



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

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

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MISHHELL KAROLINA MACHADO VALLE

DIRECTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA, MSc.

Riobamba – Ecuador

2019

© 2019, Mishell Karolina Machado Valle

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, Mishell Karolina Machado Valle, 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, 06 de Diciembre del 2019



Mishell Karolina Machado Valle
C.I 060437249-0

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

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación Tipo: Trabajo Experimental, “**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Psychotria pilosa* SOBRE XANTINA OXIDASA Y RADICAL SUPERÓXIDO MEDIANTE AUTOGRAFÍA**”, realizado por la señorita: **MISHELL KAROLINA MACHADO VALLE**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación. El mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

| | FIRMA | FECHA |
|--|--|--------------|
| BQF. Norma Cecilia Toaquiza Aguagallo, MSc. PRESIDENTA DEL TRIBUNAL |  | 2019-12-06 |
| BQF. Diego Renato Vinuesa Tapia, MSc. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN |  | 2019-12-06 |
| BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, MSc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL |  | 2019-12-06 |

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de vivir este momento.

A mi madre Victoria, por ser la fortaleza para seguir adelante cada día, por ser la que siempre con una palabra levanta mis ánimos, su paciencia, amor, humildad y consejos me forjaron para culminar esta etapa en mi vida.

A mi padre Wilson por su ejemplo de educación, perseverancia y constancia, que me han ayudado para enfrentar las adversidades.

A mis hermanos Ángel y Noelia por estar a mi lado en los momentos de dificultad.

A Tommy.

Mishell.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por hacer posible que cada peldaño haya sido alcanzado, por darme sabiduría en los momentos de angustia y fuerza inquebrantable en las noches de desvelo.

A mis padres por ser el pilar fundamental en mi formación tanto educativa como de vida y a mis hermanos por ser mi fuerza e inspiración para que este sueño hoy sea una realidad. Por haber sido el cimiento para la construcción de mi vida profesional, inculcando responsabilidad y deseos de superación, por su amor de familia que ha sido mi soporte. A mi familia que siempre ha estado pendiente de mi persona.

Al BQF. Diego Vinueza por el gran apoyo y aporte brindado en la elaboración del presente trabajo de titulación, su paciencia y conocimientos han sido indispensables; además por enseñarnos a no limitarnos y seguir adelante.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en especial a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por haber sido un segundo hogar donde conocí a personas incomparables y docentes que impartieron su conocimiento para contribuir con mi formación profesional.

Mishell.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | xii |
| SUMMARY | xiii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO I | |
| 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL | 6 |
| 1.1 Familia Rubiaceae | 6 |
| <i>1.1.1 Características</i> | <i>6</i> |
| <i>1.1.2 Distribución mundial</i> | <i>6</i> |
| <i>1.1.3 Metabolitos secundarios</i> | <i>7</i> |
| 1.2 Género Psychotria..... | 7 |
| <i>1.2.1 Características</i> | <i>7</i> |
| <i>1.2.2 Etnobotánica.....</i> | <i>8</i> |
| <i>1.2.3 Alcaloides.....</i> | <i>8</i> |
| <i>1.2.3.1 Alcaloides diméricos y poliindol.....</i> | <i>8</i> |
| <i>1.2.3.2 Alcaloides indol monoterpénico.....</i> | <i>9</i> |
| <i>1.2.4 Actividades biológicas</i> | <i>9</i> |
| <i>1.2.4.1 Citotóxica.....</i> | <i>9</i> |
| <i>1.2.4.2 Antiviral.....</i> | <i>9</i> |
| <i>1.2.4.3 Antioxidante</i> | <i>9</i> |
| <i>1.2.4.4 Analgésica.....</i> | <i>10</i> |
| 1.3 Psychotria pilosa..... | 10 |
| <i>1.3.1 Características</i> | <i>10</i> |
| <i>1.3.2 Distribución geográfica.....</i> | <i>10</i> |
| 1.4 Xantina oxidasa | 11 |
| <i>1.4.1 Historia</i> | <i>11</i> |
| <i>1.4.2 Estructura</i> | <i>12</i> |
| <i>1.4.3 Mecanismo de acción</i> | <i>12</i> |
| 1.5 Hiperuricemia..... | 13 |
| <i>1.5.1 Epidemiología.....</i> | <i>14</i> |
| <i>1.5.2 Etiología.....</i> | <i>14</i> |
| <i>1.5.3 Fisiopatología</i> | <i>14</i> |
| <i>1.5.4 Factores de riesgo.....</i> | <i>14</i> |
| <i>1.5.5 Tratamiento</i> | <i>15</i> |
| 1.6 Inhibidores de xantina oxidasa | 15 |
| <i>1.6.1 Alopurinol.....</i> | <i>15</i> |

| | | |
|--------------------|--|----|
| 1.6.1.1 | <i>Mecanismo de acción</i> | 16 |
| 1.6.1.2 | <i>Efectos adversos</i> | 16 |
| 1.6.2 | <i>Febuxostat</i> | 17 |
| 1.6.2.1 | <i>Mecanismo de acción</i> | 17 |
| 1.6.2.2 | <i>Efectos adversos</i> | 17 |
| 1.7 | <i>Estrés oxidativo</i> | 18 |
| 1.7.1 | <i>Oxidantes</i> | 18 |
| 1.7.1.1 | <i>Fuentes endógenas</i> | 18 |
| 1.7.1.2 | <i>Fuentes exógenas</i> | 19 |
| 1.7.2 | <i>Antioxidantes</i> | 19 |
| 1.7.2.1 | <i>Endógenos - Enzimáticos</i> | 19 |
| 1.7.2.2 | <i>Endógenos - No enzimáticos</i> | 19 |
| 1.7.2.3 | <i>Exógenos</i> | 20 |
| 1.7.3 | <i>Mecanismo de acción</i> | 20 |
| 1.7.4 | <i>Relación con las enfermedades</i> | 20 |
| 1.8 | <i>Autografía</i> | 21 |
| 1.8.1 | <i>Autografía de contacto</i> | 21 |
| 1.8.2 | <i>Autografía por inmersión</i> | 21 |
| 1.8.3 | <i>Autografía directa</i> | 21 |
| 1.9 | <i>Determinación de inhibidores de Xantina Oxidasa</i> | 22 |
| 1.9.1 | <i>Sistema xantina/xantina oxidasa/NBT</i> | 22 |
| 1.10 | <i>Determinación de radicales libres</i> | 22 |
| 1.10.1 | <i>Método DPPH•</i> | 22 |
| 1.10.2 | <i>Sistema Riboflavina/Luz/NBT</i> | 23 |
| 1.10.3 | <i>Sistema NADH/metosulfato de fenazina (PMS)/NBT</i> | 23 |
| CAPÍTULO II | | |
| 2. | MARCO METODOLÓGICO | 25 |
| 2.1 | Lugar de la investigación | 25 |
| 2.2 | Recolección de la materia vegetal | 25 |
| 2.3 | Identificación de la especie vegetal | 25 |
| 2.4 | Equipos, materiales y reactivos | 26 |
| 2.4.1 | <i>Equipos</i> | 26 |
| 2.4.2 | <i>Materiales</i> | 26 |
| 2.4.3 | <i>Reactivos</i> | 27 |
| 2.5 | Acondicionamiento y almacenamiento del material vegetal | 29 |
| 2.6 | Técnicas y métodos | 29 |
| 2.6.1 | <i>Control de calidad</i> | 29 |
| 2.6.1.1 | <i>Contenido de humedad</i> | 29 |

| | | |
|------------------------------|--|----|
| 2.6.1.2 | <i>Cenizas totales</i> | 29 |
| 2.6.1.3 | <i>Cenizas solubles en agua</i> | 30 |
| 2.6.1.4 | <i>Cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i> | 30 |
| 2.6.2 | Tamizaje fitoquímico | 30 |
| 2.6.3 | Obtención del extracto alcaloidal | 30 |
| 2.6.4 | Cromatografía de capa fina | 31 |
| 2.6.5 | Ensayos autográficos | 31 |
| 2.6.5.1 | <i>Método DPPH•</i> | 31 |
| 2.6.5.2 | <i>Método de Rivo flavina/Luz/ NBT</i> | 31 |
| 2.6.5.3 | <i>Método NADH / metosulfato de fenazina / NBT</i> | 32 |
| CAPÍTULO III | | |
| 3. | MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS | 33 |
| 3.1 | Control de calidad de la materia vegetal | 33 |
| 3.2 | Tamizaje fitoquímico | 34 |
| 3.3 | Obtención de alcaloides | 35 |
| 3.4 | Cromatografía capa fina (TLC) | 36 |
| 3.5 | Ensayos autográficos | 37 |
| 3.5.1 | <i>Captación de DPPH•</i> | 37 |
| 3.5.2 | <i>Ensayo Riboflavina/Luz/NBT</i> | 38 |
| 3.5.3 | <i>Ensayo NADH/PMS/NBT</i> | 39 |
| 3.5.4 | <i>Inhibición de Xantina Oxidasa</i> | 40 |
| 3.6 | Discusión | 41 |
| CONCLUSIONES | | 42 |
| RECOMENDACIONES | | 43 |
| GLOSARIO | | |
| BIBLIOGRAFIA | | |
| ANEXOS | | |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1-2: Lista de materiales utilizados | 26 |
| Tabla 2-2: Lista de materiales utilizados | 26 |
| Tabla 3-2: Lista de reactivos utilizados | 27 |
| Tabla 1-3: Resultados de los parámetros del control de calidad de hojas de <i>P. pilosa</i> | 33 |
| Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de extractos de hojas de <i>P. pilosa</i> | 34 |
| Tabla 3-3: Rendimiento de la extracción de alcaloides de <i>P. pilosa</i> | 35 |
| Tabla 4-3: Resultado de la determinación de Rf en TLC de los alcaloides totales de <i>P. pilosa</i> | 36 |
| Tabla 5-3: Capacidad captadora de DPPH* de ácido ascórbico y alcaloides totales de <i>P. pilosa</i> | 37 |
| Tabla 6-3: Captación de $O_2^{\cdot-}$ mediante el ensayo Riboflavina/Luz/NBT de taxifolina y <i>P. pilosa</i> | 38 |
| Tabla 7-3: Captación de $O_2^{\cdot-}$ mediante el ensayo NADH/PMS/NBT de taxifolina y <i>P. pilosa</i> | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1-1: Distribución de la familia Rubiaceae | 7 |
| Figura 2-1: Distribución de los principales metabolitos secundarios en las tres subfamilias de la familia Rubiaceae..... | 7 |
| Figura 3-1: Especie <i>Psychotria pilosa</i> | 10 |
| Figura 4-1: Distribución de <i>Psychotria pilosa</i> en Ecuador..... | 11 |
| Figura 5-1: Estructura de la xantina oxidorreductasa | 12 |
| Figura 6-1: Producción y eliminación de ácido úrico..... | 13 |
| Figura 7-1: Factores genéticos y ambientales..... | 14 |
| Figura 8-1: Estructura química del alopurinol..... | 15 |
| Figura 9-1: Inhibición de la xantina oxidasa por alopurinol para prevenir la conversión de hipoxantina en xantina y / o ácido úrico | 16 |
| Figura 10-1: Estructura química del febuxostat..... | 17 |
| Figura 11-1: Química de las ROS..... | 18 |
| Figura 12-1: Mecanismos de acción del sistema XO/xantina/NBT..... | 22 |
| Figura 13-1: Mecanismos de acción de radicales DPPH• a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno..... | 23 |
| Figura 14-1: Ensayo de actividad SOD. Inhibición mediante fotorreducción NBT. | 23 |
| Figura 15-1: Reducción de NBT por radical superóxido producido en el Sistema NADH/PMS. | 24 |

ÍNDICE DE ANEXOS

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

ANEXO B: Acondicionamiento del material vegetal

ANEXO C: Control de calidad de *Psychotria pilosa*

ANEXO D: Tamizaje fitoquímico de *Psychotria pilosa*

ANEXO E: Extracción de alcaloides de *Psychotria pilosa*

ANEXO F: Ensayos autográficos

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

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo determinar el potencial inhibitorio de la fracción alcaloidal de *P. pilosa* sobre xantina oxidasa y radical superóxido mediante autografía. Se obtuvo el extracto alcaloidal de las hojas de *P. pilosa* a partir de una maceración con metanol, posterior el uso de solventes orgánicos (éter etílico y acetato de etilo) y cambios de pH, alcanzando un rendimiento de 0.07%. El estudio se realizó a diferentes concentraciones de la fracción alcaloidal (1, 10, 50, 100 µg) usando metanol como disolvente. Las pruebas autográficas se desarrollaron en placas de TLC de 6 x 4 cm, mediante la técnica “dot blot”, se sembraron aproximadamente 10 µL de cada solución de alcaloides totales. Al evaluar la actividad antioxidante de *P. pilosa* mediante el método DPPH• se utilizó como referencia ácido ascórbico. Para determinar la capacidad captadora de radicales superóxido se emplearon los modelos: riboflavina, luz, nitroazul de tetrazolio (NBT) y NADH, metosulfato de fenazina (PMS), nitroazul de tetrazolio (NBT), en los dos métodos el estándar usado fue taxifolina; mientras que para evaluar el potencial inhibitorio de xantina-oxidasa se usó xantina como sustrato y alopurinol fue el control positivo; es así que estos métodos ayudaron a discriminar entre un inhibidor puro de XO y un captador de O_2^- . La cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo usando como fase móvil cloroformo/trietilamina/metanol en proporciones (6:0.5:0.6) y revelado sin tratamiento químico a 254 nm. Los datos cualitativos y cuantitativos se reflejaron en la intensidad del color y los diámetros de los halos respectivamente; el programa GelAnalyzer fue usado para obtener los resultados de las áreas de inhibición. Los resultados mostraron que la fracción alcaloidal de *P. pilosa* posee capacidad captadora de radical superóxido para los sistemas B2/luz/NBT y NADH/PMS/NBT, en contraposición no presenta inhibición de xantina-oxidasa. Se recomienda realizar estudios de elucidación estructural de los alcaloides mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

Palabras claves: <BIOQUÍMICA>, <PRODUCTOS NATURALES>, <INHIBICIÓN>, <XANTINA OXIDASA>, <*Psychotria pilosa*>, <ALCALOIDE>, <ANTIOXIDANTE>, <RADICAL SUPERÓXIDO>, <AUTOGRAFÍA>.



SUMMARY

The research aimed to determine the inhibitory potential of the alkaloidal fraction of *P. pilosa* on xanthine oxidase and superoxide radical by autography. The alkaloidal extract of the *P. pilosa* leaves was obtained from maceration with methanol, after the use of organic solvents (ethyl ether and ethyl acetate) and pH changes, reaching a yield of 0.07%. The study was conducted at different concentrations of the alkaloidal fraction (1, 10, 50, 100 µg) using methanol as solvent. The autographic tests were carried out in 6x4 cm TLC plates, using the "dot blot" technique, approximately 10 µL of each total alkaloid solution was seeded. When evaluating the antioxidant activity of *P. pilosa* using the DPPH method, ascorbic acid was used as a reference. The models were used to determine the superoxide radical scavenging capacity: riboflavin, light, tetrazolium nitro blue (NBT) and NADH, phenazine methosulfate (PMS), tetrazolium nitro blue (NBT). In both methods, the standard used was taxifolin, while to evaluate the inhibitory potential of xanthine oxidase, xanthine was used as a substrate, and allopurinol was a positive control. Thus, these methods helped discriminate between a pure XO inhibitor and a O_2^- sensor. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out using chloroform/triethylamine/ methanol as a mobile phase in proportions (6: 0.5: 0.6) and developed without chemical treatment at 254 nm. Qualitative and quantitative data were reflected in the intensity of the color and diameter of the halos, respectively; The GelAnalyzer program was used to obtain the results of the inhibition areas. The results showed that the *P. pilosa* alkaloidal fraction has a superoxide radical scavenging capacity for the B2 / light / NBT and NADH / PMS / NBT systems. In contrast, it does not exhibit xanthine oxidase inhibition. It is recommended to conduct studies of structural elucidation of alkaloids using chromatographic and spectroscopic techniques.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <NATURAL PRODUCTS>, <INHIBITION>, <XANTINA-OXIDASA>, <*Psychotria pilosa*>, <ALKALOID>, <ANTIOXIDANT>, <SUPERXIDE RADICAL>, <AUTOGRAPHY>.



INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Desde la antigüedad se aplica el uso terapéutico de plantas medicinales, para curar o aliviar las enfermedades como alternativa a la medicina farmacéutica (Gallegos, 2016, p. 327). En los programas de descubrimiento de fármacos de la industria farmacéutica y diversas organizaciones de investigación los productos naturales juegan un rol destacado (Jantan et al., 2015, p. 4). Según la Organización Mundial de la Salud, casi el 80% de los habitantes del mundo utilizan la medicina tradicional en la atención primaria de salud (Guerrero, 1996, p. 24).

