



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS  
EXTRACTOS DE QUISHUAR (*Buddleja incana*), ALISO (*Alnus acuminata*) Y  
ROMERILLO (*Hypericum laricifolium*) LOCALIZADOS EN 3 ZONAS  
GEOGRÁFICAS DIFERENTES”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR**

**BYRON GEOVANNY LLANGA GUAMÁN**

**TUTOR**

**Dra. SUSANA ABDO**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2014**

## **DEDICATORIA**

*Dedico esta tesis a mis padres Marco Llanga y Anita Guamán por todo el amor, entrega, sacrificio, apoyo, por su ejemplo brindado durante toda mi vida.*

*A mis hermanas Gabriela y Lesly, por ser mi alegría y compañía, ustedes, mi familia son lo más importante de mi vida y el regalo más hermoso que Dios me pudo brindar.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios por todas las bendiciones que me ha brindado, por escucharme en los momentos más difíciles de superar, por la vida que día a día me da.*

*A la Dra. Susana Abdo, directora de tesis, su ayuda fue primordial para la realización de esta tesis.*

*Al Dr. Carlos Donoso, colaborador de tesis, sus aportes fueron esenciales para llevar a cabo este trabajo, al Bqf. Diego Vinueza por su apoyo en la etapa final del trabajo.*

*A mis padres por siempre estar dispuestos a darme su apoyo, esto logro se los debo a ustedes, a mis tíos, primos, abuelitos, por el tiempo maravilloso compartido.*

*A mis amigos por permitirme compartir con ellos momentos de alegría, por estar presentes en los momentos buenos y malos, por darme una voz de aliento cuando más lo necesite.*

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

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE QUISHUAR (*Buddleja incana*), ALISO (*Alnus acuminata*) Y ROMERILLO (*Hypericum laricifolium*) LOCALIZADOS EN 3 ZONAS GEOGRÁFICAS DIFERENTES**”, de responsabilidad del señor egresado Byron Geovanny Llanga Guamán, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Álvarez  
**DECANO FAC. CIENCIAS**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Francisco Portero  
**DIRECTOR ESCUELA**  
**BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra. Susana Abdo  
**DIRECTOR DE TESIS**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Carlos Donoso  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Bqf. Diego Vinueza  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ing. Eduardo Tenelanda  
**COORDINADOR**  
**SISBIB - ESPOCH**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**NOTA DE TESIS**

\_\_\_\_\_

Yo, **Byron Geovanny Llanga Guamán**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

BYRON GEOVANNY LLANGA GUAMÁN

## RESUMEN

Se determinó la actividad antioxidante de plantas características del páramo ubicadas en alturas próximas a los 3000 m.s.n.m. y sobre los 4000 m.s.n.m, como son Quishuar (*Buddleja incana*), Aliso (*Alnus acuminata*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) localizados en diferentes zonas geográficas de la sierra del Ecuador, la investigación se efectuó en laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. El estudio se basa en determinar mediante ensayos químicos y enzimáticos la actividad inhibitoria de radicales libres causantes de alteraciones funcionales y estructurales, con extractos de plantas con capacidad antioxidante, considerando que las especies vegetales investigadas están expuestas a niveles altos de radiación ultravioleta por la ubicación del Ecuador.

Se usó el método de Folin-Ciocalteu para cuantificar compuestos fenólicos, el método del  $AlCl_3$  para cuantificar flavonoides y el método de inhibición enzimática de la polifenoloxidasasa para determinar la actividad antioxidante. Basados en los resultados la mayor concentración de compuestos fenólicos se encuentra en el Romerillo que se recolectó en el parque Polylepis-El Arenal del nevado Chimborazo a la altitud de 4342 m.s.n.m. La mayor concentración de flavonoides se encuentra en el Romerillo que se recolectó en las cercanías de las Lagunas de Atillo de la provincia de Chimborazo a la altitud de 3450 m.s.n.m. La especie vegetal con mejor actividad antioxidante corresponde a Quishuar que se recolectó en Riobamba a la altitud de 2750 m.s.n.m. en contraste con el Quishuar recolectado a 3930 m.s.n.m. con menor actividad antioxidante, evidenciándose diferencias significativas entre el Quishuar de diferentes altitudes. El Aliso y Romerillo de distintas altitudes no presentan diferencias significativas en la actividad antioxidante.

Se concluye que las especies vegetales investigadas presentan buena actividad antioxidante siendo sus valores cercanos al 50% de inhibición de radicales libres. Se recomienda realizar estudios en *Alnus acuminata*, *Hypericum laricifolium* y *Buddleja incanna* aplicando otros métodos para cuantificar la actividad antioxidante.

## SUMMARY

The antioxidant activity of plants characteristics of moorland located in heights nearby 3000 m.a.s.l. and 4000 m.a.s.l., such as Quishuar (*Buddleja incana*), Aliso (*Alnus acuminata*) and Romerillo (*Hypericum laricifolium*) located in different geographical areas of the highlands of Ecuador, research was carried out in laboratories of the Faculty of Sciences at Superior Polytechnic School of Chimborazo. The study is based on determining by chemical and enzymatic assays inhibitory activity of free radicals causing functional and structural alterations, with plant extracts with antioxidant capacity, considering that plant species investigated are exposed to high levels of ultraviolet radiation by the location of Ecuador.

The Folin-Ciocalteu method was used to quantify phenolics, the AlCl<sub>3</sub> method for quantifying flavonoids and the method of inhibition enzyme of polyphenoloxidase to determine the activity antioxidant. Based on the results, the highest concentration of phenolic compounds was found in the Romerillo that was collected in the Park Polylepis-El Arenal Chimborazo at the altitude of 4342 m.a.s.l. The highest concentration of flavonoids was found in the Romerillo that was collected in the vicinity of Gaps Atillo to province Chimborazo to the altitude of 3450 m.a.s.l. The plant specie with better antioxidant activity corresponds to Quishuar that was collected in Riobamba to the altitude of 2750 m.a.s.l. in contrast with Quishuar collected at 3930 m.a.s.l. with less antioxidant activity, showing significant differences between the Quishuar of different altitudes. The Aliso and Romerillo of different altitudes not have significant differences in antioxidant activity.

It is concluded that the investigated plant species have good antioxidant activity being its near values 50% inhibition of free radical. Is recommend a study in *Alnus acuminata*, *Hypericum laricifolium* and *Buddleja incanna* applying other methods to measure antioxidant activity.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
INTRODUCCIÓN	

<b>1</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Antioxidantes.....	1
1.1.1	Historia de los antioxidantes.....	1
1.1.2	Definición.....	2
1.1.3	Plantas con propiedades antioxidantes.....	2
1.1.4	Tipos de antioxidantes.....	3
1.1.4.1	Vitamina E.....	4
1.1.4.2	Vitamina C.....	4
1.1.4.3	Carotenoides.....	5
1.1.4.4	Resveratrol.....	6
1.1.5	Los antioxidantes y las reacciones de oxidación.....	7
1.1.6	Antioxidantes primarios.....	7
1.1.7	Antioxidantes secundarios.....	8
1.1.8	Antioxidantes terciarios.....	8
1.1.9	Alimentos ricos en antioxidantes.....	8
1.2	Compuestos fenólicos.....	9
1.2.1	Compuestos fenólicos de bajo peso molecular.....	9
1.2.2	Compuestos fenólicos de alto peso molecular.....	9
1.2.3	Propiedades de los compuestos fenólicos.....	9
1.2.4	Biosíntesis de flavonoides.....	10
1.3	Radicales libres.....	12
1.3.1	Definición.....	12
1.3.2	Mecanismos patogénicos de los radicales libres.....	12
1.3.3	Factores que pueden estimular la producción de radicales libres.....	13
1.4	Quishuar.....	15
1.4.1	Taxonomía.....	15
1.4.2	Descripción botánica.....	15
1.4.3	Corteza.....	15
1.4.4	Hojas.....	16



