oleraceus* se vió la presencia de saponinas, flavonoides, y triterpenos y/o esteroides. Finalmente en la muestra de *M. mollis* se notó la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, quinonas, y triterpenos y/o esteroides.

4. Con el extracto acuoso los resultados fueron: para la muestra de *E. halli* se evidenció la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, azúcares reductores, saponinas, y su respectivo principio amargo; con la muestra de *P. calaguala* se notó la presencia de: compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, azúcares reductores, y su concerniente principio amargo; de igual manera la muestra de *S. oleraceus* presentó compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, azúcares reductores, y su pertinente principio amargo; para finalizar con la muestra de *M. mollis* sólo se notó la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos y saponinas.

5. Las fracciones extraídas a partir del material vegetal objeto de estudio *E. halli*, *P. calaguala*, *S. oleraceus* y *M. mollis*, poseen entre sí, diferencias en lo que respecta a su actividad antioxidante, según los resultados expresados en los cuadros No. 05 al No. 28; encontrándose que las dosis de 1000 µg/mL de la fracción clorofórmica de *E. halli*, *P. calaguala* y *S. oleraceus* fueron las que presentaron mayor porcentaje de inhibición a la oxidación con un promedio de 100%. Determinándose bajo estos razonamientos que la fracción clorofórmica de estas especies vegetales posee actividad antioxidante y además se evidencia la concentración efectiva de extracto que pone de manifiesto el mejor efecto. Se llegó a determinar que las fracciones etanólicas presentan un comportamiento intermedio en cuanto a su actividad antioxidante, y que las fracciones acuosas son mas bien inductoras de la oxidación; de lo anterior se comprende que, al separar en cierta medida los componentes químicos que causan este efecto de la fracción clorofórmica, se tiene que los componentes solubles en dicha fracción son responsables de un evidente poder antioxidante.

6. Se determinó la calidad físico-química de los extractos fluidos de arrayán, calaguala, canayuyo y tipo como son: olor, color, aspecto índice de refracción, y pH; las variables analizadas fueron escogidas por ser estas las más representativas en la conservación y actividad de un extracto fluido:

ARRAYAN

Olor: Aromático

Color: Verde intenso

Aspecto: Transparente, homogéneo

ρ_{25} : 1,0094

η_{20} : 1,254

pH: 4,69

CALAGUALA

Olor: Aromático

Color: Verde intenso

Aspecto: Transparente, homogéneo

ρ_{25} : 1,0104

η_{20} : 1,198

pH: 4,67

CANAYUYO

Olor: Aromático

Color: Verde intenso

Aspecto: Transparente, homogéneo

ρ_{25} : 1,0089

η_{20} : 1,364

pH: 5,01

TIPO

Olor: Aromático

Color: Verde intenso

Aspecto: Transparente, homogéneo

ρ_{25} : 1,0081

η_{20} : 1,198

pH: 4,89

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda se realicen nuevas investigaciones que permitan profundizar más aún los beneficios que pueden infundir las diversas moléculas provenientes de las especies vegetales motivos de estudio.
2. De igual manera se recomienda realizar ensayos con métodos cromatográficos para aislar las moléculas y determinar cuál de ellas tiene potencial antioxidante y así poder utilizarlos en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética; dándoles la aplicabilidad del caso.
3. Explorar la zona en donde se realizó la recolección de las plantas objeto de esta investigación y analizar muestras vegetales nativas que sean de utilidad en la conservación y mantenimiento de la salud.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