Es importante destacar el papel de los alcaloides, como componentes principales de diversas plantas medicinales. Estos metabolitos secundarios poseen estructuras químicas diversas, con diferentes formas de actuar como por ejemplo la anestesia de la morfina (*Papaver somniferum*), o como estimulantes del SNC la cafeína (*Coffea arábica*) y la nicotina del tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Martínez y Ortiz, 2009, p.126). La *Atropa belladonna* presenta actividad anticolinérgica por la atropina, mientras que, los responsables de la inhibición de la mitosis celular son los alcaloides de la *Vinca rosea* y *Vinca minor* (vincristina o vinblastina), los cuales son usados como agentes antineoplásicos, con un excelente resultado en diferentes tipos de cáncer.

Sin embargo, las actividades estimulantes y depresoras no son las únicas, existe evidencia de los efectos antiespasmódicos, antitusivos, diuréticos, sedantes, antiinflamatorios, incluso aplicaciones dermatológicas, etc (Martínez y Ortiz, 2009, p. 126). La variedad de compuestos biológicamente activos en las plantas ha motivado los estudios químicos de varias especies.

Una familia de plantas con considerable potencial químico es la Rubiaceae del que se extrajo un importante alcaloide como es la cafeína utilizada como estimulante además importante por su interés económico; continuamente se han descubierto estructuras activas que incluyen pigmentos, péptidos, naftoquinonas, benzoquinonas (Matsuura et al., 2013, p. 29). Se divide en tres subfamilias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae (Mouly, 2008: p. 458).

Principalmente dos especies sobresalen en esta familia *Uncaria tomentosa* de la cual 150 compuestos se han aislado, predominando alcaloides con actividades como inmunomodulador, antiviral, antiinflamatorio, antioxidante y citostático, de igual forma *Cinchona officinalis* con su

compuesto característico “quinina” empleado para detener la muerte a causa de la malaria en Europa (Porto et al., 2009, p. 29).

Desde 1974 diversos estudios han demostrado que el género *Psychotria* tiene una importante fuente de alcaloide representado por el 52% del total de metabolitos, de ello un 87% son alcaloides del tipo indólico utilizados ampliamente en medicina (de Carvalho et al., 2016. p. 232). Los alcaloides presentes en este género se originan a partir del aminoácido triptófano, principalmente monoterpenos (indol no iridoides), destacando los polindólicos, derivados de triptamina y β -carbonilos (Pfaffenbach y Gaich, 2017, p. 2).

Actualmente, se conoce de un sinnúmero de enfermedades relacionadas con la presencia de radicales libres. En el estudio realizado por Mamat et al. (2014, p. 1827-1828) indican que la corteza del tallo de *Ardisia colorata* tiene un porcentaje de inhibición de 73.5, que podrían ser útiles para el tratamiento de la hiperuricemia o enfermedades relacionadas con la inflamación; además en el extracto de diclorometano de la especie *Labisia pumila* mostró fuertes actividades inhibitorias de XO y DPPH• debido a la presencia de compuestos fenólicos y no fenólico.

Una investigación evaluó varios extractos de plantas medicinales de Bangladesh; el extracto de *Aphanamixis polystachya* exhibió actividad para captar radicales libres en el ensayo antioxidante, así mismo la prueba de xantina oxidasa produjo una inhibición del 60% con extracto de *Shorea robusta* y una inhibición del 48% con *Embllica officinalis*, en este último se ha encontrado que su extracto muestra actividad antitumoral (Guerrero et al., 1996, p. 26).

Identificación del problema

La xantina oxidasa (XO) es una enzima que interviene en el proceso de catálisis de ácido úrico siendo este un producto final del catabolismo de las purinas (constituyentes de los ácidos nucleicos del ADN y ARN) a partir de hipoxantina a xantina, (Ferrando et al., 2014: p. 292), produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, estos productos están implicados en varios procesos patológicos (trastornos metabólicos, cardiovasculares, envejecimiento celular y carcinogénesis) debido al estrés oxidativo (Choma y Jesionek, 2014: p. 298). Por ello la inhibición de XO contribuye como una opción terapéutica para limitar los efectos nocivos del incremento del ácido úrico y especies reactivas de oxígeno.

Como consecuencia del metabolismo celular normal, los organismos están expuestos a una constante producción de ROS, gran parte procede de fuentes endógenas, sin embargo, también son generadas en respuesta a estímulos externos como la luz ultravioleta, la radiación ionizante,

fármacos o agentes tóxicos (Vaquero-Raya y Molero-Richard, 2005, p. 60). La exposición a intermedios reactivos de oxígeno como el anión superóxido (O_2^-), peróxido hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot), deterioran las proteínas, ácidos nucleicos y las membranas celulares, provocando un daño acumulado que contribuye a numerosas enfermedades (Storz y Imlay, 1999, p. 188).

La hiperuricemia se presenta, en los grupos étnicos de Oceanía (taiwaneses y maoríes) con una prevalencia alta >10%, mientras que en países desarrollados especialmente Norteamérica y Europa Occidental la prevalencia es de 1 a 4%. Los países en desarrollo (México, Guatemala, Cuba Venezuela) muestran escasos datos de prevalencia de la gota, pero se estiman valores entre 0.3 y 0.4% (Kuo, et al., 2015: p. 650); coincidiendo que la prevalencia es de 2-6 veces mayor en el sexo masculino. Cabe mencionar que en Ecuador no existen datos registrados sobre la prevalencia de dicha patología.

El tratamiento empleado para prevenir la artritis gotosa son inhibidores de xantina oxidasa considerados de primera línea para prevenir la artritis gotosa; entre ellos el alopurinol y febuxostat (Wilson y Saseen, 2016: p. 906).

Justificación del estudio

El presente trabajo de titulación tiene como objeto encontrar una alternativa para tratar los problemas relacionados con la hiperuricemia que conlleva a la gota; a través de la actividad inhibitoria de XO y capacidad de captación de radical superóxido de la fracción alcaloidal de *Psychotria pilosa*. La metodología a emplearse está basada en la autografía por inmersión de agar para obtener información de la actividad biológica y de compuestos que se presentan como mezclas complejas (Marston, 2011, p. 2676).

En Ecuador no existen datos estadísticos que indiquen la prevalencia de la hiperuricemia y la gota; una evidencia epidemiológica da a conocer una prevalencia creciente en el continente occidental, el 21% en hiperuricemia y de 1% al 4% en la gota (Bove et al., 2017, p. 23), que a largo plazo puede conllevar a complicaciones. Tanto el alopurinol como el febuxostat son medicamentos usados para la hiperuricemia, la farmacoterapia de la hiperuricemia es normalmente segura y eficaz, aunque al menos el 2% de las personas que toman alopurinol desarrollan reacciones alérgicas siendo el 20% de estas graves.

Una notable propiedad antioxidante y un sinnúmero de actividades biológicas se debe a los alcaloides de tipo indol, sin embargo no son los únicos compuestos que presentan actividad antirradical ya que estudios actuales han demostrado que compuestos fenólicos podrían actuar

como captador de radicales libres: por este motivo *P. pilosa* ofrecería resultados favorables que permitan encontrar alternativas terapéuticas.

La gran variedad de especies del género *Psychotria* en Ecuador, contribuye para la realización de estudios sobre sus compuestos activos que le confieren actividades farmacológicas; por ello se buscan alternativas naturales con eficacia terapéuticas y con menos efectos adversos para el tratamiento de la hiperuricemia, en lo estipulado en el Plan Nacional de Desarrollo Toda una Vida, cita que 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)

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

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

Objetivo Específico

- Efectuar el control de calidad de *Psychotria pilosa* para verificar la idoneidad de la materia prima vegetal.
- Identificar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en *Psychotria pilosa* mediante tamizaje fitoquímico.
- Obtener la fracción alcaloidal de *Psychotria pilosa* mediante extracción con solventes y variación de pH.
- Medir el Rf de las concentraciones del extracto de alcaloides de *Psychotria pilosa*, del halo de inhibición de XO y radical superóxido mediante el programa GEL ANALYZER.
- 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

Es una familia que ocupa el cuarto lugar entre las angiospermas abarca árboles, arbustos, hierbas y lianas, aproximadamente 13.143 especies distribuidas en 611 géneros; con un considerable potencial químico (Ramawat y Mérillon, 2013: p.122). Unas de las características relevantes de las Rubiaceae son hojas opuestas de borde entero, cáliz de sépalos fusionados, ovario ínfero y frutos carnosos indehiscentes y de tipo cápsula (Mendoza et al, 2004, p. 22).

Se divide en tres subfamilias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae (Mouly, 2008: p. 458). En la subfamilia Ixoroideae el género más representativo es el café (*Coffea*), segundo producto más comercializado después del petróleo (Naranjo et al., 2011: p. 165). Además, presenta una variedad de sustancias como alcaloides indólicos e iridoides (predominantes en esta familia), antraquinonas, terpenoides (diterpenos y triterpenos), flavonoides y otros derivados fenólicos, con énfasis en la producción de alcaloides bioactivos (Martins y Nunez, 2015, pp. 13424-13426).

1.1.2 Distribución mundial

Presenta una distribución cosmopolita, desde el continente americano a Europa, África, Asia, Australia y Oceanía, han existido fósiles de la familia Rubiaceae lo que podría indicar una antigua distribución mundial (Bremer y Eriksson, 2009: p. 766). En Colombia y Venezuela se encuentran el mayor número de especies de esta familia (Davis et al., 2009: p. 73). En Brasil, se producen especies 120 géneros y 1400 especies, siendo una de las familias de plantas económicas, ornamentales y medicinales más importantes en la flora brasileña (Martins y Nunez, 2015, p. 13423).

Dentro de las 4500 especies endémicas del Ecuador, 3028 (67,5%) se encuentran en la región Sierra a una altitud que va de 1.000 a 2.000 metros. Aproximadamente 96 especies Rubiaceae se encuentran en el territorio ecuatoriano representando al 2,1 del porcentaje total, cabe resaltar que en el bosque andino se localizan 54 especies endémicas del total de esta familia (León-Yáñez et al., 2011: pp. 20-30).

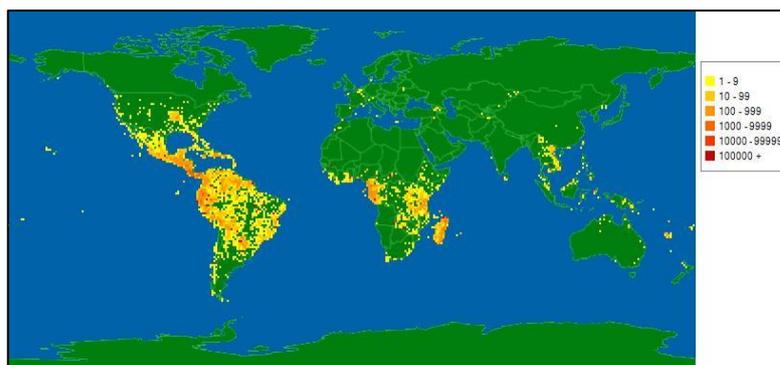


Figura 1-1: Distribución de la familia Rubiaceae

Fuente: (Tropicos, 2009)

1.1.3 Metabolitos secundarios

Según los estudios de encuestas bibliográficas de Delprete (2012, p. 101) la distribución de los metabolitos secundarios son diversas, en lo que refiere a la subfamilia Rubioideae es la segunda en poseer una alta concentración de alcaloides.

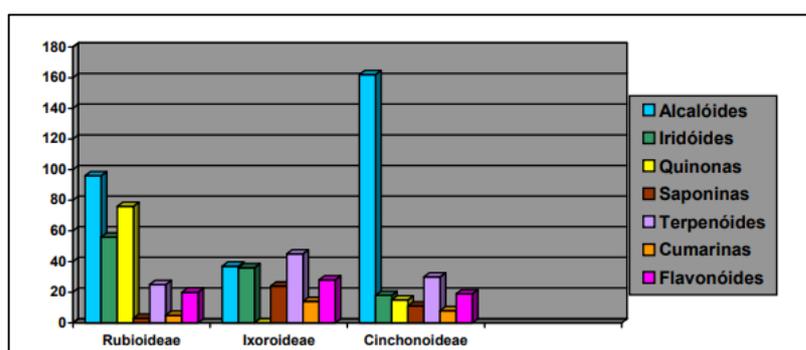


Figura 2-1: Distribución de los principales metabolitos secundarios en las tres subfamilias de la familia Rubiaceae

Fuente: (Delprete y Jardim, 2012)

1.2 Género *Psychotria*

1.2.1 Características

Pertenece a la subfamilia Rubioideae y familia Rubiaceae, es un género leñoso más grande del mundo con aproximadamente 2000 especies (Davis et al., 2001, p. 35) distribuidas en regiones tropicales y subtropicales. Varios extractos del género *Psychotria* indicaron la presencia de alcaloides y sustancias bioactivas señalándolo como el género “caliente” tanto por su capacidad citotóxica que han mostrado sus extractos y fracciones alcaloidales (Nepokroeff et al., 1999. p. 6).

1.2.2 Etnobotánica

Entre los usos tradicionales del género *Psychotria* se menciona que en México *P. papantlensis* se usa para tratar enfermedades inflamatorias; en la Amazonía peruana se utilizan *P. tenuicaulis*, *P. pilosa*, *P. poeppigiana*, *P. marcgraviella* y *P. carthagenensis* para diferentes propósitos en la como hemorragia uterina, vómitos, fiebre, diarrea, espasmos, analgésicos, sedantes y tónicos para la salud (Matsuura et al., 2013, p. 125). La *P. ipecacuana* fue utilizada hace más de 300 años como emético para tratar pacientes que ingirieron venenos, siendo la emetina uno de los compuestos activos (Calixto et al., 2016, p. 1371).

Las hojas, raíces, cortezas y rizomas de especies de *Psychotria* se usan comúnmente en la medicina tradicional incluidos fines espirituales y culturales como en problemas gastrointestinales, bronquiales, fiebre, dolor de oído, dolor abdominal, náuseas (Calixto et al., 2016, p. 1357). Otras especies como *P. rostrata*, *P. serpens*, *P. hawaiiensis*, *P. insularum*, *P. camponutans* tienen propiedades antibióticas, antivirales, antifúngicas, antiinflamatorias y antiparasitarias respectivamente (Matsuura et al., 2013, p. 125).

1.2.3 Alcaloides

El género *Psychotria* es taxonómicamente complejo debido a la falta de características morfológicas, pero la acumulación de alcaloides indólicos es un aspecto importante para la quimiosistemática. Las especies de *Psychotria* producen moléculas activas que incluyen naftoquinonas, péptidos, benzoquinonas, pigmentos y alcaloides (Porto et al, 2013, p. 30). Estudios dan a conocer que el 52% de metabolitos identificados son alcaloides y aproximadamente 87% pertenecen al subgrupo de alcaloides indólicos, 12% de triterpenos y 6% flavonoides (de Carvalho et al., 2016, p. 232). El compuesto aislado más conocido de la especie *Psychotria* es el alcaloide emetina.

1.2.3.1 Alcaloides diméricos y poliindol

El alcaloide psicotridina fue aislado de diferentes especies *P. beccarioides*, *P. oleoides* y *P. colorata*, donde la principal característica es la presencia de restos de N-metiltriptamina en sus estructuras; otros alcaloides aislados fueron cuadrígeminas, psicotridina e isopsicotridina este último de la especie *P. forsteriana* (de Carvalho et al., 2016, p. 232-233). De *P. rostrata* se identificó los alcaloides psicopentamina y psicotrimina.

1.2.3.2 Alcaloides indol monoterpénico

Los MIAs son el principal tipo de alcaloides del género *Psychotria*, biosintetizados de la unión de triptófano y la secologanina (terpeno iridoide), presentan diferentes actividades biológicas como agentes anticancerígenos, antipalúdicos y antiarrítmicos. El primer alcaloide indol monoterpénico (N-β-D-glucopiranosil vincosamida) fue aislado de las hojas de *P. leiocarpa*, concluyendo que la edad de la planta y exposición a la luz influye en la acumulación de este alcaloide (de Carvalho et al., 2016, p. 233).

La amplia gama de actividades farmacológicas del anillo de indol son diversas entre ellas están anticancerígena, antiviral, anti-VIH y antioxidante. El triptófano, la serotonina y la reserpina son alcaloides del indol, usados en la nutrición de los seres vivos, como neurotransmisor y para bajar presión sanguínea respectivamente (Singh y Singh, 2017, p. 9).

1.2.4 Actividades biológicas

1.2.4.1 Citotóxica

Se aislaron cuatro alcaloides de poliindolina de *P. forsteriana* con actividad citotóxica en células hepáticas de ratas con carcinoma. Además, otros alcaloides presentaron una citotoxicidad mayor que la vincristina (quimioterapia antitumoral) (de Carvalho et al., 2016, p. 242).