1.4.5	Flores.....	16
1.4.6	Frutos.....	16
1.4.7	Observaciones de la especie para el reconocimiento.....	16
1.4.8	Distribución y hábitat.....	16
1.4.9	Usos medicinales.....	17
1.4.10	Análisis fitoquímico.....	17
1.5	Aliso.....	17
1.5.1	Clasificación taxonómica.....	18
1.5.2	Descripción.....	18
1.5.3	Usos.....	19
1.5.4	Análisis fitoquímico.....	19
1.5.5	Estudio toxicológico.....	19
1.6	Romerillo.....	19
1.6.1	Taxonomía.....	20
1.6.2	Descripción.....	20
1.6.3	Distribución geográfica.....	20
1.6.4	Usos.....	20
1.6.5	Composición química.....	21
1.7	<i>Artemia salina</i> .....	21
1.7.1	Taxonomía.....	22
1.7.2	Reproducción.....	22
1.7.3	Eclosión de los quistes.....	22
1.7.4	Características físicas.....	22
1.7.5	Alimentación.....	23
<b>2</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>24</b>
2.1	Lugar de la Investigación.....	24
2.2	Muestras, Equipos y Reactivos.....	24
2.2.1	Muestras.....	24
2.2.2	Equipos.....	25
2.2.3	Reactivos.....	25
2.3	Técnicas y Métodos.....	26
2.3.1	Recolección.....	26
2.3.2	Procesamiento de la materia prima.....	26
2.3.3	Análisis físico-químico.....	26
2.3.3.1	Determinación de humedad.....	27
2.3.3.2	Determinación de cenizas totales.....	27
2.3.3.3	Determinación de cenizas solubles en agua.....	27

2.3.3.4	Determinación de cenizas insolubles en HCl.....	27
2.3.4	Elaboración de los extractos.....	27
2.3.5	Control de calidad de los extractos.....	27
2.3.5.1	Determinación de los requisitos organolépticos.....	28
2.3.5.2	Determinación del pH.....	28
2.3.5.3	Determinación del índice de refracción.....	28
2.3.5.4	Determinación de la densidad relativa.....	28
2.3.5.5	Determinación de los sólidos totales.....	28
2.3.6	Tamizaje Fitoquímico.....	28
2.3.7	Evaluación de la Actividad Antioxidante Total (AAT).....	29
2.3.7.1	Análisis Cromatográfico del marcador químico Flavonoides Totales expresados como porcentaje de Quercetina (TLC).....	29
2.3.7.2	Cuantificación de Flavonoides Totales (Método del AlCl <sub>3</sub> ).....	30
2.3.7.3	Cuantificación de Compuestos Fenólicos (Micrométodo de Folin-Ciocalteu).....	32
2.3.7.4	Ensayo de la Capacidad Antioxidante según el Método Enzimático de Inhibición de la Polifenoloxidasas.....	33
2.3.8	Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> .....	37
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
3.1	Control de calidad del <i>Alnus acuminata</i> , <i>Buddleja incanna</i> e <i>Hypericum laricifolium</i> .....	38
3.1.1	Determinación de Humedad.....	38
3.1.2	Determinación de Cenizas.....	39
3.2	Determinación de las propiedades organolépticos.....	39
3.3	Control de calidad de los extractos etanólicos-Parámetros físicos.....	40
3.4	Tamizaje Fitoquímico.....	41
3.5	Evaluación de la Actividad Antioxidante Total (AAT).....	44
3.5.1	Análisis Cromatográfico del marcador químico flavonoides totales expresado como presencia de Quercetina.....	44
3.5.2	Cuantificación de Flavonoides totales (Método del AlCl <sub>3</sub> ).....	46
3.5.3	Cuantificación de compuestos fenólicos (micrométodo de Folin-Ciocalteu).....	48
3.5.4	Ensayo de la capacidad antioxidante según el método enzimático de inhibición de la Polifenoloxidasas.....	51
3.5.4.1	Determinación de la actividad enzimática de la Polifenoloxidasas (PPO).....	51
3.5.4.2	Actividad Antioxidante Total.....	52

3.6	Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> .....	56
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>60</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>61</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>69</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>µeq</b>	Microequivalente
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>AAPH</b>	2,2'-azobis (2-Amidinopropano) Dihidrocloruro
<b>AAT</b>	Actividad Antioxidante Total
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>COX</b>	Ciclo oxigenasa
<b>DL50</b>	Concentración letal media
<b>EGA</b>	Equivalentes de Ácido Gálico
<b>g</b>	Gramo
<b>GPX</b>	Glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	Tripéptido Glutación
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b>L</b>	Litro
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de Baja Densidad
<b>m</b>	Metro
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milimetro
<b>Mol</b>	Moles
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PPO</b>	Polifenol oxidasa
<b>s</b>	Segundo
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Alimentos ricos en antioxidantes no nutrientes.....	8
TABLA No. 2	Muestras de material vegetal usado en la investigación.....	24
TABLA No. 3	Sitios de recolección de las muestras Aliso, Quishuar y Romerillo	26
TABLA No. 4	Esquema de reactivos para la cuantificación de flavonoides totales por el método del $AlCl_3$ .....	31
TABLA No. 5	Ecuación de la recta obtenida para la curva de calibración del estándar de Rutina para la determinación del contenido de Flavonoides Totales.....	32
TABLA No. 6	Ecuaciones de la recta obtenidas para las curvas de calibración del estándar de Ácido Gálico para la determinación del contenido de Compuestos Fenólicos Totales.....	33
TABLA No. 7	Esquema para la elaboración del buffer Acetato de Sodio/Ácido Acético a pH 5.....	34
TABLA No. 8	Esquema para el Ensayo de la Capacidad Antioxidante.....	36

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Resultados de la determinación de humedad del Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) y Romerillo ( <i>Hypericum laricifolium</i> ) como drogas secas. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.....	38
CUADRO No. 2	Resultados de la determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en HCl del Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) y Romerillo ( <i>Hypericum laricifolium</i> ) como drogas secas. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.....	49
CUADRO No. 3	Resultados de la determinación de los requisitos organolépticos de Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) y Romerillo ( <i>Hypericum laricifolium</i> ) como drogas secas. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.....	40
CUADRO No. 4	Resultados de la determinación de los parámetros físicos de los extractos etanólicos de Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) y Romerillo ( <i>Hypericum laricifolium</i> ). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.....	40
CUADRO No. 5	Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo, etanólico y acuoso de la muestra Aliso 1, Aliso 2, Quishuar 1, Quishuar 2, Romerillo 1 y Romerillo 2. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.....	42
CUADRO No. 6	Análisis por TLC de los extractos etanólicos de Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) Y Romerillo ( <i>Hypericum Laricifolium</i> ) para identificar flavonoides. Laboratorio de fitoquímica. ESPOCH, noviembre 2013.....	44
CUADRO No. 7	Resultados de la concentración de flavonoides totales expresados en mg de catequina/g de muestra determinados en los extractos etanólicos de Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) y Romerillo ( <i>Hypericum laricifolium</i> ). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.....	46
CUADRO No. 8	Resultados de la concentración de compuestos fenólicos totales expresados en mg de ácido gálico/g de muestra determinados en los extractos etanólicos de Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) y Romerillo ( <i>Hypericum laricifolium</i> ). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.....	49
CUADRO No. 9	Actividad enzimática (Abs/minuto) de la polifenoloxidasasa (PPO) medida para diferentes tiempos de congelación a -6 °C.	

	Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Pecuarias. ESPOCH, octubre del 2013.....	51
CUADRO No. 10	Resultados de la determinación de la actividad antioxidante total (AAT) expresada como porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasas (PPO) encontrados para las muestras de Aliso 1 y 2, Quishuar 1 y 2, Romerillo 1 y 2 en concentraciones de 10, 100 y 1 000 ppm. Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Pecuarias. ESPOCH, noviembre del 2013.....	53
CUADRO No. 11	Resultados de número de nauplios vivos en ensayo de biotoxicidad de extracto etanólico de Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) y Romerillo ( <i>Hypericum laricifolium</i> ) en <i>Artemia salina</i> . Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba, enero 2014.....	56
CUADRO No. 12	Resultados de concentración letal media de los extractos etanólicos de Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) y Romerillo ( <i>Hypericum laricifolium</i> ) en <i>Artemia salina</i> . Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba, enero 2014.	56
CUADRO No. 13	Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales usando catequina como patrón en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. Espoch, septiembre del 2013.....	69
CUADRO No. 14	Curva de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos totales usando ácido gálico como patrón en concentraciones de 20, 60, 100 y 140 ppm. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. Espoch, julio del 2013.....	70
CUADRO No. 15	Curva de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos totales usando ácido gálico como patrón en concentraciones de 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 y 2 000 ppm. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. Espoch, julio del 2013.....	71
CUADRO No. 16	Resultado del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 10 ppm. Programa estadístico Spss 22.....	79
CUADRO No. 17	Resultado de la comparación múltiple de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 10 ppm aplicando la prueba Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.....	79
CUADRO No. 18	Resultado del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 100 ppm. Programa estadístico Spss 22.....	79
CUADRO No. 19	Resultado de la comparación múltiple de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 100 ppm aplicando la prueba	

	Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.....	80
CUADRO No. 20	Resultado del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 1000 ppm. Programa estadístico Spss 22.....	80
CUADRO No. 21	Resultado de la comparación múltiple de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 1000 ppm aplicando la prueba Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.....	81
CUADRO No. 22	Resultado del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de la concentración de compuestos fenólicos totales de los extractos etanólicos. Programa estadístico Spss 22.....	81
CUADRO No. 23	Resultado de la comparación múltiple de la concentración de compuestos fenólicos totales de los extractos etanólicos aplicando la prueba Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.....	82
CUADRO No. 24	Resultado del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de la concentración de flavonoides totales de los extractos etanólicos. Programa estadístico Spss 22.....	82
CUADRO No. 25	Resultado de la comparación múltiple de la concentración de flavonoides totales de los extractos etanólicos aplicando la prueba Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.....	83



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Concentración de flavonoides totales extraídos en los extractos etanólicos expresados en mg de catequina por g de muestra. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. Epoch, noviembre del 2013.....	47
GRÁFICO No. 2	Concentración de compuestos fenólicos totales extraídos en los extractos etanólicos expresados en mg de ácido gálico por g de muestra. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. Epoch, noviembre del 2013.....	49
GRAFICO No. 3	Curvas de la actividad enzimática de la Polifenoloxidasa (PPO) medidas después de diferentes tiempos de congelación a -6 °C. Laboratorio de Bromatología y nutrición animal. Facultad de ciencias pecuarias. ESPOCH, octubre del 2013.....	52
GRAFICO No. 4	Actividad antioxidante expresada por porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasa de los extractos etanólicos de Aliso ( <i>Alnus acuminata</i> ), Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) y romerillo ( <i>Hypericum laricifolium</i> ) en concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. Laboratorio de bromatología y nutrición animal. Facultad de ciencias pecuarias. Epoch, octubre del 2013.....	54
GRAFICO No. 5	Curva de absorbancia vs concentración de rutina en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, para la cuantificación de flavonoides totales. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. Epoch, septiembre del 2013.....	69
GRAFICO No. 6	Curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico en concentraciones de 20, 60, 100 y 140 ppm, para la cuantificación de compuestos fenólicos totales. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. Epoch, julio del 2013.....	70
GRAFICO No. 7	Curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico en concentraciones de 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 y 2 000 ppm para la cuantificación de compuestos fenólicos totales. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. Epoch, julio del 2013.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Antioxidante neutralizando un radical libre.....	2
FIGURA No. 2	Mecanismo propuesto para la estabilización de radicales libres por la vitamina C (ácido ascórbico).....	4
FIGURA No. 3	Biosíntesis de flavonoides.....	11
FIGURA No. 4	Esquema de la reacción univalente del oxígeno.....	13
FIGURA No. 5	Ataque de radicales libres sobre componentes celulares.....	13
FIGURA No. 6	Factores que estimulan la producción de radicales libres.....	14
FIGURA No. 7	Esquema de las extracciones sucesivas del material vegetal para la aplicación de técnicas de tamizaje fitoquímico .....	27
FIGURA No. 8	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etéreo.....	28
FIGURA No. 9	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico...	28
FIGURA No. 10	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.....	29
FIGURA No. 11	Reacción de quelación del ión $Al^{3+}$ con los flavonoides.....	31
FIGURA No. 12	Reacción de Folin-Ciocalteu .....	32
FIGURA No. 13	Reacción de la polifenoloxidasas (PPO).....	34
FIGURA No. 14	Cromatografía en capa fina (TLC) donde 1: Extracto etanólico de Aliso - Facultad de Ciencias Epoch, 2: Extracto etanólico de Aliso - Carretera lagunas de Atillo-Macas, 3: Extracto etanólico de Quishuar - Facultad de Ciencias Epoch, 4: Extracto etanólico de Quishuar - Casa Cóndor-Vía San Juan-El Arenal, 5: Extracto etanólico de Romerillo - Lagunas de Atillo, 6: Extracto etanólico de Romerillo - Parque Polylepis-El Arenal.....	45

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Árbol de Quishuar.....	15
FOTOGRAFÍA No. 2	Árbol de Aliso.....	17
FOTOGRAFÍA No. 3	Arbusto de Romerillo.....	19
FOTOGRAFÍA No. 4	<i>Artemia salina</i> .....	21
FOTOGRAFÍA No. 5	Recolección de las muestras.....	72
FOTOGRAFÍA No. 6	Secado de las muestras y preparación de los extractos.....	73
FOTOGRAFÍA No. 7	Control de calidad de los extractos etanólicos.....	74
FOTOGRAFÍA No. 8	Ensayos realizados para la identificación de metabolitos secundarios en los extractos.....	75
FOTOGRAFÍA No. 9	Método de Folin-Ciocalteu y AlCl <sub>3</sub> .....	76
FOTOGRAFÍA No. 10	Preparación del extracto enzimático de la ppo.....	77
FOTOGRAFÍA No. 11	Método de inhibición de la polifenoloxidasas.....	78

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Elaboración de la curva de calibración de catequina como patrón para la cuantificación de flavonoides totales.....	69
ANEXO No. 2	Elaboración de las curvas de calibración de ácido gálico como patrón para la cuantificación de compuestos fenólicos.....	70
ANEXO No. 3	Recolección de las muestras.....	72
ANEXO No. 4	Secado de las muestras y preparación de los extractos.....	73
ANEXO No. 5	Control de calidad de los extractos etanólicos.....	74
ANEXO No. 6	Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso.	75
ANEXO No. 7	Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales.....	76
ANEXO No. 8	Extracción de la enzima ppo.....	77
ANEXO No. 9	Determinación de la actividad antioxidante.....	78
ANEXO No. 10	Análisis estadístico de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de Aliso, Quishuar y Romerillo. Programa estadístico Spss 19. Software libre.....	79
ANEXO No. 11	Análisis estadístico de compuestos fenólicos totales de los extractos etanólicos de Aliso, Quishuar y Romerillo. Programa estadístico Spss 19. Software libre.....	81
ANEXO No. 12	Análisis estadístico de flavonoides totales de los extractos etanólicos de Aliso, Quishuar y Romerillo. Programa estadístico Spss 19. Software libre.....	82

## INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos se estableció una relación entre la alimentación y el efecto que esta va a causar en la salud, actualmente existen estudios que avalan que dietas calóricamente bajas y acompañadas de alimentos antioxidantes tiene efectos positivos para la salud y se ven a reflejados en la calidad y expectativa de vida. Este cambio en la salud tiene su explicación en la reducción de los radicales libres que son partículas nocivas que se encuentran presentes en el organismo y tienen su origen en las reacciones metabólicas que se dan para nuestro funcionamiento general, mientras menos alimentos en exceso, con menos calorías, menos grasas saturadas, aditivos artificiales ingerimos habrá menos daño celular debido a los radicales libres (Beneficios de los Antioxidantes. 2014).

Productos naturales y nutracéuticos poseen compuestos antioxidantes que han demostrado actividad neuroprotectora tanto in vitro y en estudios in vivo de la muerte celular neuronal o la neurodegeneración, estos antioxidantes están presentes en varios grupos distintos de acuerdo a su estructura química (Lee J. et al. 2004).

De los antioxidantes más importantes presentes en la dieta la quercetina es un flavonoide destacado, se encuentra en frutas, verduras, té, vino y en muchos suplementos alimenticios con efectos positivos en la salud como la protección frente a enfermedades como algunos tipos de cáncer, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, pulmonares, el envejecimiento celular y demás enfermedades degenerativas (Bergonzi M. 2001).

Los radicales libre son moléculas demasiado reactivas que tienen electrones no apareados y que causan daños en el ADN, proteínas, lípidos, membranas celulares estructurales. Los efectos de los radicales libres son producidos internamente durante el metabolismo normal y externamente por causa del estrés oxidativo. Los radicales libres van aumentando conforme aumenta la edad y los mecanismos de defensa endógenos que los

combaten disminuyen, esto va a originar el daño de las estructuras celulares y provocar el envejecimiento acelerado; entre unos de sus efectos está el envejecimiento de la piel.

El té verde que es de consumo habitual en países asiáticos y en el resto del mundo tiene compuestos polifenólicos, entre ellos las epicatequinas, con poder antioxidante. Laboratorios han demostrado que el consumo o el tratamiento tópico con polifenoles inhiben agentes carcinógenos y combaten los problemas originados por la radiación ultravioleta (Green tea. 2014).

