



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

**“DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE LA
FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Psychotria viridis* SOBRE XANTINA
OXIDASA Y RADICAL SUPERÓXIDO MEDIANTE
AUTOGRAFÍA”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: CINTHYA RAQUEL REYES DÍAS

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

Riobamba – Ecuador

2019

© 2019, Cinthya Raquel Reyes Días

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

Yo, Cinthya Raquel Reyes Días, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba, 16 de octubre del 2019.

Cinthya Raquel Reyes Días

C.I. 185028350-6

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo Trabajo Experimental "DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Psychotria viridis* SOBRE XANTINA OXIDASA Y RADICAL SUPERÓXIDO MEDIANTE AUTOGRAFÍA" de responsabilidad de la señorita: Cinthya Raquel Reyes Días, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF. Diego Renato Vinueza Tapia, M.Sc DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	_____	2019-10-16
BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, M.Sc MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	2019-10-16

DEDICATORIA

Para Martha, la guerrera incansable que me dio la vida y ha sacrificado la suya por darme amor, educación y valor para enfrentar la vida.

Cintha

AGRADECIMIENTO

A Dios le doy las gracias por haber permitido que cada una de mis decisiones me hayan llevado hasta aquí.

No me alcanzaré la vida para agradecer a mis padres por haber hecho lo imposible para cumplir este grandioso sueño.

A mi familia, de manera especial a mi abuelita Maricela (+) por ser el mejor recuerdo de la infancia y ocupar un lugar muy especial en mi corazón.

A mi compañero de vida Diego, quien ha demostrado su amor incondicional en mis más duros momentos y ha cultivado el amor por la investigación. Gracias por ser el mejor docente y amigo.

Un agradecimiento especial a la BQF. Gisela Pilco por haber colaborado en el presente estudio a través de sus amplios conocimientos y amor a la enseñanza.

Un sincero agradecimiento al Sr. Gabriel Grefa y Sra. Mercedes Mamallacta pertenecientes a la comunidad Kichwa de la provincia de Napo, quienes abrieron las puertas de su hogar y compartieron saberes ancestrales de vital importancia para el desarrollo de la presente investigación.

A mi Alma Máter, ESPOCH que me acogió con cariño en sus aulas, a través de sus docentes ha permitido sumergirme en un mar de conocimiento infinito y me ha regalado la amistad de personas invaluable.

Finalmente, al Grupo de Investigación GIPRONAF por compartir conmigo muchos momentos de esparcimiento que han demostrado el don de gente de cada uno de sus integrantes.

Cinthy

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	7
1.1. Familia Rubiaceae	7
<i>1.1.1 Características</i>	<i>7</i>
<i>1.1.2 Distribución Global</i>	<i>8</i>
1.2. Género Psychotria	8
<i>1.2.1. Características</i>	<i>8</i>
<i>1.2.2 Etnobotánica</i>	<i>9</i>
<i>1.2.3 Alcaloides de Psychotria</i>	<i>10</i>
1.3. Psychotria viridis	10
<i>1.3.1 Descripción botánica</i>	<i>11</i>
<i>1.3.2. Ayahuasca</i>	<i>12</i>
<i>1.3.3 Dimetilriptamina (DMT).....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.3.1 Síntesis</i>	<i>14</i>
<i>1.3.3.2 Rol fisiológico</i>	<i>15</i>
<i>1.3.3.2 Estudios recientes</i>	<i>15</i>
1.4. Xantina oxidasa (XO)	16
<i>1.4.1. Estructura</i>	<i>16</i>
<i>1.4.2 Mecanismo de reacción.....</i>	<i>17</i>
<i>1.4.3 Enfermedades y trastornos relacionados.....</i>	<i>18</i>
<i>1.4.3.1 Hiperuricemia (HUA).....</i>	<i>18</i>
<i>1.4.3.2 Etiología.....</i>	<i>19</i>
<i>1.4.3.3 Factores de riesgo.....</i>	<i>19</i>

1.4.3.4 Tratamiento	21
1.4.4 Inhibidores de XO	21
1.4.4.1 Alopurinol	21
1.4.4.2 Febuxostat	23
1.4.4.3 Otros.....	23
1.5. Estrés oxidativo	24
1.5.1 Tipos.....	24
1.5.1.1 Estrés oxidativo exógeno.....	24
1.5.1.2 Estrés oxidativo endógeno	25
1.5.2 Enfermedades asociadas	25
1.5.3 Captación de radicales libres	25
1.5.3.1 Tipos.....	26
1.5.3.2 Fuentes	26
1.5.3.3 Mecanismos de acción	27
1.6 Autografía.....	27
1.6.1 Tipos.....	28
1.6.1.1 Autografía de contacto	28
1.6.1.2 Autografía directa	28
1.6.1.3 Autografía en inmersión (superposición de agar)	28
1.7 Determinación de inhibidores de XO	29
1.7.1 Sistema xantina/xantina oxidasa	29
1.7.2 Sistema xantina/xantina oxidasa/NBT	30
1.8 Determinación de captadores de radicales libres	31
1.8.1 Método DPPH*	31
1.8.2 Sistema NADH/metosulfato de fenazina/NBT	32
1.8.3 Sistema Riboflavina/Luz/NBT	33
2. MARCO METODOLÓGICO.....	34
2.1 Lugar de Investigación	34
2.2 Recolección del material vegetal	34

2.3	Identificación botánica	34
2.4	Equipos, materiales y reactivos	35
2.4.1	Equipos	35
2.4.2	Materiales	35
2.4.3	Reactivos	35
2.5.	Técnicas y métodos	36
2.5.1	Acondicionamiento de la materia vegetal	36
2.5.2	Control de calidad	36
2.5.3	Tamizaje fitoquímico	36
2.5.4	Obtención del extracto total de alcaloides	37
2.5.6	Cromatografía en capa fina	38
2.5.7	Ensayos autográficos	38
2.5.7.1	Inhibición de XO	39
2.5.7.2	Sistema riboflavina/luz/NBT	39
2.5.7.3	Sistema NADH/ NBT/metosulfato de fenazina (PMS)	40
2.5.7.4	Método de DPPH	40
2.5.8	Cuantificación de actividad biológica	41
2.5.8.1	Inhibición de XO	41
2.5.8.2	Método de riboflavina / luz / NBT	42
2.5.8.3	Método NADH/metosulfato de fenazina/NBT	43
2.5.8.4	Método de DPPH*	44
2.5.9	Procesamiento de datos	44
2.5.10	Análisis estadístico	45
3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS	46
3.1	Control de calidad del material vegetal	46
3.2	Tamizaje fitoquímico	47
3.3	Obtención del extracto total de alcaloides	48
3.4.	Cromatografía en capa fina (TLC)	49
3.5.	Ensayos autográficos	50

3.5.1	<i>Captación de DPPH*</i>	50
3.5.2	<i>Sistema Riboflavina/Luz/NBT</i>	51
3.5.3	<i>Sistema NADH/PMS/NBT</i>	52
3.5.4	<i>Inhibición de xantina oxidasa (XO)</i>	53
3.6.	Cuantificación de actividad biológica	54
3.6.1	<i>Captación de DPPH*</i>	54
3.6.2	<i>Sistema Riboflavina/Luz/NBT</i>	55
3.6.3	<i>NADH/PMS/NBT</i>	57
3.6.4	<i>Inhibición de xantina oxidasa (XO)</i>	58
3.7	Discusión	59
	CONCLUSIONES	61
	RECOMENDACIONES	62
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3:	Resultados de los parámetros de calidad de hojas de <i>P. viridis</i>	46
Tabla 2-3:	Resultados del tamizaje fitoquímico de extractos de hojas de <i>P. viridis</i>	47
Tabla 3-3:	Rendimiento de la extracción de alcaloides totales de <i>P. viridis</i>	48
Tabla 4-3:	Posible compuesto identificado en el extracto de ATPV mediante TLC.....	49
Tabla 5-3:	Capacidad captadora de DPPH* de ácido ascórbico y ATPV.....	50
Tabla 6-3:	Captación de O ⁻ modelo Riboflavina/Luz/NBT de taxifolina y ATPV.....	51
Tabla 7-3:	Captación de O ⁻ modelo NADH/PMS/NBT de taxifolina y ATPV.....	52
Tabla 8-3:	Resultados de inhibición de XO de alopurinol y ATPV.....	53
Tabla 9-3:	Capacidad captadora de radical libre DPPH* de ácido ascórbico.....	54
Tabla 10-3:	Capacidad captadora DPPH* del extracto de ATPV.....	55
Tabla 11-3:	Capacidad captadora de radical superóxido de ácido ascórbico.....	55
Tabla 12-3:	Capacidad captadora de radical superóxido del extracto de ATPV.....	56
Tabla 13-3:	Capacidad captadora de radical superóxido de ácido gálico.....	57
Tabla 14-3:	Capacidad captadora de radical superóxido del extracto de ATPV.....	57
Tabla 15-3:	Inhibición de xantina-oxidasa de alopurinol.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Distribución geográfica del género <i>Psychotria</i> en Ecuador.....	11
Figura 2-1: Ilustración botánica de <i>Psychotria viridis</i>	12
Figura 3-1: Preparación de Ayahuasca	13
Figura 4-1: Estructura química de N-N dimetilriptamina (DMT)	14
Figura 5-1: Estructura molecular 3D de xantina oxidorreductasa	16
Figura 6-1: Mecanismo catalítico de XO sobre xantina	17
Figura 7-1: Mecanismo de reacción de xantina oxidasa	29
Figura 8-1: Mecanismo de reacción del sistema XO/xantina/NBT	30
Figura 9-1: Reacción de DPPH* con captadores de radicales	31
Figura 10-1: Reducción de NBT inducida por O ^{•-} , generado por el sistema NADH/PMS...	32
Figura 11-1: Mecanismo de reducción de NBT por fotólisis de B ₂	33

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Recolección del material vegetal de *P. viridis*

ANEXO B: Control de calidad de las hojas secas de *P. viridis*

ANEXO C: Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso de *P. viridis*

ANEXO D: Extracción de alcaloides de *P. viridis*

ANEXO E: Ensayos autográficos

ANEXO F: Ensayos en microplaca

ANEXO G: Guía de movilización de especímenes de Flora y Fauna para *P. viridis*

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el potencial inhibitorio de la fracción alcaloidal aislada a partir de *Psychotria viridis* sobre la enzima xantina oxidasa (XO) y radical superóxido mediante autografía. Para evaluar la inhibición enzimática se utilizó como sustrato xantina, diferentes concentraciones de la fracción alcaloidal (1, 10, 50, 100 µg) disueltas en una mezcla de solución buffer de fosfato pH 7.9 y dimetilsulfóxido como mejorador de la solubilidad (0.25%), y XO. Similarmente, para determinar la capacidad captadora de radical superóxido se utilizaron dos métodos; el primero consistente en el sistema riboflavina (B2), nitroazul de tetrazolio (NBT) y luz, y el segundo constituido por nicotin adenin dinucleótido reducido (NADH), nitroazul de tetrazolio (NBT) y metosulfato de fenazina (PMS). Las pruebas se llevaron a cabo sobre placas de cromatografía de capa delgada, en las que las muestras fueron sembradas mediante la técnica *dot-blot*. Una vez obtenidos resultados positivos en las pruebas autográficas precedentes, se realizaron experimentos sobre microplacas de 96 pocillos y un lector de microelisa, para la determinación de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de la fracción alcaloidal y estándares adecuados de comparación (ácido ascórbico, ácido gálico y alopurinol) tanto para la prueba de inhibición enzimática, como para los ensayos de captación de radical superóxido. Se pudo establecer que la fracción alcaloidal de *Psychotria viridis* no exhibe una capacidad inhibitoria significativa sobre XO a las concentraciones ensayadas (4-32 µg/mL); sin embargo, muestra una muy apreciable capacidad captadora de radical superóxido, con valores de IC₅₀ de 0.94±0.064 µg/mL y 16.01±0.14 µg/mL en los sistemas B2/LUZ/NBT y NADH/PMS/NBT, respectivamente; superando incluso a los controles ensayados, ácido ascórbico IC₅₀ 2.03±0.026 µg/mL y ácido gálico IC₅₀ 22.61±0.78 µg/mL. Lo anterior origina muchas expectativas para posteriores investigaciones en el campo del potencial antioxidante de las moléculas presentes en la fracción alcaloidal de *Psychotria viridis*. Se recomienda continuar con los estudios de elucidación estructural.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA>, <AMIRUKA (*Psychotria viridis*)>, <ALCALOIDE>, <XANTINA OXIDASA>, <RADICAL SUPERÓXIDO>, <AUTOGRAFÍA (MÉTODO)>

ABSTRACT

The objective of this investigation was to determine the inhibitory potential of the isolated alkaloid fraction of *Psychotria viridis* in the enzyme xanthine oxidase (XO) and the superoxide radical by autograph. To evaluate the enzyme inhibition, different concentrations of the alkaloid fraction (1, 10, 50, 100 µg) dissolved in a mixture of phosphate solution after pH 7.9 and dimethylsulfoxide were used as a solubility improver (0.25%), and XO. Similarly, two methods were used to determine the ability to capture capacity superoxide radicals; the first consists of riboflavin (B2), nitro blue tetrazolium (NBT) and light system, and the second consists of nicotin adenine dinucleotide reduced (NADH) tetrazolium nitro blue (NBT) and phenazine methosulfate (PMS). The tests were carried out on thin layer chromatography plates, in which the samples were seeded by the dot blot technique. Once positive results were obtained in the previous autographic tests, experiments were carried out on 96-well microplates and a microelisa reader, for the determination of the mean inhibitory concentration (IC₅₀) of the alkaloidal fraction and suitable comparison standards (ascorbic acid, acid gallic acid and allopurinol) both for the enzyme inhibition test, and for the superoxide radical uptake tests. It was established that the alkaloidal fraction of *Psychotria viridis* does not exhibit a significant inhibitory capacity on XO at the concentrations tested (4-32 µg/mL); however, it shows a very appreciable superoxide radical scavenging capacity, with IC₅₀ values of 0.94±0.064 µg/mL and 16.01±0.14 µg/mL in the B2 / LUZ / NBT and NADH / PMS / NBT systems, respectively; even exceeding the controls tested, ascorbic acid IC₅₀ 2.03±0.026 µg/mL and gallic acid IC₅₀ 22.6±0.78 µg/mL. The above creates many expectations for further research in the field of the antioxidant potential of the molecules present in the alkaloidal fraction of *Psychotria viridis*. It is recommended to continue with the studies of structural elucidation.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <AMIRUKA (*Psychotria viridis*)> <ALKALOID>, <XANTHINE OXIDASE>, <SUPEROXID RADICAL>, <AUTOGRAPHY (METHOD)>

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

A nivel mundial, los extractos vegetales se analizan continuamente para determinar su bioactividad (Ramawat y Michael, 2013: p.121). Las plantas producen metabolitos secundarios tales como alcaloides, fenoles, esteroides, glucósidos, taninos, terpenoides, fitoalexinas, compuestos que ayudan en su reproducción y supervivencia y que además exhiben actividades biológicas, aplicables a la salud humana y animal (Debnath et al., 2018: p.56).

La familia *Rubiaceae* presenta una gran diversidad de sustancias como iridoides, antraquinonas, terpenoides (diterpenos y triterpenos), flavonoides y otros derivados fenólicos, con una marcada producción de alcaloides indólicos bioactivos (Porto et al., 2009: p.29). Varios estudios reportan la diversidad estructural y actividades farmacológicas de esta familia, que demuestra ser una fuente prometedora de sustancias activas, que puede dar lugar a prototipos de fármacos (Perez et al., 2012: p. 11898).

Se encuentra dividida en 3 subfamilias: Cinchonoideae, Ixoroideae y Rubioideae (Bremer y Eriksson, 2009: p.766). Algunas sustancias farmacológicamente activas y de interés económico y cultural han sido aisladas a partir de la familia *Rubiaceae*; como es el caso de la cafeína (*Coffea arabica*), genipina (*Genipa americana*), quinina (*Cinchona*) y DMT (*P. viridis*) (Martins y Nunez, 2015: p. 13423).

Desde 1974, varios trabajos han demostrado que *Psychotria* perteneciente a la subfamilia Rubioideae es una fuente potencial de alcaloides, con aproximadamente el 52%, del cual alrededor del 87% pertenecen al subgrupo de alcaloides indol (de Carvalho et al., 2016: p.232). De igual forma, se ha comprobado que el anillo indol posee una amplia gama de actividades farmacológicas como: antihistamínico, antifúngico, antimicrobiano, antioxidante, regulador del crecimiento de plantas, anti-VIH, anticonvulsivo, antiinflamatorio y analgésico (Singh y Singh, 2017: p.9).

Diferentes estudios han demostrado que los alcaloides presentes en algunas especies vegetales poseen actividad inhibitoria sobre XO y capacidad captadora de radicales libres. Una investigación presentada por Ahmad et al. (2010: p.716) expone que los alcaloides oxindol de *Isatis costata* tienen gran capacidad para combatir la hiperuricemia, especialmente la costinona A. Otro estudio recientemente publicado por Sang et al. (2017: p.3) también informó que los alcaloides de *Nelumbinis folium* tienen potencial para combatir la hiperuricemia, con una actividad inhibitoria de XO. Por otro lado, no se han registrado estudios acerca de la inhibición de XO por parte de especies del género *Psychotria*. No obstante, se han descrito distintos trabajos sobre la actividad captadora de radicales libres en varias especies de *Psychotria*, como *P. carthagenensis*, *P. capillacea* las cuales exhiben mejores resultados en comparación a compuestos de referencia y se atribuyen en su mayoría a compuestos de origen fenólico (Formagio et al., 2014: p. 746).

Con respecto a *Psychotria viridis*, esta ha demostrado tener actividad citotóxica e inhibitoria de acetilcolinesterasa (Soares et al., 2017: p. 89), siendo su componente mayoritario, la dimetiltriptamina (DMT) conocida principalmente por los efectos psicodélicos breves e intensos que produce cuando se administra por vía oral en forma de ayahuasca (bebida de cohorte espiritual elaborada por las comunidades indígenas de las regiones amazónicas de Colombia, Ecuador, Perú y Brasil) (Barker, 2018, p. 8). Sin embargo, evidencia reciente sugiere que la DMT se encuentra de forma endógena en el cerebro y desempeña papeles importantes en el sistema nervioso central y periférico, pudiendo actuar incluso como neurotransmisor (Carbonaro y Gatch, 2016: p. 6). Además, presenta acciones antihipóxicas, antidepresivas y constituye un promotor de la plasticidad neuronal (Dean et al., 2019: pp.1-2).

Identificación del problema

La xantina oxidasa (XO) es una enzima que cataliza la formación de ácido úrico a partir de la xantina y la hipoxantina, compuestos que a su vez se producen a partir del catabolismo de las purinas (Maiuolo et al., 2016: p. 1). Por lo tanto, cualquier defecto o alteración en la vía de degradación de las purinas puede resultar en un aumento del nivel de ácido úrico, reconocido como un factor de riesgo importante para el desarrollo de la gota. Cabe señalar, que las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas a partir de las reacciones catalizadas por XO también pueden contribuir a una serie de afecciones patológicas que incluyen inflamación, trastornos metabólicos, envejecimiento celular y carcinogénesis (Bove et al., 2017: p.27). Este hecho sugiere que la inhibición

de la actividad de XO puede constituir una estrategia terapéutica no solo para la hiperuricemia sino también para otras enfermedades.

Las ROS producidas en mayor proporción durante las reacciones mediadas por XO son los aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Xu et al. 2019: p. 70). Aunque el H_2O_2 no es un radical libre, es capaz de formar ROS como anión hidroxilo (OH^\bullet) altamente reactivo especialmente con fosfolípidos de las membranas celulares y proteínas (Liguori et al., 2018: pp. 757-758). Se ha demostrado a través de estudios *in vivo* e *in vitro* que la generación de estas moléculas puede dar lugar a varias patologías como: lesión miocárdica por isquemia, accidente cerebrovascular, isquemia esplácnica, hepática, renal, pulmonar, shock circulatorio, insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión, hipercolesterolemia, aterosclerosis, diabetes, colitis y otras enfermedades inflamatorias (Pacher, 2006, pp. 1-17).

A nivel mundial la prevalencia más alta de gota se ha registrado en los países de Oceanía, particularmente, en grupos étnicos como los aborígenes taiwaneses y maoríes, con estimaciones >10%. En la mayoría de los países de América del Norte y Europa Occidental, se han registrado rangos de 1 a 4% lo que sugiere que la prevalencia e incidencia de la gota está aumentando en los países desarrollados (Kuo et al., 2015: pp:649-650). Los datos de los países en vías de desarrollo son más escasos y están a cargo del Programa Orientado a la Comunidad para el Control de las Enfermedades Reumáticas (COPCORD), lanzado por la OMS y la Liga Internacional de Asociaciones de Reumatología que han intentado ampliar el conocimiento sobre la prevalencia de las enfermedades reumáticas en países de América Central y del Sur como México, Venezuela y Cuba donde se estima un rango de entre 0.3 – 0.4% (Peláez et al., 2011: pp. 4-5). Por su parte, Ecuador no cuenta con registros actuales sobre la temática planteada, hecho que no elimina la posibilidad de una prevalencia significativa de estos trastornos en el país y que invita a las organizaciones gubernamentales a tomar las medidas necesarias para la obtención de datos epidemiológicos.

En la actualidad, el estrés oxidativo es el principal responsable del desarrollo de un sinnúmero de enfermedades (Liguori et al., 2018: p. 758), por lo que la búsqueda de nuevas moléculas capaces de mitigar los efectos nocivos de ROS ha planteado un paralelismo literario basado en la lucha del bien contra el mal, en donde los antioxidantes constituyen el Santo Grial actuando como una barrera protectora contra las ROS (Ghezzi et al., 2017: p. 1791).

Por su parte, los inhibidores de XO (alopurinol y al febuxostat) se consideran actualmente la terapia de primera línea para el tratamiento a largo plazo de la gota y los trastornos relacionados (Wilson y Saseen, 2016: pp. 906-907). El uso continuado de alopurinol está asociado con eventos adversos graves, por ejemplo: hipersensibilidad, hepatitis, nefritis intersticial y eosinofilia; los cuales reducen la tolerancia y la adherencia a largo plazo con el tratamiento. Mientras que, el febuxostat a pesar de ser mejor tolerado en comparación con alopurinol sigue presentando reacciones indeseables (Ojha et al., 2017: pp. 7-8).