1.2.4.2 Antiviral

Hace más de 300 años los alcaloides de Ipecac fueron aislados de la *P. ipecacuana*, la emetina uno de los compuestos activos evaluado como agente antiviral contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), al inhibir la replicación del VIH-1, en la actividad de la transcriptasa inversa; dando como resultado una reducción de modelos celulares en 80% de la infección por VIH-1. Además, subfracciones de extracto etanólico de *P. serpens* han demostrado su capacidad de suprimir la replicación del virus herpes simple tipo 1 (Calixto et al., 2016, p. 1371).

1.2.4.3 Antioxidante

Mediante el ensayo de hipoxantina / xantina oxidasa, la evaluación del extracto crudo de *P. umbellata* mostro actividad antioxidante sobre cepas de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en

superóxido dismutasa y / o catalasa, expuestas a H₂O₂ y paraquat, siendo este último más eficiente (de Carvalho et al., 2016, pp. 250-251).

1.2.4.4 Analgésica

Las propiedades analgésicas de los extractos y compuestos aislados de *P. colorata* muestran que en las hojas y flores de dicha planta existe actividad analgésica similar a la de los opioides para ello se aplicó la prueba de respuesta al dolor en animales es así que el movimiento y retorcimiento de la cola comprobó su actividad (Elisabetsky et al., 1995, p. 75).

1.3 *Psychotria pilosa*

1.3.1 Características

Son arbustos de 2 hasta 3 m de altura, se desarrolla en alturas entre el nivel del mar y 2000 m, esta especie es originaria de América Central y del Sur, crece en sotobosques (debajo de los árboles); están provistos de una corteza marrón clara que a su vez cubren a las ramas, las hojas presentan características de color verde oscuro, ovaladas, puntiagudas además flores blancas de las cual brota racimos de frutos azules con el interior esponjoso (Tropicos, 2009, p. 1).



Figura 3-1: Especie *Psychotria pilosa*

Fuente: (Tropicos, 2009)

1.3.2 Distribución geográfica

Psychotria pilosa se habitúa a una variedad de climas y es resistente de -1.2 hasta -3.8 °C tomando como referencia las Zonas Climáticas USDA 9 (Tropicos, 2009, p. 1).

La mayor parte de esta especie está ubicada en la región Amazónica como es en las provincias de Morona Santiago, Napo, Pastaza, Zamora-Chinchipec; una pequeña parte está situado en Carchi, Chimborazo, Pichincha, Cotopaxi, El Oro y Esmeraldas.

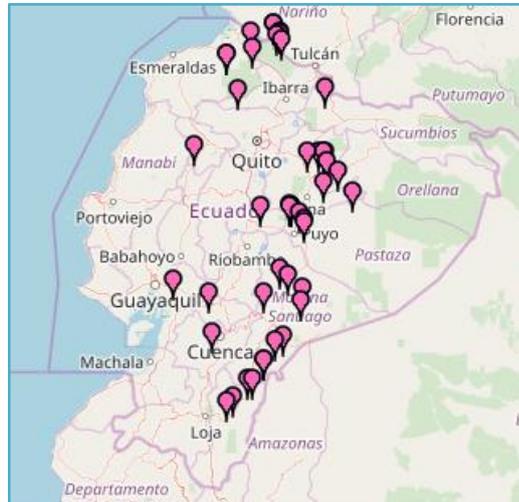


Figura 4-1: Distribución de *Psychotria pilosa* en Ecuador

Fuente: (Tropicos, 2009)

1.4 Xantina oxidasa

Es una molibdoflavoenzima que tiene una amplia distribución, se encuentra tanto en bacterias como en el ser humano mismo que posee grandes cantidades en el hígado y el tracto gastrointestinal; la relación del daño oxidativo y XO es muy estrecho por la producción de especies reactivas del oxígeno implicados en diferentes estados patológicos. Se encuentra en dos formas deshidrogenasa y oxidasa; además juega un rol importante en el catabolismo de las purinas (Tang, Long, y Liu, 2014, p. 108).

1.4.1 Historia

Schardinger demostró en 1902, que la leche contiene una enzima capaz de oxidar aldehído a ácidos, entonces se llamó “enzima Schardinger”; Morgan en 1922 mostro que la leche contiene una enzima capaz de oxidar xantina e hipoxantina, esta enzima se llamaba XO.

Además, Hass y Hill y Hass y Lee indicaron que la leche contiene una sustancia a la que le llamaron "itate", capaz de oxidar nitrito a nitrato. Booth en 1938 mostro una evidencia, indicando que la “enzima Schardinger” era XO (Kostić et al., 2015, p. 2).

1.4.2 Estructura

La XO es un homodímero con peso molecular 290 kDa, se incluye a la familia de las proteínas del molibdeno; contiene dos sitios de unión al sustrato por separado, en su estructura contiene un molibdeno, dinucleótidos de adenina flavina (FAD) y dos centros de hierro-azufre (2Fe-2S) del tipo ferredoxina en sus dos subunidades independientes (Kostić et al., 2015, p. 2).

Cada centro catalítico posee tres dominios con un potencial redox importante, el primero contiene el cofactor molibdeno (MoCo), seguido del dominio que contiene el cofactor flavin adenina dinucleótido (FAD) y el último dominio contiene los dos centros de azufre de hierro (Maiuolo et al., 2016, p. 5).

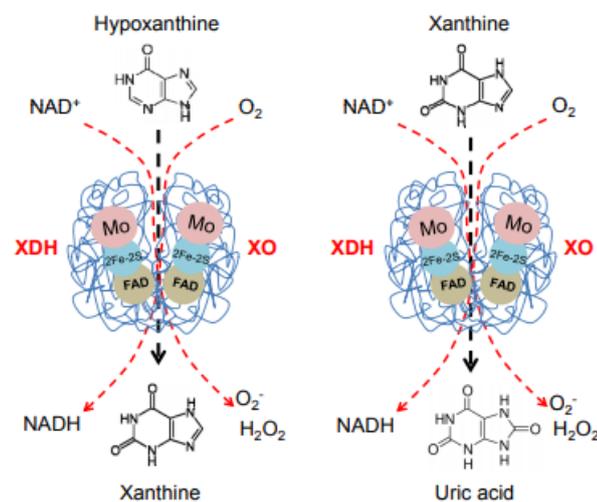


Figura 5-1: Estructura de la xantina oxidorreductasa

Fuente: (Chen, Lü, & Yao, 2016)

1.4.3 Mecanismo de acción

La degradación de las purinas y sus nucleótidos ocurre durante la renovación de los ácidos nucleicos endógenos y la degradación de los ácidos nucleicos ingeridos, durante los cuales la mayoría de las purinas se convierten en ácido úrico (Bhagavan y Ha, 2015, p. 476).

La hidrólisis de los ácidos nucleicos en el organismo producen mononucleótidos, mediante enzimas endógenas y exógenas rompen sus enlaces, posterior son degradados a nucleósidos, a través de la enzima 5'-nucleotidasa que libera guanosina (GMP) y adenosina (AMP). Tanto la GMP y AMP siguen diferentes vías de metabolización; por medio de una desaminación se elimina el grupo amino de la AMP formando iosina, posterior actúa la nucleotidasa dando HX, misma enzima que convierte la guanosina en guanina. La oxidación de la HX a través de la XO forma

xantina y la guanina se desamina por medio de la guanina desaminasa para dar xantina, esta se oxida nuevamente por la xantina oxidasa formando ácido úrico (Maiuolo et al., 2016, p. 8).

En la oxidación de las purinas, el molibdeno acepta electrones (e^-), siendo reducido de Mo^{6+} a Mo^{4+} (BHAGAVAN Y HA) formando el complejo $LMo(IV)-O-(SH)(OP)$, la transferencia de electrones desde el centro del molibdeno hacia afuera implica que una molécula de H_2O desplace el complejo enzima-sustrato para formar el ligando $Mo-OH$, consecuente ocurre una semirreacción oxidativa donde los electrones pasan del cofactor FAD al NAD^+ para la forma de deshidrogenasa u O_2 en el caso de la forma oxidasa; la hidroxilación de HX en posición C-2 resulta xantina, posterior un grupo hidroxilo se adiciona en posición C-8 formando el ácido úrico (Cao, Pauff, & Hille, 2010, p. 28044).

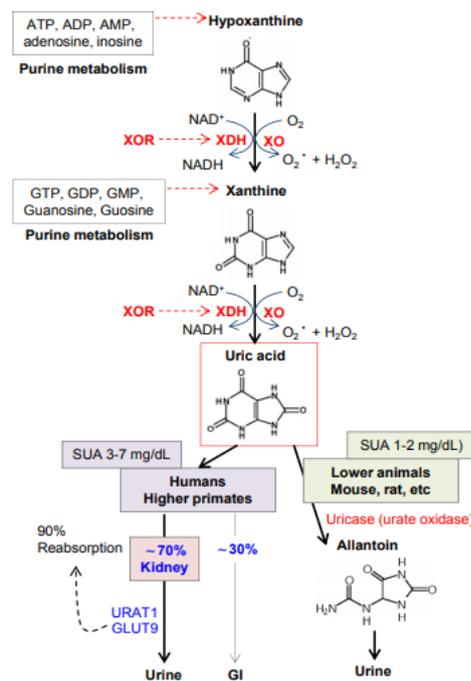


Figura 6-1: Producción y eliminación de ácido úrico

Fuente: (Chen et al., 2016)

1.5 Hiperuricemia

Es producto del trastorno en el metabolismo de las purinas, en el que existe un exceso de ácido úrico en la sangre; donde los valores séricos no deben ser superiores 5.7 mg/dL en mujeres y en hombres de 7.0 mg/dL (Gondim et al., 2001, p. 463).

La concentración sérica de AU está determinada por el balance entre su producción y eliminación; cuando se incrementa la producción o disminuye la eliminación se lo conoce como HU (Vargas, 2017, p. 156).

1.5.1 Epidemiología

Estudios indican que la prevalencia a nivel mundial de la gota está entre 0.1% a 10%, asimismo en países de Norte América y Europa occidental los datos varían del 1% al 4% (Chen, Lü, & Yao, 2016, pp. 2503-2505). En lo que refiere a la relación de género, por cada mujer 3 y 4 varones desarrollan hiperuricemia y aproximadamente un 10% de los individuos con hiperuricemia desarrolla gota (Sancho, 1980, p. 101).

1.5.2 Etiología

El incremento de ácido úrico sérico (AUS) es una condición indispensable para que se produzca gota, las causas pueden ser de diferentes índoles tanto de carácter genético que ocurre en el 90% de los casos y la alteración del metabolismo de las purinas (enfermedades hematológicas y neoplásicas), lo que favorece un aumento del catabolismo o disminución de la síntesis de ATP (Sancho et al., 1980, p. 101).

1.5.3 Fisiopatología

El producto final del metabolismo de las purinas es el ácido úrico (último catabolito de los nucleótidos purínicos), al día se sintetiza dos tercios del mismo que es eliminado en la orina ($\approx 400-700$ mg/dl/24 h= $238-416$ mmol/24h). La eliminación del urato restante a la luz intestinal es mediante secreciones, con la ayuda de bacterias intestinales se degradan el ácido úrico a alantoína y CO_2 (Sancho et al., 1980, p. 102). Los trastornos fisiopatológicos que pueden causar hiperuricemia son el incremento en la síntesis del ácido úrico y disminución de la excreción renal.

1.5.4 Factores de riesgo

Entre los diversos factores de riesgo para el desarrollo de HU están modificables (genéticos, edad, factores socio-económicos, etnia) y no modificables (alimentación, tabaco, fármacos) (Chalès et al., 2017, pp. 4-7).

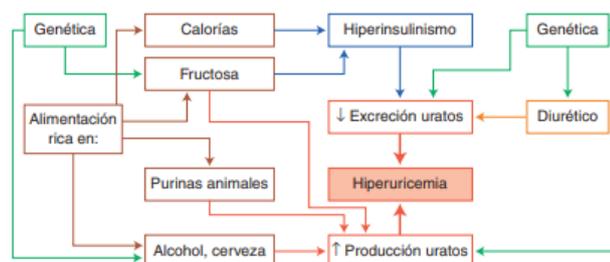


Figura 7-1: Factores genéticos y ambientales

Fuente: (Chalès et al., 2017)

1.5.5 Tratamiento

Para el manejo de hiperuricemia las drogas que se emplea son agentes uricostáticos en particular alopurinol, oxipurinol, febuxostat, mediante la inhibición competitiva de XO ayudan a reducir la producción de UA y agentes uricosúricos que favorecen la excreción urinaria de UA por ejemplo probenecid, benzbromarona, lesinurad, que modula la reabsorción de urato en el túbulo renal (Bove et al., 2017, p. 24).

1.6 Inhibidores de xantina oxidasa

Las concentraciones elevadas de UA son el resultado de niveles altos en la actividad de la XO y estrés oxidativo, siendo el principal motivo para diferentes estados de enfermedad que es característico de muchos estados de enfermedad vascular; además XOR es indispensable ya que limita la velocidad en el metabolismo de las purinas, por esto los inhibidores de la xantina oxidasa (XOI) cumplen un rol importante para reducir tanto los niveles circulantes de ácido úrico como el estrés oxidativo vascular (Kostić et al., 2015, p. 3).

1.6.1 Alopurinol

En la década de 1940 el alopurinol ([4-hidroxipirazolo (3,4-d) pirimidina]), primer fármaco inhibidor de XOR, fue descubierto por dos científicos estadounidenses premios Nobel Gertrude Elion y George Hitchings, posterior en 1966 para tratar la artritis gotosa aguda la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) aprobó este medicamento (Chen et al., 2016, p. 2507).

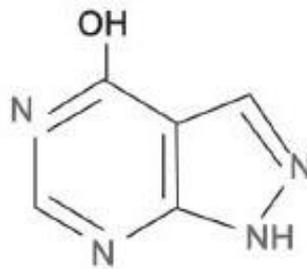


Figura 8-1: Estructura química del alopurinol

Fuente: (Gómez-Puerta, 2011)

1.6.1.1 Mecanismo de acción

Es un inhibidor basado en mecanismos, actúa el catabolismo de las purinas reduciendo la producción de UA al impedir que reacciones bioquímicas lo formen. Mediante hidrólisis de XOR produce oxipurinol el principal metabolito activo farmacológicamente, el cual se une al ion molibdeno reducido, Mo (IV) de la enzima (Chen et al., 2016, p. 2507); las bases de purina hipoxantina (HX) y xantina tienen como análogos estructurales al alopurinol y oxipurinol que se unen competitivamente a la XO e inhiben la formación de xantina y ácido úrico (Murrell y Rapeport, 1986, p. 343). Es así que los pacientes tratados con alopurinol presentan en plasma y orina mayor concentración de HX y xantina y una disminución de UA.

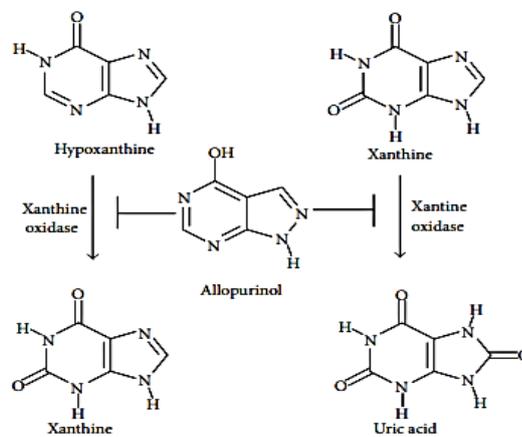


Figura 9-1: Inhibición de la xantina oxidasa por alopurinol para prevenir la conversión de hipoxantina en xantina y / o ácido úrico

Fuente: (Kostić et al., 2015)

Adicional se da una inhibición por retroalimentación de la amidofosforribosil transferasa (PPAT), por el agotamiento del sustrato fosforribosilpirofosfato (PRPP) que participa en la velocidad de la biosíntesis de las purinas y con ello una reducción de la biosíntesis de purinas de novo.

1.6.1.2 Efectos adversos

Existen algunos estudios que indican la relación directa entre la concentración de alopurinol y manifestaciones de efectos adversos; lo más común es la erupción cutánea que incluye síndrome de hipersensibilidad por alopurinol (SHA), vasculitis, hepatitis, necrólisis epidérmica, nefritis, fiebre e inclusive síndrome de Stevens-Johnson que puede causar 20% de mortalidad (Murrell y Rapeport, 1986, p. 350).

1.6.2 Febuxostat

Se sintetizó en el Instituto Teijin para la Investigación Biomédica, fue aprobado en el 2009 por la FDA para el tratamiento de hiperuricemia a dosis de 40 u 80 mg/día; en tratamientos a largo plazo, en pacientes con intolerancia al alopurinol y con insuficiencia renal debe considerarse este medicamento (Hosoya et al., 2014, p. 2). Es considerado como fármaco de segunda línea ya que no es exequible a toda la población por su alto costo.