La inhibición de las enzimas antioxidantes y los niveles bajos de antioxidantes producen estrés oxidativo, causan daños en las células y pueden matarlas, el estrés oxidativo desencadena en patologías como la hipertensión, la arterioesclerosis que dañan las paredes de las células vasculares, por estos motivos los antioxidantes se están estudiando intensamente en farmacología como posibles tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas y los accidentes cerebrovasculares, también forman parte de suplementos dietéticos con la finalidad de mejorar la salud y prevenir enfermedades. Además de estas aplicaciones para la salud son usados en la industria de los conservantes alimenticios, cosméticos y en las industrias de la gasolina y del caucho para evitar su degradación (antioxidantes. 2013).

La mayor parte de la población mundial trata su salud usando plantas. En nuestro país existen aproximadamente 500 especies medicinales y el 80% de los ecuatorianos dependen del uso de las plantas y sus productos para la salud y bienestar. La mayor parte de las plantas del mundo dentro de las cuales 35000 tiene propiedades medicinales están en los países que se encuentran actualmente en vías de desarrollo, de todos los compuestos de la farmacopea occidental 7000 de ellos se obtienen de las plantas (Plantas Medicinales Ecuador).

Investigación realizadas en *Hypericum laricifolium* lograron el aislamiento de dos nuevos productos naturales, hentriacontanyl cafeato, nonacosanyl cafeato. Además de otros compuestos entre ellos al ácido cafeico, ácido felúrico, estigmasterol, quercetina, el ácido shikímico, motivo por el cual esta especie vegetal se ha usado en la presente investigación (Constituyents of *Hypericum laricifolium*. 2013).

Existe evidencia de la presencia de oregonina en las hojas de *Alnus acuminata*, que tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Botero. et al. 2013).

El Quishuar posee actividad antioxidante comprobada, así como presencia de polifenoles, flavonoides. Investigaciones con especies del género *Buddleja* en extractos hidroalcohólicos y acuosos de las hojas dan evidencia de fuerte actividad antioxidante que está asociado al poder cicatrizante en heridas de la piel y el proceso inflamatorio (Benavides N. 2011) (Letelier M. et al. 2006).

El Quishuar, el Aliso y el Romerillo se han utilizado a lo largo de los años por conocimientos ancestrales para tratar problemas reumáticos, cicatrizar heridas, tratar la fiebre, hemorragias, gripe, infecciones, que son problemas de salud frecuentes y causa común de consultas médicas.

En el país existe gran diversidad de flora, y en nuestra serranía se encuentran muchas plantas de altura que soportan durante muchas horas los rayos del sol y al considerar esta exposición prolongada a las radiaciones UV se ha decidido estudiar las capacidades antioxidantes de estas 3 especies vegetales.

Esta investigación busca verificar, identificar y analizar las propiedades de Quishuar (*Buddleja incana*), Aliso (*Alnus acuminata*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) para determinar su capacidad antioxidativa, contribuyendo de tal manera con una nueva herramienta contra la oxidación y aportando conocimientos para el buen vivir de nuestra sociedad.

Por consiguiente vamos a recolectar las especies, elaborar los extractos, determinar químicamente la actividad antioxidante, el tamizaje fitoquímico y la toxicidad de las especies vegetales usadas en esta investigación.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 ANTIOXIDANTES

#### 1.1.1 HISTORIA DE LOS ANTIOXIDANTES

El término antioxidante fue utilizado originalmente para referirse específicamente a un producto químico que previniera el consumo de oxígeno. A finales del siglo XIX y a principios del siglo XX, extensos estudios, fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del metal, la vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en la formación de escoria en motores de combustión interna (Jacob R. 1996).

Las primeras investigaciones sobre el rol de los antioxidantes en biología se centraron en su uso para la prevención de la oxidación de grasas insaturadas, que es la principal causa de rancidez en los alimentos. La actividad antioxidante podía ser medida simplemente colocando la grasa en un contenedor cerrado con oxígeno y midiendo la tasa de consumo de éste. Sin embargo fue la identificación de las vitaminas A, C y E como antioxidantes la que revolucionó el campo y condujo a dilucidar la importancia de los antioxidantes en la bioquímica de los organismos vivos (Wolf G. 2005).

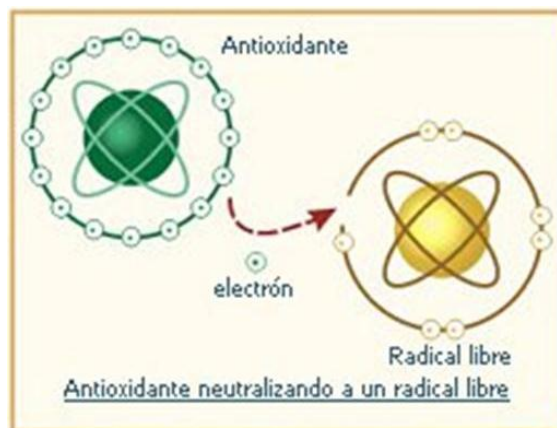
Los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes, fueron investigados por primera vez cuando se reconoció que una sustancia con actividad antioxidante probablemente era una que se oxidaba a sí misma fácilmente. La investigación de cómo la vitamina E prevenía el proceso de peroxidación de lípidos condujo a la identificación de antioxidantes como agentes reductores que previenen reacciones oxidativas, a menudo depurando especies reactivas del oxígeno antes de que puedan dañar las células (Lee J. et al. 2004).



### 1.1.2 DEFINICIÓN

El cuerpo trata de protegerse de los daños causados por los radicales libres generando ciertas sustancias conocidas como antioxidantes, pero cuando ocurren circunstancias de estrés, alimentación inadecuada, enfermedad o deterioro general del organismo, su cantidad llega a ser claramente insuficiente. En estos casos es vital reforzar la dieta con alimentos ricos en antioxidantes, o bien tomar complementos de los mismos. Entre los antioxidantes más conocidos están la vitamina A, la vitamina C, la vitamina E, el betacaroteno, el selenio, la melatonina, los bioflavonoides y la coenzima Q10. Los antioxidantes son moléculas que desprenden con facilidad electrones, neutralizando de este modo los oxidantes o radicales libres (Stevens N. 1998).

Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de retardar o prevenir la oxidación en presencia de oxígeno, o sea se encargan de contrarrestar los efectos nocivos de los radicales libres. Los antioxidantes pueden ser exógenos o endógenos, los primeros son aportados principalmente por los alimentos, por su parte, los endógenos son producidos por el mismo organismo como un mecanismo de defensa intrínseco (Antioxidantes en su dieta. 2013).



**FIGURA No. 1. Antioxidante neutralizando a un radical libre.**

### 1.1.3 PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Existen plantas que según conocimiento popular tienen propiedades antioxidantes pero en muchos casos se desconoce su composición química por lo que se han realizado en las

últimas décadas investigaciones para conocer sus mecanismos y composición. (García L. et al. 2001) (López V. et al. 2007).

Existen plantas como la *Daucus carota sativa* (zanahoria), la *Curcubita maxima* D (calabaza) y otros frutos coloreados que contienen  $\beta$ -carotenos, precursores de la vitamina A. Los aceites de *Glycine max* L (soya), *Gossypium barbadense* L (algodón), *Zea mays* L (maíz) contienen vitamina E. El aceite de la *Roystonea regia* (palma real) contiene antioxidantes naturales como los tocoferoles, vitamina E y tocotrienoles. La *Psidium gajaba* L (guayaba) tiene alto contenido de vitamina C (alrededor de 870 mg de ácido ascórbico en 100 mL<sup>3</sup> de jugo fresco), también existen otros cítricos como son naranja, toronja y otros que contienen vitamina C en cantidades apreciables (García L. et al. 2001) (López V. et al. 2007).

Existen sustancias que aunque se conoce su acción antioxidante no están tan bien estudiadas como las vitaminas. A continuación se refieren plantas que se reportan popularmente que contienen alguna sustancia con acción antioxidante en algunos casos comprobadas: La *Musa paradisiaca* L (plátano burro) contiene una mezcla compleja de polihidroxifenoles y taninos, el *Arachis hipogea* (maní) tiene bioflavonoides, el *Pino cubensis* G contiene proantocianidinas oligoméricas, las semillas de uva *Vitis vinifera* L, contiene también proantocianidinas, la *Theobroma cacao* L, más conocido como cacao y sus derivados contiene abundantes polifenoles, el extracto de corteza de mango *Mangifera indica* L contiene flavonoides, taninos y microelementos como el Fe, Se, Cu y Zn, el romero *Rosmavirus officinalis* L contiene cineol (García L. et al. 2001) (López V. et al. 2007).