Finalmente, los estudios actuales sobre actividad antiradicalaria han puesto su total atención a compuestos de tipo fenólico, que incluyen derivados de estilbeno como el resveratrol, ácidos fenólicos y flavonoides (Liguori et al., 2018: p. 758). Y han dejado de lado a compuestos como los alcaloides de tipo indol cuya estructura promete una notable propiedad antioxidante y un sin número de actividades biológicas adicionales (Kherkhache et al., 2018: pp. 5-6). Es así que, la estructura aminoindólica de la DMT presente en las hojas de *Psychotria viridis* podría ofrecer resultados satisfactorios en este campo.

Justificación del estudio

En América del Sur, los géneros *Uncaria*, *Cinchona* y *Psychotria* de la familia *Rubiaceae* son de especial interés debido a las bioactividades de sus fitoquímicos (Ramawat y Michael, 2013: p. 122). El género *Psychotria* ha sido etiquetado como uno de los géneros "calientes" ya que ha mostrado tener una amplia gama de actividades biológicas cuyos responsables son alcaloides indólicos y monoterpénicos, en su mayoría (Ramawat y Michael, 2013: p. 125). Sin embargo, no se ha llevado a cabo ningún tipo de estudio de especies del género en inhibición enzimática sobre XO.

Estadísticamente, la problemática de hiperuricemia y gota no se encuentra bien definida a nivel de Ecuador. Sin embargo, la evidencia epidemiológica reciente ha mostrado una tendencia creciente en la incidencia de estas enfermedades en el mundo occidental que estiman una prevalencia de hasta el 21% para la hiperuricemia y del 1% al 4% para la gota (Bove et al., 2017: p. 24) y representa un riesgo a largo plazo que se podría evitar a través del hallazgo de nuevas alternativas terapéuticas a partir de fuentes naturales.

A pesar de los problemáticos efectos secundarios del alopurinol, sigue siendo la piedra angular del tratamiento clínico de la hiperuricemia y trastornos relacionados (Chung et al., 2010: p. 219). Es por ello, que en el mundo científico existe un espacio para el descubrimiento y desarrollo de nuevos inhibidores de XO para la terapia de dichas patologías. Actualmente, se desea hallar compuestos que puedan compararse con el perfil de eficacia del alopurinol cuya seguridad sea superior (Dalbeth et al. 2019: p. 125), y con un enfoque antioxidante que logre paliar afecciones isquémicas, enfermedades inflamatorias y las diversas formas de lesión orgánica generadas por la producción de ROS. En los últimos años, aproximadamente 107 inhibidores de XO han entrado en pruebas clínicas y, sin duda, hay interés en el desarrollo de nuevas series adicionales (Ghezzi et al. 2017: p. 3)

Al ser *Psychotria* un género que incluye alrededor de 1650 especies y existiendo en el Ecuador alrededor de 50 especies distribuidas principalmente en las zonas bajas y bosques andinos (Ulloa et al., 2016), es importante explotar nuevas áreas de investigación que contribuyan a cumplimentar lo estipulado en el Plan Nacional de Desarrollo Toda una Vida en el inciso d15, que menciona se debe: "Impulsar programas de investigación, formación, capacitación y actualización que respondan a las potencialidades y necesidades territoriales" (Secretaría Técnica Plan Toda Una Vida, 2018).

Asimismo, el estudio de *Psychotria viridis* supone el fortalecimiento de saberes ancestrales que han sido mermados por la aculturación acelerada, la pérdida de bosques primarios y el paso inclemente del tiempo. A través de la etnobotánica ha sido posible el rescate de conocimientos milenarios para el aprovechamiento sostenible de la diversidad vegetal y sobre todo para su devolución a los pueblos indígenas en armonía con las nuevas generaciones científicas y académicas (Ríos et al., 2007: p.1-3).

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

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

Objetivos específicos

- Establecer la idoneidad de la materia prima vegetal a emplearse a través del control de calidad de hojas de *Psychotria viridis*.
- Identificar cualitativamente la presencia de los metabolitos secundarios de *Psychotria viridis* a través de tamizaje fitoquímico.
- Estimar el rendimiento de alcaloides totales en hojas de *Psychotria viridis* mediante extracción líquido - líquido con variación de pH.
- Determinar la concentración media inhibitoria IC_{50} del extracto de alcaloides totales de *Psychotria viridis* sobre xantina oxidasa y radical superóxido mediante espectrofotometría en microplaca.
- Diferenciar inhibidores puros de xantina oxidasa de captadores de superóxido y agentes antioxidantes a través de la generación no enzimática de superóxido (NADH y riboflavina) y el ensayo de DPPH*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Familia Rubiaceae

1.1.1 Características

Rubiaceae es la cuarta familia más grande dentro de las angiospermas con un estimado de 13,000 especies repartidas en 650 géneros (de Carvalho et al., 2016: pp. 145-149). En su mayoría, los miembros de esta familia son árboles o arbustos pequeños, pero también se pueden encontrar en forma de árboles grandes, plantas herbáceas anuales, perennes, leñosas, lianas o epífitas; rara vez como plantas acuáticas o suculentas. (Porto, Henriques y Fett-neto 2009).

El espécimen vegetal más conocido de *Rubiaceae* es la planta de café (*Coffea arabica*) debido a su importancia económica (Davis et al., 2009: p. 69) y por haber dado nombre a esta familia ya que la palabra *Rubiaceae* proviene del latín "rubeus" que significa rojo, color característico de su fruto en estado de madurez (Koehbach y Gruber, 2015: p. 60).

El origen de esta familia data de hace millones de años. Se ha determinado que el ancestro común más antiguo pertenece al período del Mioceno, pero se cree que su origen es mucho más antiguo (Bremer y Eriksson, 2009: p. 767). Debido a la complejidad de sus especies, la clasificación taxonómica de esta familia se realiza en base a estudios filogenéticos y quimiotaxonómicos. Las publicaciones más recientes han establecido tres subfamilias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae (Bremer y Eriksson, 2009: p. 771).

1.1.2 Distribución Global

Las Rubiáceas se han adaptado a una amplia variedad de condiciones ambientales por lo que pueden desarrollarse en casi cualquier tipo de hábitat alrededor mundo. Esto incluye ambientes áridos, bosques húmedos, regiones tropicales e incluso climas tan fríos como en el sub Ártico. En las regiones templadas, las especies de esta familia se encuentran principalmente como especies herbáceas, mientras que en regiones tropicales adquieren estructuras leñosas (Bremer y Eriksson 2009).

En relación al número total de especies de *Rubiaceae*, las regiones con mayor biodiversidad son: Colombia, Venezuela, Nueva Guinea, Norte de Brazil con 1026, 785, 725 y 645 variedades respectivamente (Davis et al. 2009).

En Ecuador existen 84 géneros y alrededor de 557 especies de las cuales 98 son endémicas. Según el libro Rojo de plantas endémicas del Ecuador desarrollado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), más del 50% de las especies endémicas del país se encuentran en peligro crítico de extinción y se sospecha que un 14% podrían estar extintas (Cornejo y Jaramillo 2000).

1.2. Género *Psychotria*

Psychotria es el género más grande de las Rubiáceas, con más de 2000 especies, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. En base a sus características morfológicas y distribución geográfica, posee tres subgéneros: *Psychotria* (pantropical), *Hetero Psychotria* (especies neotropicales) y *Tetramerae* (África y especies de Madagascar) (Nepokroeff, Bremer y Sytsma 1999: p. 5).

1.2.1. Características

En sentido amplio, este género se caracteriza por la presencia de un ovario inferior, corola recta de color blanco o verdoso, ovario con un solo óvulo por lóculo y frutos carnosos con 2 a 5 semillas de apariencia lisa o acanalada (Nepokroeff, Bremer y Sytsma 1999: p. 6). Por su parte, las especies del

subgénero *Psychotria* se caracterizan por presentar hojas rojo-marrón o, a veces, de color verde opaco; sus estípulas son generalmente vainas y caducas, con una cresta pequeña y pálida, a menudo con una franja de pelos de color marrón rojizo; las semillas poseen dos surcos longitudinales en la superficie ventral plana y usualmente cuatro o cinco surcos longitudinales en la superficie dorsal redondeada (Hamilton, 1989, p. 68).

En Ecuador se encuentran aproximadamente 50 especies distribuidas en regiones de baja altitud; 7 especies han sido identificadas en los bosques andinos: *P. hartwegiana* Standley, *Cephaelis jamesonii* Standley, *P. madida* Standley, *P. nervosa* Sw., *P. recordiana* Standley, *P. rugulosa* H.B.K. y *P. tinctoria* Ruiz & Pavón. (Ulloa y Moller, 2018).

1.2.2 Etnobotánica

Varias especies de *Psychotria* son ampliamente utilizadas en la medicina popular mundial para el tratamiento de diversas enfermedades, que incluyen trastornos reproductivos, bronquiales, gastrointestinales, períodos pre y posparto, preparadas por infusión o decocción. Su uso externo en forma de baños o cataplasmas está indicado para pallear la fiebre, dolor de cabeza, dolor de oído y trastornos de la piel y ojos (Frescura et al., 2013: p. 23).

Las flores y frutos de *P. colorata*, por ejemplo, son utilizados por los “caboclos” del Amazonas para tratar el dolor de oído y el dolor abdominal (Verotta et al., 1999: p. 165). En Malasia, las hojas de *P. rostrata* se emplean para el tratamiento del estreñimiento (Takayama et al., 2004: p. 2945).

Los usos tradicionales de estas plantas en Ecuador son de tipo medicinal, social y alimenticio. Es así que los frutos de *P. trichocephala* y *P. zevallosii* son comestibles. Especies como: *P. anemothyrsa*, *P. bahiensis*, *P. marginata*, *P. poeppigiana*, *P. racemosa*, *P. berteroana*, entre otras, sirven para tratar infecciones o lesiones de la piel y mucosas. Con respecto a lo social, los *shamanes* de la etnia Tsa’chi-Pichincha utilizan *P. caerulea* para curar el “mal aire”, *P. capitata* para quitar la mala suerte y *P. hispidula* para activar buenas energías y sacar los malos espíritus; las etnias Wao, Shuar, Cofán, Secoya y Kichwa del Oriente, por su parte emplean *Psychotria viridis* para la preparación de *yagé*, ayahuasca o “*pinde*” (bebida alucinógena espiritual) (De la Torre et al. 2008: pp. 551-555).

1.2.3 Alcaloides de *Psychotria*

Las especies de *Psychotria* a menudo acumulan alcaloides de indol, rasgo que puede ser importante para la quimiosistemática, debido a la falta de características morfológicas notorias en este género taxonómicamente complejo (Calixto et al., 2016: p.1358). Los principales alcaloides encontrados en el subgénero *Psychotria* son los poliindoles, que se caracterizan por la presencia de N-metilriptamina en sus estructuras como la psicotridina obtenida de *P. beccarioides*, *P. forsteriana*, *P. oleoides* y *P. colorata*. Otro grupo de alcaloides corresponde a MIAs (alcaloides indol monoterpénicos) característicos del subg. *Heteropsychotria*, mismos que han mostrado ser agentes anticancerígenos, antipalúdicos y antiarrítmicos (de Carvalho et al., 2016: pp. 232-234).

Además de los compuestos mencionados se han reportado otro tipo de alcaloides. De las partes aéreas de *P. glumerullata*, por ejemplo, se aislaron alcaloides de quinolina. El estudio químico de *P. klugii* condujo al aislamiento de alcaloides de benzoquinolizidina: klugina, O-demetilcefalina, cefalina, isocefalina y 7-O-etilipecósido (Yang et al., 2016: pp. 1-3).

Las investigaciones fitoquímicas partir de extractos, fracciones y/o alcaloides aislados de *Psychotria* confirman una larga lista de actividades biológicas *in vivo* e *in vitro* (Porto et al., 2009: p.30) . Diferentes investigaciones han demostrado que estas especies poseen principalmente actividades citotóxicas, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas. Algunos ejemplos son: la capacidad citotóxica de los alcaloides poliindólicos de *P. forsteriana* en células de hepatoma de rata o la actividad analgésica de hodgkinsina y umbelatina obtenidas de *P. colorata* y *P. umbellata*, respectivamente (de Carvalho et al., 2016: pp. 248-252). Un estudio presentado por Fragoso et al. (2008, p. 559) indica que *P. umbellata* produce un alcaloide indol monoterpénico denominado psicolatina que mostró gran capacidad de captación de $O_2^{\bullet-}$.

1.3. *Psychotria viridis*

P. viridis se conoce comúnmente como "amiruka" o "chacrana" en Ecuador y Perú respectivamente. Fue descrita por primera vez en 1779 por Ruiz y Pavón. Se encuentra en forma de arbustos o árboles y crece naturalmente en áreas de bosques planos y húmedos con clima tropical, desde la región norte de América Central hasta América del Sur. Se encuentra más comúnmente en la región amazónica de Ecuador (Esmeraldas, Napo, Pastaza), Perú y el norte de

Bolivia (Soares et al., 2017: pp. 929-930). Su período de floración se da en marzo, mientras que la fructificación inicia en enero hasta junio y durante el mes de septiembre (Hamilton, 1989, p. 94).



Figura 1-1: Distribución geográfica del género *Psychotria* en Ecuador

Fuente: Tropicos, 2009

1.3.1 Descripción botánica

Árbol o arbusto de 2 a 4 m de altura; tallos lisos, corteza pálida; estípulas ovadas, ápices acuminados de 3-6 mm; hojas subsésiles, pecioladas de color marrón rojizo opaco a verde marrón, con 7-10 pares de venas secundarias divergentes y venas terciarias poco visibles. Las inflorescencias terminales o pseudoaxilares presentan un eje principal con una longitud de 6.5-12 cm donde se dispone un pedúnculo de 2-6 cm de largo con flores dispuestas a manera de glomérulos con brácteas ciliadas, irregulares de color rojo-pardas. Flores sésiles; cáliz en forma de copa, corola blanca, 5 estambres con filamentos de 2 mm de largo, anteras de 0.5 mm de largo. Su fruto constituye una drupa de color rojo en estado de madurez con 4.5-5 mm de largo y 3-3.5 mm de diámetro, en su interior posee semillas que presentan 4-5 surcos longitudinales profundos, con 2 surcos longitudinales en la superficie ventral (Hamilton, 1989, p.94).



Figura 2-1: Ilustración botánica de *Psychotria viridis*

Fuente: Trópicos, 2019

1.3.2. Ayahuasca

La ayahuasca es una bebida psicoactiva natural utilizada durante siglos por los grupos indígenas de las regiones amazónicas de Brasil, Perú, Colombia y Ecuador con fines religiosos y terapéuticos. La palabra ayahuasca proviene del quechua *aya* que significa "alma" o "espíritu muerto", y *waska* "cuerda" o "vid" (Cox, 2010, p. 39).

Generalmente es preparada mediante la decocción prolongada de la liana *Banisteriopsis caapi* (*Malpighiaceae*) junto con las hojas de *Psychotria viridis* (*Rubiaceae*). *B. caapi* contiene alcaloides β -carbólicos como harmina, tetrahydroharmina (THH) y harmalina, que son inhibidores reversibles de la monoaminoxidasa A (MAO-A), mientras que *P. viridis* contiene N, N- dimetilriptamina (DMT). La DMT por sí sola es oralmente inactiva ya que la MAO-A periférica se encarga de su degradación, por su parte las β -carbólicas al inhibir su metabolismo permiten que el alcaloide atraviese la barrera hematoencefálica (BHE) y alcance los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} expresados en las neuronas de la capa V de las áreas corticales relacionadas con el procesamiento emocional y la introspección (dos Santos, Carlos y Hallak 2017: p. 1).



Figura 3-1: Preparación de Ayahuasca

Fuente: (Santos y Hallak, 2019)

En Ecuador, el pueblo quechua manifiesta que la ingestión de ayahuasca libera al espíritu para que deambule, de modo que se puedan descifrar los planes del enemigo, visitar tribus amigas y asegurar el amor de sus mujeres. Esta bebida se puede elaborar de diferentes maneras y es ingerida por el chamán de una aldea con el fin de comunicarse con los dioses para descubrir la fuente y el tipo de enfermedad de sus pacientes. La preparación y consumo de ayahuasca está destinada exclusivamente a los chamanes; sin embargo, muchas personas ajenas a las comunidades aborígenes principalmente turistas la beben e indican que la ayahuasca facilita "un retorno" al útero materno, a la fuente y el origen de todas las cosas", las personas son capaces de observar "todas las divinidades tribales, la creación del universo, los primeros seres humanos y animales, e incluso el establecimiento del orden social" (Cox, 2010, p.512).

Los estudios en voluntarios y animales sanos han evidenciado sus propiedades antidepresivas y ansiolíticas por lo que su consumo se asocia con una menor incidencia de problemas de salud mental. La evidencia sugiere que esta bebida puede ser empleada como una herramienta terapéutica en neuroprotección y el tratamiento de trastornos mentales y adicción; que vincula las experiencias místicas con la función conductual en general (Muttoni, Ardissino y John 2019: p. 12).

1.3.3 Dimetilriptamina (DMT)

La N, N-dimetilriptamina (DMT) es un alcaloide aminoindólico, tipo triptamina, de carácter endógeno en mamíferos y en una amplia variedad de plantas que incluyen los géneros *Phalaris*, *Delosperma*, *Acacia*, *Desmodium*, *Mimosa*, *Virola* y *Psychotria* (Carbonaro y Gatch, 2016: p. 4). El

interés de esta molécula recae en su capacidad para producir alucinaciones visuales breves y episódicas a altas concentraciones y por encontrarse en varias preparaciones chamánicas como: ayahuasca, hoasca o yagé, utilizados por pueblos indígenas en América del Sur durante siglos. Se ha reportado recientemente su uso como una droga recreativa en Europa y América del Norte (Carbonaro y Gatch 2016: pp. 3-4).

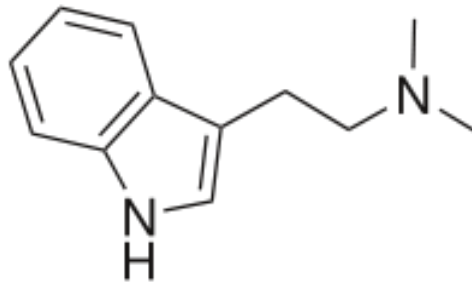


Figura 4-1: Estructura química de N-N dimetiltryptamina (DMT)

Fuente: (Carbonaro y Gatch, 2016)

La actividad alucinógena de la DMT exógena se atribuye a su afinidad por los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A}. Sin embargo, esta teoría ha sido invalidada por el descubrimiento de compuestos que carecen de los efectos visuales de DMT y que poseen mayor afinidad por el receptor 5-HT_{2A}, de manera que este mecanismo no explica por completo los efectos psicodélicos de DMT. Se ha concluido que el receptor 5-HT_{2A} es necesario, pero no suficiente para los efectos alucinógenos de DMT, y que los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{1A}, al igual que los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos, dopamina, acetilcolina, TAAR y receptores sigma-1 también juegan un papel importante (Dean et al. 2019: p. 1-3; Carbonaro y Gatch 2016: p. 20).

1.3.3.1 Síntesis

La DMT fue sintetizada por primera vez en 1931 por el químico Richard Manske. Años más tarde, en 1946, el microbiólogo Oswaldo Gonçalves descubrió la presencia de DMT en especies vegetales. No fue hasta 1956 que se descubrieron las propiedades alucinógenas cuando Stephen Szara, un químico y psiquiatra húngaro, logró aislar DMT a partir de *Mimosa hostilis* para ser autoadministrarse el extracto por vía intramuscular (Barker 2018, p. 3).

A nivel biológico en animales y plantas, el triptófano es el precursor de DMT. La biosíntesis inicia con la descarboxilación del triptófano por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) dando lugar a la triptamina (TA) que a través de una dimetilación catalizada por la indol-N-metiltransferasa (INMT) produce N-metiltriptamina (NMT) y luego DMT, utilizando S-adenosil-metionina (SAM) como fuente de metilo (Barker, 2018, pp. 4-5).

1.3.3.2 Rol fisiológico

Aunque se reconoce la presencia natural de DMT en humanos y animales, su función biológica sigue siendo un misterio. En roedores se ha demostrado que DMT se encuentra en bajas concentraciones en el tejido cerebral, que se ven incrementadas bajo situaciones de estrés. En 2001, se pensaba que la DMT endógena existía en concentraciones demasiado bajas para producir efectos farmacológicos. Sin embargo, se ha demostrado que DMT es secuestrada localmente en vesículas de almacenamiento de neurotransmisores a concentraciones farmacológicamente relevantes, pudiendo así activar otros receptores farmacológicos como los de serotonina y dopamina. Estos hallazgos sugieren que DMT puede tener un papel destacable en la fisiología normal del SNC y que podría emplearse como tratamiento para trastornos relacionados, como la ansiedad e incluso como inductor de la plasticidad neuronal (Carbonaro y Gatch 2016: pp. 7-8).

1.3.3.2 Estudios recientes

En 2014, Attila Szabo y sus colaboradores determinaron que la DMT desempeña una función importante en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa, disminuyendo significativamente los niveles de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF α e IL8 (Szabo et al. 2014: pp. 1-3). En 2016, este grupo postuló que DMT se genera de manera endógena en situaciones de estrés, aliviando los efectos adversos como la hipoxia isquémica en el cerebro (Szabo et al. 2016; citados por Dean et al., 2019).

1.4. Xantina oxidasa (XO)

La XO corresponde a una de las dos isoformas del homodímero xantina oxidoreductasa (XOR) con un peso molecular de 290 kDa. Se presume que fue descubierta por Schardinger en 1902 cuando notó que alguna de las sustancias presentes en la leche bovina era capaz de oxidar aldehídos a ácidos. En mamíferos, se encuentra principalmente a nivel del hígado, corazón e intestino (Kostić et al. 2015: p. 2).

1.4.1. Estructura

La XO pertenece a la familia de molibdoflavoproteínas. Está constituida por dos subunidades de 150 kDa aproximadamente, compuestas por tres dominios, como se muestra en la (Fig. 11). El dominio más grande contiene un centro de molibdeno (cofactor de molibdeno; molibdopterina), el intermedio un cofactor de flavin adenín dinucleótido (FAD), mientras que el más pequeño posee dos centros de azufre de hierro tipo ferredoxina, Fe/S I y Fe/S II (Okamoto, Kusano y Nishino 2013: p. 2606).