En el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se determinó la actividad antioxidante de cuatro especies vegetales, fraccionadas con tres solventes de polaridad creciente (cloroformo, etanol y agua) y a tres niveles de concentración para cada una; preparadas a partir del extracto etanólico de la porción aérea de *Eugenia halli*, *Polypodium calaguala*, *Sonchus oleraceus* y *Myinthosthachis mollis*, recolectadas en la comunidad Chañag parroquia Quimiag cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, usando como metodología experimental el ensayo de capacidad antioxidante según el método enzimático de inhibición de la polifenoloxidasas y como patrón antioxidante ácido ascórbico a la dosis de 1000 µg/mL. Es así que de las fracciones extraídas a partir del material vegetal objeto de estudio, se determinó que poseen entre sí, diferencias en lo que respecta a su actividad antioxidante, según los resultados expresados en los cuadros No. 05 al No. 28; encontrándose que las dosis de 1000 µg/mL de la fracción clorofórmica de *E. halli*, *P. calaguala* y *S. oleraceus* fueron las que presentaron mayor porcentaje de inhibición a la oxidación con un promedio de 100%. Determinándose que la fracción clorofórmica de estas especies vegetales posee actividad antioxidante y además se evidencia la concentración efectiva de extracto que pone de manifiesto el mejor efecto.

Además de los resultados expuestos en el cuadro N° 35 en el cual se verifica la elevada concentración de flavonoides, explican en cierta medida la capacidad antioxidante de *E. halli* y *P. calaguala*.

En cuanto a la naturaleza química de los flavonoides responsables de la actividad antioxidante, de los resultados obtenidos podemos hipotetizar, que aquellos por su solubilidad son derivados flavónicos metoxilados hecho que explica que los extractos clorofórmicos presenten una mayor inhibición enzimática.

CAPÍTULO VII

7. SUMMARY

At the Laboratory of natural Products of the Science Faculty of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, the anti-oxidizing activity of four vegetal species fractured with three solvents of increasing polarity (chloroform, ethanol and water) at three concentration levels for each, was determined; they were prepared from the ethanol extract of the aerial portion of *Eugenia halli*, *Polypodium calaguala*, *Sonchus oleraceus* and *Mynthostachis mollis*, collected in the Chañag community, Quimiag parish, Riobamba canton, Chimborazo province, using as an experimental methodology the trial of anti-oxidizing capacity according to the enzyme method of inhibition of the polyphenoloxidase and as an anti-oxidizing pattern the ascorbic acid at 1000 µg/mL dosage. Thus from the fractions extracted from the vegetal material the study object it was determined that they have between them differences as to their anti-oxidizing activity, according to the results expressed in the tables N° 05 up to N° 28; it was found out that the 1000 µg/mL dosage of the chloroform fraction of *E halli*, *P calaguala* and *S oleraceus* were which presented the highest percentage of inhibition to oxidation with 100 % average. It was determined that the chloroform fraction of these vegetal species has an anti-oxidizing activity and the effective extract concentration which manifests the best effect, is evident. Moreover, the results exposed in the table N° 35 in which the elevated concentration of flavonoids is verified, explain up to a certain extent the anti-oxidizing capacity of *E halli* and *P calaguala*. As to the chemical nature of the flavonoids responsible for the anti-oxidizing activity, from the results it is possible to put forward the hypothesis that those due to their solubility are derived metoxilated flavonics, a fact that explains that the chloroform extracts present a major enzyme inhibition.

CAPÍTULO VIII

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **ADAMSON, G. e.;** Lazarus, s.a.; Mitchell, a.e.; prior, r. l.; Guohua cau; Jacobs, p.h.; Kremers; b.g.; Hammerstone,j.f.; Rucker,r.; Ritter, k. and H. Schmitz. 1999. HPLC method for the Quantification of procyanidins in cocoa and Chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. J. Agric. Food Chem., Vol. 47, 4184 - 4188.
2. **AKIBA S,** Matsugo S, Packer L, Konishi T (1998). «Assay of protein-bound lipoic acid in tissues by a new enzymatic method». Anal Biochem 258 (2): pp. 299 – 304. PMID 9570844.
3. **ALONSO, J.,** Tratado de fitofármacos y nutraceuticos, primera edición, Argentina, Rosario, Editorial CORPUS, 2004. Pp. 244-247, 325-327, 863-868, 884-886.
4. **AMES B., CATHCART R., SCHWIERS E., HOCHSTEIN P.** (1981). «Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical caused aging and cancer: a hypothesis». Proc Natl Acad Sci U S A 78 (11): pp. 6858 – 62. PMID 6947260.
5. **BENZIE, IRIS AND Y.T. SZETO.** 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/ antioxidant power assay. J. Agric. Food Chem. Vol. 47, 633-636.
6. **BOCCO, A., CUVELIER, M.E.; RICHARD, H. Y BERSET, C.**1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. J. Agric. Food Chem. Vol. 46, 2123-2129.
7. **CHAUDIÈRE J, FERRARI-ILIOU R.** «Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms». Food Chem Toxicol 37 (9–10): pp. 949 – 62. PMID 10541450.