#### 1.1.4 TIPOS DE ANTIOXIDANTES

Entre los antioxidantes endógenos se pueden mencionar las enzimas y coenzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, peroxidasas, glutatión (GSH) y el ácido úrico. Por su parte, los antioxidantes exógenos que se conocen en el campo alimentario son (Antioxidantes en su dieta. 2013):

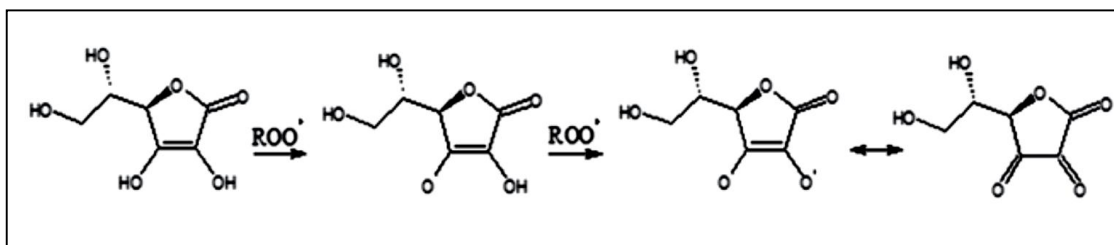
#### 1.1.4.1 VITAMINA E

Presente en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, el maní, las carnes, el pollo, el pescado y algunas verduras y frutas (Antioxidantes en su dieta. 2013).

#### 1.1.4.2 VITAMINA C

La vitamina C participa en el sistema de regeneración de la vitamina E, manteniendo el potencial antioxidante del plasma. También aumenta los niveles de glutatión intracelular, desempeñando así un importante papel en la protección de las proteínas contra la oxidación del grupo tiol. A esta vitamina le atribuyen propiedades antioxidantes y es de destacar su papel a la hora de evitar la proliferación de nitrosaminas. Se ha utilizado con éxito en el tratamiento de algunos tumores de intestinos, como pólipos y adenomas (Dadé M. et al. 2009).

Se ha comprobado experimentalmente que inhibe la formación de nitrosaminas cancerígenas. También algunos estudios sugieren la posibilidad de tratamiento con ácido ascórbico para algunos tipos de cáncer (de vejiga, de pulmón, etc.). La vitamina C actúa como antioxidante y agente reductor. Interviene proporcionando electrones a compuestos tanto en el interior de la célula como en el exterior. Así, puede actuar fuera de la célula, conjuntamente con la vitamina E, en la prevención de la oxidación lipídica. Es de esta forma que actúa frente la oxidación de las LDL, punto donde se inicia la lesión aterosclerótica (Antioxidantes. 2013) (La Excelencia de los Antioxidantes. 2013).



**FUENTE:** Reyes, A. Antioxidantes. Revista Académica de Investigación TLATEMOANI. 2011.  
**FIGURA No. 2.** Mecanismo propuesto para la estabilización de radicales libres por la vitamina C (ácido ascórbico).

Es sabido que la vitamina C se destruye en parte por efecto del calor (cocción) y del almacenamiento prolongado. De ahí la gran importancia nutricional que tiene tomar

vegetales crudos en las comidas y a diario, ya que, al igual que otras vitaminas hidrosolubles, apenas se acumula en nuestro organismo y éste la precisa continuamente. Es muy sensible a la luz, a la temperatura y al oxígeno del aire. Incluso un zumo de naranja natural pierde su contenido de vitamina C a los 15-20 min de haberlo preparado, y también se pierde en las verduras cuando las cocinamos (Palomino L. et al. 2009) (La Excelencia de los Antioxidantes. 2013).

#### 1.1.4.3 CAROTENOIDES

Entre ellos se encuentran:

- Beta carotenos (en verduras y frutas amarillas y anaranjadas y verduras verdes oscuras)
- Alfa carotenos (en la zanahoria)
- Licopenos (en el tomate)
- Luteínas y xantinas (en verduras de hojas verdes como el brócoli)
- Beta criptoxantinas (en frutas cítricas) (Antioxidantes en su dieta. 2013).

Recientemente, se han descubierto en algunos alimentos, otros antioxidantes no nutrientes, tales como:

- Isoflavonas en los frijoles
- Bioflavonoides en los cítricos
- Quercetina en la cebolla
- Polifenoles en las aceitunas (Antioxidantes en su dieta. 2013).

En el café, el vino tinto y el té también se han encontrado algunos antioxidantes no nutrientes. La forma de suplir los antioxidantes para proteger al organismo del efecto oxidativo producido por los radicales libres, sobre lo cual todos los autores consultados están de acuerdo, es el consumo de alimentos ricos en vitamina E, vitamina C, carotenoides y otras sustancias que tienen función antioxidante (Antioxidantes en su dieta. 2013).

#### 1.1.4.4 RESVERATROL

El resveratrol, se encuentra presente como antioxidante natural en algunas frutas y vegetales, posee diversas propiedades benéficas para la salud que comprenden, la quimioprotección, cardioprotección, propiedades anti envejecimiento y antiinflamatorias (Resveratrol. 2014).

#### FUENTES PRINCIPALES DEL RESVERATROL

El resveratrol se encuentra en uvas, vino, jugo de uva, cacahuates, arándanos y zarzamoras. En las uvas, el resveratrol se encuentra solo en la piel y la cantidad varía con el tipo de cultivo y origen geográfico (Resveratrol. 2014).

#### ACCIÓN COMO ANTIOXIDANTE Y OTROS EFECTOS SALUDABLES

El resveratrol actúa sobre los radicales libres, responsables del envejecimiento celular. Esta fitoalexina posee actividad en el organismo, manteniendo la concentración de antioxidantes intracelulares presentes en los sistemas biológicos, sin embargo, el mecanismo bioquímico a través del cual se lleva a cabo este proceso se encuentra bajo investigación. El resveratrol es uno de los compuestos fenólicos, presentes en el vino que puede actuar para favorecer el descenso de las enfermedades del corazón. Por otra parte, hay evidencias médicas que muestran, que el resveratrol juega un papel importante en la prevención de la carcinogénesis. Además, algunos de sus oligómeros, conocidos como viniferinas, presentan una actividad biológica amplia que involucra la protección antimicrobiana, efectos antivirales y propiedades antiinflamatorias, así mismo, se indica que pueden ser importantes agentes anticancerígenos, debido a que son hábiles agentes inhibitorios de eventos celulares asociados con el cáncer. El resveratrol tiene un sinnúmero de efectos benéficos para la salud, siendo más conocida su acción antioxidante, sin embargo, también se ha encontrado que tiene actividad antiinflamatoria y anti envejecimiento. No obstante, aún faltan estudios acerca de sus propiedades farmacológicas, por lo que esta molécula continúa siendo objeto de investigación, en cuanto a la dosificación exacta del resveratrol, efectos secundarios y por cuánto tiempo se debe de consumir (Resveratrol. 2014).

### 1.1.5 LOS ANTIOXIDANTES Y LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN

Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermediarios del radical libre e inhibiendo otras reacciones de oxidación. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores (Ej: tioles, polifenoles) (Sies H. 1997).

Aunque las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, también pueden ser perjudiciales, por lo tanto las plantas y los animales mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como las vitaminas C y E, enzimas (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa), así como proteínas de unión a metales, etc. Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células del organismo (Halliwell B. et al. 2004).

El sistema anti-oxidante contiene tres grupos principales de antioxidantes: primarios, secundarios y terciarios (Daglia M. et al. 2000).

### 1.1.6 ANTIOXIDANTES PRIMARIOS

Previenen la formación de nuevos radicales libres, esto lo consiguen convirtiendo los radicales libres existentes en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas, por ejemplo:

1. Superóxido dismutasa (SOD): convierte  $O_2$  en peróxido de hidrógeno.
2. Glutatión peroxidasa (GPX): convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. (Daglia M. et al. 2000).
3. Proteínas de unión a metales (Ferritina, Ceruloplasmina): Limitan la disponibilidad de Fe necesaria para formar el radical  $OH^\cdot$  (Daglia M. et al. 2000).

### 1.1.7 ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS

Capturan los radicales evitando las reacciones en cadena, por ejemplo: Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), Vitamina C (ascorbato),  $\beta$ -caroteno, ácido úrico, Bilirrubina, Albúmina (Daglia M. et al. 2000).

### 1.1.8 ANTIOXIDANTES TERCARIOS

Reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Incluyen enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Daglia M. et al. 2000).

### 1.1.9 ALIMENTOS RICOS EN ANTIOXIDANTES

Se debe incluir en la dieta a los alimentos ricos en antioxidantes naturales, los cuales son importantes de promocionar en el consumo diario de todos los individuos, entre ellos los más importantes son las frutas, hortalizas, verduras, legumbres, cacao, pan, cereales, papas, frutos secos y el aceite de oliva (Antioxidantes en su dieta. 2013).