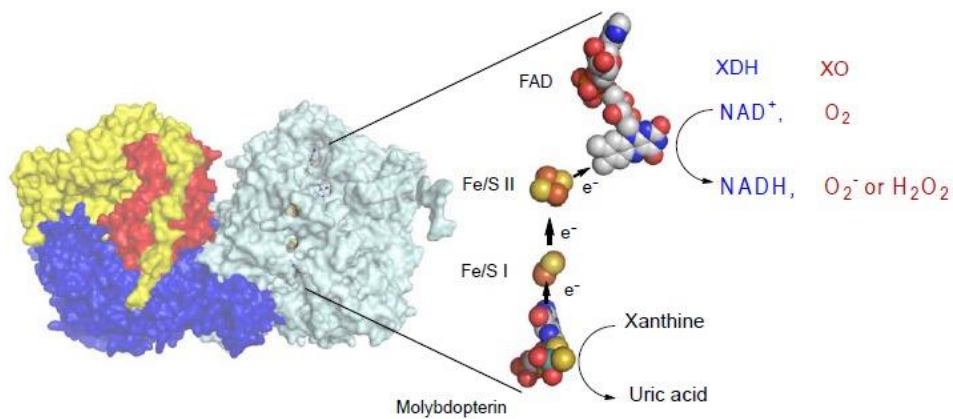


Figura 5-1: Estructura molecular 3D de xantina oxidoreductasa

Fuente: Enroth et al., 2000

1.4.2 Mecanismo de reacción

La enzima XO participa en el metabolismo de las purinas, catalizando la hidroxilación oxidativa de hipoxantina y xantina (sustratos) para producir ácido úrico y la reducción de O_2 en el centro de la flavina, generando radical superóxido y peróxido de hidrógeno (Ojha et al. 2017: p. 5).

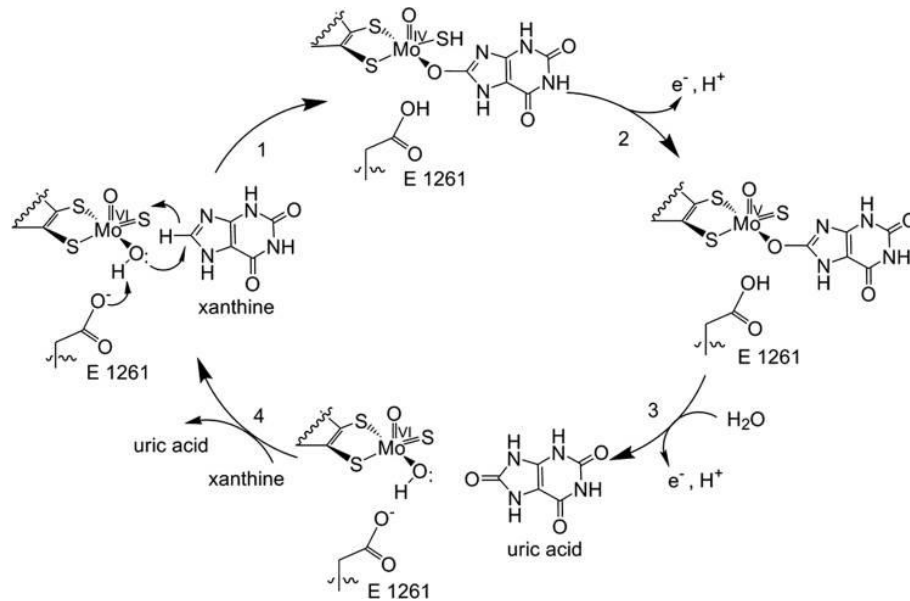


Figura 6-1: Mecanismo catalítico de XO sobre xantina

Fuente: Cao, Pauff y Hille 2010

El mecanismo de hidroxilación del sustrato por el centro de molibdeno de XO se representa en la Figura 6-1. La reacción inicia mediante la abstracción de un protón unido un carbono del sustrato por parte de un residuo de glutamato del centro de Mo que provoca la reducción de Mo (VI) a Mo (IV). Después de la desprotonación, el Mo (IV) forma un complejo LMo(IV)-O-(SH)(OP), donde OP representa el sustrato ahora unido al molibdeno a través del grupo hidroxilo introducido catalíticamente por los centros de azufre de hierro (SH), y L representa el ligando de eneditiolato del cofactor piranopterina común en todas las enzimas mononucleares de molibdeno y tungsteno. En el curso de la transferencia de electrones fuera del centro de molibdeno, el complejo enzima-sustrato es desplazado por una molécula de H_2O para regenerar el ligando Mo-OH para un ciclo catalítico posterior. En esta última semirreacción oxidativa, los electrones pasan del centro de FAD a un aceptor terminal de electrones; NAD^+ en el caso de la forma de deshidrogenasa de la enzima u O_2 en el caso de la forma de oxidasa. La hipoxantina es hidroxilada primero en C-2 para

formar xantina, y luego esta última se convierte en ácido úrico por hidroxilación en C-8 (Cao, Pauff y Hille 2010: p. 28044; Kostić et al. 2015: p. 2).

De acuerdo al potencial redox a nivel molecular, los centros de reacción se disponen linealmente en el siguiente orden: centro de molibdopterina, los dos centros de azufre de hierro de tipo [2Fe-2S] y centro de FAD. En relación a los centros de azufre de hierro, Fe/S II tiene el mayor potencial redox (Russ, Hall y Basu 2008: p. 15).

1.4.3 Enfermedades y trastornos relacionados

El ácido úrico y las ROS resultantes de la reacción catalizada por XO, son moléculas a las que se atribuye el desarrollo de hiperuricemia y estrés oxidativo que a su vez desencadena una larga lista de enfermedades a nivel orgánico.

En las células humanas se encuentran las dos isoformas del homodímero XOR pero en mayor cantidad la XDH que puede convertirse fácilmente en XO mediante la oxidación de los residuos de sulfhidrilo o por proteólisis (Enroth et al. 2000: p. 10723). Dado que el aceptor final de electrones de XO es el O₂, la formación de especies reactivas de oxígeno como los superóxidos es inevitable; por lo que se cree que está implicada en la patogénesis de la isquemia-reperfusión y en la producción de peroxinitrito y el anión carbonato, ambos oxidantes biológicos potentes. Las concentraciones elevadas de ROS resultantes de la actividad de XO se asocia con ataques cardíacos y derrames cerebrales, lesión de la médula espinal. Al encontrarse altas concentraciones de XOR en el hígado, una lesión en este órgano podría permitir la liberación de la enzima a la circulación de manera que se uniría al endotelio vascular, causando disfunción vascular e hipoxia miocárdica o renal. (Trager 2006: p. ; Cao, Pauff y Hille 2010: p.).

1.4.3.1 Hiperuricemia (HUA)

La hiperuricemia se define como el incremento de ácido úrico a concentraciones séricas superiores 6.8–7.0 mg/dL. Es considerada como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la gota, enfermedad caracterizada por la acumulación de ácido úrico en las

articulaciones. Sin embargo, se ha demostrado que la hiperuricemia no siempre desemboca en gota (Chen, Lü y Yao 2016: p. 2502).

1.4.3.2 Etiología

La producción de ácido úrico es el paso final del metabolismo de las purinas. La hiperuricemia puede ser resultado de la sobreproducción de ácido úrico por degradación acelerada de las purinas (hemólisis, rabdomiólisis y lisis tumoral) o disminución de la excreción de urato en caso de insuficiencia renal y acidosis metabólica o una combinación de ambos procesos (Maiuolo et al. 2016: p. 6).

1.4.3.3 Factores de riesgo

A excepción de ciertos síndromes monogénicos raros, la HUA es un trastorno común y complejo causado por múltiples factores de riesgo (Bovet et al. 2004; Kuo et al. 2015; Raja et al. 2019; Gustafsson y Unwin 2013).

- **Edad y sexo:** Los hombres tienen casi 3 veces más probabilidades de desarrollar HUA en comparación con las mujeres, siendo los hombres negros los más afectados. La incidencia de HUA aumenta con la edad tanto en hombres como en mujeres, pero el aumento más significativo relacionado con la edad se observa en las mujeres posmenopáusicas, lo que podría relacionarse con la disminución de estrógeno y su acción uricosúrica.
- **Dieta y consumo de alcohol:** Desde hace tiempo se reconoce que la dieta y el consumo de alcohol tienen un papel importante en el desarrollo de HUA. Sin embargo, solo en esta década han surgido pruebas sólidas para apoyar esta asociación. Se ha demostrado que una dieta rica en purinas procedentes de carne y mariscos aumenta el riesgo de HUA. Además, se encontró que entre el consumo de alcohol y el riesgo relativo de HUA se incrementa en 1.17 por cada 10g de aumento en el consumo diario de alcohol; entre las

diversas bebidas alcohólicas, la cerveza que contiene, además de alcohol, una gran cantidad de guanosina confiere el mayor riesgo.

- **Fármacos:** Se sabe que varios medicamentos aumentan el riesgo de HUA al aumentar los niveles de ácido úrico a través de la reducción de la excreción renal de ácido úrico. Los diuréticos de asa, tiazidas y similares son los fármacos más comúnmente asociados en este aspecto. Además, otros medicamentos de tipo antihipertensivo, incluidos los bloqueadores β , los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los antagonistas de angiotensina II a excepción de losartán también se asociaron con la HUA incidente. La ciclosporina y el tacrolimus, ambos utilizados para la inmunosupresión, también aumentan el riesgo de HUA al reducir la excreción renal de urato. Los pacientes con infección por VIH parecen tener un mayor riesgo de HUA, resultante del uso de agentes antirretrovirales como ritonavir, que pueden causar lipodistrofia y alteración metabólica.
- **Comorbilidad:** La evidencia que relaciona la HUA con el síndrome metabólico, la enfermedad cardiovascular y las enfermedades renales es amplia. Por ejemplo, la obesidad como parte del síndrome metabólico aumenta el riesgo de HUA. Las personas con hipertensión generalmente tienen el doble de probabilidades de desarrollar HUA incidente. La hiperuricemia se ha relacionado con la función renal alterada y el desarrollo de enfermedad renal crónica asociada con un aumento del 60% en el riesgo de HUA. La evidencia basada en la población sugiere un riesgo cuatro veces mayor de gota incidente para aquellos con insuficiencia cardíaca congestiva y un riesgo seis veces mayor para aquellos con enfermedad renal. La probabilidad de HUA es mayor con psoriasis y anemia de células falciformes, presumiblemente debido al aumento de la renovación celular. En 2011 se encontró un aumento del 73% en el riesgo de HUA en personas con anemia. Los informes de casos han sugerido una asociación entre HUA e hipotiroidismo, una posible explicación para esta asociación es la capacidad de la hormona tiroidea para influir en los niveles de ácido úrico a través de la regulación de la tasa de filtración glomerular

1.4.3.4 Tratamiento

De acuerdo con las pautas internacionales de la Sociedad de Reumatología. El eje central para el tratamiento de la hiperuricemia y enfermedades asociadas como la gota, consiste en la terapia de reducción de urato a largo plazo mediante (Dalbeth et al. 2019: p. 123):

- **Inhibidores de la xantina oxidasa (XO):** alopurinol hasta 900 mg diarios; febuxostat hasta 120 mg diarios.

- **Medicamentos uricosúricos:** probenecid hasta 1 g dos veces al día; benzbromarona hasta 200 mg diarios; lesinurad 200 mg diarios.

- **Uricasa recombinante:** infusión intravenosa de 8 mg de pegloticasa cada dos semanas.

1.4.4 Inhibidores de XO

En vista que la XO es una enzima crítica en la producción de ácido úrico y ROS, se convierte en un blanco efectivo para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de la hiperuricemia y enfermedades relacionadas.

1.4.4.1 Alopurinol

El primer fármaco inhibidor de XO fue el alopurinol [4-hidroxi pirazolo (3,4-d) pirimidina], que fue descubierto por los premios Nobel estadounidenses, Gertrude Elion y George Hitchings, en la década de 1940. Fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en 1966 para el tratamiento de la artritis gotosa aguda recurrente, tofos, nefropatía por urato, cálculos renales de ácido úrico.

Mecanismo de acción

El alopurinol es un análogo estructural de la hipoxantina. Después de la ingestión, el alopurinol es metabolizado en el hígado a su metabolito farmacológicamente activo, el oxipurinol (aloxantina), que actúa como un inhibidor competitivo de la enzima xantina oxidasa. Esto disminuye la conversión de hipoxantina y xantina en ácido úrico. Como resultado, hay un aumento en la hipoxantina y la xantina séricas que provoca la inhibición por retroalimentación de la síntesis de purinas de novo y con ello una disminución de las concentraciones séricas de ácido úrico (Ojha et al. 2017: p. 5-7).

Efectos adversos

Se estima que el alopurinol es utilizado por más de 1,2 millones de pacientes en los Estados Unidos y el Reino Unido. El alopurinol generalmente es bien tolerado, pero del 2 al 5% de los pacientes tratados experimentan efectos adversos (Bove et al., 2017: p. 25).

Cabe destacar que es uno de los medicamentos más comunes asociados con reacciones de hipersensibilidad potencialmente mortales, que incluyen depresión de la médula ósea, hepatotoxicidad, síndrome de StevensJohnson (SSJ), necrólisis epidérmica tóxica y exantema farmacológico con eosinofilia y manifestaciones sistémicas que pueden ocurrir incluso después de meses o años de medicación. Estas reacciones graves ocurren con una frecuencia del 0.1 a 0.4%, con una alta mortalidad (27-32%) y una alta morbilidad, incluyendo insuficiencia renal y secuelas oculares (Chen, Lü y Yao 2016: pp. 2506-2507).

Otros efectos adversos del alopurinol incluyen neuritis periférica, nefritis intersticial, toxicidad renal debido al deterioro del metabolismo de la pirimidina y malformaciones congénitas cuando se usa durante el embarazo. Aunque el mecanismo de la toxicidad del alopurinol no se comprende completamente, se hipotetiza que la acumulación de su metabolito, el oxipurinol, junto con factores inmunológicos y genéticos puede modificar las proteínas celulares y desencadenar una respuesta autoinmune contra las células de la piel o el hígado (Ojha et al. 2017: p. 8; Chen, Lü y Yao 2016: p. 2507).

1.4.4.2 Febuxostat

Mecanismo de acción

El febuxostat constituye un inhibidor selectivo de XO no análogo de las purinas. Actúa bloqueando el centro activo pterina-molibdeno del complejo enzimático. A diferencia del alopurinol y oxipurinol que solamente inhiben la forma reducida de la enzima, el febuxostat forma un complejo estable con la enzima tanto reducida como oxidada, evitando acción catalítica de los dos estados y la producción indeseada de ROS (Ragab et al., 2017; Chen et al., 2016).

Efectos secundarios

Los efectos secundarios del febuxostat incluyen reacciones de hipersensibilidad hepática o renal, y erupciones cutáneas benignas en aproximadamente el 5% de los pacientes durante los ensayos de fase 3. La notificación de reacciones cutáneas graves es rara pero ligeramente más frecuente en pacientes con intolerancia cutánea previa al alopurinol. En los estudios de fase 3, los efectos secundarios cardiovasculares y la mortalidad han aumentado numéricamente con respecto a los pacientes tratados con alopurinol. Esto ha llevado a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) a recomendar precaución al prescribir febuxostat en pacientes con antecedentes de enfermedad cardíaca y a solicitar un ensayo de seguridad cardiovascular posterior a la licencia que compare el febuxostat con el alopurinol, cuyos resultados aún están pendientes (Ragab, Elshahaly y Bardin 2017: p. 506).

1.4.4.3 Otros

La literatura reciente indica que varias sustancias no purínicas han sido investigadas para la inhibición de la xantina oxidasa, como las moléculas basadas en heteroarilos o flavonas cuyas modificaciones estructurales que podrían dar lugar a potentes inhibidores de XO. Además, varios extractos de plantas recientemente informados que poseen un potencial inhibidor significativo de la xantina oxidasa presenta una promesa suficiente para iniciar un programa de detección para la

identificación de otros extractos de plantas y fitoconstituyentes que poseen potencial inhibidor hacia la enzima.

1.5. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se genera cuando el equilibrio está a favor de los radicales libres debido al aumento en su producción o al agotamiento del nivel endocelular de antioxidantes, hecho asociado al daño de una amplia gama de especies moleculares, incluidos lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. (Parejo et al. 2002: p. 6862). Los radicales libres tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan constantemente *in vivo* y pueden conducir a la peroxidación lipídica y la oxidación de algunas enzimas, así como la degradación de proteínas por lo que las células poseen varios sistemas biológicos de defensa, para protegerse del daño mediado por este tipo de moléculas (Pisoschi y Pop 2015: p. 55)

1.5.1 Tipos

En general, el estrés oxidativo es resultado de la presencia de xenobióticos, activación del sistema inmune en respuesta a microorganismos invasores (inflamación) y radiación, razón por la cual de acuerdo a su origen, el estrés oxidativo puede clasificarse en endógeno o exógeno (Gagné, 2014, p. 104).

1.5.1.1 Estrés oxidativo exógeno

Las fuentes exógenas de radicales libres son abundantes e incluyen contaminación del aire y el agua, tabaco, alcohol, metales pesados o de transición, fármacos (p.ej., ciclosporina, tacrolimus, gentamicina y bleomicina), solventes industriales, alimentos (p. ej., carne ahumada, aceites usados y grasas) y radiación, que dentro del cuerpo se metabolizan en forma radicales libres (Liguori et al. 2018: p. 758).

1.5.1.2 Estrés oxidativo endógeno

Los radicales libres se pueden generar en procesos biológicos como la respiración celular, respuesta inmune, procesos inflamatorios y durante la actividad física intensiva. Las formas más comunes de radicales libres endógenos son las ROS como: radical hidroperoxilo, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, anión hidroxilo y radical hidroxilo; resultado de la reducción de O₂ por parte de varias enzimas oxidasas, como NADP⁺ oxidasa, xantina oxidasa y ciclooxigenasa. Las ROS también se pueden formar en la cadena de transporte de electrones mitocondriales, en el curso de la fosforilación oxidativa que produce ATP (Pisoschi y Pop 2015: p. 56).

1.5.2 Enfermedades asociadas

El daño inducido por los radicales libres en el estrés oxidativo se ha confirmado como un contribuyente a la patogénesis y fisiopatología de muchos problemas de salud crónicos, como afecciones neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica), enfisema, enfermedades cardiovasculares, metabólicas e inflamatorias, cataratas y cáncer. Se ha evaluado que el estrés oxidativo se correlaciona con más de 100 enfermedades. La producción progresiva de especies reactivas de oxígeno también acelera el envejecimiento, lo que conlleva al deterioro de las funciones fisiológicas promoviendo la incidencia de enfermedades y la reducción de la esperanza de vida (Pisoschi y Pop, 2015: p. 56).

1.5.3 Captación de radicales libres

Los seres humanos poseen un sistema antioxidante de defensa que incluye antioxidantes endógenos (enzimáticos y no enzimáticos) y exógenos, siendo la dieta la principal fuente exógena. El descubrimiento de nuevas fuentes antioxidantes podría detener el desarrollo de las enfermedades relacionadas a ROS y otros radicales libres.

1.5.3.1 Tipos

Endógeno

Los antioxidantes endógenos incluyen vías enzimáticas y no enzimáticas. Las enzimas antioxidantes primarias son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). La SOD convierte el anión superóxido en H_2O_2 , que se descompone en agua y oxígeno por CAT, evitando la producción de radicales hidroxilo. Por su parte, GSH-Px convierte los peróxidos y los radicales hidroxilo en formas no tóxicas mediante la oxidación de glutatión reducido (GSH) en disulfuro de glutatión y luego se reduce a GSH por glutatión reductasa. Otras enzimas antioxidantes son la glutatión-S-transferasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En contraste, los antioxidantes no enzimáticos son moléculas que interactúan con ROS y terminan las reacciones en cadena de los radicales libres, entre lo que destaca la bilirrubina, α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, albúmina y el ácido úrico que representan el 85% de la capacidad antioxidante en plasma (Liguori et al., 2018: p. 758).

Exógeno

Los antioxidantes exógenos incluyen el ácido ascórbico (vitamina C), que elimina el anión hidroxilo y superóxido, el α -tocoferol (vitamina E), que interviene contra la peroxidación lipídica de las membranas celulares, y los antioxidantes fenólicos, que incluyen derivados de estilbeno (resveratrol, fenólico ácidos y flavonoides), lecitinas oleaginosas, selenio, zinc y medicamentos como la acetilcisteína (Liguori et al., 2018: p. 758)..

1.5.3.2 Fuentes

De acuerdo a su origen los antioxidantes pueden ser sintéticos o naturales y se usan de manera rutinaria en la elaboración de alimentos y medicamentos, especialmente aquellos que contienen aceites y grasas para protegerlos contra la oxidación. Los antioxidantes fenólicos sintéticos, como el hidroxitolueno butilado (BHT) y el hidroxianisol butilado (BHA) son ejemplos destacados. Sin embargo, algunas propiedades físicas de este tipo de antioxidantes, como su alta volatilidad e

inestabilidad a temperatura elevada, legislación estricta sobre el uso de aditivos alimentarios sintéticos y la naturaleza cancerígena de algunos de ellos ha provocado que las industrias prefieran el uso de antioxidantes naturales antes que los sintéticos.

En vista del aumento de los factores de riesgo del ser humano a diversas enfermedades mortales, ha habido una tendencia mundial hacia el uso de sustancias naturales presentes en frutas, vegetales y plantas medicinales como antioxidantes terapéuticos. Se ha informado que existe una relación inversa entre la ingesta de alimentos y plantas medicinales ricas en antioxidantes y la incidencia de enfermedades humanas. Muchos compuestos antioxidantes, que se encuentran naturalmente en fuentes vegetales, han sido identificados como captadores de oxígeno activo o radicales libres. Hay varios informes que muestran el potencial antioxidante de las frutas. Se ha encontrado que bayas, cerezas, cítricos, ciruelas pasas y aceitunas, poseen una actividad antioxidante significativa, sobre todo por la presencia de compuestos fenólicos (Lobo et al., 2010: p. 123).