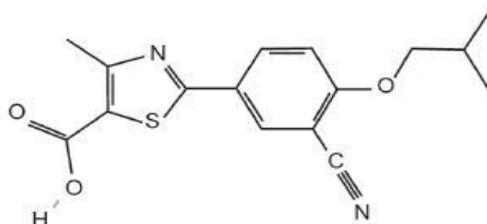


Figura 10-1: Estructura química del febuxostat

Fuente: (Gómez-Puerta, 2011)

1.6.2.1 Mecanismo de acción

Es un inhibidor selectivo no purínico de XO basado en estructura, inhibe tanto la forma oxidada y reducida de la enzima; no interviene en otras moléculas del metabolismo de las purinas, a diferencia del alopurinol que actúa solo sobre la forma reducida (Kimura et al., 2018, p. 399). El sitio activo de pterina-molibdeno se bloquea mediante la unión del febuxostat y la enzima XO, evitando el acceso del sustrato al sitio activo y reduciendo ROS (Takano et al., 2005, p. 1842).

1.6.2.2 Efectos adversos

Este medicamento es bien aceptado por el organismo pero hay efectos adversos leves y moderados que provocan esta droga, el daño hepático leve y diarrea en un 3%, náuseas y mareo en 2%, por ultimo cefalea con 1% (Gómez-Puerta, 2011, p. 172).

Existiría un posible riesgo de tromboembolismo cardiovascular a dosis de febuxostat de 80 y 120 mg/día, así lo demuestra un estudio de Fase III, la Comisión Europea recomienda precaución al usar en pacientes con enfermedades cardiacas (Ernst y Fravel, 2009, pp. 2513-2514).

1.7 Estrés oxidativo

La exposición a radicales libre y ROS como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), provoca estrés oxidativo causando daño celular incluidos lípidos, membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Storz & Imlay, 1999, p. 188). La producción excesiva e inevitable de radicales libres como subproducto de los procesos bioquímicos o de contaminantes externos causa un desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes (Betteridge, 2000, p. 3).

En la mitocondria se produce la mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno a causa de la oxido-reducción del O_2 en el que intervienen varias enzimas oxidasas (NADP⁺ oxidasa, xantina oxidasa) (Facultad de Estudios Superiores «Zaragoza.» División de Estudios de Posgrado e Investigación., 2012, p. 99)

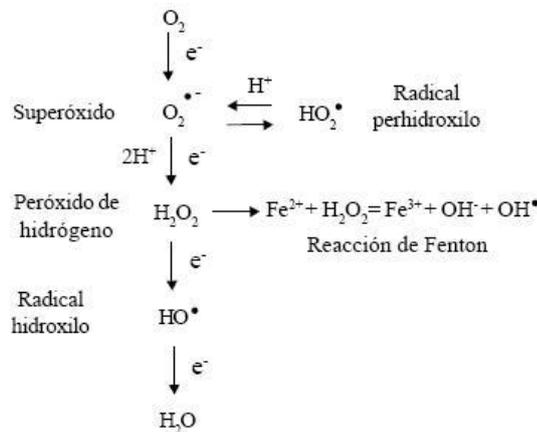


Figura 11-1: Química de las ROS

Fuente: (Benezer–Benezer et al., 2008)

1.7.1 Oxidantes

1.7.1.1 Fuentes endógenas

Los procesos biológicos son indispensables para el mantenimiento de la vida, la respiración celular y respuesta a infecciones microbianas generan una serie de reacciones que a la vez desencadena la formación de especies reactivas de oxígeno, incluso en el ejercicio físico intenso (Pisoschi y Pop, 2015, p. 56). Como resultado del metabolismo celular se produce ROS a partir del oxígeno molecular, principal responsable de la producción de especies oxidantes, mediante el cual se forman anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en la mitocondria en el proceso de transporte de electrones, radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Birben et al, 2012, p. 9).

1.7.1.2 Fuentes exógenas

La principal es el humo del tabaco, en cuya mezcla de sustancias está presente el óxido de nitrógeno y de azufre que pueden interactuar con el citocromo P450 (Paredes Salido y Roca Fernández, 2002, p. 95); el alcohol, exposición a pesticidas, la contaminación ambiental, hidrocarburos, incluso diferentes tipos de radiación, como la del microondas, la luz ultra violeta, generan excitación que dan lugar a radicales libres (Sies, 1997, p. 291).

1.7.2 Antioxidantes

En los diferentes mecanismos de protección celular, intervienen estructuras moleculares conocidas como antioxidantes que previenen o evitan la oxidación; las concentraciones empleadas con bajas con respecto al sustrato oxidado y actúan estabilizando las ROS, transformando a moléculas menos reactivas, bloqueando la unión al oxígeno o capturando los radicales libres, lo que lleva el nombre de “radical scavengers” (Gutiérrez-Salinas et al., 2014, p. 452).

1.7.2.1 Endógenos - Enzimáticos

Las enzimas con actividad antioxidante que se encuentran en células eucariotas, juegan un papel importante en el proceso de detoxificación de la célula, los de mayor relevancia son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Sies, 1997, p. 294).

Para prevenir la producción del radical hidroxilo, se da una serie de reacciones donde la SOD convierte en H_2O_2 al anión superóxido mediante una oxidación, seguido de la CAT y el GPX-Px que compiten por el peróxido de hidrogeno para catalizar la conversión a H_2O o alcohol (Pisoschi y Pop, 2015, p. 64).

1.7.2.2 Endógenos - No enzimáticos

Al interactuar los oxidantes fisiológicos y los tioles (-SH) han demostrado su capacidad para mantener el estado de homeostasis redox, eliminando peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo; el ácido úrico actúa en la autooxidación de la hemoglobina suprimiendo radicales libres.

La bilirrubina, melatonina, albumina y coenzima Q ejerce una actividad citoprotectora de las membranas celulares y lipoproteínas plasmáticas contra el daño radical amortiguando el efecto oxidativo (Pisoschi y Pop, 2015; p. 65; Rahman, 2007, p. 221)

1.7.2.3 Exógenos

Proviene de la dieta diaria, incluye la vitamina C un antioxidante hidrosoluble que elimina los radicales libres de oxígeno además ayuda a regenerar la Vitamina E a partir de radicales de α -tocoferol; mientras que la vitamina E antioxidante lipofílico previene la peroxidación lipídica (Rahman, 2007, p. 224). La acción directa de los carotenos (β -caroteno) en el oxígeno impide un daño fotooxidativo; otro tipo de antioxidantes de gran importancia son compuestos fenólicos como isoflavonas (fréjol), flavonoides (cítricos), quercetina (cebolla), polifenoles (aceituna) incluso el café y el vino pertenecen a este grupo ya que disminuyen la peroxidación de fosfolípidos (Avello y Suwalsky, 2006, pp. 165-166).

El cacao (*Theobroma cacao* L) posee propiedades antioxidantes debido a la presencia de polifenoles *Rosmarinus officinalis* L conocida como romero contiene cineol, sustancia antioxidante utilizada para evitar la rancidez de las grasas; las proantocianidinas de la uva (*Vitis vinifera* L) previenen el riesgo de enfermedades cardiovasculares por acción de los flavonoides (García et al., 1982, p. 234).

Así mismo existen antioxidantes artificiales como la N-acetilcisteína, el dimetilsulfóxido (DMSO), la etildimetiltiourea y el etanol, los tres últimos son capaces de eliminar radicales libres y neutralizar los efectos del radical (Paredes Salido y Roca Fernández, 2002a, p. 99). Otras sustancias sintéticas más potentes son el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo, butilhidroxiquinona (BHQ) (Coba, 2010, p. 23).

1.7.3 Mecanismo de acción

La protección celular ante el daño oxidativo puede ocurrir por diferentes mecanismos la interacción directa con ROS, agotamiento del oxígeno molecular para prevenir formar radicales libres, eliminación de iones metálicos y captar especies reactivas de oxígeno (Pisoschi y Pop, 2015, pp. 63-65).

1.7.4 Relación con las enfermedades

El peróxido de hidrógeno, radical superóxido y el oxígeno son especies reactivas de oxígeno que están asociados con diferentes estados fisiopatológicos, el UA y las ROS están relacionados por desarrollar hiperuricemia y estrés oxidativo, a este último se le atribuye enfermedades degenerativas como Parkinson, Alzheimer, lesión de reperfusión del corazón o cerebro,

aterosclerosis, asimismo en la patogénesis de diversas afecciones, como envejecimiento, artritis, cáncer e inflamación (Kostić et al., 2015, p. 1).

1.8 Autografía

Es un método basado en la detección de actividades antioxidantes, enzimáticas antibacterianas y antifúngicas; empleado para separación de compuestos usando técnicas cromatografías como la cromatografía de capa fina (TLC), la cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), cromatografía laminar de rendimiento óptimo (OPLC) y la electrocromatografía capilar (CEC) (Choma y Grzelak, 2011, p. 2684). El método presenta un alto grado de sensibilidad, con una gran ventaja por su bajo costo y ahorro de tiempo.

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, & Furlan, 2006, pp. 15-16)

1.8.1 Autografía de contacto

La placa de TLC sembrada es colocada sobre el agar, después se solidifica por unos minutos y mediante difusión los compuestos se van presentando, la placa se retira y es incubada. Las zonas de inhibición aparecen en los lugares, donde los compuestos con actividad estaban en contacto con la capa de agar (Choma y Grzelak, 2011, p. 2685).

1.8.2 Autografía por inmersión

Es una técnica que combina tanto la autografía de contacto ya que existe una transferencia de compuestos de la placa al agar y la directa porque la capa de agar permanece en la superficie de la placa TLC, primero se cubre con una capa de agar después se gelifica, continuamente se siembra la enzima teniendo en cuenta que el agar debe estar a una temperatura de 45 °C para evitar la inactivación y se procede a incubar (Choma y Grzelak, 2011, p. 2686).

1.8.3 Autografía directa

La placa de TLC previamente desarrollada es sumergida en una suspensión de interés, pasa a incubarse; se observarán zonas donde no hubo reacción mismas que corresponden a la actividad biológica buscada (Rivas-Morales, 2016, p. 88).

1.9 Determinación de inhibidores de Xantina Oxidasa

1.9.1 Sistema xantina/xantina oxidasa/NBT

Ramallo et al. (2006, p. 17) adaptó este método aplicando una solución que contiene la enzima xantina oxidasa y NBT; en donde la oxidación de la xantina produce radicales superóxido, que reducen el NBT amarillo pálido a formazán púrpura. Las sustancias capaces de inhibir la acción de la enzima evitarán la producción del O_2^- y por lo tanto la producción de formazán.

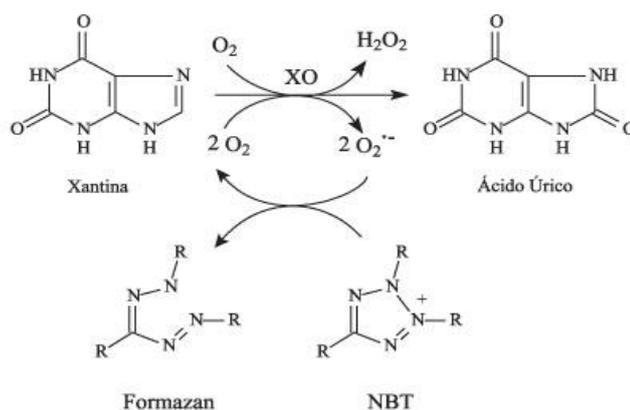


Figura 12-1: Mecanismos de acción del sistema XO/xantina/NBT

Fuente: (Alves, David, David, Bahia, & Aguiar, 2010)

1.10 Determinación de radicales libres

1.10.1 Método DPPH•

En 1958 este método fue desarrollado por Marsden Blois, se basa en el uso del radical libre de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto o extracto para captar el radical DPPH• (Alves et al., 2010, p. 2204), este radical en forma libre presenta una absorbancia de 515-520 nm, además una buena estabilidad (Oliveira, 2015, p. 36). El electrón impar del átomo de nitrógeno de DPPH• se reduce al recibir un átomo de hidrógeno de los antioxidantes formando DPPH-H reducido, resultando hidrazina y continuamente un cambio de color violeta a un amarillo pálido por los grupos pícricos residuales, además un decrecimiento de la absorbancia (Kedare y Singh, 2011, p. 412; Molyneux, 2004, p. 212).

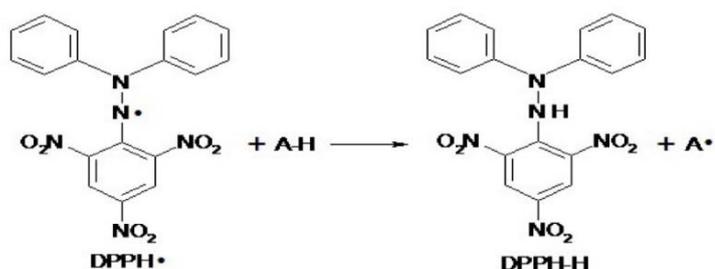


Figura 13-1: Mecanismos de acción de radicales DPPH• a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno

Fuente: (Oliveira, 2015)

1.10.2 Sistema Riboflavina/Luz/NBT

La actividad SOD de los polímeros fue analizada por medición de la inhibición de la fotorreducción de nitroazul de tetrazolio (NBT). Este ensayo indirecto comprendió varias reacciones: la riboflavina excitada fotoquímicamente se redujo primero por metionina en un semiquinona, que donó un electrón al oxígeno para formar la fuente de superóxido, mismo que convirtió fácilmente NBT en un producto formazán morado. De esta manera, la actividad SOD fue inversamente relacionado con la cantidad de formazán que se forma a 550nm (Piacham et al., 2003, p. 1254).

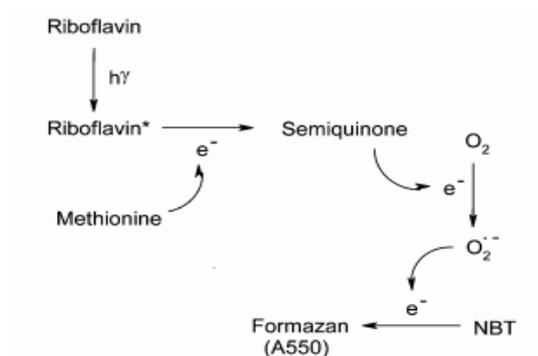


Figura 14-1: Ensayo de actividad SOD.

Inhibición mediante fotorreducción NBT.

Fuente: (Piacham et al., 2003)

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

El sistema NADH/PMS/NBT evalúa la capacidad para capta radicales superóxido; el mecanismo dispone dos etapas, la oxidación del NADH por acción del PMS y la reducción del NBT mediante la transferencia de electrones provenientes del anión superóxido para producir formazán púrpura

registrada a 570nm, la disminución de la absorbancia a 560 nm con el antioxidante indica el consumo de $O_2^{\cdot-}$ en la mezcla de reacción. (Zapata, 1996, p. 410).

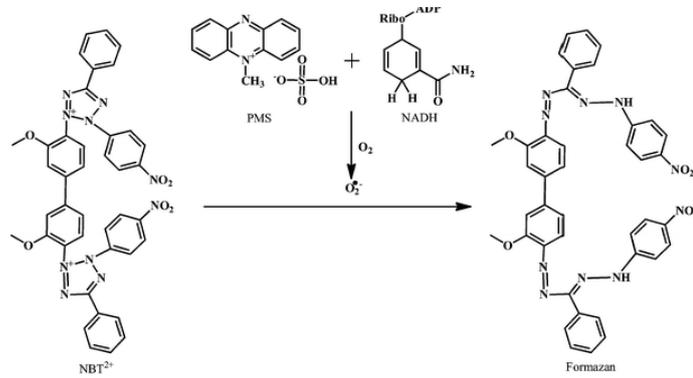


Figura 15-1: Reducción de NBT por radical superóxido producido en el Sistema NADH/PMS.

Fuente: (Nimse y Pal, 2015)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de la 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 de la materia vegetal

Para realizar la recolección primero se emitió un oficio al Ministerio del Ambiente, ubicado en la ciudad de Ambato; con ello se logró obtener el acta de Movilización de Especímenes de Vida Silvestre No. 28-2019-DPAT-V.S 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 Y SOSTENIBLE".

La recolección de *Psychotria pilosa* en estado de fructificación se realizó en el Cantón Baños en el mes de agosto del 2019, alrededor de las 3 de la tarde. El área de colección corresponde a las siguientes coordenadas: latitud -1.3969899 y longitud -78.4228897, en el hemisferio sur.