**TABLA No. 1. Alimentos ricos en antioxidantes no nutrientes.**

<b>Producto</b>	<b>Antioxidante</b>
Frijol de soya	Isoflavonas, ácidos fenólicos
Té verde, té negro	Polifenoles, catequinas
Café	Ésteres fenólicos
Vino tinto	Ácido fenólico
Romero, sábila	Ácido carnósico, ácido rosmarínico
Cítricos y otras frutas	Bioflavonoides, chalconas
Cebollas	Quercetina, camferol
Aceitunas	Polifenoles, catequinas

## 1.2 COMPUESTOS FENÓLICOS

### 1.2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS DE BAJO PESO MOLECULAR

Los compuestos fenólicos se pueden dividir en moléculas simples y polímeros de éstas de mayor peso molecular. Entre los primeros cabe destacar a los flavonoides como los compuestos más importantes de este subgrupo; siendo los antocianos los compuestos más representativos y responsables del color característico de la granada. Dentro de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular destacan los ácidos fenólicos y dentro de ellos el ácido gálico y el ácido elágico (Sánchez A. et al. 2011).

### 1.2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS DE ALTO PESO MOLECULAR

Los taninos son los polifenoles más característicos de alto peso molecular. Las moléculas fenólicas tienen gran capacidad de reacción y existen, sobre todo, combinadas con un ácido orgánico o un azúcar (como en los ácidos fenólicos, los flavonoles y las antocianidinas), o bien con ellas mismas para formar un polímero (taninos). El grado de polimerización depende del número de moléculas fenólicas que se condensan: desde dos o tres moléculas hasta incluso diez moléculas. Los taninos que se encuentran en mostos y vinos jóvenes corresponden a dímeros o trímeros (taninos hidrolizables), mientras que en los vinos viejos los taninos pueden llegar a contener diez moléculas condensadas (taninos condensados, no hidrolizables, procianidinas o protoantocianidinas). Su grado de condensación condiciona su calidad gustativa y depende de la maduración y de la calidad de la vendimia y del envejecimiento del vino. No se les encuentra en condensaciones superiores a diez monómeros, pues se hacen insolubles y precipitan (Sánchez A. et al. 2011) (Viticultura de Calidad. 2014).

### 1.2.3 PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Las funciones fenólicas se oxidan rápidamente en quinonas. La vulnerabilidad de la vendimia depende de la abundancia de sistemas enzimáticos que catalizan la reacción y, en particular, de la actividad de la tirosinasa y de la lacasa. La oxidación controlada conduce a la «maduración» del vino, pero la oxidación demasiado rápida o demasiado



completa compromete la calidad del producto: visualmente y gustativamente (gustos y olores indeseables) (Viticultura de Calidad. 2014).

#### 1.2.4 BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES

Entre los compuestos fenólicos se encuentran los flavonoides. Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación. En la ruta de biosíntesis de flavonoides, la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por calcona sintasa y da lugar a naringerina calcona, precursor de los flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la estilbeno sintasa conduce a la formación estilbenos implicados en mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos (García A. et al. 2009).

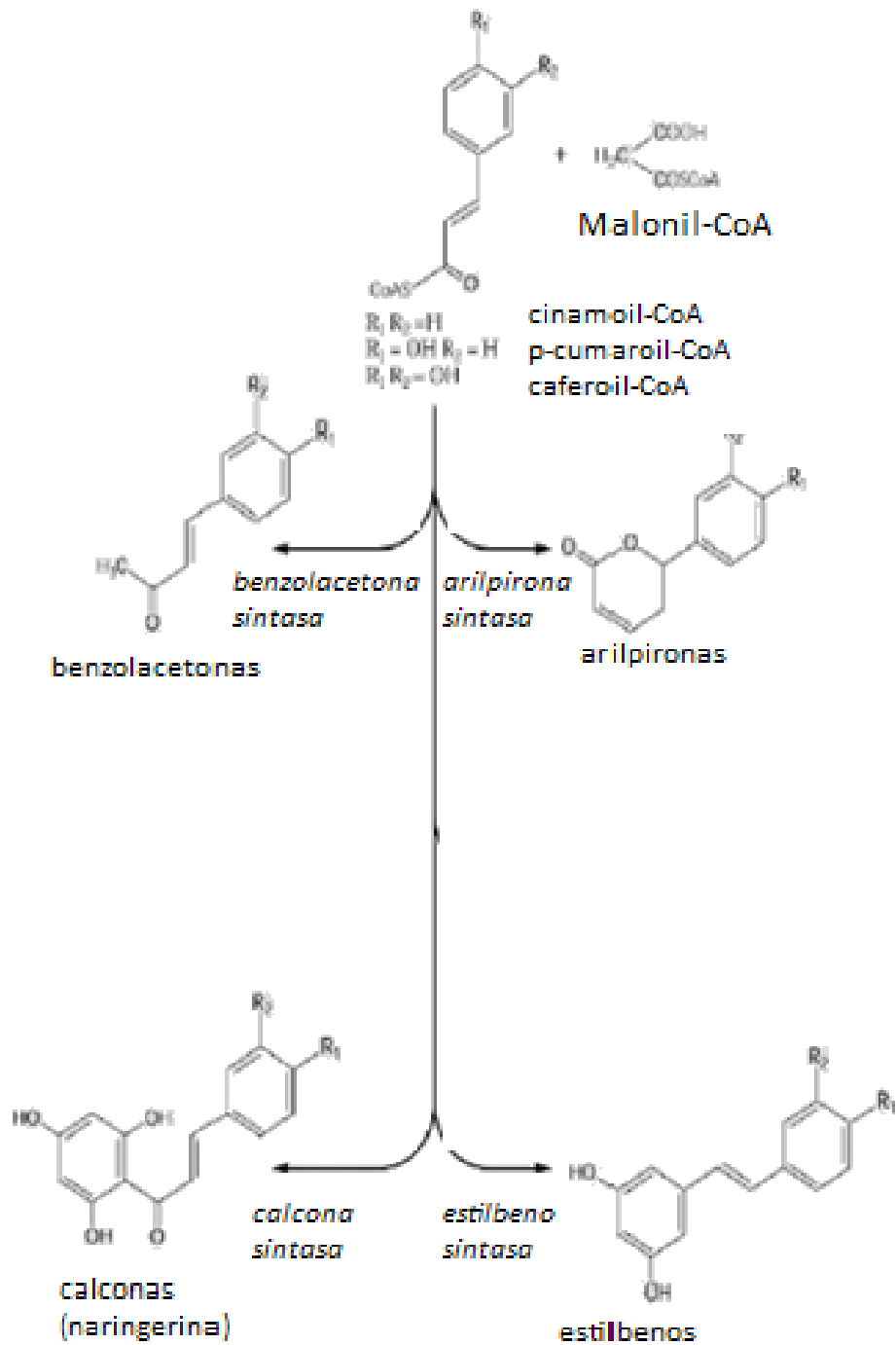


FIGURA No. 3. Biosíntesis de flavonoides.

## **1.3 RADICALES LIBRES**

### **1.3.1 DEFINICIÓN**

Los radicales libres se pueden definir como cualquier especie química capaz de existir en forma independiente y que contiene uno o más electrones libres o no apareados. La mayoría de los radicales libres son inestables y químicamente muy reactivos. Ejemplos de radicales libres que se forman en el organismo son súper óxido, hidroxilo, óxido de nitrógeno (Antioxidantes en su dieta. 2013).

### **1.3.2 MECANISMOS PATOGENICOS DE LOS RADICALES LIBRES**

En condiciones como la inflamación, la hiperoxia, el metabolismo de algunas drogas y la exposición a radiaciones, incrementa la producción de radicales libres derivados del oxígeno. Un desequilibrio entre estos radicales y los sistemas antioxidantes causa alteraciones funcionales y estructurales.

Los radicales libres inician una cascada de reacciones sobre los ácidos grasos poliinsaturados, que se conocen como peroxidación lipídica (auto-oxidación), y que puede producir alteraciones en las membranas biológicas. La interacción de los radicales libres con las proteínas da lugar a una oxidación de los restos laterales de aminoácidos, que ocasiona una pérdida de la función biológica que desempeñan, también pueden reaccionar con todos los componentes de los ácidos nucleicos, producir oxidaciones de las bases nitrogenadas, dando lugar a mutaciones.

El aumento de la actividad antioxidante es la consecuencia del exceso de oxidación, en un intento de restaurar la homeostasis celular.

En la insuficiencia renal crónica, está aumentada la producción de radicales libres, por ello se ha indicado que los radicales libres están implicados en el daño renal progresivo.