1.5.3.3 Mecanismos de acción

Se han propuesto dos mecanismos principales de acción para los antioxidantes. El primero es un mecanismo de ruptura de cadena por el cual el antioxidante primario dona un electrón al radical libre para su estabilización. El segundo mecanismo implica la eliminación de ROS/iniciadores de especies reactivas de nitrógeno mediante la desactivación del catalizador iniciador de la cadena. Los antioxidantes pueden ejercer su efecto sobre los sistemas biológicos mediante diferentes mecanismos, incluida la donación de electrones, la quelación de iones metálicos, los co-antioxidantes o la regulación de la expresión génica (Lobo et al. 2010: p. 121).

1.6 Autografía

La autografía se basa en la separación de compuestos a través de técnicas de cromatografía plana, como cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), cromatografía de capa con sobre presión (OPLC) y electrocromatografía plana. La autografía puede detectar cualquier actividad biológica, por ejemplo, antioxidante, enzimático, antiestrogénico, antimutagénico, antibacteriano, antifúngico, etc (Dewanjee et al., 2015: p. 75).

El método autográfico de TLC combina la separación cromatográfica y la determinación de la actividad *in situ* facilitando la localización y el aislamiento de los constituyentes activos en una mezcla (Ramallo, Zacchino y Furlan, 2006: pp. 15-16).

1.6.1 Tipos

1.6.1.1 Autografía de contacto

La placa de TLC sirve como soporte para la separación de compuestos de una mezcla de sustancias, luego la placa es colocada sobre el agar funcionalizado y gelificado durante algunos minutos u horas para permitir la transferencia por difusión de los compuestos presentes en la placa TLC. Las zonas de inhibición aparecen en los lugares donde los compuestos bioactivos estaban en contacto con la capa de agar. Es el método menos empleado (Choma y Grzelak, 2011: pp. 2685-2686)

1.6.1.2 Autografía directa

El principio de este método se basa en que una placa desarrollada de TLC se sumerge en una suspensión de reacción. Los lugares en donde se detecta actividad biológica se muestran como zonas de inhibición (Dewanjee et al., 2015: p. 77)

1.6.1.3 Autografía en inmersión (superposición de agar)

En este método, la placa TLC es cubierta con agar simple, después de la solidificación se siembran los microorganismos o enzimas y luego se incuba. Este método combina la autografía de contacto y la directa, porque los compuestos se transfieren de la placa al medio de agar, como en un método de contacto; al mismo tiempo, la capa de agar permanece sobre la superficie de la placa durante la incubación y visualización, como en la autografía directa (Rahalison et al., 1991: p. 199).

1.7 Determinación de inhibidores de XO

Durante más de 50 años, los únicos fármacos inhibidores de XO aprobados y disponibles en el mercado fueron el alopurinol y febuxostat. En la última década ha habido un resurgimiento en la búsqueda de nuevos inhibidores de XO a partir de síntesis química. Sin embargo, la mayoría de moléculas determinadas son resultado de farmacomodulaciones del alopurinol, razón por la que la investigación fitoquímica se ha sumado a la causa (Luna, Dolzhenko y Mancera 2019: p. 714).

1.7.1 Sistema xantina/xantina oxidasa

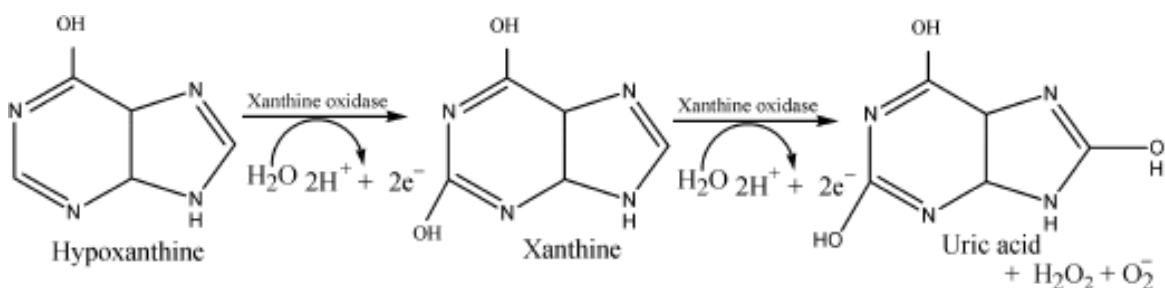


Figura 7-1: Mecanismo de reacción de xantina oxidasa

Fuente: (Kostić et al. 2015)

La enzima xantina oxidasa (XO) cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y posteriormente a ácido úrico con la producción de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. En este método, la producción de ácido úrico es el indicador de actividad de XO, de modo que es posible la determinación de sustancias inhibidoras de XO a través de la cuantificación de este metabolito a 295nm mediante espectrofotometría (Kostić et al. 2015: p. 3).

1.7.2 Sistema xantina/xantina oxidasa/NBT

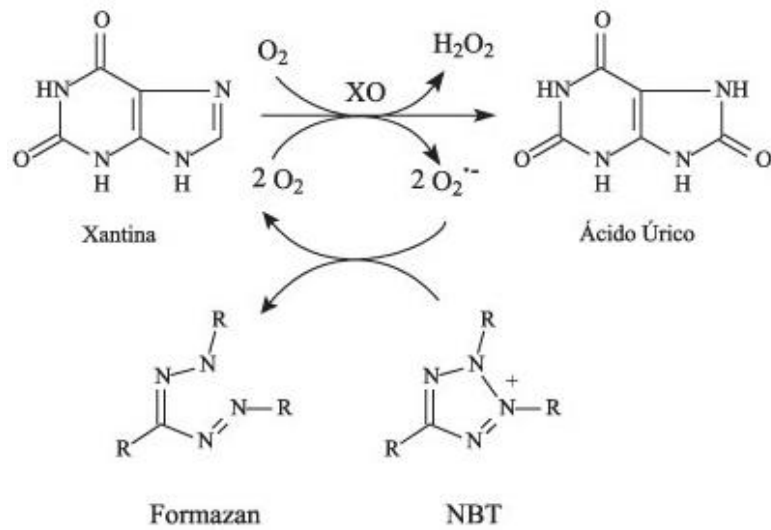


Figura 8-1: Mecanismo de reacción del sistema XO/xantina/NBT

Fuente: (Alves et al., 2010)

En 1971, Fridovich y sus colaboradores colocaron su atención en la enzima superóxido dismutasa (SOD) y desarrollaron varios métodos que involucran la generación de radical superóxido para la medición de su actividad *in vitro*. Al conocer que la reacción mediada por XO produce $O_2^{\bullet -}$ se desarrolló una técnica para medir la actividad de esta enzima, que incluye el uso de una sal de tetrazolio (NBT) que actúa como indicador de producción de radical superóxido por la formación de formazán (Greenwald 2018: p. 257).

El fundamento de este método permitió la derivación de uno nuevo para la determinación indirecta de inhibidores de XO. Sin embargo, dado que el ensayo utiliza la producción de radicales superóxido como indicador de la actividad enzimática de XO, los captadores de radicales libres también darán resultados positivos por lo que es necesaria la aplicación de pruebas confirmatorias (Ramallo, Zacchino y Furlan 2006: p. 17).

1.8 Determinación de captadores de radicales libres

Para la comunidad científica, la producción y detección de ROS no ha sido fácil debido a la complejidad de sus reacciones; puesto que definir el tipo de especies químicas presentes en un punto determinado de la reacción es complicado. Este hecho incrementa la complejidad experimental y plantea el desarrollo de varios sistemas o métodos que permitan conocer con certeza el comportamiento de las ROS para el descubrimiento de sustancias capaces de inhibirlas (Greenwald, 2018, p. 117).

1.8.1 Método DPPH*

Este método fue desarrollado por Blois en 1958 para determinar actividad antioxidante usando 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH*) (Prior, Wu y Schaich 2005: P. 4296). El DPPH* se caracteriza por ser un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón de reserva sobre su estructura (Figura 2-3) de modo que no se dimeriza, como la mayoría de radicales libres. Además, posee un color violeta profundo, con una absorción máxima a 517 nm (Cieřla et al. 2015: p. 3).

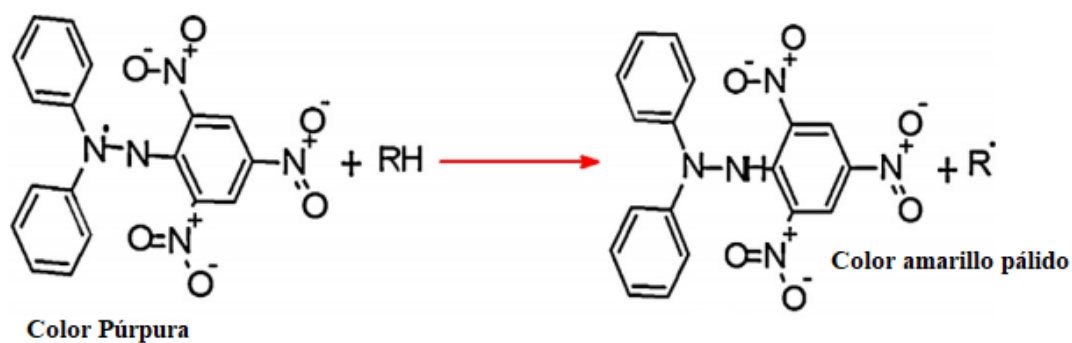


Figura 9-1: Reacción del radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH*) con captadores de radicales.

Fuente: Cieřla et al., 2015

El ensayo se basa en la medición de la capacidad de captación de radicales libres por parte de sustancias antioxidantes. El electrón del átomo de nitrógeno en el DPPH* se reduce al recibir un átomo de hidrógeno del antioxidante para dar lugar a la hidracina (Kedare y Singh 2011: p. 412-413).

Tras la reducción, el color violeta característico de la solución de DPPH* cambia a un color amarillo pálido causado por la presencia del grupo de ácido pírico (Molyneux, 2004, p. 212)

1.8.2 Sistema NADH/metosulfato de fenazina/NBT

En principio este método fue introducido por el bioquímico británico A. Pearse en 1957 para la detección histoquímica de la actividad de la deshidrogenasa. No obstante, se han desarrollado nuevas aplicaciones de esta técnica para la búsqueda de sustancias antioxidantes. La cuantificación de la actividad captadora de ROS a través de este sistema de reacción no enzimático es posible gracias a la producción de radical superóxido a partir de metosulfato de fenazina y nicotin adenin dinucleótido (PMS/NADH) que reduce el nitroazul de tetrazolio (NBT) a un formazán de color púrpura cuya formación se registra a 570nm (Mandal et al., 2011: p. 2).

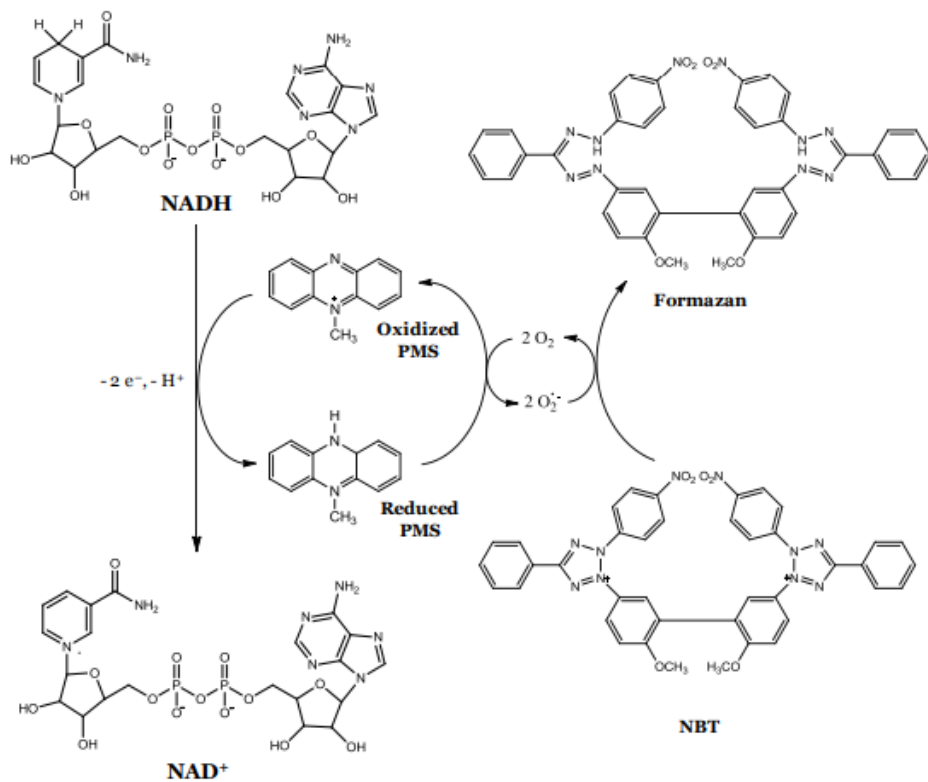


Figura 10-1: Representación esquemática de la reducción de NBT inducida por O^{•-}, generado por el sistema NADH/PMS

Fuente: (Lino, 2014)

El mecanismo fundamental de este ensayo se basa en la reducción del metosulfato de fenazina (PMS) por parte de la coenzima NADH, lo que provoca la generación de radical superóxido cuyos electrones son transferidos a la sal de tetrazolio como aceptor final produciendo un formazán púrpura insoluble en agua (Stockert et al., 2018: p.2).

1.8.3 Sistema Riboflavina/Luz/NBT

El método de Riboflavina/Luz/NBT fue desarrollado por Beuchamp y Fridovich en 1971 para la determinación indirecta de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), basada en la capacidad de SOD para inhibir las reacciones impulsadas por aniones superóxido. Sin embargo, su aplicación se ha dirigido a la búsqueda de sustancias capaces de captar $O_2^{\bullet-}$ a partir de extractos vegetales y otras fuentes (Cheng et al., 2015; p. 272).

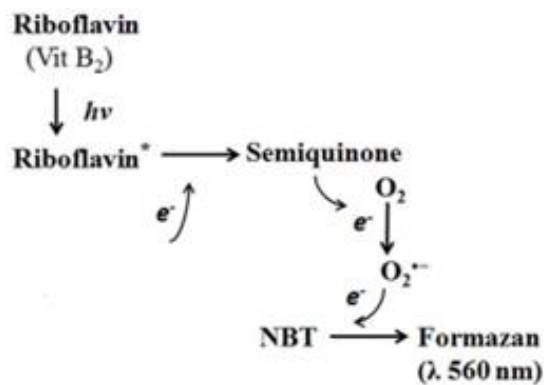


Figura 11-1: Mecanismo de reducción de NBT por fotólisis de B₂

Fuente: (Cheng et al. 2015)

Este ensayo se fundamenta en la reducción fotoquímica de flavinas como la riboflavina (B₂) que genera radicales superóxido que reducen el NBT, lo que resulta en la formación de formazán azul (Kumaran y Karunakaran 2006: p. 147). La secuencia probable de esta reacción fotoquímica implica la excitación del NBT mediante la absorción de un fotón obtenido de la fotólisis de B₂ que da lugar a un radical semiquinona que reacciona con oxígeno para producir $O_2^{\bullet-}$ que finalmente reducen el NBT para formar formazán (Ver Figura 11-1) (Beuchamp y Fridovich 1971: p. 280).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Investigación

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Recolección del material vegetal

Se recolectaron las hojas de *Psychotria viridis* en estado de fructificación en la Finca Amiruka ubicada en el sector de San Pablo de Ushpayacu de la ciudad del Tena, provincia del Napo; alrededor de las 17h00 del mes de abril del 2019.

Previo a la recolección se gestionó la Guía de Movilización de Especímenes de Flora y Fauna Silvestre Nro. 75-08-2019-VS-DPAN-MAE en calidad de Investigación dentro del Convenio Marco de Acceso a Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2018-0086 denominado "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU USO POTENCIAL USO SOSTENIBLE".

2.3 Identificación botánica

La identificación del espécimen fue llevada a cabo por el Ing. Jorge Caranqui, botánico responsable del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.4 Equipos, materiales y reactivos

2.4.1 Equipos

Estufa de convección natural RedLine by Binder, molino de cuchillas Arthur H. Thomas C.O, balanza de precisión HDM, estufa Memmert SNB400, mufla, balanza analítica HDM, cámara UV, sonicador, rotavapor Heidolph®, sorbona, pH-metro, termoagitador magnético Thermo Scientific™, centrífuga, mezclador de vórtice, lámpara fluorescente 20W, termómetro digital, micropipeta multicanal F1-Clip Tip Thermo Scientific™, refrigerador General Electric®, congelador General Electric®, lector de microplacas Thermo Scientific™.

2.4.2 Materiales

Placas TLC Silicagel 60 RP-2 F₂₅₄ (Sigma Aldrich®), microplacas de 96 pocillos CITOTEST®.

2.4.3 Reactivos

Éter dietílico, etanol 96%, metanol absoluto, éter de petróleo, H₂SO₄, NH₄OH, acetato de etilo, goma arábiga, sulfato de sodio anhidro, agua destilada, cloroformo, trietilamina, 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH*), EDTA, fosfato dipotásico (K₂HPO₄), fosfato monopotásico (KH₂PO₄), DMSO, hidróxido de sodio (NaOH); todos de grado analítico. Agar (cenizas 2-4.5%), NBT (~98% TLC), polvo microbiano liofilizado de xantina oxidasa (≥7 unidades/mg), xantina (≥99%), riboflavina (≥98%), NADH (≥97% HPLC), metosulfato de fenazina (PMS, ≥90% UV); obtenidos de Sigma Aldrich Chemical Co. (USA).

Compuestos de referencia: taxifolina (≥90% HPLC), ácido ascórbico, ácido gálico y alopurinol (> 99 % TLC) adquiridos en Sigma Aldrich Chemical Co. (USA).

2.5. Técnicas y métodos

2.5.1 Acondicionamiento de la materia vegetal

Se realizó la limpieza del material vegetal y se desecaron a una temperatura de 35°C en una estufa de convección natural durante 48 horas. Se trituro la muestra en un molino de cuchillas, para la obtención de un tamaño de partícula aproximado de 2-3mm. El material seco fue conservado en bolsas de papel a 25°C en condiciones de oscuridad hasta su posterior análisis.

2.5.2 Control de calidad

El control de calidad del material vegetal se realizó mediante los procedimientos descritos por Miranda et al. (1992, pp. 31-45). A partir de 2 gramos de material vegetal seco y pulverizado se calculó la humedad higroscópica por pérdida de masa en términos de % p/p. Las cenizas totales se obtuvieron por ignición a 600°C, y posteriormente se determinó los valores de cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico mediante método gravimétrico. Los procedimientos se llevaron a cabo por triplicado.

2.5.3 Tamizaje fitoquímico

Las hojas secas y en polvo de *P. viridis* (20g) se extrajeron sucesivamente por maceración durante 48 horas con éter dietílico, etanol 96% y agua destilada. Se realizó el cribado fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso para la detección cualitativa de metabolitos secundarios tales como: alcaloides, esteroides/terpenoides, taninos y fenoles, quinonas, grasas, lactonas y cumarinas, catequinas, azúcares reductores, resinas, aminoácidos, saponinas, flavonoides, mucílagos y principios amargos. Se procedió en base a las Normas Rmales de Miranda et al. (1992, pp. 31-45).

2.5.4 Obtención del extracto total de alcaloides

Se realizaron dos extracciones a partir de 50g de planta seca con 500mL de metanol absoluto como solvente de extracción, durante un período de 48 horas. El macerado se sometió a sonicación durante 1 hora por día. El extracto líquido bruto resultante se filtró y concentró a presión reducida a 50°C hasta sequedad para la obtención del extracto crudo seco.

El extracto crudo se reconstituyó con 200mL de H₂SO₄ (1% v/v) y se desengrasó con éter de petróleo (40 mL) por tres ocasiones de manera que se obtiene una fase orgánica que contiene otro tipo de metabolitos (aceites, ceras, mucílagos, etc.) y una fase acuosa ácida en la que se encuentran los alcaloides en forma protonada (Linskens y Ferdinand, 1994: p.2).

La fase acuosa acidificada se trató con NH₄OH (25% v/v) hasta alcanzar pH 9. La solución se lavó con acetato de etilo cuatro veces con el objetivo de transferir los alcaloides a la fase orgánica en forma de base (Linskens y Ferdinand, 1994: p.2). Posteriormente, se añadió goma arábica y sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua residual.

El extracto se filtró y se evaporó a presión reducida a 50°C hasta sequedad. Finalmente, se obtuvo el extracto bruto de alcaloides totales. Se pesó el balón y su contenido se depositó en un frasco ámbar que se conservó en un desecador bajo condiciones de oscuridad hasta su análisis.

2.5.5 Preparación de soluciones

Todas las soluciones se prepararon a diario para su uso inmediato. A excepción de la enzima XO que fue almacenada en congelación a -20°C, una vez reconstituida se conservó en refrigeración a 4°C por un máximo de 7 días (Greenwald, 1985, p.25).

2.5.6 Cromatografía en capa fina

La separación de alcaloides se realizó sobre placas TLC 6x3cm en donde se depositaron aproximadamente 10 µL de una solución de alcaloides de *P. viridis* (100 µL/mL). Para la elución, se preparó una fase móvil constituida por cloroformo/trietilamina/metanol (6:0.5:0.6, v/v/v) (Kowalczuk et al. 2015). Para la visualización de la placa se empleó una cámara UV a 570nm. Finalmente, se calculó el Rf (factor de retardo) a través de la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{D_R}{D_{FM}}$$

Donde:

D_R = Distancia recorrida por el soluto (cm)

D_{FM} = Distancia recorrida por la fase móvil (cm)

2.5.7 Ensayos autográficos

Los ensayos de inhibición de XO y captación de radical superóxido fueron ejecutados a través de los métodos detallados por Ramallo et al. (2006, pp. 16-19) con ligeras modificaciones. La captación de radicales DDPH* se realizó en base a lo especificado por Soler et al. (2000, pp. 330-338). Para todos los ensayos autográficos se aplicó la técnica "dot blot"; se depositó directamente un volumen de concentración conocida sobre un soporte sólido funcionalizado (Diamandis y Christopoulos.,1996: pp. 537). La formación de halos de inhibición permite la evaluación cualitativa y cuantitativa de la reacción por comparación del diámetro e intensidad de color. Los resultados se evaluaron a través del software GelAnalyzer® 2010.