8. **CHEN C, QU L, LI B, XING L, JIA G, WANG T, GAO Y, ZHANG P, LI M, CHEN W, CHAI Z** (2005). «Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury». *Clin Chem* 51 (4): pp. 759 – 67. PMID 15695327.
9. **DAVIES K** (1995). «Oxidative stress: the paradox of aerobic life». *Biochem Soc Symp* 61: pp. 1–31. PMID 8660387.
10. **EVELSON P, TRAVACIO M, REPETTO M, ESCOBAR J, LLESUY S, LISSI E** (2001). «Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols». *Arch Biochem Biophys* 388 (2): pp. 261 – 6. PMID 11368163.
11. **FINKEL T, HOLBROOK NJ** (2000). «Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing». *Nature* 408 (6809): pp. 239-47. PMID 11089981.
12. **GERMAN J**. «Food processing and lipid oxidation». *Adv Exp Med Biol* 459: pp. 23–50. PMID 10335367.
13. **GLANTZOUNIS G, TSIMOYIANNIS E, KAPPAS A, GALARIS D** (2005). «Uric acid and oxidative stress». *Curr Pharm Des* 11 (32): pp. 4145 – 51. PMID 16375736.
14. **GOW-CHIN YEN AND HUI-YIN CHEN**. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43, 27-32.
15. **HAGERMAN, A.; RIEDL, K.; ALEXANDER JONES, G.; SOVIK, K.; RITCHARD, N.; HARTZFELD, P. AND T. RIECHEL**.1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, 1887-1892.
16. **IMLAY J**. «Pathways of oxidative damage». *Annu Rev Microbiol* 57: pp. 395–418. PMID 14527285.

17. **JACOB R.** «Three eras of vitamin C discovery». *Subcell Biochem* 25: pp. 1–16. PMID 8821966.
18. **KÄHKÖNEN, MARJA; ANU I. COPIA AND MARINA HEINONEN.** 2001. Berry phenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 4076 – 4082.
19. **KÄHKÖNEN, MARJA; ANU I. COPIA; HEIKKI J. VUORELA; JUSSI- PEKKA RAUHA; KALEVI PIHA-LAJA; TUTTI S. KUJALA AND MARINA HEINONEN.** 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47, 3954 – 3962.
20. **KHAW K, WOODHOUSE P** (1995). «Interrelation of vitamin C, infection, haemostatic factors, and cardiovascular disease». *BMJ* 310 (6994): pp. 1559 – 63. PMID 7787643.
21. **KNIGHT J.** «Free radicals: their history and current status in aging and disease». *Ann Clin Lab Sci* 28 (6): pp. 331-46. PMID 9846200.
22. **KRIEGER-LISZKAY A** (2005). «Singlet oxygen production in photosynthesis». *J Exp Bot* 56 (411): pp. 337-46. PMID 15310815.
23. **LENAZ G** (2001). «The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology». *IUBMB Life* 52 (3–5): pp. 159-64. PMID 11798028.
24. **MATILL HA** (1947). Antioxidants. *Annu Rev Biochem* 16: 177–192.
25. **MOREAU AND DUFRAISSE,** (1922) *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*, 86, 321.
26. **NAKABEPPU Y, SAKUMI K, SAKAMOTO K, TSUCHIMOTO D, TSUZUKI T, NAKATSU Y** (2006). «Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids». *Biol Chem* 387 (4): pp. 373-9. PMID 16606334.