2.3 Identificación de la especie vegetal

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

2.4 Equipos, materiales y reactivos

2.4.1 Equipos

Tabla 1-2: Lista de materiales utilizados

| PROCEDIMIENTO | EQUIPO |
|---|-------------------------------------|
| Acondicionamiento de la materia vegetal | Estufa de convección natural |
| | Molino Arthur. H. Thomas |
| | Balanza de precisión |
| Control de calidad | Estufa Memmert SNB |
| | Reverbero |
| | Mufla |
| | Balanza analítica |
| Tamizaje fitoquímico | Sorbona |
| Obtención del extracto alcaloidal | Sonicador |
| | Rotavapor Heidolph |
| | pH-metro |
| Ensayos autográficos | Termoagitador magnético Thermo |
| | Centrifuga |
| | Agitador Vortex |
| | Lámpara fluorescente 20W |
| | Termómetro digital |
| | Pipeta automática Thermo Scientific |
| | Cámara UV |
| Gel Analyzer Software | |
| Almacenamiento de reactivos | Congelador |
| | Refrigerador |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

2.4.2 Materiales

Tabla 2-2: Lista de materiales utilizados

| PROCEDIMIENTO | MATERIAL |
|--------------------|-----------------------|
| Control de calidad | Crisoles de porcelana |
| | Pinza para crisoles |

| | |
|--|---------------------------------|
| | Papel filtro |
| | Pipeta graduada 10 mL |
| | Embudo |
| | Trípode |
| | Desecador |
| Tamizaje fitoquímico | Envases ámbar 500 mL |
| | Tubos de ensayo |
| | Gradilla de tubos |
| | Pipetas Pasteur |
| | Pipeta graduada 10 mL |
| Obtención del extracto alcaloidal | Envase de vidrio de 1000 mL |
| | Balón de destilación boca 29/32 |
| | Embudo de decantación |
| | Vaso de precipitación de 500 mL |
| Ensayos autográficos | Erlenmeyer 50mL |
| | Placas TLC Silicagel (2x6) |
| | Puntas para pipeta |
| | Capilares |
| | Papel aluminio |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

2.4.3 Reactivos

Tabla 3-2: Lista de reactivos utilizados

| PROCEDIMIENTO/ENSAYO | | REACTIVOS |
|-----------------------------|---|-------------------------------|
| Control de calidad | Cenizas solubles en agua | Agua destilada |
| | Cenizas insolubles en ácido clorhídrico | Ácido clorhídrico al 10%. |
| | | Agua destilada |
| | | Ácido nítrico |
| | | Nitrato de plata 0.1mol/L |
| Extractos | Etéreo | Éter dietílico |
| | Alcohólico | Etanol 96% |
| | Acuoso | Agua destilada |
| Tamizaje fitoquímico | Alcaloides | Reactivo de Dragendorff |
| | | Reactivo de Mayer |
| | | Reactivo de Wagner |
| | Antocianinas | Ácido clorhídrico concentrado |

| | | |
|--|--|--|
| | | Alcohol amílico |
| | Esteroides/Terpenoides | Reactivo de Liebermann-Burchard |
| | Taninos y fenoles | Reactivo FeCl ₃ |
| | Flavonoides | Reactivo de Shinoda |
| | Quinonas | Reactivo de Brontrager |
| | Aceites y grasas | Solución acuosa de Sudán III Solución acuosa de Sudán IV 5% |
| | Lactonas y coumarinas | Reactivo de Baljet |
| | Catequinas | Carbonato de sodio |
| | Azúcares reductores | Reactivo de Fehling |
| | Resinas | Agua destilada |
| | Aminoácidos o aminas | Reactivo de Ninhidrina |
| | Saponinas | - |
| | Mucílagos | - |
| | Principios amargos | - |
| Extracción de alcaloides | Metanol | Hidróxido de amonio |
| | Ácido sulfúrico al 2% | Acetato de etilo 25% |
| | Éter de petróleo | Goma arábica |
| | Sulfato de sodio anhidro | |
| Ensayos autográficos | Método de DPPH• | Solución de DPPH• |
| | | Agar (5mg/mL) |
| | | Ácido ascórbico (estándar) |
| | Método de riboflavina/luz/NBT | Agar (5mg/mL) |
| | | EDTA |
| | | Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄ |
| | | Fosfato monopotásico KH ₂ PO ₄ |
| | | Agua bidestilada |
| | | Solución de NBT |
| | Método NADH/ fenofosfato de fenazina/NBT | Rivoflavina (1.25mg/mL) |
| Taxifolina (estándar) | | |
| Agar (5mg/mL) | | |
| EDTA | | |
| Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄ | | |
| Fosfato monopotásico KH ₂ PO ₄ | | |
| Agua bidestilada | | |
| Solución de NBT | | |
| | | Solución NADH |

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| | Fenofosfato de fenazina (PMS) |
| | Taxifolina (estándar) |
| Inhibición de XO | Agar (5mg/mL) |
| | Fosfato dipotásico K_2HPO_4 (PBS) |
| | Fosfato monopotásico KH_2PO_4 (PBS) |
| | EDTA |
| | Agua bidestilada |
| | Solución de XO (34.2 U/L) |
| | Solución de NBT (1.86 mg/mL) |
| | Xantina (sustrato) |
| | Alopurinol (estándar) |
| Cromatografía | Cloroformo $CHCl_3$ |
| | Metanol CH_3OH |
| | Trietilamina Et_3N |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

2.5 Acondicionamiento y almacenamiento del material vegetal

Para esta investigación se utilizaron las hojas de *Psychotria pilosa*, se procedió a limpiar, además fueron secadas en la estufa a 50 °C por 12 horas y trituradas en un molino de cuchillas hasta obtener pequeñas partículas entre 2 a 3 milímetros, hasta su posterior análisis se guardó en fundas negras completamente limpias y almacenada en un ambiente oscuro a 25°C.

2.6 Técnicas y métodos

2.6.1 Control de calidad

2.6.1.1 Contenido de humedad

El procedimiento se llevó a cabo por triplicado, mediante el método gravimétrico por desecación en la estufa; en un capsula previamente tarada colocar 2 mg de material vegetal, desecar a 105°C por 3 horas, enfriar a temperatura ambiente, pesar y repetir hasta obtener peso constante (Miranda, 2002, pp. 12-13).

2.6.1.2 Cenizas totales

La determinación de cenizas totales se realizó a través del método gravimétrico (Miranda, 2002, pp. 8-9).

2.6.1.3 Cenizas solubles en agua

La determinación de cenizas solubles en agua se realizó a través del método gravimétrico (Miranda, 2002, p. 10).

2.6.1.4 Cenizas insolubles en ácido clorhídrico

La determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico se realizó a través del método gravimétrico, se procedió en base al escrito de las Normas Ramales de Miranda et al. (2002, p. 9).

2.6.2 Tamizaje fitoquímico

Para realizar el tamizaje fitoquímico se requirió pesar 20 mg de material vegetal seco de *Psychotria pilosa*, como lo describe en las Normas Ramales de Miranda et al. (2002, p. 15-22) para posterior extraer sucesivamente por maceración durante 48 horas con éter dietílico, etanol 96% y agua destilada. Para la detección cualitativa de los principales grupos fitoquímicos se realizaron los siguientes ensayos: Dragendorff, Mayer, Wagner, Liebermann-Burchard, FeCl₃, Shinoda, Brontrager, antocianinas, Sudan, Baljet, catequinas, Fehling, resinas, ninhidrina, espumas, mucilagos y principios amargos.

2.6.3 Obtención del extracto alcaloidal

Para la obtención de alcaloides se procedió a realizar la maceración, en el que se empleó 50 g de planta seca de *Psychotria pilosa* en 500 mL de metanol absoluto durante 72 horas; al mismo tiempo por el lapso de 1 hora el macerado se sometió a sonicación, una vez al día.

El extracto metanólico se filtra para posterior concentrar en el rotavapor a presión reducida y temperatura de 50°C y de esta manera se obtiene el extracto crudo seco. Para reconstituir se empleó 200 mL de H₂SO₄ (2% v/v), esto nos ayudó a solubilizar los alcaloides; se repitió la filtración, para desengrasar se utilizó éter de petróleo por seis veces consecutivas, es así que se obtiene una fase etérea orgánica (aceites, ceras, mucílagos) y una fase acuosa ácida (alcaloides) a la que se basificó con NH₄OH (25% v/v) hasta llegar a pH 9.

Se sometió a una extracción de alcaloides con acetato de etilo por 3 repeticiones, consecuentemente se añadió goma arábiga y sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua sobrante. Por último, se filtró el extracto y se evaporó a presión reducida en el evaporador rotativo a temperatura de 50°C; hasta obtener el extracto bruto de alcaloides totales, hasta su uso se conservó en un frasco ámbar y se procede a pesar. Para desarrollar los ensayos se reconstituyo con metanol absoluto.

2.6.4 Cromatografía de capa fina

Se empleó placas TLC 6x4cm, se sembró en un mismo punto 10 µL de la solución de alcaloides totales de *P. pilosa* (µL/mL). Para la fase móvil se empleó cloroformo/trietilamina/metanol (6:0.5:0.6, v/v/v), posterior la placa se introdujo al envase que contiene el solvente, retirar la placa, secar, revelar en la cámara UV a 254 nm y calcular el Rf mediante la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto } (d_R)}{\text{distancia recorrida por la fase móvil } (d_{FM})}$$

2.6.5 Ensayos autográficos

Para realizar los ensayos se tomó como referencia la metodología desarrollada por Ramallo et al., (2006, p. 17) donde explica los métodos de inhibición de XO y captación de radical superóxido, por otra parte la captación de radicales libre DPPH• se basó en lo descrito por Huang et al. (2014, pp. 1-2).

En las placas de TLC se sembró en orden creciente 10µL de las diluciones de *P. pilosa* (1, 5, 10, 50 y 100 µg), aplicando el método “dot blot”; se procedió a secar la para los diferentes ensayos. A través del programa GelAnalyzer se midió el diámetro de los halos de inhibición, dando un resultado tanto cualitativo por la intensidad del color como cuantitativo.

2.6.5.1 Método DPPH•

Posterior de sembrar, la placa fue sumergida por un lapso de 5 segundos en la solución etanólica de DPPH• (0.2 mM), se secó al ambiente; el resultado fueron manchas amarillas únicamente en los lugares de actividad con un fondo púrpura; como estándar se empleó el ácido ascórbico por su actividad antioxidante.

2.6.5.2 Método de Rivo flavina/Luz/ NBT

En la mezcla de EDTA (1 mM), PBS (50 mM) y agua destilada, se colocó el agar (1 mg/mL) el cual fue disuelto a 80 °C, la solución se enfrió hasta 60°C en ese momento se añadió la solución de NBT (0.22 mg/mL) y solución de riboflavina (0.0125 mg/mL) previamente filtrada, obteniendo la solución.

Sobre la placa TLC fue distribuido aproximadamente 5 mL de la solución de riboflavina, se dejó solidificar el agar en un lugar libre de luz, consecuentemente se empleó una lámpara fluorescente de 20 W para que la reacción comience. Cuando existe captación de radicales superóxido las zonas muestran color claro con un fondo morado, se corroboró con el estándar usado que fue la taxifolina.

2.6.5.3 Método NADH / metosulfato de fenazina / NBT

En la mezcla de EDTA (1 mM), PBS (50 mM) pH 7,9 y agua destilada, se colocó el agar (1 mg/mL) el cual fue disuelto a 80 °C, la solución se enfrió hasta 60°C para colocar la solución de NBT (0.22 mg/mL) y NADH (0.117 mg/mL), obteniendo la solución de NADH.

La solución de NADH preparada fue distribuida sobre las placas de TLC tanto *P. pilosa* como de la taxifolina usada como referencia, para luego solidificar en un ambiente obscuro, las placas fueron sumergidas en la solución de PMS (2.7 µM) a temperatura ambiente durante 20 minutos en oscuridad. Al existir una captación de radicales superóxido se presentan manchas color claro con un fondo púrpura.

2.6.5.4 Inhibición de XO

El agar (1 mg/mL) fue disuelto a 80 °C en una mezcla de EDTA (1 mM), PBS (50 mM) y agua, se enfrió hasta 55°C para incorporar solución de NBT (0.22 mg/mL), cuando la temperatura disminuye hasta los 50 °C se añade la solución de XO (68 mU/mL) posterior a lo cual se mezcló obteniendo la solución de trabajo.

Sobre las placas de TLC tanto de *P. pilosa* y de alopurinol se distribuyó aproximadamente 5mL y en un ambiente oscuro se dejó solidificar, fue sumergido en la solución de xantina (3 mM) e incubado a 38 °C en oscuridad por el lapso de 20 minutos usando el baño maría. Al existir inhibición de XO aparecen como zonas claras sobre un fondo púrpura oscuro.

Dado que el ensayo de XO produce radicales superóxido como indicador de la actividad enzimática, los captadores de radicales $O_2^{\cdot-}$ podrían resultar falsos positivos. Es así que para diferenciar entre un inhibidor puro de XO y un captador de $O_2^{\cdot-}$ se probaron dos sistemas de generación no enzimática de superóxido: riboflavina/luz/NBT y NADH/NBT/metosulfato de fenazina (PMS) (Ramallo et al., 2006, p. 17).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

3.1 Control de calidad de la materia vegetal

Tabla 1-3: Resultados de los parámetros del control de calidad de hojas de *P. pilosa*

| Parámetro | <i>P. pilosa</i> | Farmacopea Europea |
|-----------------------------|------------------|--------------------|
| Humedad | 10.034±0.0047 | 10-12 |
| Cenizas totales | 8.227±0.00031 | 12 |
| Cenizas solubles en agua | 4.7320± 0.00056 | 6 |
| Cenizas insolubles en ácido | 1.9534±0.0123 | 3 |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

La Tabla 1-3 muestra el control de calidad de la materia vegetal en la que se garantiza la idoneidad de la misma, en cuanto a la humedad de las hojas de *P. pilosa* fue de 10.034% valor que se encuentra dentro de los límites de aceptabilidad de acuerdo a la Farmacopea Europea 2012; este parámetro es importante para la conservación del material vegetal y para asegurar la calidad y seguridad de los ensayos posteriores, el contenido excesivo de humedad provocará la activación de enzimas causando degradación de los principios activos y favorecerá el crecimiento microbiano.

El contenido de cenizas totales es de 8.2267%, en cenizas solubles en agua 5.7320% y 1.9534% en la determinación de cenizas insolubles en ácido; según los rangos normales de la Farmacopea Europea 2012 estos valores están dentro de los parámetros permitidos, estos análisis indican si el material vegetal tiene compuestos orgánicos e inorgánicos (cloruros, carbonatos, fosfatos, calcio) procedentes de su tejido vegetal o de la materia extraña (tierra de cultivo), la cantidad de sales solubles en agua y la presencia de minerales (Kunle et al., 2012, p. 107).

3.2 Tamizaje fitoquímico

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

| Ensayo/ Prueba | Extracto | | | Metabolito a identificar |
|---------------------|----------|------------|--------|--------------------------|
| | Etéreo | Alcohólico | Acuoso | |
| Dragendorff | - | ++ | + | Alcaloides |
| Mayer | - | + | + | Alcaloides |
| Wagner | - | ++ | + | Alcaloides |
| Liebermann-Burchard | + | + | NA | Esteroides/ Terpenoides |
| Cloruro férrico | NA | + | + | Taninos y fenoles |
| Shinoda | NA | + | + | Flavonoides |
| Brontrager | NA | + | NA | Quinonas |
| Antocianinas | NA | - | NA | Antocianinas |
| Sudán III y IV | + | NA | NA | Aceites y grasas |
| Baljet | + | NA | NA | Lactonas y coumarinas |
| Catequinas | + | - | NA | Catequinas |
| Fehling | NA | + | + | Azúcares reductores |
| Resinas | NA | - | NA | Resinas |
| Ninhidrina | NA | - | NA | Aminoácidos o aminas |
| Espuma | NA | - | - | Saponinas |
| Mucílagos | NA | NA | - | Mucílagos |
| Principios amargos | NA | NA | + | Principios amargos |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

En la Tabla 2-3 se observa los resultados del tamizaje fitoquímico; en el extracto hidroalcohólico de *P. pilosa* los compuestos identificados que predominan son los alcaloides que mediante los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner confirman la presencia de estos metabolitos secundarios que han demostrado tener actividad antioxidante y captadores de radicales libres, asimismo la presencia de taninos, fenoles, flavonoides y azúcares. En el extracto etéreo y alcohólico el resultado fue positivo para esteroides y terpenoides.

3.3 Obtención de alcaloides

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

| Material vegetal | Peso del material vegetal seco | Solvente de extracción | Extracción total de alcaloides | Rendimiento |
|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| | g | mL | mg | % |
| <i>Psychotria Pilosa</i> | 50 | 500 | 34 | 0.07 |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

El rendimiento obtenido a partir de 50 g de *Psychotria pilosa* fue de 0.07%, mediante la extracción líquido-líquido con solventes orgánicos y cambio de pH, el rendimiento de la extracción depende de las condiciones experimentales como es la temperatura, presión, naturaleza del solvente así como la naturaleza de los compuestos a extraer (peso molecular, estructura química, volatilidad, polaridad) que afectan el proceso fotosintético de la misma (Azcón-Bieto y Talón, 2008, p. 167). El porcentaje de rendimiento permite conocer la cantidad de metabolitos secundarios obtenidos.