Se colocó cuidadosamente 10µL de cada dilución de alcaloides de *P. viridis* o los respectivos compuestos de referencia en placas TLC con ayuda de un capilar de vidrio y se dejó secar durante unos minutos. Las muestras se colocaron en orden creciente de concentración a lo largo de la placa. Para todos los casos se probaron las siguientes cantidades de muestra: 1, 5, 10, 50 y 100 µg.

2.5.7.1 Inhibición de XO

Se preparó una mezcla de EDTA, PBS (pH 7.9) y agua destilada para disolver el agar a 80 °C. La solución se dejó enfriar hasta 55°C y se incorporó la solución de NBT. Una vez alcanzados los 50°C, se añadió la solución de XO y se mezcló por inversión para obtener la solución de tinción. Las concentraciones finales en solución fueron: agar (1 mg/mL), EDTA (1 mM), PBS (50 mM), NBT (0.22 mg/mL) y XO (68 mU/mL).

Inmediatamente se vertió 5 mL de la solución de tinción sobre la placa TLC. Se colocó la placa en oscuridad hasta la gelificación del agar. Para iniciar la reacción, se procedió a su inmersión en una solución de xantina (3 mM). La xantina se solubilizó con una cantidad mínima de solución de NaOH 0.1M y se diluyó al volumen con buffer PBS-EDTA (tampón fosfato 200 mM + EDTA 10 mM, pH 7.5). Finalmente, se incubó a 38 °C durante 20 minutos en baño maría bajo oscuridad. Aquellas concentraciones que muestran actividad aparecen como zonas claras sobre un fondo oscuro de color púrpura. Se utilizó alopurinol como compuesto de referencia bajo iguales condiciones.

Debido a que la oxidación enzimática de xantina produce radical superóxido, aquellas sustancias con capacidad captadora de $O_2^{\bullet-}$ podrían resultar en falsos positivos (Ramallo et al., 2006: p.17). Para discriminar entre un inhibidor puro de XO y un captador de $O_2^{\bullet-}$ se probaron dos sistemas de generación no enzimática de superóxido: riboflavina/luz/NBT y NADH/NBT/metosulfato de fenazina (PMS).

2.5.7.2 Sistema riboflavina/luz/NBT

El agar se disolvió a 80 °C en una mezcla de EDTA, PBS (pH 7.9) y agua destilada. La solución se dejó enfriar a 60 °C y se añadió solución de NBT y solución de riboflavina dando como resultado una solución de tinción de riboflavina. Las concentraciones finales presentes en la solución fueron: agar (1 mg/mL), EDTA (1 mM), PBS (50 mM), NBT (0.22 mg/mL) y riboflavina (0.0125 mg/mL).

Aproximadamente, 5 mL de la solución de tinción de riboflavina se distribuyeron sobre la placa TLC. Una vez solidificado el agar bajo oscuridad, la reacción se inició colocando la placa debajo de una lámpara fluorescente de 20 W. Los sitios que muestran captación de radical superóxido aparecen como zonas claras contra un fondo púrpura. Se empleó taxifolina como compuesto de referencia bajo las mismas condiciones.

2.5.7.3 Sistema NADH/ NBT/metosulfato de fenazina (PMS)

El agar se disolvió a 80 °C en una mezcla de EDTA, PBS (pH 7.9) y agua destilada. La solución se dejó enfriar a 60 °C, luego se agregaron las soluciones de NBT y NADH y se mezcló por inversión para la obtención de la solución de tinción de NADH. Las concentraciones finales en solución fueron: agar (1 mg/mL), EDTA (1 mM), PBS (50 mM), NBT (0.22 mg/mL) y NADH (0.117 mg/mL).

Alrededor de 5 mL de solución de tinción de NADH se distribuyeron sobre una placa de TLC. Después de la solidificación del agar en la oscuridad, la placa se sumergió en una solución de PMS (2.7 µM) a 25°C durante 20 minutos en oscuridad. Las regiones con actividad captadora de radical superóxido se manifiestan como zonas claras contra un fondo púrpura. Se utilizó taxifolina como compuesto de referencia bajo iguales condiciones.

2.5.7.4 Método de DPPH

La placa TLC sembrada se sumergió durante 10 segundos en una solución etanólica de DPPH* 0,4 mM. Posteriormente, se retiró el exceso de la solución de tinción y se secó con aire frío. Al finalizar, la placa posee un fondo púrpura con manchas amarillas o claras en aquellos sitios que mostraron actividad antioxidante. Se sometió al mismo procedimiento al ácido ascórbico que fue empleado como compuesto de referencia.

2.5.8 Cuantificación de actividad biológica

Los ensayos se realizaron en microplaca de 96 pocillos. Se ejecutó la medición espectrofotométrica de la actividad inhibitoria de XO y captación de radicales superóxido y DPPH* con diferentes concentraciones de alcaloides totales de *P. viridis*. Todos los experimentos se efectuaron por triplicado (n=3), con tres repeticiones individuales.

2.5.8.1 Inhibición de XO

La actividad inhibitoria sobre XO *in vitro* se realizó de acuerdo con el método detallado por (Supasuteekul et al. 2016), basado en la producción enzimática de ácido úrico. El ensayo se llevó a cabo en condiciones aeróbicas y se monitoreó por espectrofotometría a 295nm.

El sustrato de reacción corresponde a la solución de xantina 0.4 mM, debido a su escasa solubilidad en medio acuoso se disolvió con una cantidad mínima de solución de NaOH 0.1M. Luego se diluyó al volumen con buffer PBS-EDTA (tampón fosfato 50 mM + EDTA 0.5 mM, pH 7.5). La enzima XO se preparó en buffer PBS-EDTA (tampón fosfato 50 mM + EDTA 0.5 mM, pH 7.5) a una concentración de 50 mU/mL.

Las soluciones madre de alcaloides de *P. viridis* y alopurinol (compuesto de referencia) se prepararon disolviendo 10 mg de muestra en 1.5 mL de DMSO y se completó a 25mL con PBS (50 mM, pH 7.5) para obtener una concentración final de 400 µg/mL. A partir de la solución madre se obtuvieron otras de concentraciones menores que se diluyeron con PBS (50 mM, pH 7.5). La concentración final de DMSO en pocillo correspondió al 0.025% de manera que no tiene efecto sobre la actividad de XO (Duong et al. 2017).

Se prepararon tres soluciones de reacción que corresponden al grupo control, muestra y control negativo. El control negativo consistió en 60µL de buffer PBS-EDTA (tampón fosfato 50 mM + EDTA 0.5 mM, pH 7.5) y 40µL de xantina 0.4 mM (pH 7.5). El grupo control consistió en 20µL de buffer PBS-EDTA (tampón fosfato 50 mM + EDTA 0.5 mM, pH 7.5), 40µL de xantina 0.4 mM (pH 7.5) y 40µL de solución de XO (50 mU/mL). La solución de reacción para las muestras

constó de 40µL de xantina 0.4 mM (pH 7.5), 20µL de diferentes concentraciones de alcaloides de *P. viridis* o compuesto de referencia y 40µL de solución de XO (50 mU/mL).

La reacción se inició con la adición de xantina 0.4 mM (pH 7.5) a 25°C. Después de 5 minutos se dio lectura a la microplaca a una longitud de onda de 295nm. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación 1.

$$\%Inhibición\ XO = \frac{Abs_C - Abs_M}{Abs_C - Abs_N} \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde:

Abs_C= Absorbancia del control

Abs_M= Absorbancia de la muestra

Abs_N= Absorbancia del control negativo

2.5.8.2 Método de riboflavina / luz / NBT

La generación de $O_2^{\bullet-}$ se ejecutó mediante la fotodescomposición de riboflavina en solución acuosa, misma que se detectó a través de la reducción de NBT a formazán (Kumaran y Karunakaran 2006). Se aplicó la metodología descrita por (Supasuteekul et al. 2016) con ciertas modificaciones.

Las diluciones de las muestras de ensayo se prepararon con una solución de MeOH 30% tamponada con PBS (pH 7,9) para obtener diferentes concentraciones.

Se colocó una mezcla de 30µL de PBS (50 Mm, pH 7.9), 100 µL de riboflavina (266 µM), y 20 µl de EDTA (1 mM). Luego, se adicionó 40µL de muestra y 30µL de NBT (750 µM) en una microplaca de 96 pocillos. Finalmente, la mezcla de reacción se iluminó con una lámpara fluorescente de 20 W a 0.1mV a 0.12 mW/cm² (Cheng et al. 2015) durante 30 minutos a 25°C.

Las absorbancias fueron medidas por un lector de microplacas Thermo Scientific™ a 570nm. Se utilizó una mezcla de reacción similar que se mantuvo en la oscuridad y sirvió como control negativo.

El porcentaje de captación de radical superóxido se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad captadora de } O_2^{\bullet-} (\%) = \frac{Abs_C - Abs_M}{Abs_C} \times 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde:

Abs_C= Absorbancia del control

Abs_M= Absorbancia de la muestra

Se usó la solución tamponada de MeOH al 30% como control negativo. Se utilizó ácido ascórbico como compuesto de referencia que se trató bajo las mismas condiciones que las muestras.

2.5.8.3 Método NADH/metosulfato de fenazina/NBT

La capacidad captadora de radicales superóxido se midió a través del método ligeramente modificado descrito por (Lim et al. 2019). Las soluciones de trabajo de NBT (0.2mM), NADH (0.5mM) y PMS (60 μM), se prepararon en buffer Tris-HCl 16mM (pH 8.0). Se realizó una mezcla con 50μL de solución de NBT, NADH, y diferentes concentraciones de muestra. La reacción se inició mediante la adición de solución de PMS para producir radical superóxido. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia se midió a 560 nm. La actividad se calculó mediante la Ecuación 2.

Una solución de reacción sin PMS se tomó como control negativo. Se empleó ácido gálico como compuesto de referencia en iguales condiciones.

2.5.8.4 Método de DPPH*

La actividad antioxidante sobre radicales DPPH* se midió de acuerdo con el método de (Lim et al. 2019) ligeramente modificado. Se colocó 100µL de solución etanólica de DPPH* (200 µM) y se mezcló con el mismo volumen de extracto diluido o compuesto de referencia en una microplaca de 96 pocillos a 25°C durante 30 minutos. La absorbancia se midió a 517nm con un blanco que contenía DPPH* y metanol. Se usó ácido ascórbico como compuesto de referencia.

El porcentaje de captación de radicales DPPH* se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad captadora de DPPH*}(\%) = \frac{Abs_B - Abs_M}{Abs_B} \times 100 \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde:

Abs_B= Absorbancia del blanco

Abs_M= Absorbancia de la muestra

2.5.9 Procesamiento de datos

Los resultados de las pruebas autográficas se tomaron como valores semicuantitativos preliminares de actividad biológica que justifican la realización de ensayos cuantitativos por espectrofotometría en microplaca.

Los datos obtenidos de la medición espectrofotométrica en microplaca se procesaron en Excel. Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar.

Además, se determinó la concentración inhibitoria media (IC₅₀) que corresponde a la concentración que da lugar al 50% de inhibición de XO o captación de O₂^{•-}. El IC₅₀ se calculó en base a la regresión lineal del porcentaje de inhibición de XO o captación de radical superóxido vs la concentración de la muestra. Se usó *Blesquiu* como software de cálculo.

2.5.10 Análisis estadístico

Se utilizó ANOVA unidireccional con un nivel de confianza del 95% para determinar las diferencias significativas entre los valores medios.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos a través de los métodos y técnicas descritos en el capítulo II.

3.1 Control de calidad del material vegetal

Tabla 1-3: Resultados de los parámetros de calidad de hojas de *P. viridis*

	Humedad (%)	Cenizas totales (%)	Cenizas solubles en agua (%)	Cenizas insolubles en ácido (%)
Hojas de <i>P. viridis</i>	3.3753±0.0043	5.2487±0.0012	3.5642±0.0067	0.8431±0.0116
Referencia Farmacopea Británica	7-14	Hasta 12	7	5

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

La presencia de agua es uno de los principales factores responsables del deterioro de las drogas vegetales, ya que conduce a la activación de enzimas y; si las condiciones lo permiten, a la proliferación de microorganismos; por ende, es vital alcanzar y mantener un bajo contenido de humedad para lograr una estabilidad adecuada. Por otro lado, la determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido determinan la autenticidad y pureza de la muestra vegetal, así como la presencia de límites tolerables de metales y ausencia de silicatos. Los resultados del control de calidad de las hojas desecadas de *P. viridis* se presentan en la Tabla 1-3, mismos que se encuentran dentro de los rangos establecidos por la Farmacopea Británica, lo cual garantiza la idoneidad de droga vegetal para ensayos posteriores.

3.2 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó a través de estimaciones bioquímicas de coloración y precipitación para detectar la presencia de diferentes metabolitos secundarios en los extractos de hojas secas de *P. viridis* utilizando solventes de polaridad creciente: éter dietílico, etanol y agua destilada.

Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de extractos de hojas de *P. viridis*

Metabolito ensayado	Nombre del ensayo	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
Alcaloides	Dragendorff	-	+++	++
	Mayer	-	++	+
	Wagner	-	++	+
Esteroides/Terpenoides	Liebermann-Burchard	+	+	NA
Taninos y fenoles	Cloruro Férrico	NA	++	+
Quinonas	Borntrager	NA	+	NA
Aceites y grasas	Sudan	+	NA	NA
Lactonas y coumarinas	Baljet	+	++	NA
Catequinas		NA	-	NA
Azúcares reductores	Fehling	NA	+	++
Resinas		NA	-	NA
Aminoácidos	Ninhidrina	NA	-	NA
Saponinas	Espuma	NA	-	-
Flavonoides	Shinoda	NA	+	++
Mucílagos		NA	NA	+
Principios amargos		NA	NA	+

+++; Reacción de gran intensidad; ++: Reacción de mediana intensidad; +: Reacción de baja intensidad; -: No detectado; NA: No aplica

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

Los resultados del tamizaje fitoquímico se muestran en la tabla 2-3, que destaca la presencia de alcaloides, esteroides, terpenos, lactonas, glicósidos, flavonoides, taninos y mucílagos. La presencia y/o ausencia de metabolitos secundarios en los diferentes extractos se debe a solubilidad de cada fitoquímico en determinado solvente (Prabu et al., 2018: p. 2).

Los hallazgos descritos anteriormente son consistentes con los expuestos en otra investigación, en la que se identificaron; los triterpenos pentacíclicos, ácido ursólico y oleanólico; los esteroides

24-metilen-cicloartanol, estigmasterol y β -sitosterol; los esteroides glicosilados 3-O- β -D-glucosil- β -sitosterol y 3-O- β -D-glucosil-estigmasterol; un triterpeno poliinsaturado, escualeno; los ésteres de glicerol, 1-palmitoilglicerol y triacilglicerol; una mezcla de hidrocarburos de cadena larga; el aldehído nonacosanal; los ácidos grasos de cadena larga hentriacontanoico, hexadecanoico y ácido heptadenoico; el éster metil heptadecanoato; el 4-metil-epi-quinato y dos alcaloides indólicos, N, N-dimetiltriptamina (DMT) y N-metiltriptamina (Soares et al. 2017: pp. 930-932).

3.3 Obtención del extracto total de alcaloides

El carácter básico de los alcaloides permite su aislamiento a partir de cambios de pH. Este tipo de metabolitos secundarios se encuentra en forma de sales solubles en las plantas debido a la protonación del átomo de nitrógeno (Linskens y Ferdinand, 1994: p.2), este comportamiento permite que solventes polares como el metanol sean capaces de solubilizar a estos componentes tanto en forma de base libre como sal, razón por la que se empleó metanol como solvente de extracción.

Tabla 3-3: Rendimiento de la extracción de alcaloides totales de *P. viridis*

Material vegetal	Peso de la muestra vegetal seca (g)	Solvente de extracción*	Extracto total de alcaloides (mg)	Rendimiento (%)
Hojas de <i>P. viridis</i>	50	Metanol 500 mL	387	0.77

* Se realizaron 2 extracciones consecutivas.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

La fracción alcaloidal que se obtuvo a partir de las hojas de *P. viridis* se encuentra en forma de base libre que es soluble únicamente en solventes orgánicos, con un rendimiento de 0.77% del material seco. El rendimiento obtenido supera a lo reportado por Callaway et al. (2005; pp. 146-150) que sugiere un contenido de alcaloides que oscila entre 0.1 a 0.66 %. Sin embargo, se encuentra por debajo del 4.6% de alcaloides obtenidos de especímenes de la Amazonía del Norte de Brasil. En general, esta variación puede deberse a factores medioambientales como: estacionalidad, altitud, latitud y tipo de bioma que influyen en la producción de alcaloides por parte de esta especie vegetal (Cavalcante et al. 2018: p. 1250).

3.4. Cromatografía en capa fina (TLC)

El uso de técnicas cromatográficas posee amplias aplicaciones en el campo de Productos Naturales, dado que permite la separación e identificación presuntiva de compuestos en muestras desconocidas.

Tabla 4-3. Posible compuesto identificado en el extracto de ATPV mediante TLC

Extracto	Fase móvil	D _{FM} (cm)	D _R (cm)	R _f	Posible compuesto identificado
Extracto de alcaloides totales de hojas de <i>P. viridis</i>	Cloroformo/Trietilamina /Metanol (6:0.5:0.6)	4.2	2.184	0.52	Dimetiltriptamina (DMT)

ATPV: Alcaloides totales de *Psychotria viridis*; **D_{FM}:** Distancia recorrida por la fase móvil; **D_R:** Distancia recorrida por el soluto; **R_f:** Factor de retardo

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

El eluyente seleccionado, en base a su aplicación en investigaciones publicadas preliminarmente para la evaluación del contenido de DMT en plantas comercializadas en Brasil, Perú y Hawai bajo el nombre de “*Psychotria viridis*”; permitió la detección en la muestra en estudio de un compuesto con un R_f de 0.52, el cual podría corresponder a DMT. Cabe indicar que fue el único compuesto visualmente detectable sobre la placa cromatográfica posterior al desarrollo de la misma, constituyéndose en el potencial marcador fitoquímico del extracto alcaloidal total.

Esta hipótesis puede ser fundamentada en la investigación de Rivier y Lindgren (1972, pp. 110-115) que indica la presencia de 99% de DMT y trazas de N-monometiltriptamina en hojas de *P. viridis* colectadas en el suroeste de la Amazonía peruana, que evidencia la riqueza de esta especie en alcaloides tipo triptamina.

3.5. Ensayos autográficos

3.5.1 Captación de DPPH*

Tabla 5-3: Capacidad captadora de DPPH* de ácido ascórbico y ATPV

Cantidad, μg	Áreas calculadas con el programa GelAnalyzer	
	Ácido ascórbico	Alcaloides totales de <i>P. viridis</i>
1	680	22
5	2379	187
10	2729	490
50	5332	2623
100	5874	3647

ATPV: Alcaloides totales de *Psychotria viridis*

Los valores representan las áreas de inhibición calculadas mediante el programa GelAnalyzer en unidades arbitrarias

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

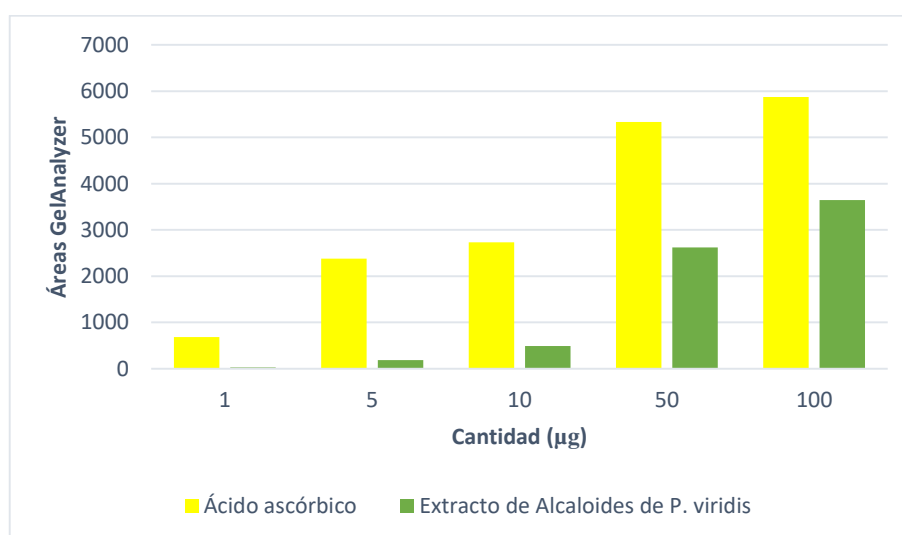


Gráfico 1-3: Áreas de captación de DPPH* vs concentración de ácido ascórbico y ATPV

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

En relación a los resultados obtenidos de la prueba autográfica para la evaluación de la actividad captadora del radical DPPH*, se pudo observar un comportamiento directamente proporcional entre la cantidad de sustancia (tanto para el control positivo, como para la muestra ensayada) con respecto a la capacidad de captación de DPPH*. Las áreas encontradas para el control y la muestra exhiben una pronunciada actividad, siendo superior la sustancia control (ácido ascórbico). Para encontrar una relación que permita una comparación más robusta resultó necesario realizar el ensayo en microplaca en múltiples concentraciones, que se exponen en la sección 3.6.