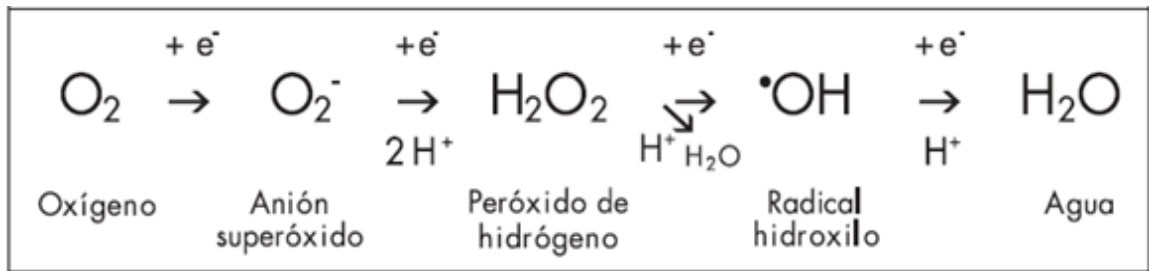


FIGURA No. 4. Esquema de la reducción univalente del oxígeno.

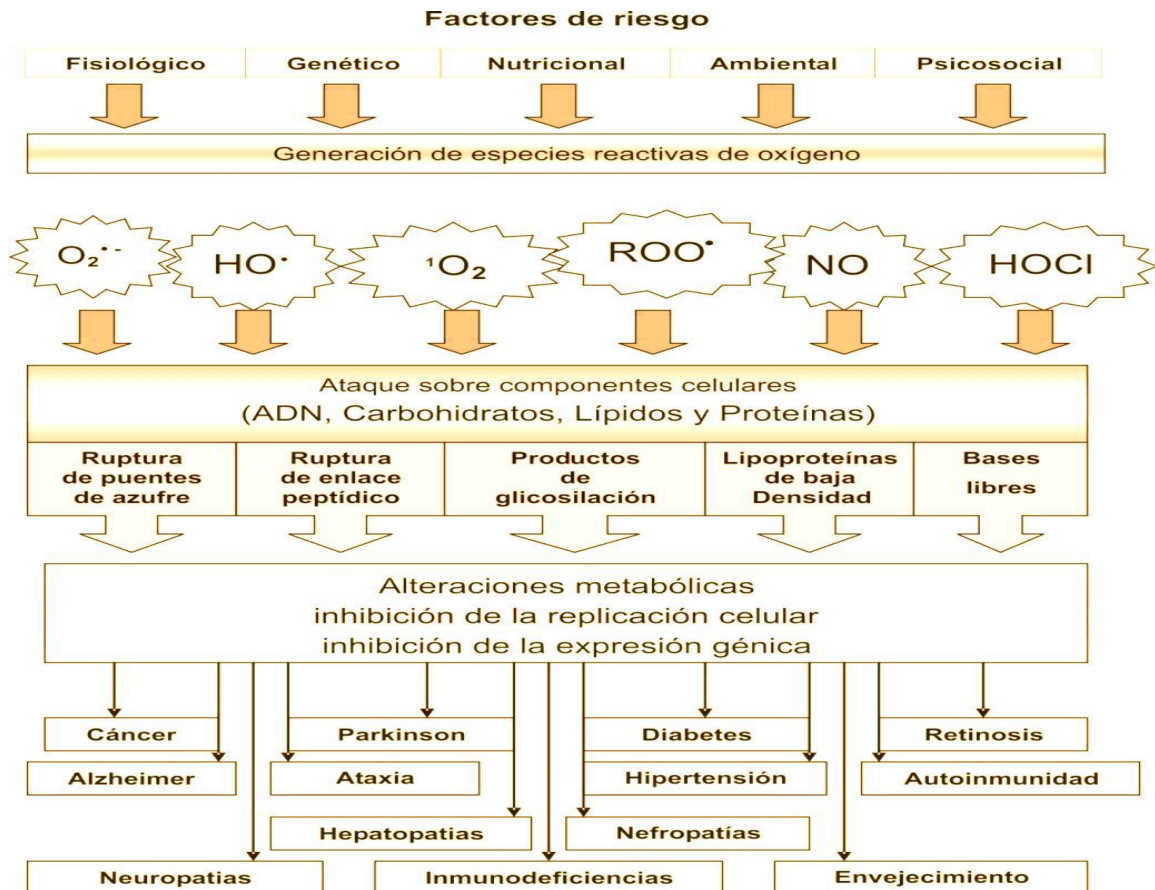


FIGURA No. 5. Ataque de radicales libres sobre componentes celulares.

1.3.3 FACTORES QUE PUEDEN ESTIMULAR LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES SON:

1. Las inflamaciones
2. El cigarrillo
3. El ejercicio
4. La contaminación del aire
5. Las radiaciones

6. Las dietas altas en ácidos grasos poliinsaturados
7. Las isquemias
8. Los carcinógenos (Antioxidantes en su dieta. 2013).

Uno de los cambios biológicos asociados a la ancianidad es el aumento en la formación de los radicales libres con daños subsecuentes a los procesos celulares. Numerosos estudios se han basado en la teoría del envejecimiento por radicales libres y el papel de los antioxidantes, como vitamina E. Dentro de los efectos adversos de los radicales libres, se citan los daños a la membrana celular, al colágeno, al ADN, al material cromosómico y a las proteínas, enzimas y moléculas que nivelan la concentración de calcio intracelular (Antioxidantes en su dieta. 2013).



FIGURA No. 6. Factores que estimulan la producción de radicales libres.

## 1.4 QUISHUAR



FOTOGRAFIA No. 1. Árbol de Quishuar.

### 1.4.1 TAXONOMÍA

Familia botánica: *Buddlejáceas*

Nombre científico: *Buddleja incana*

Nombres comunes: Quishuar, quishuara (*Árboles de Ecosistemas Forestales Andinos*. 2013).

### 1.4.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es un árbol de porte pequeño hasta mediano, de 3 m a 12 m de altura y 20 cm a 50 cm de diámetro, con el tronco a menudo robusto (*Árboles de Ecosistemas Forestales Andinos*. 2013).

### 1.4.3 CORTEZA

La corteza externa es agrietada y de color marrón cenizo. La corteza interna es de color crema claro (*Árboles de Ecosistemas Forestales Andinos*. 2013).

#### 1.4.4 HOJAS

Las hojas son simples, opuestas y alargadas. Miden de 10-12 cm de longitud por 2-2,5 cm de ancho. Son gruesas, con la cara interior densamente cubierta de pelos diminutos que le dan un color blanco y un aspecto afelpado y suave al tacto. La cara superior es de color verde claro u oscuro, con venas fuertemente impresas. Tienen el borde finamente dentado (Árboles de Ecosistemas Forestales Andinos. 2013).

#### 1.4.5 FLORES

Sus flores son pequeñas, de aproximadamente 5 mm de longitud, y están agrupadas en pequeños racimos de muchas flores. Los pétalos son de color anaranjado a amarillo y forman un tubo corto, con 4 estambres y un pistilo (Árboles de Ecosistemas Forestales Andinos. 2013).

#### 1.4.6 FRUTOS

Los frutos son pequeños, ovoides, de unos 5-6 mm de longitud. Se abren en dos partes y contienen gran cantidad de semillas diminutas (Árboles de Ecosistemas Forestales Andinos. 2013).

#### 1.4.7 OBSERVACIONES PARA EL RECONOCIMIENTO DE LA ESPECIE

Se reconoce principalmente por su porte pequeño a mediano; por sus hojas que son coriáceas, alargadas y lanceoladas, con la cara inferior de color blanco y textura aterciopelada; y por sus pequeñas y abundantes flores pequeñas de vivo color anaranjado y amarillo (Árboles de Ecosistemas Forestales Andinos. 2013).

#### 1.4.8 DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT

Se encuentra en Bolivia, Colombia, Ecuador, Venezuela y Perú. El rango de distribución de la especie oscila entre los 1400-4200 m.s.n.m. (ecorregiones de la serranía esteparia y la puna), en formaciones de bosque seco a subhúmedo (Árboles de Ecosistemas Forestales Andinos. 2013).

#### 1.4.9 USOS MEDICINALES

Para fines medicinales se usa el follaje en infusión como antirreumático. También se aplica sobre la piel para cicatrizar heridas, verrugas, el resfriado, mezclado con orina para aliviar el dolor. En veterinaria es utilizada en algunas comunidades del Perú para tratar la enfermedad del sueño en ovinos, para la curación de la queratitis, úlceras y heridas. En la actualidad se le atribuyen efectos antibacterianos y antimicóticos ginecológicos, así como el de estimular la proliferación del endometrio y regenerador de la piel, en ratones se ha demostrado que inhibe la COX-2 (Árboles de Ecosistemas Forestales Andinos. 2013) (Poma E. et al. 2009).