3.4 Cromatografía capa fina (TLC)

Tabla 4-3: Resultado de la determinación de Rf en TLC de los alcaloides totales de *P. pilosa* usando como fase móvil Cloroformo, Trietilamina, Metanol.

| Extracto | d _{FM} (cm) | d _R (cm) | Rf |
|--|----------------------|---------------------|-------|
| Alcaloides totales de <i>P. pilosa</i> | 4.2 | 2.2 | 0.523 |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

El Rf de 0.523 podría indicar la presencia de compuestos derivados de la triptamina, estudios han demostrado que el género *Psychotria* se caracteriza por la presencia de alcaloides cuyo aminoácido es el triptófano (Martins y Nunez, 2015a, p. 13428). La fase móvil usada fue Cloroformo, Trietilamina, Metanol (6:0.5:0.6), revelado sin tratamiento químico a 254 nm; para verificar la presencia de los metabolitos secundarios determinados en el tamizaje fitoquímico.

3.5 Ensayos autográficos

3.5.1 Captación de DPPH•

Tabla 5-3: Capacidad captadora de DPPH• de ácido ascórbico y alcaloides totales de *P. pilosa*

| Concentración (µg) | Áreas de captación de radical DPPH• | |
|--------------------|-------------------------------------|------------------|
| | Ácido ascórbico | <i>P. pilosa</i> |
| 1 | 2148 | 741 |
| 5 | 5486 | 2102 |
| 10 | 6596 | 3546 |
| 50 | 10250 | 5478 |
| 100 | 11032 | 7436 |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

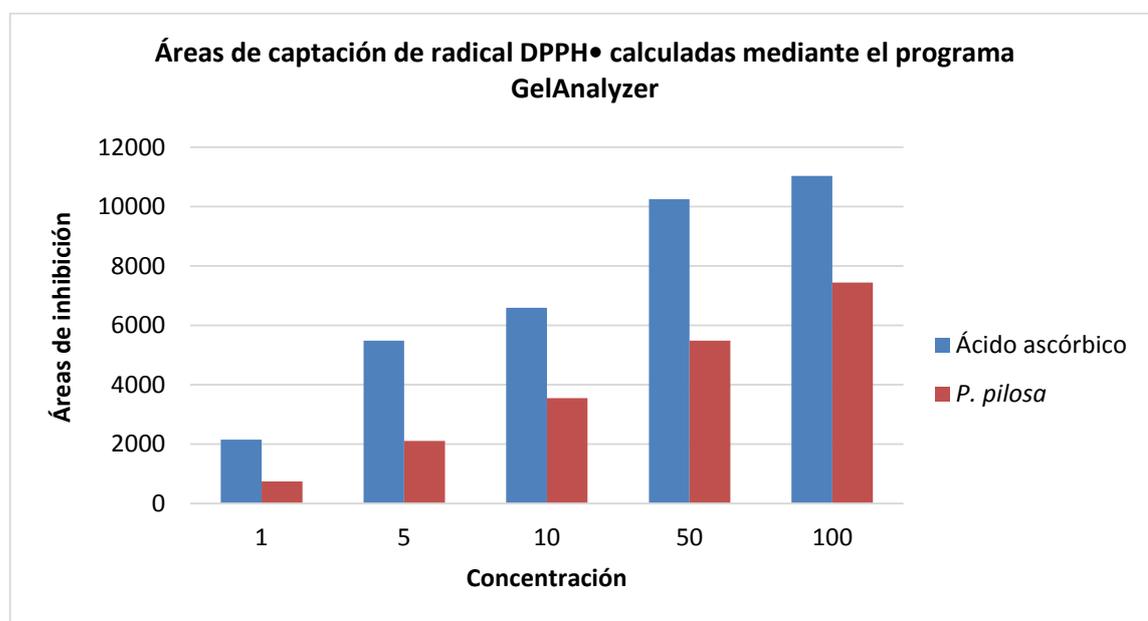


Gráfico 1-3: Áreas de inhibición de DPPH• de ácido ascórbico y alcaloides totales de *P. pilosa*

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

La actividad antioxidante fue medida mediante la captación de radical DPPH•, en el Gráfico 1-3 se observa que las áreas de inhibición de captación del radical DPPH• tanto de la muestra (*P. pilosa*) como del estándar (ácido ascórbico), además la concentración y las áreas de inhibición tienen una relación directa, entre mayor concentración, mayor captación de radical DPPH•.

El ácido ascórbico sobrepasa las áreas de inhibición de la muestra, sin embargo los alcaloides de *P. pilosa* indican una actividad bastante relevante y parecida al control positivo; esto quiere decir que posee actividad antioxidante para captar radical DPPH•.

3.5.2 Ensayo Riboflavina/Luz/NBT

Tabla 6-3: Captación de O_2^- mediante el ensayo Riboflavina/Luz/NBT de taxifolina y *P. pilosa*

| Concentración (μg) | Áreas de captación de O_2^- | |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------|
| | Taxifolina | <i>P. pilosa</i> |
| 1 | 79 | 57 |
| 5 | 235 | 217 |
| 10 | 792 | 410 |
| 50 | 866 | 602 |
| 100 | 892 | 759 |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

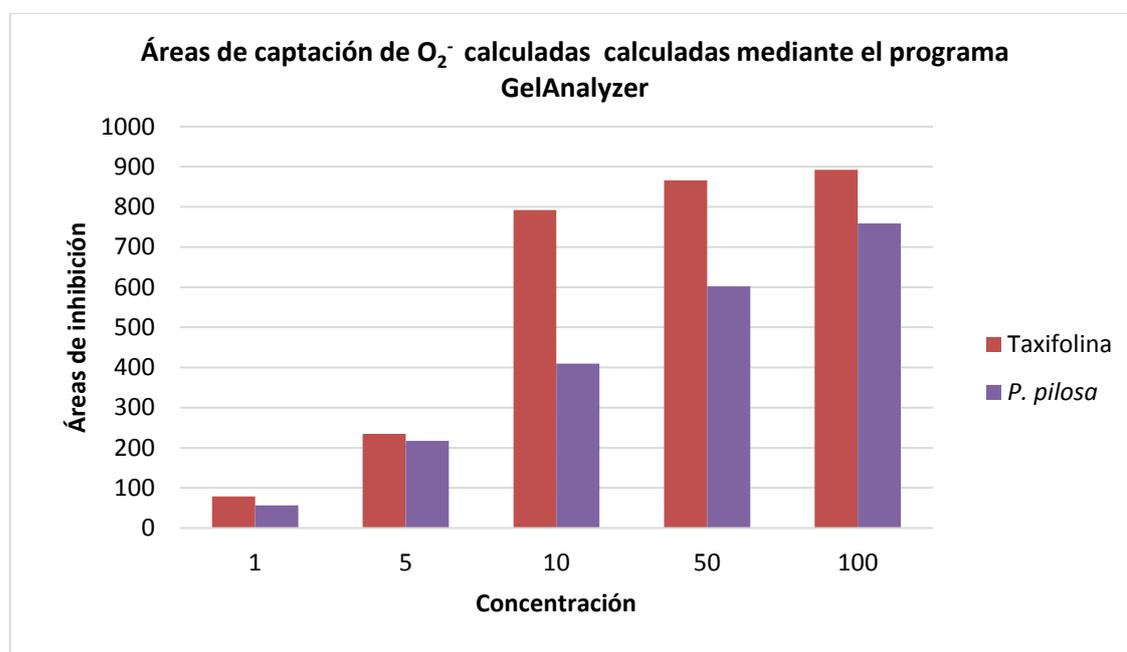


Gráfico 2-3: Áreas de captación de O_2^- mediante el ensayo Riboflavina/Luz/NBT de taxifolina y *P. pilosa*

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

Para la evaluación de captación de radical superóxido se empleó el ensayo B2/Luz/NBT, en el Gráfico 2-3 se observan las áreas de inhibición, la muestra de *P. pilosa* tiene similar capacidad de captar O_2^- que el control positivo (taxifolina), por lo que se puede plantear que las áreas presentan una considerable actividad.

De la misma forma existe una la relación entre la concentración y la captación de O_2^- , siendo directamente proporcionales.

3.5.3 Ensayo NADH/PMS/NBT

Tabla 7-3: Captación de O_2^- mediante el ensayo NADH/PMS/NBT de taxifolina y *P. pilosa*

| Concentración | Áreas de captación de O_2^- | |
|---------------|-------------------------------|------------------|
| | Taxifolina | <i>P. pilosa</i> |
| 1 | 263 | 141 |
| 5 | 389 | 227 |
| 10 | 479 | 299 |
| 50 | 541 | 378 |
| 100 | 628 | 471 |

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

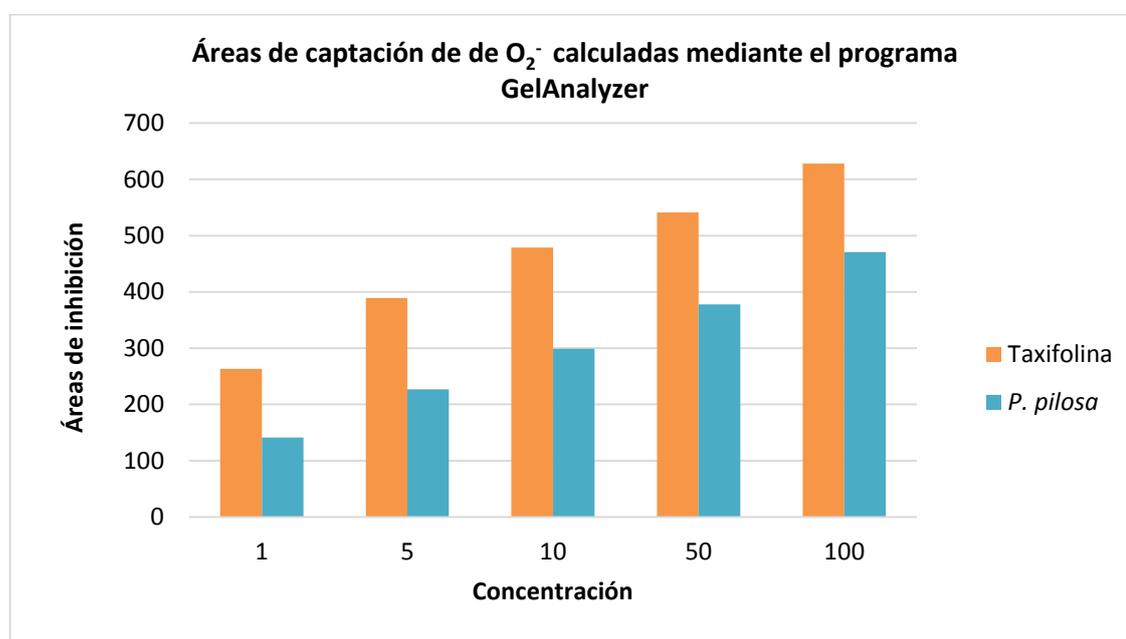


Gráfico 3-3: Áreas de captación de O_2^- mediante el ensayo NADH/PMS/NBT de taxifolina y *P. pilosa*

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

Mediante el ensayo NADH/PMS/NBT se evaluó la actividad de captar radicales superóxido, en el Gráfico 3-3 se puede observar que la muestra de *P. pilosa* tiene una apreciable capacidad de captar O_2^- , siendo comparado con el estándar (taxifolina) la actividad es semejante.

De la misma forma el gráfico indica que a mayor concentración mayor capacidad de captar radicales superóxido, es así que tienen una relación directamente proporcional.

3.5.4 Inhibición de Xantina Oxidasa

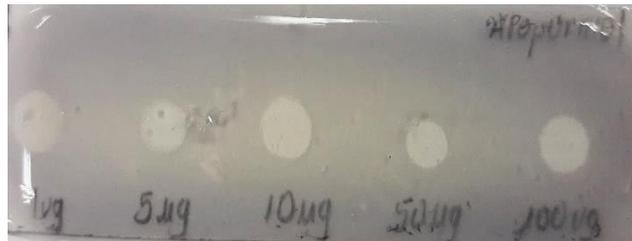


Figura 1-3: Inhibición de Xantina, control positivo (alopurinol)

Fuente: (Machado, 2019)

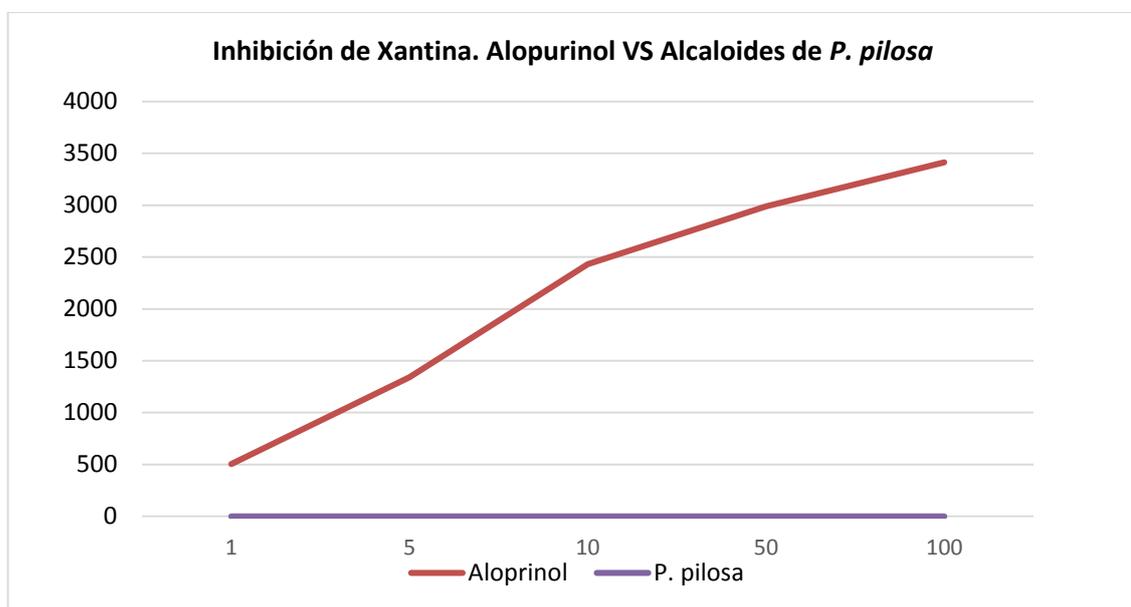


Gráfico 4-3: Inhibición de Xantina. Alopurinol VS Extracto alcaloidal de *P. pilosa*

Realizado por: Machado, Mishell, 2019

En la prueba autográfica de inhibición de xantina oxidasa de la Figura 1-3 indica al alopurinol como estándar; presentando una destacada actividad de inhibición de XO, lo contrario ocurre con la muestra de *P. pilosa* donde la actividad es nula. Por esta razón no inhibe la catálisis de hipoxantina a xantina y posterior a ácido úrico.

Es así que tanto los ensayos de B2/luz/NBT y NADH/PMS/NBT y captación de DPPH• indican únicamente su potencial antioxidante.

3.6 Discusión

En los resultados de autografía para los sistemas B2/luz/NBT, NADH/PMS/NBT y captación de radical DPPH•, se evidenció que *P. pilosa* actúa como captador de electrones; con una importante actividad antioxidante de los alcaloides. Además se presume que el compuesto principal responsable de la actividad son derivados de la triptamina. Anteriores estudios han demostrado que el género *Psychotria* se caracteriza por la presencia de alcaloides cuyo aminoácido es el triptófano (Martins y Nunez, 2015a, p. 13428).

Un derivado importante del aminoácido triptófano es la hormona melatonina (5-metoxi-N-acetil-triptamina), varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han evidenciado que concentraciones tanto fisiológicas como farmacológicas de melatonina protegen contra el daño oxidativo, con una actividad neutralizante de la melatonina, dirigido específicamente contra los radicales hidroxilo. La capacidad de eliminación de radicales hidroxilo se debe a la estructura química; específicamente del grupo metilo del anillo indol. Reiter JR (1995, p. 456) evidenció que la melatonina presentaba un efecto protector antioxidante frente al daño oxidativo superior al del manitol, glutatión y vitamina E.

Varios estudios han demostrado que el género *Psychotria* no solo posee actividades antioxidantes, de lo contrario un sinnúmero de actividades caracterizan a este género, es así que *P. colorata*, es utilizado por aborígenes amazónicos para tratar el dolor de oído y el dolor abdominal, a esto se le atribuye su actividad analgésica. Las actividades antimicrobianas del extracto metanólico de las hojas de *P. microlabastra* contra bacterias, protozoos y hongos, también se ha evidenciado. Por esta razón las actividades farmacológicas de especies de *Psychotria* son amplias, brindando alternativas no solo para tratar la hiperuricemia, sino otras patologías.