3.5.2 Sistema Riboflavina/Luz/NBT

Tabla 6-3: Captación de $O_2^{\cdot-}$ modelo Riboflavina/Luz/NBT de taxifolina y ATPV

Cantidad, μg	Áreas calculadas con el programa Gel-analyzer	
	Taxifolina	Alcaloides totales <i>p.viridis</i>
1	146	0
5	200	582
10	1959	2174
50	5959	5497
100	6337	6288

ATPV: Alcaloides totales de *Psychotria viridis*

Los valores representan las áreas de inhibición calculadas mediante el programa GelAnalyzer en unidades arbitrarias.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

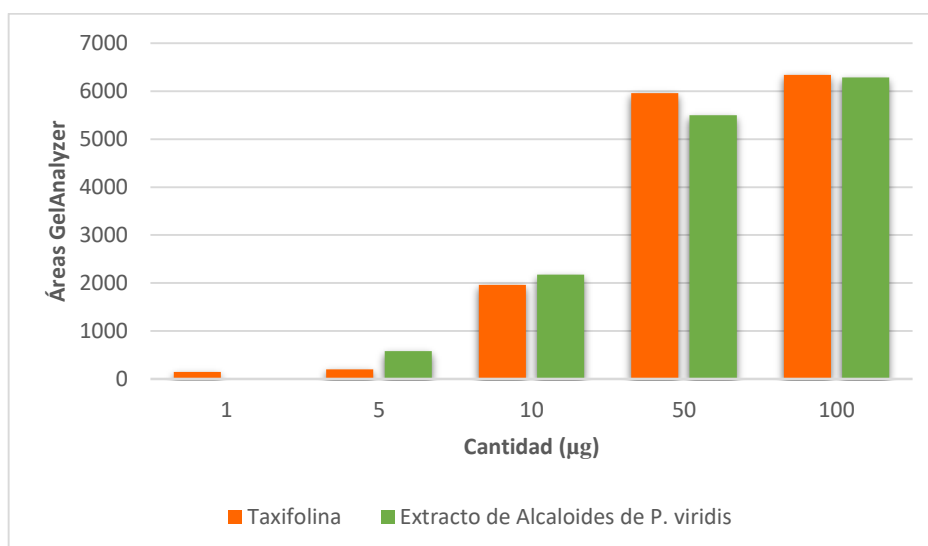


Gráfico 2-3: Áreas de captación de $O_2^{\cdot-}$ vs concentración de taxifolina y ATPV. Modelo B_2 /luz/NBT

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

Respecto a los resultados alcanzados en la prueba autográfica para la evaluación de la actividad captadora de radical superóxido (modelo B_2 /Luz/NBT), se registró una relación directamente proporcional entre la cantidad de sustancia (tanto para el control positivo, como para la muestra ensayada) con respecto a la capacidad de captación de radical superóxido. Las áreas encontradas para el control y la muestra exhiben una pronunciada actividad, siendo comparables entre sí. Posteriormente, se realizó el ensayo en microplaca a varios niveles de concentración, el cual permitió la determinación del IC_{50} tanto del control positivo como de la sustancia problema, resultados que se describen en la sección 3.6.

3.5.3 Sistema NADH/PMS/NBT

Tabla 7-3: Captación de O_2^- modelo NADH/PMS/NBT de taxifolina y ATPV

Cantidad, μg	Áreas calculadas con el programa Gel-analyzer	
	Taxifolina	Alcaloides totales <i>P. viridis</i>
1	43	834
5	1594	2332
10	2129	2872
50	6534	5169
100	8310	6886

ATPV: Alcaloides totales de *Psychotria viridis*

Los valores representan las áreas de inhibición calculadas mediante el programa GelAnalyzer en unidades arbitrarias.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

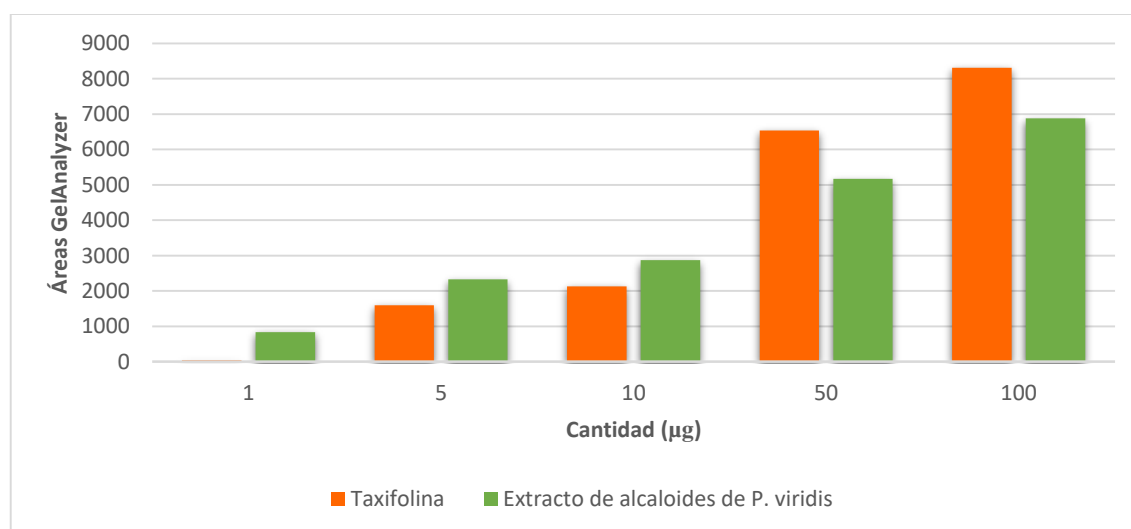


Gráfico 3-3: Áreas de captación de O_2^- vs concentración de taxifolina y ATPV. Modelo NADH/PMS/NBT

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

A partir de los resultados obtenidos en la prueba autográfica para la evaluación de actividad captadora de radical superóxido (modelo NADH/PMS/NBT), se observó una tendencia directamente proporcional entre la cantidad de sustancia (tanto para el control positivo, como para la muestra ensayada) con respecto a la capacidad de captación de radical superóxido. Las áreas encontradas para el control y la muestra muestran una actividad acentuada, siendo ligeramente superior la perteneciente al control positivo. De forma subsecuente, se llevó a cabo el ensayo en microplaca con varios niveles de concentración, mediante el cual se pudo determinar la IC_{50} tanto del control positivo como de la sustancia problema, resultados que se describen en la sección 3.6.

3.5.4 Inhibición de xantina oxidasa (XO)

Tabla 8-3: Resultados de inhibición de XO de alopurinol y ATPV

Cantidad, μg	Áreas calculadas con el programa GelAnalyzer	
	Alopurinol	Alcaloides totales <i>P. viridis</i>
1	454	440
5	1561	653
10	2245	855
50	3025	1034
100	4554	1318

ATPV: alcaloides totales de *P. viridis*

Los valores representan las áreas de inhibición calculadas mediante el programa GelAnalyzer en unidades arbitrarias.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

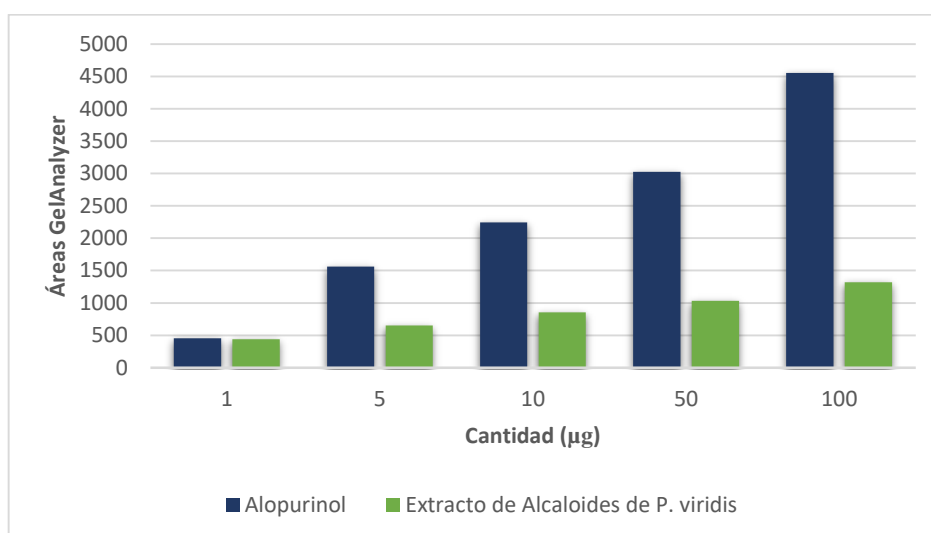


Gráfico 4-3: Áreas de inhibición de xantina oxidasa vs concentración de alopurinol y ATPV. Sistema XO/xantina/NBT.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

La prueba autográfica de inhibición de xantina oxidasa muestra que, el alopurinol como control positivo tiene una actividad muy superior a la del extracto alcaloidal de *P. viridis*. Sin embargo, a la luz de la magnitud de los resultados en las pruebas autográficas preliminares, tanto de captación de DPPH* como de radical superóxido; hacen sospechar que la actividad de los alcaloides de *P. viridis* se debe preponderantemente a su potencial antioxidante (captador de radicales libres), mas no a su capacidad inhibitoria sobre esta enzima.

3.6. Cuantificación de actividad biológica

La cuantificación de potencial inhibitorio sobre DPPH*, radical superóxido y xantina oxidasa se realizó en microplaca por espectrofotometría. Las microplacas son ampliamente utilizadas en las ciencias biológicas y químicas debido a sus dimensiones estandarizadas que las hacen ideales para la automatización y a sus volúmenes de muestra relativamente pequeños que brindan ventajas en términos de uso de reactivos, costo y velocidad (Hermanson, 2013, p. 142).

3.6.1 Captación de DPPH*

Tabla 9-3: Capacidad captadora de radical libre DPPH* de ácido ascórbico

Concentración, µg/mL	Captación de radical libre, %
0.25	6.90±0.84 ^a
0.50	17.27±1.06
1.50	34.60±1.01
2.50	47.23±0.81 ^b
3.50	67.69±0.26
5.00	85.85±0.31

$IC_{50} = 1.92 \pm 0.057$

Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de $n=3$,

^{a, b} Valores sin diferencia significativa ácido ascórbico v.s. alcaloides brutos de *Psychotria viridis*, ANOVA.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

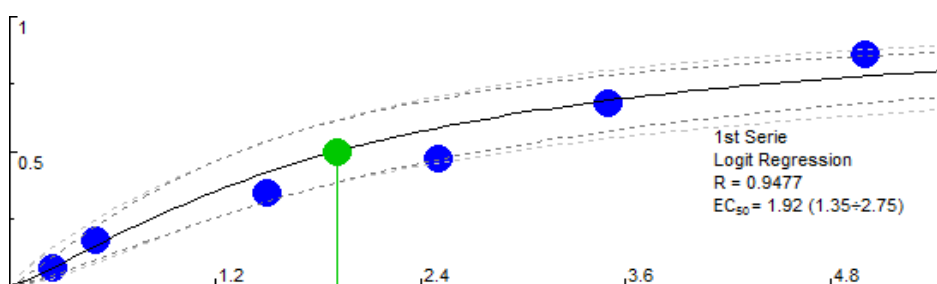


Gráfico 5-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC₅₀ de ácido ascórbico

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

Tabla 10-3: Capacidad captadora DPPH* del extracto de ATPV

Concentración, µg/mL	Captación de radical libre, %
0.025	2.46±0.59
0.05	4.06±0.85
0.25	6.89±0.46 ^a
0.5	12.98±0.53
2.5	47.97±0.85 ^b
12.5	81.61±0.65

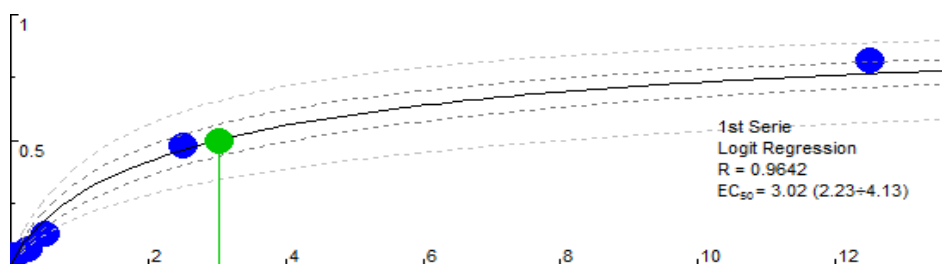
$IC_{50} = 3.02 \pm 0.051$

ATPV: alcaloides brutos de *P. viridis*

Los valores representan el promedio ± desviación estándar de n=3.

^{a, b} Valores sin diferencia significativa ácido ascórbico v.s. alcaloides brutos de *Psychotria viridis*, ANOVA.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

**Gráfico 6-3:** Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC_{50} del extracto de alcaloides brutos de *P. viridis*

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

En correspondencia al ensayo de DPPH*, el valor de IC_{50} para el control positivo (ácido ascórbico) es menor al de los alcaloides brutos de *P. viridis*, lo que implica que el ácido ascórbico tiene una mayor capacidad de captación de radical libre DPPH* con respecto a los ATPV. También se determinó que a concentraciones de 0.25 y 2.5 µg/mL no existe diferencia significativa entre ácido ascórbico v.s. alcaloides brutos de *Psychotria viridis*.

3.6.2 Sistema Riboflavina/Luz/NBT

Tabla 11-3: Capacidad captadora de radical superóxido de ácido ascórbico

Concentración, µg/mL	Captación de radical superóxido, %
0.20	9.33±3.35
0.40	14.66±1.11
1.00	30.11±1.94
2.00	51.39±1.52 ^a
4.00	67.40±2.63

$IC_{50} = 2.03 \pm 0.026$

Los valores representan el promedio ± desviación estándar de n=3.

^a Valores sin diferencia significativa ácido ascórbico v.s. alcaloides brutos de *Psychotria viridis*, ANOVA.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

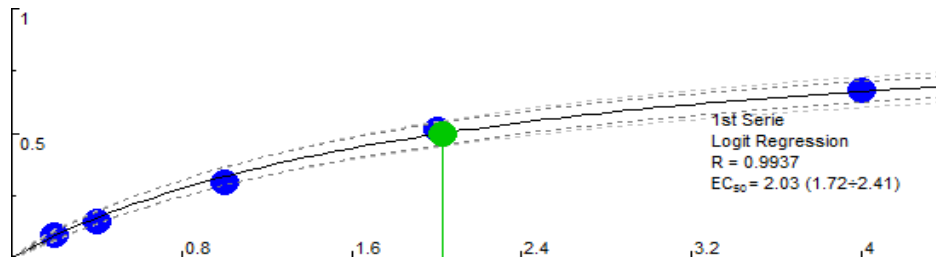


Gráfico 7-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC₅₀ de ácido ascórbico

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

Tabla 12-3: Capacidad captadora de radical superóxido del extracto de ATPV

Concentración, µg/mL	Captación de radical superóxido, %
0.25	23.48±2.04
0.50	38.09±1.17
1.00	50.99±2.15 ^a
3.00	73.16±0.74
5.00	80.99±0.79
IC ₅₀ = 0.94±0.064	

ATPV: alcaloides brutos de *Psychotria viridis*

Los valores representan el promedio ± desviación estándar de n=3.

^a Valores sin diferencia significativa ácido ascórbico v.s. alcaloides brutos de *Psychotria viridis*, ANOVA.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

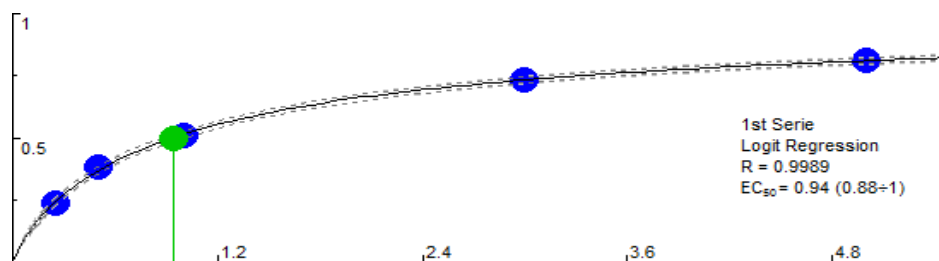


Gráfico 8-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC₅₀ del extracto de alcaloides brutos de *P. viridis*

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

En relación al ensayo de captación de radical superóxido a través del sistema Riboflavina/Luz/NBT, el valor de IC₅₀ para el ácido ascórbico (control positivo) es mayor al de los alcaloides brutos de *P. viridis*, lo que quiere decir que los ATPV tienen una mayor capacidad de captación de O⁻ con respecto al ácido ascórbico. También, se determinó que a la concentración de 1 µg/mL no existe diferencia significativa entre ácido ascórbico y alcaloides brutos de *Psychotria viridis*.

3.6.3 Sistema NADH/PMS/NBT

Tabla 13-3: Capacidad captadora de radical superóxido de ácido gálico

Concentración, µg/mL	Captación de radical superóxido, %
8.00	19.58±0.87 ^c
12.00	28.89±2.41 ^b
16.0	38.77±2.13
32.0	63.17±0.58 ^a
48.0	72.68±0.46

$$IC_{50} = 22.61 \pm 0.78$$

*Los valores representan el promedio ± desviación estándar de n=3.

^{a, b, c} Valores sin diferencia significativa ácido ascórbico v.s. alcaloides brutos de *Psychotria viridis*, ANOVA.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

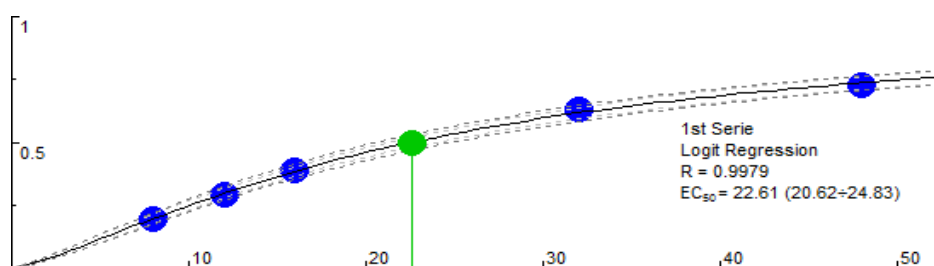


Gráfico 9-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC₅₀ de ácido gálico

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

Tabla 14-3: Capacidad captadora de radical superóxido del extracto de ATPV

Concentración, µg/mL	Captación de radical superóxido, %
4.00	6.89±0.66
8.00	20.33±1.82 ^c
12.0	28.75±0.72 ^b
16.0	59.08±2.28 ^a
32.0	78.30±0.64

$$IC_{50} = 16.01 \pm 0.14$$

ATPV: Alcaloides brutos de *Psychotria viridis*

*Los valores representan el promedio ± desviación estándar de n=3.

^{a, b, c} Valores sin diferencia significativa ácido ascórbico v.s. alcaloides brutos de *Psychotria viridis*, ANOVA.

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

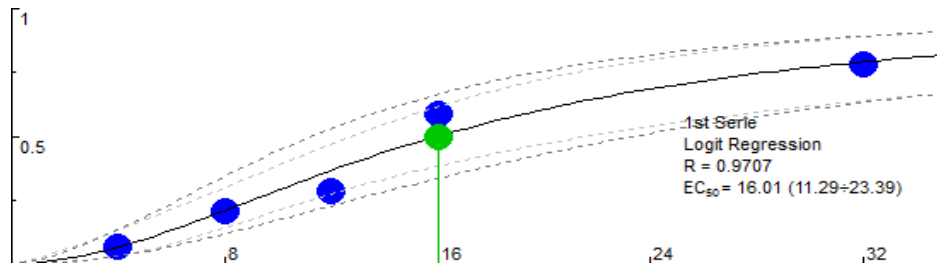


Gráfico 10-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC₅₀ del extracto de alcaloides brutos de *P. viridis*

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

En referencia al ensayo de captación de radical superóxido a través del sistema NADH/PMS/NBT, el valor de IC₅₀ para el ácido gálico (control positivo) es menor al de los alcaloides brutos de *P. viridis*, es decir que los ATPV tienen una mayor capacidad de captación de O⁻ con respecto al ácido gálico. También, se determinó que a las concentraciones de 8 y 12 µg/mL no existen diferencias significativas entre ácido gálico y alcaloides brutos de *Psychotria viridis*.

3.6.4 Inhibición de xantina oxidasa (XO)

Tabla 15-3: Inhibición de xantina-oxidasa de alopurinol

Concentración, µg/mL	Captación de radical libre, %
0.20	13.45±0.38
0.40	30.24±0.87
0.60	44.33±0.59
0.80	59.91±0.71
1.00	71.74±0.54

$$IC_{50} = 0.628 \pm 0.067$$

Los valores representan el promedio ± desviación estándar de n=3,

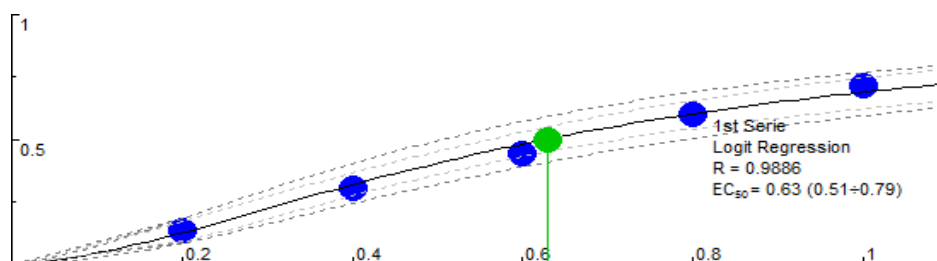


Gráfico 11-3: Ajuste al modelo logarítmico para la estimación del IC₅₀ de alopurinol

Realizado por: Reyes, Cinthya, 2019.

Aunque el extracto de *P. viridis*, aparentemente presenta cierto nivel de actividad inhibitoria sobre XO en autografía, resulta destacable que las cantidades de alcaloide bruto, a las cuales se puede verificar un efecto apreciable, no pueden ser alcanzadas en disolución debido a la imposibilidad de solubilizar los alcaloides totales; aún con el uso de DMSO a la máxima concentración permitida (0.25% v/v; concentración a la que no existen afectaciones sobre la actividad enzimática). Por lo anteriormente expuesto, aunque se realizaron sendos ensayos, no se pudo verificar actividad inhibitoria apreciable de los alcaloides totales de *P. viridis* sobre xantina-oxidasa según el protocolo en microplaca. Por su parte, se logró determinar que el IC₅₀ del alopurinol corresponde a 0.628±0.067 µg/mL, dato que se correlaciona con estudios anteriores (Kapoor y Saxena, 2014: p. 9)

3.7 Discusión

Los resultados expuestos tanto en autografía como microplaca demuestran un significativo potencial antioxidante por parte de la fracción alcaloidal de *P. viridis*, cuyo principal componente se presume es DMT. La DMT es un alcaloide aminoindólico, cuya estructura se caracteriza por la alta reactividad del anillo aromático con ROS, lo que permite que esta indolamina funcione fácilmente como donante de electrones, a través de la formación de radicales melatoninilo, o mediante una adición de radicales electrofílicos en la posición C-3 (Estevão et al. 2010: p. 4870).