27. **PROESTOS, C. ; N. CHORIANOPOULOS; G. J. E. NYCHAS AND M. KOMAITIS.** 2005. RP- HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53,1190-1195.
28. **RAHA S, ROBINSON B** (2000). «Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing». *Trends Biochem Sci* 25 (10): pp. 502-8. PMID 11050436.
29. **RICHELLE, M.; ISABELLE TAVAZZI AND ELIZABETH OFFORD.** 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (Coffee, Cocoa and Tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 3438 – 3442.
30. **ROBBINS, R.** 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2866-2887.
31. **ROEDIG-PENMAN, A. AND M. H. GORDON.** 1997. Antioxidant properties of catequins and Green tea extracts in model food emulsions. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 45, 4267-4270.
32. **ROSKOSKI, R,** *Bioquímica, primera edición, México, Editorial McGraw-Hill, 1997. Pp.76-79*
33. **RUIDAVETS, J. B.; TEISSEGRE,P.L.; FERRIÈRES, J.; CARANDO, S.; BOUGARD, G. Y J. J CA-BANIS.** 2000. Catechin in the mediterranean diet: vegetable, fruit or wine? *Athero-sclerosis.* Vol. 153, 107-117.
34. **SIDDHURAJU, P. AND K. BECKER.** 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2144 – 2155.

- 35. SIDDHURAJU, PERUMAL AND KLAUS BECKER.**2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2144 -2156.
- 36. SIES H** (1993). «Strategies of antioxidant defense». *Eur J Biochem* 215 (2): pp. 213 – 9. PMID 7688300.
- 37. SIES H** (1997). «Oxidative stress: oxidants and antioxidants». *Exp Physiol* 82 (2): pp. 291-5. PMID 9129943.
- 38. SOBERMAN, ROY J. AND CHRISTMAS, PETER** (2003). «The organization and consequences of eicosanoid signaling». *J. Clin. Invest* 111: pp.1107-1113. doi:doi:10.1172/JCI200318338.
- 39. STADTMAN E** (1992). «Protein oxidation and aging». *Science* 257 (5074): pp. 1220– 4. PMID 1355616.
- 40. STOHS S, BAGCHI D** (1995). «Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions». *Free Radic Biol Med* 18 (2): pp. 321-36. PMID 7744317.
- 41. SZABÓ I, BERGANTINO E, GIACOMETTI G** (2005). «Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation». *EMBO Rep* 6 (7): pp. 629-34. PMID 15995679.
- 42. TEICHERT J, PREISS R** (1992). «HPLC-methods for determination of lipoic acid and its reduced form in human plasma». *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 30 (11): pp. 511 – 2. PMID 1490813.
- 43. VALKO M, IZAKOVIC M, MAZUR M, RHODES C, TELSNER J** (2004). «Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence». *Mol Cell Biochem* 266 (1–2): pp. 37–56. PMID 15646026.

44. **VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN M, MAZUR M, TELSER J** (2007). «Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease». *Int J Biochem Cell Biol* 39 (1): pp. 44–84. PMID 16978905.
45. **VELIOGLU, Y.S., MAZZA, G.; GAO, L. AND B.D. OOMAH.** 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, 4113-4117.
46. **VERTUANI S, ANGUSTI A, MANFREDINI S** (2004). «The antioxidants and proantioxidants network: an overview». *Curr Pharm Des* 10 (14): pp. 1677–94. PMID 15134565.
47. **VINSON, J.A.; YOUSEF A. DABBAG; MAMDOUH M. SHERRY AND JINHEE JANG.** 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43, N°11, 2800-2802.
48. **WEI ZHENG AND SHIOW Y. WANG.** 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 5165-5170.
49. **WOLF G** (2005). «The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill». *J Nutr* 135 (3): pp. 363-6. PMID 15735064.
50. **YEN, G.H. AND CHEN, H.Y.** 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43, 27-32.
51. **YOGALAKSHMI B, VISWANATHAN P, ANURADHA CV.** Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology* . 2010 Feb 9;268(3):204-12.