En una investigación fitoquímica realizado por Bafna Ar y Mishra Sh (2015, pp.131-137), demostró que el extracto metanólico de *C. orchoides* presentó una actividad antirradical similar al ácido ascórbico, dependiente de la concentración inhibiendo el radical DPPH•; se indicó la presencia de glucósidos fenólicos los que actúan como antioxidantes con un gran poder destructor de radicales libres, debido a sus grupos hidroxilo fenólicos.

CONCLUSIONES

Mediante el control de calidad de la especie *Psychotria pilosa*, se verificó la idoneidad de la especie; en los ensayos tanto de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico los valores cumplieron los límites establecidos, indicando que es apta para su uso y que no posee ningún tipo de contaminación que interfieran en los análisis.

El tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de *Psychotria pilosa* indicó la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, taninos, quinonas, terpenoides y esteroides, además mucílagos, principios amargos y azúcares.

El extracto alcaloidal se obtuvo de las hojas de *P. pilosa* a partir de una maceración con metanol el cual es un solvente polar en el que los alcaloides son hidrosolubles debido a su medio ácido, con el posterior el uso de solventes orgánicos (éter etílico y acetato de etilo) y cambios de pH, alcanzando un rendimiento de 0.07% de alcaloides totales.

La cromatografía en capa fina es una herramienta útil para evaluar los componentes fitoquímicos de manera rápida; el extracto de *P. pilosa* presentó un Rf de 0.523 el cual puede ser un indicativo de compuestos derivados de la triptamina, ya que diversos estudios han demostrado que el género *Psychotria* se caracteriza por la presencia de alcaloides cuyo aminoácido es el triptófano.

Los ensayos de RIBOFLAVINA/LUZ/NBT y NADH/PMS/NBT indicaron que la fracción alcaloidal posee capacidad de captar radical superóxido y radicales DPPH•, es decir inhibidor de radical superóxido, pero mediante la técnica autográfica XANTINA/XANTINA OXIDASA/NBT no exhibió ninguna actividad con ello se puede discriminar los captadores de radical superóxido de inhibidores puros de XO.

RECOMENDACIONES

Al realizar el ensayo enzimático es recomendable trabajar sobre un área totalmente limpia y fuera del alcance de la luz para evitar algún tipo de contaminación o reacción no deseada, a la vez se debe respetar los tiempos establecidos de medición porque se trata de métodos muy sensibles.

Se recomienda tomar en cuenta los factores ambientales de recolección de la planta, las condiciones experimentales como es la temperatura, presión, naturaleza del solvente así como la naturaleza de los compuestos a extraer (peso molecular, estructura química, volatilidad) para que no se vea afectado el rendimiento de la planta.

Es aconsejable realizar un estudio más exhaustivo sobre los constituyentes alcaloidales presentes en las hojas de *P. pilosa* para de este modo determinar qué compuestos son causantes de la actividad biológica.

GLOSARIO

Abreviaturas

| | |
|------------------------|--|
| Mg | Microgramo |
| μL | Microlito |
| $\text{O}_2^{\cdot-}$ | Radical superóxido |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grados Celsius |
| -SH | Tiol |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AHS | Síndrome de hipersensibilidad al alopurinol |
| AOX | Antioxidante |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| AUS | Ácido úrico sérico |
| CAT | Catalasa |
| CEC | Electrocromatografía capilar |
| Cm | Centímetro |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH \cdot | 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FAD | Favín adenín dinucleótido |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GSH | Glutación |
| GSH-Px | Glutación peroxidasa |
| H_2O_2 | Peróxido de hidrogeno |
| Hgb | Hemoglobina |
| HPTLC | Cromatografía de capa fina de alto rendimiento |
| HU | Hiperuricemia |
| HX | Hipoxantina |
| Mg | Miligramos |
| MIAs | Alcaloides indol monoterpénicos |
| mL | Mililitro |
| Mo | Molibdeno |

| | |
|-----------------|---|
| NADH | Nicotin adenin dinucleótido reducido |
| NBT | Nitroazul de tetrazolio |
| OH [·] | Radical hidroxilo |
| OPLC | Cromatografía laminar de rendimiento óptimo |
| PBS | Solución salina amortiguadora de fosfatos |
| PMS | Metosulfato de fenazina |
| PPAT | Amidofosforribosil transferasa |
| PRPP | Fosforribosilpirofosfato |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| TLC | Cromatografía en capa delgada |
| UA | Ácido úrico |
| XO | Xantina oxidasa |
| XOI | Inhibidores de xantina oxidasa |
| XOR | Xantina Oxidorreductasa |

Ácido ascórbico: conocida como vitamina C, es un nutriente hidrosoluble que se encuentra en ciertos alimentos. En el organismo, actúa como antioxidante ayudando a proteger las células contra los daños causados por los radicales libres (Repo & Encina Zelada, 2008, p. 110).

Alcaloide: metabolito secundario que en sus moléculas contienen átomos de nitrógeno secundarios, terciarios o cuaternarios (Hashimoto y Yamada, 1994, pp. 257-258). Se derivan de aminoácidos principalmente de lisina, ornitina, tirosina, triptófano y fenilalanina (Aniszewski, 2007, p. 5).

Antioxidante: compuestos químicos sintéticos o naturales que tienen la capacidad de evitar o reducir la intensidad de las reacciones de oxidación (Coba et al., 2010, p. 23).

Autografía: método basado en la detección y separación de compuestos usando técnicas cromatografías como la cromatografía de capa fina (TLC), la cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), cromatografía laminar de rendimiento óptimo (OPLC) y la electrocromatografía capilar (CEC) (Choma y Grzelak, 2011, p. 2684).

Cromatografía en capa fina: es un método analítico, utilizado para la separación de compuestos, donde la placa de sílice gel (fase estacionaria) es sumergida en una fase móvil (eluyente) la cual sube por capilaridad desplazando los compuestos. Un indicador fluorescente permitirá la visualización de aquellos compuestos activos a la luz ultravioleta (Sherma y Fried, 2003, p. 1).

DPPH•: La molécula DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se caracteriza por ser un radical libre estable en virtud de la reubicación de electrones no apareados en toda la molécula. Al agregar una sustancia que actúa con hidrógeno a una solución de DPPH•, se obtiene hidrazina cambiando simultáneamente el color de violeta a amarillo pálido (Alves et al., 2010, p. 2204).

Hiperuricemia: es un aumento en la concentración de ácido úrico en sangre, los niveles de ácido úrico normales son hasta 6.0 mg/dL en mujeres y hasta 7.0 mg/dL en hombres. Es el principal factor de riesgo para la gota (Sancho et al., 1980, p. 102).

NBT: es una sal de tetrazolio soluble en agua, color amarillo; en presencia de $O_2^{\cdot-}$ es reducido a formazán un compuesto insoluble en agua de color azul muy intenso, además es un oxidante potente en medio acuoso y en condiciones ácidas, si es expuesto a la luz o calor se reduce (Muñoz & Alfaro, 2000, p. 31).

Radical libre: son moléculas o fragmento de moléculas altamente reactivos, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo generadora de gran inestabilidad (Venereo, 2002, p. 128).

Radical scavenger: utilizados para inhibir la oxidación térmica; reaccionan con radicales libres reduciéndolos a estables (Maier y Calafut, 1998, p. 32).

Radical superóxido: $O_2^{\cdot-}$ es el radical más abundante y común a nivel celular, es formado principalmente en la cadena de transporte de electrones, es inestable y altamente reactivo. Es generado en reacciones de autooxidación y enzimáticas en diferentes orgánulos celulares (Corrales & Muñoz, 2012, p. 217).

Riboflavina: conocida como vitamina B₂, es un nutriente esencial que mantiene las funciones del metabolismo energético, actúa como cofactor en las reacciones enzimáticas, se encuentra en las formas de las coenzimas flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleotido (FAD) (Delgadillo y Ayala, 2009, p. 22).

Taxifolina: tipo de flavonoide que demostró un potente efecto neutralizador de los radicales libres, se encuentra en el aceite de oliva, uvas, cítricos y cebollas, es un componente bioactivo con importancia farmacológica incluyendo hepatoprotector, antitumorales, neuroprotectores y efectos antiinflamatorios (Razak et al., 2018, p. 2).

Xantina oxidasa: es una molibdoflavoenzima, que produce especies reactivas de oxígeno, además participa en el catabolismo de las purinas catalizando la oxidación de la hipoxantina a xantina, y de la xantina a ácido úrico (Kostić et al., 2015, p. 2).

BIBLIOGRAFIA

ALVES ET AL. "Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos". *Química Nova*, vol. 33, n.º 10, 2010, pp. 2202-10, DOI: 10.1590/S0100-40422010001000033. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s010040422010001000033&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

ANISZEWSKI. *Alkaloids - Secrets of Life*. Elsevier, 2007.

AVELLO Y SUWALSKY. "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección". *Atenea (Concepción)*, n.º 494, Universidad de Concepción, 2006, pp. 161-72, DOI: 10.4067/S0718-04622006000200010. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s071804622006000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

AZCON-BIETO Y TALON. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana, 2008.

BENEZER-BENEZER ET AL. "La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión de la Resistencia a Enfermedades en Plantas". *Revista mexicana de fitopatología*, vol. 26, n.º 1, Sociedad Mexicana de Fitopatología, 2008.

BETTERIDGE. "What is oxidative stress?" *Metabolism*, vol. 49, n.º 2, 2000, pp. 3-8, DOI: 10.1016/S0026-0495(00)80077-3. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049500800773>.

BHAGAVAN Y HA. "Nucleotide Metabolism". *Essentials of Medical Biochemistry*, Elsevier, 2015, pp. 465-87, DOI: 10.1016/B978-0-12-416687-5.00025-7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166875000257>.

BIRBEN ET AL. "Oxidative Stress and Antioxidant Defense". *World Allergy Organization Journal*, vol. 5, n.º 1, 2012, pp. 9-19, DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613. Disponible en: <http://www.waojournal.org/content/5/1/9>.

BOVE ET AL. "An evidence-based review on urate-lowering treatments: implications for optimal treatment of chronic hyperuricemia". *Vascular Health and Risk Management*, vol. Volume 13, 2017, pp. 23-28, DOI: 10.2147/VHRM.S115080. Disponible en: <https://www.dovepress.com/an-evidence-based-review-on-urate-lowering-treatments-implications-for-peer-reviewed-article-vhrm>.

BREMER Y ERIKSSON. "Time tree of rubiaceae: Phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes". *INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT SCIENCES*, vol. 170, n.º 6, 2009, pp. 766-93, DOI: 10.1086/599077. Disponible en: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/599077>.

CALIXTO ET AL. "The genus psychotria: Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology and biological properties". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 27, n.º 8, Brazilian Chemical Society, 2016, pp. 1355-78, DOI: 10.5935/0103-5053.20160149. Disponible en: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0103-5053.20160149>.

CAO ET AL. "Substrate Orientation and Catalytic Specificity in the Action of Xanthine Oxidase". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, n.º 36, 2010, pp. 28044-53, DOI: 10.1074/jbc.M110.128561. Disponible en: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.m110.128561>.

CHALÈS ET AL. "Gota". *EMC - Aparato Locomotor*, vol. 50, n.º 4, 2017, pp. 1-21, DOI: 10.1016/S1286-935X(17)87224-5. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286935X17872245>.

CHEN ET AL. "Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview". *Medical Science Monitor*, vol. 22, 2016, pp. 2501-12, DOI: 10.12659/MSM.899852. Disponible en: <http://www.medscimonit.com/abstract/index/idart/899852>.

CHOMA Y GRZELAK. "Bioautography detection in thin-layer chromatography". *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, n.º 19, 2011, pp. 2684-91, DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.069. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310017632>.

CHOMA Y JESIONEK. "Effects-Directed Biological Detection: Bioautography". *INSTRUMENTAL THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY*, Elsevier, 2014, pp. 279-312, DOI: 10.1016/B978-0-12-417223-4.00011-X. Disponible en:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/b978012417223400011x>.

COBA ET AL. "Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*". *La Granja*, vol. 11, n.º 1, 2010, pp. 22-30, DOI: 10.17163/lgr.n11.2010.03. Disponible en: <http://revistas.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/11.2010.03>.

CORRALES Y MUÑOZ. "Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno". *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, vol. 10, n.º 1794-2470, 2012, pp. 135-250.

A. DAVIS ET AL. "The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae)". *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 135, n.º 1, 2001, pp. 35-42, DOI: 10.1006/bojl.2000.0390. Disponible en: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2001.tb02366.x>.

A. P. DAVIS ET AL. "A Global Assessment of Distribution, Diversity, Endemism, and Taxonomic Effort in the Rubiaceae". *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 96, n.º 1, 2009, pp. 68-78, DOI: 10.3417/2006205. Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.3417/2006205>.

DE CARVALHO ET AL. "Psychotria Genus: Chemical Constituents, Biological Activities, and Synthetic Studies". *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 48, 2016, pp. 231-61, DOI: 10.1016/B978-0-444-63602-7.00007-2. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/b9780444636027000072>.

DELGADILLO Y AYALA. "Efectos de la deficiencia de riboflavina sobre el desarrollo del tejido dentoalveolar, en ratas". *Anales de la Facultad de Medicina*, vol. 70, n.º 1, Facultad de Medicina San Fernando de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2009.

DELPRETE Y JARDIM. "Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges". *Rodriguésia*, vol. 63, n.º 1, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012, pp. 101-28, DOI: 10.1590/S2175-78602012000100009. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s217578602012000100009&lng=en&tlng=en.

ELISABETSKY ET AL. "Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.)

Muell. Arg. alkaloids". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 48, n.º 2, 1995, pp. 77-83, DOI: 10.1016/0378-8741(95)01287-N. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037887419501287n>.

ERNST Y FRAVEL. "Febuxostat: A selective xanthine-oxidase/xanthine-dehydrogenase inhibitor for the management of hyperuricemia in adults with gout". *Clinical Therapeutics*, vol. 31, n.º 11, 2009, pp. 2503-18, DOI: 10.1016/j.clinthera.2009.11.033. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291809004330>.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA." DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION. "TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas" *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, vol. 15, n.º 2, División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2012.

FERRANDO ET AL. "Alopurinol y su papel en el tratamiento de la sarcopenia". *Revista Española de Geriátría y Gerontología*, vol. 49, n.º 6, Elsevier, 2014, pp. 292-98, DOI: 10.1016/j.regg.2014.05.001. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0211139X14000900>.

GALLEGOS. "Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador". *Anales de la Facultad de Medicina*, vol. 77, n.º 4, 2016, p. 327, DOI: 10.15381/anales.v77i4.12647. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v77n4/a02v77n4.pdf>.

GARCÍA ET AL. "Plantas con propiedades antioxidantes". *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 20, n.º 3, Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, Ministerio de Salud Pública, 1982.

GÓMEZ-PUERTA. "Gota: nuevos conceptos patogénicos y nuevos agentes terapéuticos". *Revista Colombiana de Reumatología*, vol. 18, n.º 3, 2011, pp. 163-74, DOI: 10.1016/S0121-8123(11)70051-2. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0121812311700512>.

GONDIM ET AL. *Dieta e Medicamentos no Tratamento da Hiperuricemia em Pacientes Hipertensos*. 2001, pp. 463-67.

GUERRERO ET AL. "Bioensayos específicos con plantas seleccionadas de Bangladesh". *Revista*

Cubana de Plantas Medicinales, vol. 9, n.º 2, Editorial Ciencias Médicas, 1996.

GUTIÉRREZ-SALINAS ET AL. "Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno". *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, vol. 19, 2014, pp. 446-54.

HASHIMOTO Y YAMADA. "Alkaloid Biogenesis: Molecular Aspects". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 45, n.º 1, 1994, pp. 257-85, DOI: 10.1146/annurev.pp.45.060194.001353. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pp.45.060194.001353>.

HOSOYA ET AL. "The effect of febuxostat to prevent a further reduction in renal function of patients with hyperuricemia who have never had gout and are complicated by chronic kidney disease stage 3: study protocol for a multicenter randomized controlled study". *Trials*, vol. 15, n.º 1, BioMed Central, 2014, p. 26, DOI: 10.1186/1745-6215-15-26. Disponible en: <https://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6215-15-26>.

HUANG ET AL. "Antioxidant activities of two metallothionein-like proteins from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam. 'Tainong 57') storage roots and their synthesized peptides". *Botanical Studies*, vol. 55, n.º 1, 2014, p. 64, DOI: 10.1186/s40529-014-0064-4. Disponible en: <https://as-botanicalstudies.springeropen.com/articles/10.1186/s40529-014-0064-4>.