Se han llevado a cabo diversos estudios con respecto al perfil antioxidante de compuestos de tipo triptamina como serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) y melatonina (N-acetil5-metoxitriptamina). De acuerdo con los estudios *in silico* de Bentz et al., (2018: p. 6387), la estructura aminoindol de las triptaminas, les confiere una actividad antioxidante intrínseca que permite el desarrollo de moléculas mucho más activas. Sin embargo, dichos estudios se enfocan únicamente en la captación de radical hidroxilo y peroxilo; sin tomar en cuenta a otro tipo de ROS como los radicales superóxido.

La literatura no reporta ningún estudio específico sobre la actividad antioxidante de DMT. En general, se sabe que las triptaminas podrían tener una notable actividad captadora de radicales debido a la presencia del átomo de nitrógeno del anillo de indol que da lugar a tres mecanismos: formación de aductos radicales, transferencia de un solo electrón y transferencia de átomos de hidrógeno (Bentz et al. 2018: p. 6386).

En 2010, Estevão y sus colaboradores realizaron la determinación de la actividad antioxidante de derivados indólicos por síntesis orgánica, en donde se utilizó el esqueleto de DMT cuyos grupos metilo fueron sustituidos por hidrógeno. Los resultados para captación de radical superóxido fueron totalmente desfavorables, lo que parece indicar que los grupos metilo tienen vital importancia en el desarrollo de la reacción.

De acuerdo con la bibliografía analizada, el potencial antioxidante de las triptaminas está confirmado al igual que las betacarbolinas presentes en la "ayahuasca" lo que podría explicar la longevidad de los indígenas amazónicos que la consumen. Esta aseveración, está sustentada en el estudio realizado por Correa-Netto et al. (2017:p. 5), quienes evaluaron la influencia de la exposición crónica a la ayahuasca durante el envejecimiento en ratones, determinando que la ayahuasca no altera ninguno de los parámetros ponderados en el estudio con respecto al envejecimiento, lo cual indicó que el consumo crónico de ayahuasca no afecta la memoria ni la orientación espacial de los individuos sometidos al ensayo.

Con respecto a la inhibición enzimática, a pesar de que algunas investigaciones sugieren que el anillo indólico da lugar a potentes inhibidores de xantina oxidasa (Song et al. 2015: p. 1), se pudo comprobar que no es el caso de DMT *per sé*. Sin embargo, se podrían realizar estudios posteriores de farmacomodulación tomando como base el esqueleto de DMT, de manera que se puedan encontrar derivados que exhiban inhibición sobre xantina oxidasa, además de que sea posible la elucidación de los grupos necesarios en la estructura para llegar a la consecución del farmacóforo.

Finalmente, el uso de taxifolina, ácido ascórbico y ácido gálico como compuestos de referencia se justifica por su potencial inhibitorio sobre xantina oxidasa (taxifolina) y capacidad captadora de radicales libres (ácido ascórbico y ácido gálico) pronunciados y su amplia aplicación como compuestos de referencia en este sentido en investigaciones preliminares (Mandal et al., 2011; Ramallo et al., 2006; Yang et al., 2016).

CONCLUSIONES

1. Mediante la aplicación de técnicas autográficas se pudo determinar que la fracción alcaloidal aislada a partir de *Psychotria viridis* posee una actividad captadora de radical superóxido significativa, mediante la aplicación de los modelos RIBOFLAVINA/LUZ/NBT y NADH/PMS/NBT; sin embargo, no exhibe actividad inhibitoria sobre XO.
2. Una vez ejecutado el control de calidad de las hojas de *Psychotria viridis*, utilizadas como materia prima vegetal en esta investigación, se pudo establecer un nivel adecuado de idoneidad de la misma, en términos de cumplimiento de los límites establecidos para los parámetros de humedad, cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido.
3. El screening fitoquímico de las hojas de *Psychotria viridis* indicó la presencia de metabolitos secundarios representativos, principalmente: alcaloides, flavonoides, taninos, quinonas, coumarinas, terpenoides y esteroides, así como mucílagos, principios amargos y azúcares.
4. Luego de llevar a cabo el aislamiento de la fracción alcaloidal de *Psychotria viridis* mediante extracciones líquido-líquido, se obtuvo un rendimiento de 0.77% de alcaloides totales.
5. No fue posible determinar la concentración media inhibitoria IC₅₀ de la fracción alcaloidal aislada a partir de *Psychotria viridis* sobre XO, dado que a las concentraciones ensayadas no se detectó actividad significativa.
6. Se logró diferenciar el carácter captador de radical superóxido de la fracción alcaloidal de *Psychotria viridis*, así como su comportamiento como agente antioxidante a través de la generación no enzimática de superóxido y el ensayo de DPPH, con valores de IC₅₀ de 0.94±0.064 µg/mL y 16.01±0.14 µg/mL en los sistemas B2/LUZ/NBT y NADH/PMS/NBT, respectivamente; y 3.02±0.051 µg/mL para la captación de DPPH*.

RECOMENDACIONES

Dado el significativo potencial antioxidante de DMT, se recomienda realizar estudios *in vivo* que consoliden dicha actividad biológica y permitan su aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

Puesto que los ensayos del presente estudio se realizaron con el extracto de alcaloides totales de *P. viridis*, se recomienda realizarlos con alcaloides aislados a través de técnicas cromatográficas adecuadas.

Se recomienda el estudio del potencial inhibitorio sobre XO y captación de radicales libres de la fracción total y flavónica de hojas y frutos de *Psychotria viridis* en vista de la gran diversidad de componentes fitoquímicos que presentan otras especies del mismo género.

GLOSARIO

Abreviaturas

$O_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
ATPV	Alcaloides totales de <i>Psychotria viridis</i>
B ₂	Riboflavina
BHE	Barrera Hematoencefálica
cm	Centímetro
COPCORD	Programa Orientado a la Comunidad para el Control de las Enfermedades Reumáticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dimetiltriptamina
DPPH*	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HUA	Hiperuricemia
HUA	Hiperuricemia
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
INMT	indol-N-metiltransferasa
m	Metro

MIAs	Alcaloides indol monoterpénicos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NMT	N-metiltriptamina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PMS	Metosulfato de fenazina
PUCE	Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Rf	Factor de retardo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAM	S-adenosil-metionina
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
SSJ	Síndrome de Stevens Johnson
TA	Triptamina
THH	Tetrahidroharmina
TLC	Cromatografía en capa delgada
XO	Xantina oxidasa
XOR	Xantina Oxidorreductasa

Términos

Autografía: Análisis que fusiona la cromatografía plana y el método de detección biológica. Es una técnica eficaz y económica para el análisis químico de extractos vegetales para identificar moléculas con actividad farmacológica (Dewanjee et al. 2015: p 75).

Alcaloide: Compuesto orgánico cíclico que contiene nitrógeno en estado de oxidación negativo, característica que le confiere basicidad. En forma general, los alcaloides derivan biosintéticamente de aminoácidos como: fenilalanina, tirosina, triptófano, ornitina y lisina (Wieczorek et al., 2015: p. 133).

Antioxidante: Sustancias de origen natural o sintético que inhibe o retrasa la oxidación de moléculas biológicamente relevantes, mediante captación específica de radicales libres o quelación de metales (Flora y Mittal, 2015: p. 608).

Cromatografía en capa delgada (TLC): Método analítico de separación de compuestos sobre un soporte revestido por una capa adsorbente (fase estacionaria) que generalmente es sílica gel, sobre la cual se colocan las muestras para su posterior elución con un disolvente o una mezcla de disolventes (fase móvil) dentro de una cámara hermética. La muestra viaja a través de la placa en función de las propiedades químicas y físicas de los analitos presentes en la muestra. Los analitos se detectan e identifican en función de su migración relativa y su reacción de color a los reactivos de derivatización cromogénicos o la capacidad de absorber la luz ultravioleta (Guy, 2007, pp. 1-2).

DPPH*: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, radical libre estable gracias a la deslocalización de uno de sus electrones, hecho que impide su dimerización y lo diferencia de otros radicales libres (Kedare y Singh, 2011: p.1).

Espectrofotometría: Método analítico que mide las propiedades de absorbancia o transmisión de un material o sustancia en función de la longitud de onda (Myers, 2019, p. 18;)

Formazán: Compuestos obtenidos a partir de la reducción de sales de tetrazolio, poseen colores intensos, que van desde el rojo cereza hasta un púrpura intenso debido a cadenas de átomos $-N = NC = N-NH$ (Nineham, 1955, p. 257). Generalmente se trata de sustancias sólidas con un punto de fusión relativamente bajo a pesar del gran tamaño de las moléculas (Şenöz, et al., 2012: pp. 295-298).

Longitud de onda: Distancia que separa dos crestas de una onda electromagnética. Su símbolo es λ (Daley, 2013, p. 216).

Absorbancia: Conocida también como densidad óptica, extinción o absorbancia decádica, Es una medida de la cantidad de luz absorbida por una muestra mediante espectrometría, particularmente para análisis cuantitativos. Las unidades típicas de absorbancia se denominan "unidades de absorbancia", que tienen la abreviatura AU y no tienen dimensión (Daley, 2013, p. 216).

Concentración inhibitoria media (IC₅₀): Concentración de una sustancia o mezcla de sustancias que se requiere para inhibir una actividad biológica en un 50% (Brody, 2018, p. 328).

Hiperuricemia: Estado fisiológico en el que el ácido úrico tiene un valor superior a 7,0 mg/dL en hombres y superior a 5,7 mg/dL en mujeres (Bardin y Richette: 2014, p. 188).

Radical libre: Cualquier especie molecular que contiene un electrón no apareado en un orbital atómico, capaz de existir de forma independiente (Lobo et al., 2010: p. 118).

Radical scavenger: Cualquier sustancia que ayude a proteger las células del daño causado por los radicales libres producidos durante el metabolismo celular (National Cancer Institute USA, 2018)

Radical superóxido: Compuesto altamente reactivo producido cuando el oxígeno es reducido por un solo electrón, y que puede generarse durante la función catalítica normal de varias enzimas (Whaley-Connell et al., 2012: p. 1322).

Metosulfato de fenazina: Sustancia química usada como un portador de electrones durante la producción de NADH o NADPH para la reducción de compuestos susceptibles (Worsfold, et al., 1977: p. 152).

Lector de microplacas: Equipo del tipo fotómetro que mide la absorbancia en una gran variedad de sustancias de aplicación clínica y técnica (Thermo Scientific™, 2019).

Microplaca 96 pocillos: Placa de poliestireno o vinilo, transparente a la radiación ultravioleta (UV) para dilución en serie, almacenamiento y transferencia de microvolúmenes de muestras o reactivos. Está constituida por 96 pocillos distribuidos en 12 columnas y 8 filas con una capacidad máxima de 300µL cada uno. Tiene un uso extendido en las áreas de enzimología e inmunología (Thermo Scientific™, 2019a).

NADH: Coenzima que consiste en dos nucleótidos (adenina y nicotidamida) unidos a través de grupos 5'-fosfato. Corresponde a la forma reducida de NAD⁺ (Belenky, et al., 2007: p. 54).

Nitrazul de tetrazolio (NBT): Sal orgánica de cloro del tipo ditetrazolio, utilizado ampliamente en la detección histoquímica de la actividad deshidrogenasa, y como indicador redox en combinación con métodos índigogénicos (Stockert et al., 2018: p. 2).

Riboflavina: Conocida también como vitamina B2. Es un compuesto hidrosoluble sintetizado por algunas plantas y bacterias; precursor del dinucleótido flavin-adenina (FAD) y del mononucleótido de flavina (FMN), que actúan como cofactores en diferentes reacciones metabólicas. La deficiencia de vitamina B2 causa enfermedades cardiovasculares, anemia, cáncer y muchos trastornos neurológicos y del desarrollo (Ghosh et al., 2019: p. 201).

BIBLIOGRAFÍA

AHMAD, I., et al. Sapiens. "Xanthine oxidase/tyrosinase inhibiting, antioxidant, and antifungal oxindole alkaloids from *Isatis costata*". *Pharmaceutical Biology*, vol. 48, n°6 (2010), (Pakistan) pp. 716-721. ISSN 17445116. DOI 10.3109/13880200903271298.

BARDIN, T. y RICHETTE, P. "Definition of hyperuricemia and gouty conditions". *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 26, n°2 (2014), (S.I.) pp. 186-191. ISSN 10408711. DOI 10.1097/BOR.000000000000028.

BARKER, S.A. "N, N-dimethyltryptamine (DMT), an endogenous hallucinogen: Past, present, and future research to determine its role and function". *Frontiers in Neuroscience*, vol. 12, n°4 (2018), (United State of America), pp. 1-35. ISSN 1662453X. DOI 10.3389/fnins.2018.00536.

BELENKY, P., BOGAN, K.L. y BRENNER, C. "NAD⁺ metabolism in health and disease". *Trends in biochemical sciences* [en línea], 2007, (United State of America -Chicago), 32(1), pp. 12-9. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 0968-0004. DOI 10.1016/j.tibs.2006.11.006. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17161604>.

BOVE, M., et al. Sapiens. "An evidence-based review on urate-lowering treatments: Implications for optimal treatment of chronic hyperuricemia". *Vascular Health and Risk Management*, vol. 13, n°1 (2017), (Italia), pp. 23-28. ISSN 11782048. DOI 10.2147/VHRM.S115080.

BREMER, B. y ERIKSSON, T. "Time tree of rubiaceae: Phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes". *International Journal of Plant Sciences*, vol. 170, n°6 (2009), (United State of America -Chicago) pp. 766-793. ISSN 10585893. DOI 10.1086/599077.

BRODY, T. *Drug-Drug Interactions: Small Molecule Drugs*. S.I.: (s.n.), 2018, pp. 5-10. ISBN 9780128146477.

CALIXTO, N., et al. Sapiens. "The genus psychotria: Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology and biological properties". *Revista de la Sociedad Brasileña de Química*, vol. 27, n°8 (2016), (Brasil) pp. 1356-1374. ISBN 9057821516.

CAO, H., PAUFF, J. y HILLE, R. "Substrate orientation and catalytic specificity in the action of xanthine oxidase: The sequential hydroxylation of hypoxanthine to uric acid". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, n°36 (2010), (United State of America-California) pp. 28044-28053. ISSN 1083351X. DOI 10.1074/jbc.M110.128561.

CARBONARO, T.M. y GATCH, M.B. "Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine". *Brain Research Bulletin* [en línea], 2016, (United State of America), 126 (2), pp. 74-88. [Consulta: 5 diciembre 2018]. ISSN 18732747. DOI 10.1016/j.brainresbull.2016.04.016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.016>.

CHEN, C., LÜ, J., y YAO, Q. "Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview". *Medical Science Monitor* [en línea], 2016, (S.l.) 22(1), pp. 2501-2512. [Consulta: 5 diciembre 2018]. ISSN 1643-3750. DOI 10.12659/MSM.899852. Disponible en: <http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/899852>.

CHENG, C., et al. Sapiens. "Investigations of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity". *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. vol. 148, n°1 (2016), (United State of America) pp. 262-267. ISSN 18732682. DOI 10.1016/j.jphotobiol.2015.04.028.

CHOMA, I.M. y GRZELAK, E.M. "Bioautography detection in thin-layer chromatography". *Journal of Chromatography A* [en línea], 2011, (S.l.) 1218(19), pp. 2684-2691. [Consulta: 5 diciembre 2018]. ISSN 00219673. DOI 10.1016/j.chroma.2010.12.069. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>.

CHUNG, Y., et al. Sapiens. Optimizing Therapy With Allopurinol: Factors Limiting Hypouricemic Efficacy. *The Medical Science* [en línea], 2010, (S.l.), 335(3), pp. 219-226. [Consulta: 5 diciembre 2018]. ISSN 0002-9629. DOI 10.1097/MAJ.0b013e31815acb10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31815acb10>.

CORNEJO, X. y JARAMILLO, T. *Especies de Rubiaceae. Libro Rojo de especies endémicas del Ecuador* [en línea]. Quito-Ecuador: (s.n.), 2000. [Consulta: 3 octubre 2019]. Disponible en: <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500405>.

COX, P.A. *Botanical Neurotoxins. Comprehensive Toxicology*. 3. 3^{ra} edición. USA: (Elsevier Inc.), 2010, pp. 499-513. ISBN 9780081006016.

DALBETH, N., et al. Sapiens. "Review Making the right thing the easy thing to do : strategies to improve outcomes in gout". *The Lancet Rheumatology* [en línea], 2019, (S.l.), 1(2), pp. 1122-1131. [Consulta: 5 diciembre 2018]. ISSN 2665-9913. DOI 10.1016/S2665-9913(19)30004-9. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S2665-9913\(19\)30004-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2665-9913(19)30004-9).

DALEY, R. *Organic Chemistry, part 2 of 3 - Richard Daley*. Boston: (Cengage Learning), 2013, pp. 216-254.

DAVIS, A., et al. Sapiens. "A Global Assessment of Distribution, Diversity, Endemism, and

Taxonomic Effort in the Rubiaceae". *Annals of the Missouri Botanical Garden* [en línea], 2009, (United State of America), 96(1), pp. 68-78. [Consulta: 15 enero 2019]. ISSN 0026-6493. DOI 10.3417/2006205. Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.3417/2006205>.

DE CARVALHO, A.R., et al. Sapiens. *Psychotria Genus: Chemical Constituents, Biological Activities, and Synthetic Studies*. S.l.: (s.n.), 2016, pp. 499-513. ISBN 9780444636027.

DE LA TORRE, L., et al. Sapiens. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (con extracto de datos)*. Quito-Ecuador: (s.n.), pp. 1-35. ISBN 9789978771358.

DEAN, J.G., et al. Sapiens. "Biosynthesis and extracellular Concentrations of N,N-dimethyltryptamine (DMt) in Mammalian Brain". *Nature* [en línea], 2019, (United State of America), 9(11), pp. 1-25. [Consulta: 5 enero 2019]. DOI 10.1038/s41598-019-45812-w. Disponible en: www.nature.com/scientificreports.

DEBNATH, B., et al. Sapiens. "Role of plant alkaloids on human health : A review of biological activities". *Materials Today Chemistry* [en línea], 2018, (United State of America), 9(1), pp. 56-72. [Consulta: 5 enero 2019]. ISSN 2468-5194. DOI 10.1016/j.mtchem.2018.05.001. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>.

DEWANJEE, S., et al. Sapiens. "Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry". *Journal of Pharmaceutical Analysis* [en línea], 2015, (United State of America), 5(2), pp. 75-84. [Consulta: 5 enero 2019]. ISSN 20951779. DOI 10.1016/j.jpha.2014.06.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>.

DIAMANDIS, Eleftherios; & CHRISTOPOULOS, Theodore. *Immunoassay*, Estados Unidos: Elsevier, 1996. ISBN 0-12-214730-8, pp. 537.

DOS SANTOS, R.G., CARLOS, B.J. y HALLAK, J.E. "Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience". *Therapeutic Advances in Psychopharmacology* [en línea], 2017, (United State of America), 7(4), pp. 141-157. [Consulta: 4 octubre 2019]. DOI 10.1177/2045125316689030. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.04.053>.

DUONG, N.T., et al. Sapiens. "Xanthine oxidase inhibitors from Archidendron clypearia (Jack.) I.C. Nielsen: Results from systematic screening of Vietnamese medicinal plants". *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 10, n°6 (2017), (China), pp. 549-556. ISSN 19957645. DOI 10.1016/j.apjtm.2017.06.002.

ECUADOR. SECRETARIA TÉCNICA PLAN TODA UNA VIDA, Plan Nacional de Desarrollo "Toda Una Vida" 2017 - 2021. [En línea] 2017. [Consulta: 15 septiembre 2019] Disponible en: <http://www.todaunavida.gob.ec/valores-mision-vision/>

ENROTH, C., et al. Sapiens. *Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion.* [en línea]. S.l.: (s.n.), 2015. pp. 1-10. [Consulta: 5 octubre 2019]. Disponible en: www.rcsb.org.

FLORA, G., MITTAL, M. y FLORA, S. *Medical Countermeasures-Chelation Therapy* [en línea]. S.l.: Elsevier Inc., 2015. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISBN 9780124199552. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-418688-0.00026-5>.

FORMAGIO, A., et al. Sapiens. Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in Psychotria Leaf Extracts. *Antioxidants* [en línea], vol. 3, n°4 (2014), (Brasil) pp. 745-757. ISSN 2076-3921. DOI 10.3390/antiox3040745. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2076-3921/3/4/745/>.

FRAGOSO, V., et al. Sapiens. "Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of Psychotria umbellata Vell". *Toxicology in Vitro*, vol. 22, n°3 (2008), (United State of America) pp. 559-566. ISSN 08872333. DOI 10.1016/j.tiv.2007.11.010.

FRESCURA, V.D., et al. Sapiens. "Post-treatment with plant extracts used in Brazilian folk medicine caused a partial reversal of the antiproliferative effect of glyphosate in the Allium cepa test". *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica* [en línea], 2013, (United State of America), 37(2), pp. 23-8. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 0327-9545. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392578>.

GAGNÉ, F. *Oxidative Stress. Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods.* S.l.: s.n., 2014, pp. 103-115. DOI 10.1016/B978-0-12-411604-7.00006-4.

GHEZZI, P., et al. Sapiens. "The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects". *British Journal of Pharmacology.* vol. 174, n°12 (2017), (Italia), pp. 1784-1796. ISSN 14765381. DOI 10.1111/bph.13544.

GHOSH, S., DATTA, K. y DATTA, S.K. *Rice vitamins* [en línea]. S.l.: Elsevier Inc. in cooperation with AACC International, 2019. [Consulta: 15 marzo 2018]. ISBN 9780128115084. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811508-4.00007-1>.

GREENWALD, A. CRC handbook of methods for oxygen radical research. United States: Taylor & Francis, 1985. ISBN 0-8493-2936-1, p.21.

GUY, R.C. *Methods for analysis of gastrointestinal function* [en línea]. S.l.: Elsevier Inc., 2007. [Consulta: 15 marzo 2018]. ISBN 9781420004267. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02125-5>.

HAMILTON, C.W. "A Revision of Mesoamerican Psychotria Subgenus Psychotria (Rubiaceae), Part I: Introduction and Species 1-16". *Annals of the Missouri Botanical Garden*. vol. 76, n°1 (1989), (United State of America), p. 67. ISSN 00266493. DOI 10.2307/2399343.

KOEHBACH, J. y GRUBER, C. *Cyclotides in the Rubiaceae* [en línea]. S.l.: Elsevier Ltd, 2015. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISBN 9780128000304. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.abr.2015.09.002>.

KEDARE, S.B. y SINGH, R.P. "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay". *Journal of Food Science and Technology*. vol. 48, n°4 (2011), (S.l.) pp. 412-422. ISSN 00221155. DOI 10.1007/s13197-011-0251-1.

KHERKHACHE, H.P., et al. Sapiens. A new indole alkaloid , antioxidant and antibacterial activities of crude extracts from *Saccocalyx satureioides*. *Natural Product Research* [en línea], vol. 1, no. 1, (2018), (Suecia) pp. 1-7. ISSN 1478-6419. DOI 10.1080/14786419.2018.1519817. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1519817>.

KOSTIĆ, D.A. "Xanthine oxidase: Isolation, assays of activity, and inhibition". *Journal of Chemistry*. vol. 15, n°4 (2015), (Serbia) pp. 3-11. ISSN 20909071. DOI 10.1155/2015/294858.

KOWALCZUK, A.P., et al. Sapiens. "Identification challenges in examination of commercial plant material of *Psychotria viridis*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*". *Drug Research*. vol. 72, n°4 (2015), (Polonia) pp. 747-755. ISSN 00016837.

KUMARAN, A. y KARUNAKARAN, R.J. "Antioxidant activities of the methanol extract of *Cardiospermum halicacabum*". *Pharmaceutical Biology*, vol. 44, n°2 (2006), (India) pp. 146-151. ISSN 13880209. DOI 10.1080/13880200600596302.

KUO, C. "Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors". *Nature Publishing Group* [en línea], 2015, (S.l.), 11(11), pp. 649-662. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 1759-4790. DOI 10.1038/nrrheum.2015.91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2015.91>.

LIGUORI, I., et al. Sapiens. "Oxidative stress, aging, and diseases". *Clinical Interventions in Aging*. vol. 13, n°1 (2018), (Italia) pp. 757-772. ISSN 11781998. DOI 10.2147/CIA.S158513.

LINSKENS, Hans-Ferdinand, JACKSON, John F. *Alkaloids*. Berlín: Springer-Verlag, 1994. ISBN 978-3-642-84226-9, p.2.

LIM, S., et al. Sapiens. "Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components". *Food Chemistry*. vol. 278, n°1 (2019), (Corea) pp. 178-184. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.11.058.

LOBO, V., et al. Sapiens. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, vol. 4, n°8 (2010), (India) pp. 118-126. ISSN 09737847. DOI 10.4103/0973-7847.70902.

MAIUOLO, J., et al. Sapiens. "Regulation of uric acid metabolism and excretion". *International Journal of Cardiology* [en línea], 2015 (Italia), 213 (1), pp. 8-14. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 18741754. DOI 10.1016/j.ijcard.2015.08.109. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.109>.

MARTINS, D. y NUNEZ, C.V. "Secondary metabolites from Rubiaceae species". *Molecules*, vol. 20, n°7 (2015), (S.I.) pp. 13422-13495. ISSN 14203049. DOI 10.3390/molecules200713422.

MIRANDA, Martha; et al. Normas Ramales. Medicamentos de origen vegetal. Tinturas y Extractos fluidos. La Habana: MINSAP;1992, pp. 31-45.

MUTTONI, S., ARDISSINO, M. y JOHN, C. "Classical psychedelics for the treatment of depression and anxiety: A systematic review". *Journal of Affective Disorders* [en línea], 2019, (S.I.), 258(4), pp. 11-24. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 01650327. DOI 10.1016/j.jad.2019.07.076. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.07.076>.

MYERS, D.N. *Innovations in Monitoring With Water-Quality Sensors With Case Studies on Floods, Hurricanes, and Harmful Algal Blooms. Separation Science and Technology (New York)*. Nueva York.: Elsevier Inc., 2019, pp. 219-283.

NATIONAL CANCER INSTITUTE USA. *Free radical scavenger - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute*. [en línea]. Washington.: s.n, 2018. pp. 1-14. [Consulta: 3 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/free-radical-scavenger>.

NEPOKROEFF, M., et al. "Reorganization of the Genus *Psychotria* and Tribe *Psychotrieae* (Rubiaceae) Inferred from ITS and *rbcL* Sequence Data". *Systematic Botany* [en línea], 1999, (Washington), 24(1), pp. 5. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 03636445. DOI 10.2307/2419383. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/2419383?origin=crossref>.

NINEHAM, A.W. "The chemistry of formazans and tetrazolium salts". *Chemical Reviews*, vol. 55, n°2 (1955), (S.I.) pp. 355-483. ISSN 15206890. DOI 10.1021/cr50002a004.

OJHA, R., et al. Sapiens. "An updated patent review: xanthine oxidase inhibitors for the

treatment of hyperuricemia and gout (2011-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [en línea], 2015, (India), 27(3), pp. 311-345. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 17447674. DOI 10.1080/13543776.2017.1261111. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2017.1261111>.

OKAMOTO, K., KUSANO, T. y NISHINO, T. "Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase". *Current Pharmaceutical Design*. vol. 19, n°14 (2013), (Tokyo) pp. 2606-2614. ISSN 13816128. DOI 10.2174/1381612811319140010.

PACHER, P. "Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol". *Pharmacological Reviews* [en línea], 2006, (S.l.), 58(1), pp. 87-114. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 0031-6997. DOI 10.1124/pr.58.1.6. Disponible en: <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.58.1.6>.

PELÁEZ, I., et al. Sapiens. "Epidemiology of the Rheumatic Diseases in Mexico . A Study of 5 Regions Based on the COPCORD Methodology Epidemiology of the Rheumatic Diseases in Mexico . A Study of 5 Regions Based on the COPCORD Methodology". *COPCORD*. vol. 86, n°23 (2011), (Mexico) pp 72-88. DOI 10.3899/jrheum.100951.

PAREJO, I., et al. Sapiens. "Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 50, n°23 (2002), (Barcelona-España) pp. 6882-6890. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf020540a.

PEREZ, R.M., FLORES, L.B. y NEIRA, A.M. "Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from piper auritum leaves in vitro and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats". *Molecules*. vol. 17, n°10 (2012), (Italia) pp. 11897-11919. ISSN 14203049. DOI 10.3390/molecules171011897.

PISOSCHI, A. y POP, A. "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review". *European Journal of Medicinal Chemistry* [en línea], 2015, (Romania), 97(1), pp. 55-74. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 17683254. DOI 10.1016/j.ejmech.2015.04.040. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.

PORTO, D.D., HENRIQUES, A.T. y FETT-NETO, A.G. *Bioactive Alkaloids from South American Psychotria and Related Species*. S.l.: s.n, 2009. pp. 29-36.

PRABU, K., et al. Sapiens. "Anti-oxidant activity, phytochemical screening and HPLC profile of rare endemic *Cordia diffusa*". *Journal of King Saud University - Science* [en línea], 2018, (S.l.), 7(1), pp. 55-74. ISSN 10183647.

RAHALISON, L., et al. Sapiens. "A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants". *Phytochemical Analysis*. vol. 2, n°5 (2002), (United State of America) pp. 199-203. ISSN 10991565. DOI 10.1002/pca.2800020503.

RAMALLO, A., ZACCHINO, S. y FURLAN, R. "A Rapid TLC Autographic Method for the Detection of Xanthine Oxidase Inhibitors and Superoxide Scavengers". *Phytochemical Analysis*. vol. 17, n°3 (2006), (Argentina) pp. 16-19. ISSN 09580344. DOI 10.1002/pca.874.

RAMAWAT, K.G. y MICHAEL, M.J. *Natural products* [en línea]. Berlin: Springer, 2013. [Consulta: 15 febrero 2019]. ISBN 9780080512426. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080512426500069>.

RÍOS, M., et al. *Plantas Útiles del Ecuador*. Quito - Ecuador. Ediciones Abya - Yala, 2007. pp. 1-3.

RUSS, H., HALL, J. y BASU, P. "The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chemical Reviews*". *American Chemical Society*. vol. 23, n°1 (S.I.) pp. 1-174. ISSN 15378276. DOI 10.1038/jid.2014.371.

SANG, M., et al. Sapiens. "Modeling and optimizing inhibitory activities of Nelumbinis folium extract on xanthine oxidase using response surface methodology". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], 2017, (United State of America), 139(1), pp. 37-43. [Consulta: 15 febrero 2019]. ISSN 1873264X. DOI 10.1016/j.jpba.2017.02.048. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.048>.

ŞENÖZ, H., BIOL, H. y ET, Ö. "The Chemistry of Formazans and Tetrazolium Salts Formazanlar ve Tetrazolyum Tuzlarının Kimyası Review Article Hülya Şenöz. *J". Biol. & Chem.* S.I.: (s.n.), 2012, pp.25-34.

SINGH, T.P. y SINGH, O.M. "Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids". *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [en línea], 2017, (S.I.), 18(1), pp. 9-25. [Consulta: 15 febrero 2019]. ISSN 13895575. DOI 10.2174/1389557517666170807123201. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/154723/article>.

SOARES, D., et al. Sapiens. "*Psychotria viridis*: Chemical constituents from leaves and biological properties". *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, vol. 89, n°2, (2017) (Brasil) pp. 927-938. ISSN 16782690. DOI 10.1590/0001-3765201720160411.

SOLER, C; et al. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis* [en línea], vol. 11, n°5 (2000), pp. 330-338. [Consulta: 15

septiembre 2019]. ISSN 0958-0344. DOI10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<330::aid-pca534>3.0.co;2-g. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/1099-1565%28200009/10%2911%3A5%3C330%3A%3AAID-PCA534%3E3.0.CO%3B2-G>.

STOCKERT, J.C., et al. Sapiens. "Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives". *Acta Histochemica* [en línea], 2017, (Buenos Aires-Argentina), 120(3), pp. 159-167. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 16180372. DOI 10.1016/j.acthis.2018.02.005. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>.

SUPASUTEEKUL, C., et al. Sapiens. "Antioxidant, DNA damage protective, neuroprotective, and α -glucosidase inhibitory activities of a flavonoid glycoside from leaves of *Garcinia gracilis*". *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [en línea], 2016, (Brasil), 26(3), pp. 312-320. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 0102695X. DOI 10.1016/j.bjp.2016.01.007. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.007>.

SZABO, A., et al. Sapiens. "Psychedelic N,N-dimethyltryptamine and 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine modulate innate and adaptive inflammatory responses through the sigma-1 receptor of human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS ONE*, vol. 9, n°8 (2014) (India) pp. 1-12. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0106533.

SZABO, A., et al. Sapiens. "The endogenous hallucinogen and trace amine N,N-dimethyltryptamine (DMT) displays potent protective effects against hypoxia via sigma-1 receptor activation in human primary iPSC-derived cortical neurons and microglia-like immune cells". *Frontiers in Neuroscience*, vol. 10, n°1 (2016) (India) pp. 1-11. ISSN 1662453X. DOI 10.3389/fnins.2016.00423.

TAKAYAMA, H., et al. Sapiens. "New type of trimeric and pentameric indole alkaloids from *Psychotria rostrata*". *Organic Letters*. vol. 6, n°17 (2004) (Malasia) pp. 2945-2948. ISSN 15237060. DOI 10.1021/ol048971x.

THERMO SCIENTIFIC. *Well Microtiter Microplates*. [en línea]. S.l.: s.n, 2019, pp. 1-5. [Consulta: 3 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/2101#/2101>.

THERMO SCIENTIFIC. *Thermo Scientific.Fotómetro para microplacas Multiskan. Fisher Scientific*. [en línea] . S.l.: s.n, 2019, pp. 1-5. [Consulta: 3 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/multiskan-fc-microplate-photometer/11590685>.

TRAGER, W.F. "Principles of drug metabolism 1: Redox reactions". *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. vol. 5, n°17 (2004) (S.l.) pp. 87-132.

TROPICOS. *Tropicos Name - Psychotria viridis Ruiz & Pav. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador* [en línea]. S.l.: s.n., 2009 [Consulta: 4 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=27902202&projectid=2>.

ULLOA, C. y MOLLER, P. "Psychotria in Trees and shrubs of the Andes of Ecuador". [en línea]. Quito-Ecuador: s.n., 2018 [Consulta: 4 octubre 2019]. Disponible en: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=127386.

VEROTTA, L., et al. Sapiens. "High-performance liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry analyses of the alkaloid extracts of Amazon Psychotria species". *Journal of Chromatography A*. vol. 841, n°2 (1999) (Italia) pp. 165-176. ISSN 00219673. DOI 10.1016/S0021-9673(99)00298-8.

WHALEY A., et al. Sapiens. *Diabetic vascular disease* [en línea]. First Edit. S.l.: (Elsevier Inc.), 2012, pp. 5-25. ISBN 9780123815101. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00100-9>.

WIECZOREK, P.P., et al. Sapiens. *Bioactive alkaloids of hallucinogenic mushrooms*. S.l.: (s.n.), 2015, pp. 1-5. ISBN 9780444634627.

WILSON, L. y SASEEN, J. "Gouty Arthritis: A Review of Acute Management and Prevention". *Pharmacotherapy*. vol. 36, n°8 (2016) (S.l.) pp. 906-922. ISSN 18759114. DOI 10.1002/phar.1788.

WORSFOLD, M., MARSHALL, M. y ELLIS, E. "Enzyme detection using phenazine methosulphate and tetrazolium salts: Interference by oxygen". *Analytical Biochemistry*. vol. 79, n°2 (1977) (S.l.) pp. 152-156. ISSN 10960309. DOI 10.1016/0003-2697(77)90389-X.

YANG, H., et al. Sapiens. "Chemical Constituents of Plants from the Genus Psychotria". *Chemistry and Biodiversity*. vol. 13, n°1 (2016) (China) pp. 807-820. ISSN 16121880. DOI 10.1002/cbdv.201500259.

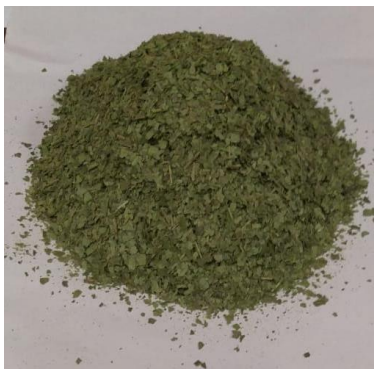
ANEXOS

ANEXO A: Recolección del material vegetal de *Psychotria viridis*



Arbusto de *Psychotria viridis* en estado de fructificación. Finca Amiruka Napo, Tena.

ANEXO B: Control de calidad de las hojas secas de *Psychotria viridis*



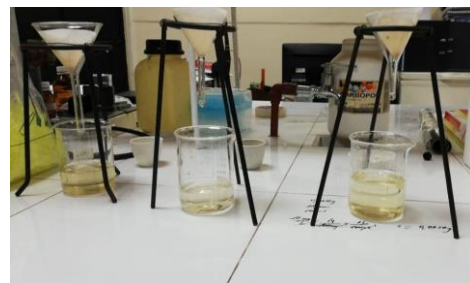
Hojas desecadas y pulverizadas de *Psychotria viridis*



Obtención de cenizas totales por ignición

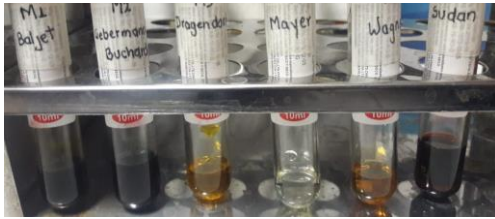


Filtración de cenizas totales para obtener cenizas solubles en agua

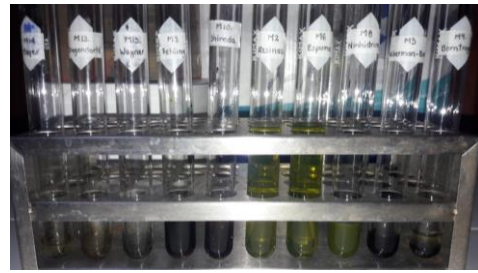


Filtración de cenizas totales para obtener cenizas insolubles en ácido

ANEXO C: Tamizaje fitoquímico de los extractos



Reacciones de identificación del extracto
etéreo



Reacciones de identificación del extracto
etanólico



Reacciones de identificación del extracto acuoso

ANEXO D: Extracción de alcaloides de hojas de *Psychotria viridis*



Concentración del extracto bruto de alcaloides en
rotavapor por presión reducida a 50°C

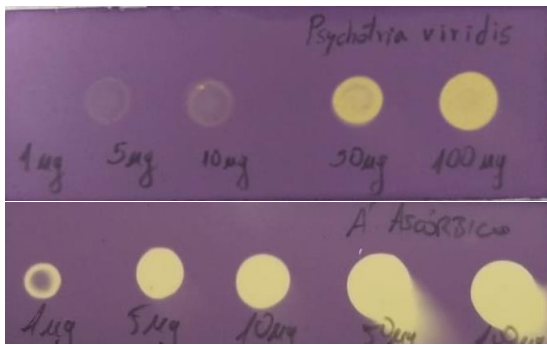


Extracto total seco de alcaloides de
Psychotria viridis

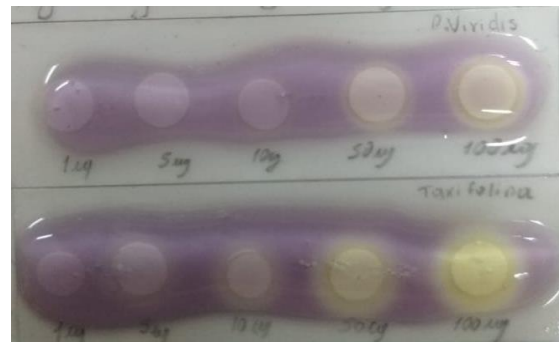


Reacción de Dragendorff del extracto de alcaloides
totales de *Psychotria viridis* reconstituido con HCl 0.1N

ANEXO E: Ensayos autográficos



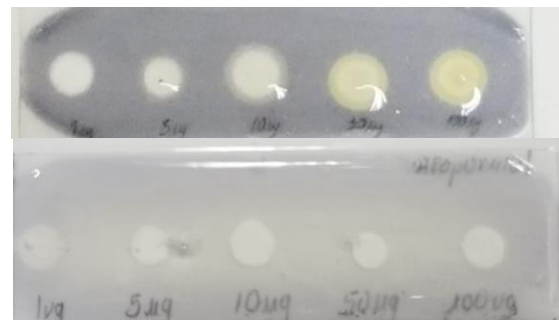
Ensayo de DPPH*; *P. viridis* (arriba), ácido ascórbico (abajo)



Sistema B2/LUZ/NBT; *P. viridis* (arriba), taxifolina (abajo)

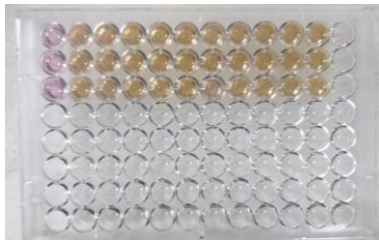


Sistema NADH/PMS/NBT; *P. viridis* (arriba), taxifolina (abajo)

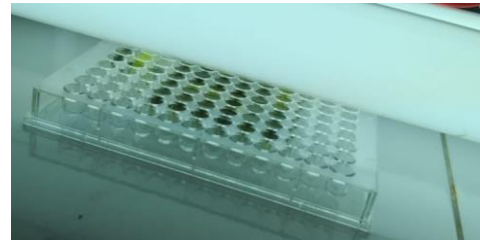


Sistema Xantina oxidasa/Xantina/NBT; *P. viridis* (arriba), alopurinol (abajo)

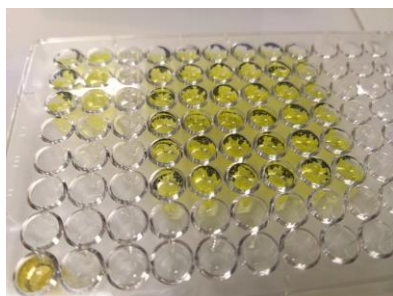
ANEXO F: Ensayos en microplaca



Ensayo de DPPH*. Extracto total de alcaloides de *P. viridis*



Sistema B2/LUZ/NBT. Extracto total de alcaloides de *P. viridis*



Sistema NADH/PMS/NBT



Lector de microplacas Thermo Scientific™

ANEXO G: Guía de movilización de especímenes de Flora y Fauna para *Psychotria viridis*



GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE

Nro. 75-08-2019-VS-DPAN-MAE

Fecha de emisión: 01 de Agosto de 2019

Fecha de movilización: 02 Agosto de 2019 **Válido hasta:** 02 Agosto de 2019 **Hora:** 23H00

La Dirección Provincial del Ambiente de Napo **Autoriza a** Diego Vinuesa con CI 0603187154 investigador de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo **a la movilización de especímenes de** Fauna (), Flora (X) **desde:** El cantones Tena, provincia de Napo **hacia:** La ciudad de Riobamba, Al Herbario de La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ESPOCH, provincia de Chimborazo, Panamericana Sur Km 1,5 **de acuerdo al siguiente detalle:**

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	DESCRIPCIÓN DEL ESPECIMEN O PARTE CONSTITUTIVA	ESTADO	CANTIDAD
Psychotria viridis	Por identificar	Especie vegetal de la familia Rubiaceae, hojas o muestras botánicas	Muestras de hojas secas	1
TOTAL				1

Observaciones:

Los especímenes o elementos constitutivos se movilizarán en:

Vehículo: Chevrolet Aveo **RUC:** X **Placa:** TBF 1239

Conductor: Gustavo Díaz **C.I.** 1801706639

Los especímenes van en calidad de:

Traslado al centro de manejo () Nombre del centro de manejo:.....

Comercio () Nombre del centro de manejo

Investigación (X) Nombre de la Investigación: **ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE, convenio marco MAE-DNB-CM-2018-0086**

Firma de responsabilidad:

Ing. Carlos Rivadeneyra
Director Provincial del Ambiente Napo

Firma del beneficiario.....
J.O.

Revisado 01-08-2019.

[Handwritten signature]



ORIGINAL FIEL COPIA
 NÚMERO: 0269019 HORA: 09:33 PLACAS: TBF1239
 NOMBRE DEL CONDUCTOR: Diego Pineda
 DIRECTOR FORESTAL: Georgette
 FIRMAS INSPECTOR FORESTAL: *[Signature]*