JANTAN ET AL. "The Evolving Role of Natural Products from the Tropical Rainforests as a Replenishable Source of New Drug Leads". *Drug Discovery and Development - From Molecules to Medicine*, InTech, 2015, DOI: 10.5772/59603. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/drug-discovery-and-development-from-molecules-to-medicine/the-evolving-role-of-natural-products-from-the-tropical-rainforests-as-a-replenishable-source-of-new>.

KEDARE Y SINGH. "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay". *Journal of Food Science and Technology*, vol. 48, n.º 4, 2011, pp. 412-22, DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0251-1>.

KIMURA ET AL. "Febuxostat Therapy for Patients With Stage 3 CKD and Asymptomatic Hyperuricemia: A Randomized Trial". *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 72, n.º 6, 2018, pp. 798-810, DOI: 10.1053/j.ajkd.2018.06.028. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638618308345>.

KOSTIĆ ET AL. "Xanthine oxidase: Isolation, assays of activity, and inhibition". *Journal of Chemistry*, vol. 2015, 2015, pp. 1-8, DOI: 10.1155/2015/294858. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/294858/>.

KUNLE FOLASHADE ET AL. "Standardization of herbal medicines". *International Journal of Biodiversity and Conservation*, vol. 4, n.º 3, 2012, pp. 101-12, DOI: 10.5897/IJBC11.163. Disponible en: [http://www.academicjournals.org/ijbc/abstracts/abstracts/abstracts2012/march/kunle et al.htm](http://www.academicjournals.org/ijbc/abstracts/abstracts/abstracts2012/march/kunle%20et%20al.htm).

KUO ET AL. "Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence and risk factors". *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 11, n.º 11, 7 de noviembre de 2015, pp. 649-62, DOI: 10.1038/nrrheum.2015.91. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nrrheum.2015.91>.

LEÓN-YÁNEZ ET AL. *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador 2000 [Red book of Ecuador's endemic plants 2000]*. Editado por Alfonso Sánchez y Omar Vacas-Cruz, Segunda Ed, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2011.

MAIER Y CALAFUT. "Additives". *Polypropylene*, Elsevier, 1998, pp. 27-47, DOI: 10.1016/B978-188420758-7.50008-4. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781884207587500084>.

MAIUOLO ET AL. "Regulation of uric acid metabolism and excretion". *International Journal of Cardiology*, vol. 213, 2016, pp. 8-14, DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.08.109. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527315303429>.

MAMAT ET AL. "Xanthine Oxidase Inhibitory and DPPH Radical Scavenging Activities of Some Primulaceae Species". *Sains Malaysiana*, 2014, pp. 1827–1833.

MARSTON. "Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry". *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, n.º 19, mayo de 2011, pp. 2676-83, DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.068. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310017620>.

MARTINEZ Y ORTIZ. *Plantas medicinales con alcaloides en la provincia de Jaén*. 2009, pp. 125-63.

MARTINS Y NUNEZ. "Secondary metabolites from Rubiaceae species". *Molecules*, vol. 20, n.º 7,

22 de julio de 2015, pp. 13422-95, DOI: 10.3390/molecules200713422. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/13422>.

MATSUURA ET AL. "Bioactive alkaloids from South American psychotria and related rubiaceae". *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 119-47, DOI: 10.1007/978-3-642-22144-6_101. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-22144-6_101.

MENDOZA ET AL. *Rubiaceae de Colombia: Guía ilustrada de generos*. Editado por Claudia María Villa G., Bogotá, 2004, pp. 1-351.

MIRANDA. "Métodos de Análisis de Drogas y Extractos". *Farmacognosia y Productos Naturales*, vol. 2, n.º 1, 2002, pp. 8-30.

MOLYNEUX. "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity". *Songklanakarin J. Sci. Technol*, vol. 26, 2004, pp. 211-19.

MOULY. "Systématique de la tribu des Ixoreae A. Gray (Rubiaceae): Phylogénie, biogéographie et taxinomie". *Acta Botanica Gallica*, vol. 155, n.º 3, 2008, pp. 457-64, DOI: 10.1080/12538078.2008.10516125. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/12538078.2008.10516125>.

MUÑOZ Y ALFARO. "Estandarización de la técnica de reducción del NBT mediante lectura en placas de micro ELIS". *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, vol. 35, n.º 1-2, Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, 2000.

MURRELL Y RAPEPORT. "Clinical Pharmacokinetics of Allopurinol". *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 11, n.º 5, 1986, pp. 343-53, DOI: 10.2165/00003088-198611050-00001. Disponible en: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-198611050-00001>.

NARANJO ET AL. "Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades Antioxidant activity of different grades of Colombian coffee". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 16, n.º 2, Editorial Ciencias Médicas, 2011, pp. 164-73.

NEPOKROEFF ET AL. "Reorganization of the Genus Psychotria and Tribe Psychotrieae (Rubiaceae) Inferred from ITS and rbcL Sequence Data". *Systematic Botany*, vol. 24, n.º 1, 1999, pp. 5-27, DOI: 10.2307/2419383. Disponible en:

<https://www.jstor.org/stable/2419383?origin=crossref>.

NIMSE Y PAL. "Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms". *RSC Advances*, vol. 5, n.º 35, 2015, pp. 27986-8006, DOI: 10.1039/C4RA13315C. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?doi=c4ra13315c>.

OLIVEIRA. "Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão". *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 17, n.º 1, 2015, pp. 36-44, DOI: 10.1590/1983-084X/12_165. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s151605722015000100036&lng=pt&tlng=pt.

PAREDES SALIDO Y ROCA FERNÁNDEZ, "Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular". "Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular". *Offarm*, vol. 21, n.º 7, Doyma, 2002.

PFAFFENBACH Y GAICH. "The Rhazinilam-Leuconoxine-Mersicarpine Triad of Monoterpenoid Indole Alkaloids". *The alkaloids*, 2017, pp. 1-84, DOI: 10.1016/bs.alkal.2016.07.001. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1099483116300189>.

PIACHAM ET AL. "A polymer supported manganese catalyst useful as a superoxide dismutase mimic". *Chem. Commun.*, n.º 11, 2003, pp. 1254-55, DOI: 10.1039/B301683H. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?doi=b301683h>.

PISOSCHI Y POP. "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review". *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 97, 2015, pp. 55-74, DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523415300039>.

PORTO, FETT-NETO, ET AL. "Bioactive alkaloids from South American psychotria and related rubiaceae". *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, 2013, pp. 119-47, DOI: 10.1007/978-3-642-22144-6_101. Disponible en: https://catbull.com/alamut/bibliothek/psychotria_alkaloids.pdf.

PORTO, MATSUURA, ET AL. "Bioactive Alkaloids from South American Psychotria and Related Species". *The Open Bioactive Compounds*, 2009, pp. 119-47, DOI: 10.1007/978-3-642-

22144-6_101. Disponible en: https://catbull.com/alamut/bibliothek/psychotria_alkaloids.pdf.

RAHMAN. "Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. " *Clinical interventions in aging*, vol. 2, n.º 2, Dove Press, 2007, pp. 219-36.

RAMALLO ET AL. "A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers". *Phytochemical Analysis*, vol. 17, n.º 1, 2006, pp. 15-19, DOI: 10.1002/pca.874. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.874>.

RAMAWAT Y MÉRILLON. "Natural products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes". *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, editado por Kishan Gopal Ramawat y Jean-Michel Mérillon, Springer Berlin Heidelberg, 2013, DOI: 10.1007/978-3-642-22144-6. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-22144-6>.

RAZAK ET AL. "Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest and causes tumor regression by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway". *BMC Cancer*, vol. 18, n.º 1, 2018, p. 1043, DOI: 10.1186/s12885-018-4959-4. Disponible en: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4959-4>.

REPO Y ENCINA ZELADA. "Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas". *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 74, n.º 2, Sociedad Química del Perú, 2008.

RIVAS-MORALES ET AL. *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, 2016, DOI: 10.3926/oms.313. Disponible en: <https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/book/97>.

SANCHO ET AL. "Medicina integral: medicina preventiva y asistencial en el medio rural" *Medicina Integral*, vol. 35, n.º 3, IDEPSA, 1980.

SHERMA Y FRIED. *Handbook of thin-layer chromatography*. Marcel Dekker, 2003.

SIES. "Oxidative stress: oxidants and antioxidants". *Experimental Physiology*, vol. 82, n.º 2, 1997, pp. 291-95, DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>.

SINGH Y SINGH. "Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids". *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 18, n.º 1, 2017, DOI: 10.2174/1389557517666170807123201. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/154723/article>.

STORZ Y IMLAYT. "Oxidative stress". *Current Opinion in Microbiology*, vol. 2, n.º 2, 1999, pp. 188-94, DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80033-2. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527499800332>.

TAKANO ET AL. "Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase". *Life Sciences*, vol. 76, n.º 16, 2005, pp. 1835-47, DOI: 10.1016/j.lfs.2004.10.031. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320504010598>.

TANG ET AL. "Hyperglycemia-Associated Oxidative Stress Induces Autophagy: Involvement of the ROS-ERK/JNK-p53 Pathway". *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, Elsevier, 2014, pp. 105-15, DOI: 10.1016/B978-0-12-405530-8.00008-X. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012405530800008x>.

TROPICOS. *Tropicos | Nombre - Psychotria pilosa Ruiz & Pav. Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador*. 2009.

VAQUERO-RAYA Y MOLERO-RICHARD. "Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica?" *Gastroenterología y Hepatología*, vol. 28, n.º 8, 2005, pp. 473-84, DOI: 10.1157/13078997. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210570505715089>.

VARGAS. "Ácido úrico y Síndrome metabólico: "causa o efecto"". *Mexican Group for Basic and Clinical Research in Internal Medicine*, vol. 19, 2017, pp. 155-69.

VENEREO. "Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes". *Revista Cubana de Medicina Militar*, vol. 31, n.º 2, Centro Nacional de Información de Medicina Militar, 2002.

WILSON Y SASEEN. "Gouty Arthritis: A Review of Acute Management and Prevention". *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, vol. 36, n.º 8, 2016, pp. 906-22, DOI: 10.1002/phar.1788. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/phar.1788>.

ZAPATA ET AL. "Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba) ". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 17, n.º 4, Editorial Ciencias Médicas, 1996.

ANEXOS

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



Arbusto de *Psychotria pilosa*

ANEXO B: Acondicionamiento del material vegetal



Hojas de *Psychotria pilosa* en el desecador

ANEXO C: Control de calidad de *Psychotria pilosa*



Determinación de humedad



Obtención de cenizas totales



Calcinación de papel filtro con residuo para la obtención de cenizas solubles en agua



Lavado del residuo con agua caliente para la obtención de cenizas insolubles en ácido

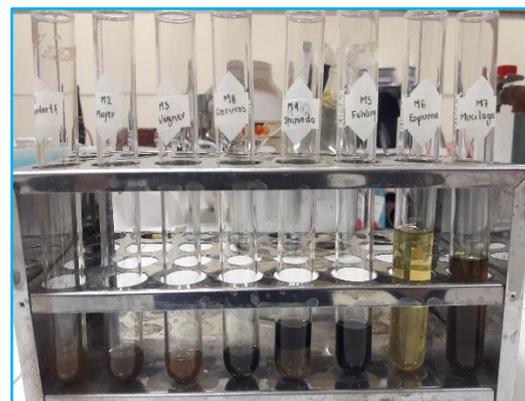
ANEXO D: Tamizaje fitoquímico de *Psychotria pilosa*



Ensayos de identificación en extracto etéreo



Ensayos de identificación en extracto alcohólico

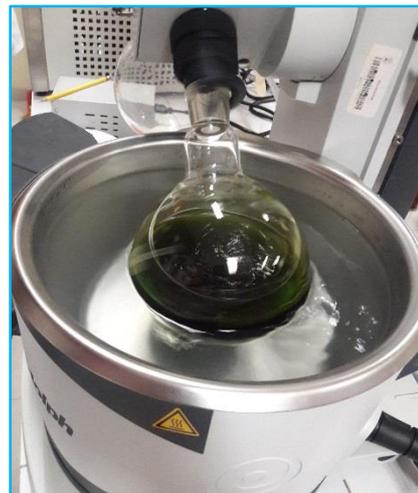


Ensayos de identificación en extracto acuoso

ANEXO E: Extracción de alcaloides de *Psychotria pilosa*



Filtrado de extracto líquido bruto



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



Basificar con NH_4OH (25% v/v) hasta pH 9

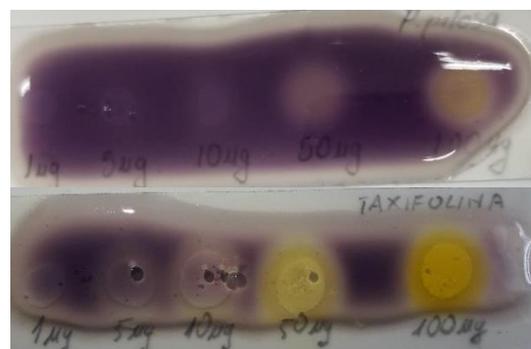


Extracto total seco de alcaloides de *Psychotria pilosa*

ANEXO F: Ensayos autográficos



Ensayo de DPPH•



Ensayo Rivoflavina /Luz/NBT



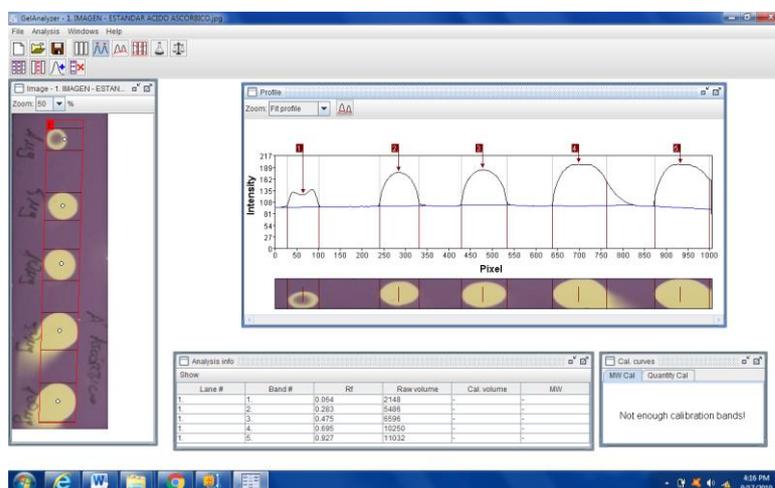
Ensayo NADH/PMS/NBT



Ensayo XO/Xantina/NBT



Cromatografía en capa fina TLC



Medición de las áreas de captación de DPPH• del ácido ascórbico

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

MINISTERIO DEL AMBIENTE



**DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE TUNGURAHUA
UNIDAD DE PATRIMONIO NATURAL-VIDA SILVESTRE**

ACTA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE VIDA SILVESTRE No. 28-2019-DPAT-V.S

En la ciudad de Ambato, a los 27 días del mes de septiembre de 2019, el Señor Lcdo. Edwin Lozada RESPONSABLE DE VIDA SILVESTRE - UNIDAD DE PATRIMONIO NATURAL DE TUNGURAHUA, autoriza al señor BQF. **Diego Renato Vinuesa Tapia M.Sc** y en su representación a la señorita **Mishell Karolina Machado Valle** con C.I. **0604372490** para que realice la movilización de especímenes de vida silvestre, de acuerdo al siguiente detalle:

| LOCALIDAD | SITIO DE MUESTREO | ORDENES / FAMILIAS | ESTADO / PRESERVACIÓN | CANTIDAD | OBSERVACIONES |
|------------|-------------------|---|-----------------------|---|---|
| TUNGURAHUA | Baños | Rubiaceae (<i>Psychotria pilosa</i>) | En fresco | 1 Muestra de hojas de la especie vegetal <i>Psychotria pilosa</i> | Movilización de una muestra de hojas de la especie vegetal (<i>Psychotria pilosa</i>), perteneciente a la familia Rubiaceae, dentro del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos del Proyecto de Investigación Científica N° MARE-DIS-CM-2018-0038 "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL UNO SOSTENIBLE" |
| TOTAL | | | | 1 muestra de hojas | |

Los especímenes se movilizan en calidad de:

Custodia temporal () Trabajo investigativo (X)

Comercio ()

Taxidermia ()

Se moviliza desde: Provincia de Tungurahua, cantón Baños de Agua Santa

Hasta: Provincia de Chimborazo, cantón Riobamba, Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) - Panamericana Sur km 1 ½.

Fecha de movilización: sábado, 28 de septiembre de 2019.

Vehículo: Transporte público (bus de la Cooperativa de Transporte Baños).

Investigadora Autorizada para la movilización: Mishell Karolina Machado Valle con C.I.: 0604372490

Elaborado por:


Lcdo. Edwin Lozada
RESPONSABLE
VIDA SILVESTRE TUNGURAHUA