#### 1.4.10 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Contiene fenoles, glicósidos, terpenoides, triglicósidos flavonoides, una saponina triterpenoide llamada mimengoside B, triterpenoides, iridoides, glicósidos phenylpropides y un glicósido flavonoide con efectos citotóxicos en cultivo de hepatocitos, verbascosides, derivados del ácido cafeico, catalpol y flavonoides con efectos antioxidantes (Mayor R. et al. 2010).

### 1.5 ALISO



FOTOGRAFÍA No. 2. Árbol de Aliso.



### 1.5.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Hamamelididae

Orden: Fagales

Familia: Betulaceae

Género: *Alnus*

Especie: *acuminata* (Aliso en sistemas silvopastorales. 2014).

### 1.5.2 DESCRIPCIÓN

Árbol monoico, inerme, de 6-15 m de altura, 20-50 cm de diámetro, corteza lisa y gris claro en los individuos jóvenes, tornándose gris oscura y rugosa en los adultos. Follaje caduco constituido por hojas simples, alternas, elípticas, de 5-18 cm de largo por 4-9 cm de ancho, con el ápice agudo o acuminado, base redondeada o aguda, borde irregularmente aserrado, glabras o subglabras al envejecer, nervaduras prominentes en el envés, pecíolo de 2-3 cm. de largo (Aliso. 2013).

Flores masculinas en amentos cilíndricos erguidos y luego péndulos, de unos 10 cm de largo por 1 cm de ancho, con numerosas brácteas que protegen a tres flores. Estas flores poseen un cáliz con 4 sépalos desiguales y 4 estambres con las anteras dorsifijas. Flores femeninas en pseudoestróbilos ovoideos de hasta 25 mm de largo por 12 mm de diámetro, con brácteas tectrices que protegen 2 flores, con 2 estilos divergentes (Aliso. 2013).

Infrutescencia: pseudoestróbilos ovoides de 25 mm de largo por 15 mm de diámetro, escamoso, con numerosas brácteas leñosas, cada una de las cuales cubren 2 semillas (núculas) comprimidas, aladas, de 2 mm de diámetro, color castaño, de estilos persistentes (Aliso. 2013).

### 1.5.3 USOS

Se le atribuye propiedades medicinales y especialmente contra la fiebre, hemorragias, gripe, como cicatrizante y antirreumático (Aliso. 2013).

### 1.5.4 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

El aliso presenta quinonas, esteroides, alcaloides, saponinas, cardenólidos, aceites esenciales, taninos, compuestos fenólicos derivados del pirogalol y flavonoides (Aliso. 2013).

### 1.5.5 ESTUDIO TOXICOLÓGICO

Estudios realizados en ratas se observó buena tolerancia sin ningún efecto tóxico considerable a dosis de 2.000 mg/kg. Esta planta se puede tomar en forma de infusión cuatro veces al día utilizando 20 g/L agua. La presencia de quinonas y esteroides permite una buena acción antiinflamatoria, antiséptica, antibacteriana, antiespasmódica y antiulcerosa, pudiéndose utilizar para problemas digestivos, dolor estomacal y evitar infecciones intestinales y las úlceras. Además, es un buen reconstituyente del organismo por sus efectos múltiples. La presencia de flavonoides favorece estas acciones, junto con los taninos y los aceites esenciales, sobre todo por su efecto antiséptico en garganta, estómago y piel. Puede usarse para lavado de heridas (Aliso. 2013).

## 1.6 ROMERILLO



**FOTOGRAFÍA No. 3. Arbusto de romerillo.**

### 1.6.1 TAXONOMÍA

Nombre Científico	<i>Hypericum laricifolium</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Theales
Familia	Hypericaceae
Género	Hypericum
Epíteto Específico	Laricifolium

### 1.6.2 DESCRIPCIÓN

Arbustos, árboles pequeños, sufrútices o hierbas, glabros o con pelos simples; tallo con corteza exfoliante; leño fisurado. Hojas opuestas, decusadas, sésiles o cortamente pecioladas, más o menos unidas en la base; lámina entera, glándulas presentes. Inflorescencia de una sola flor o numerosas flores (Constituyents of *Hypericum laricifolium*. 2013).

### 1.6.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Esta especie la encontramos en Venezuela, Colombia, y Ecuador entre los 2 200 a 4 300 msnm (Constituyents of *Hypericum laricifolium*. 2013).

### 1.6.4 USOS

Se usan como materia colorante, para teñir de amarillo el algodón, la lana y para curar una verruga tipo “zute”, se usa para curar el Paludismo (Constituyents of *Hypericum laricifolium*. 2013).

Uno de los componentes más abundantes de la planta (hypericina) también ha demostrado presentar propiedades antitumorales vía la actividad apoptocica de las células malignas.

Otros estudios demuestran el estudio citotóxico en células tumorales, además inhibe el crecimiento in vitro de células de cáncer mamario en ratas y en humanos, actividad antitumoral en carcinoma celular escamoso, melanoma maligno y linfoma. Por otro lado, la planta ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivos y numerosos virus. Por la vía tópica es empleado como cicatrizante, antiséptico y antiviral, posee marcada acción antiinflamatoria, antiespasmódica y diurética, actividad antidepresiva y antiviral (Laines G. 2010).

#### 1.6.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Su composición química es muy compleja pudiéndose citar entre sus principales componentes en hojas y flores a los derivados diantrónicos (naftodiantronas) especialmente la hypericina y pseudohypericina, flavonas, derivados floroglucínicos como Hyperforina (2 a 4,5%), adhyperforina (0,2 a 1,8%), flavonoides. Estos últimos componentes son abundantes del 2 al 4%: en hiperosido, rutosido, quersitrosido e hisoquersitrosido. Se señala la presencia de trazas de xantonas en los tallos floridos; aceite esencial, taninos, ácidos fenólicos, triterpenos, carotenoides y esteroides. Los constituyentes responsables de la coloración del zumo contenidos en las puntuaciones negruscas de las hojas son naftodiantronas: hypericina, biogenéticamente derivada de la hemodolantrona, va acompañada por pseudohypericina y en la planta fresca protohypericina y protoseudohypericina (Laines G. 2010).

#### 1.7 *Artemia salina*



FOTOGRAFÍA No. 4. *Artemia salina*.

### 1.7.1 TAXONOMÍA

Artemia es un pequeño crustáceo, de color semitransparente que vive en lagos salados y estanques de salinas. El género Artemia, es el crustáceo branquiópodo más ampliamente distribuido en el mundo, su clasificación taxonómica es: Phylum: Arthropoda, Subphylum: Crustacea, Clase: Branchiopoda, Orden: Anostraca, Familia: Artemidae (Otto A. et al. 2012).

### 1.7.2 REPRODUCCIÓN

Es un animal ovíparo, que se reproduce mediante huevos llamados quistes los que se dividen en dos tipos: Uno tiene la cáscara delgada y escotillas en la bolsa de la cría y el otro tiene la cáscara fuerte y permanecen viables durante varios años fuera del agua y eclosionan al ser sumergidos en agua salada (Otto A. et al. 2012).

### 1.7.3 ECLOSIÓN DE LOS QUISTES

La *Artemia salina* se reproduce a través de quistes de gran resistencia que pueden conservarse intactos durante largos períodos alejados de cualquier fuente de agua, en ese momento los quistes se encuentran en una especie de cápsulas biológicas que se reactiva con su hidratación durante unas o dos horas en agua dulce (Otto A. et al. 2012).

### 1.7.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Los adultos de Artemia miden hasta 10 mm de longitud en las poblaciones bisexuales y hasta 20 mm en las poblaciones partenogenéticas. Los adultos se caracterizan por un cuerpo alargado con dos ojos completos pedunculados, un aparato digestivo lineal, unas anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales. El macho posee un par de piezas prensiles musculadas muy característico como antenas en la región cefálica mientras que en la parte posterior del tórax se puede observar un par de penes. La hembra no tiene apéndices distintivos en la región cefálica, puede ser fácilmente reconocida por el saco de puesta o útero que está situado detrás del undécimo par de toracópodos (Otto A. et al. 2012).

### 1.7.5 ALIMENTACIÓN

La Artemia se alimenta principalmente de Plancton, Detritus y toda materia orgánica en suspensión, además se le puede suministrar en cultivos artificiales, clara de huevo, harinas de pescado, de maíz, soja entre otros (Otto A. et al. 2012).

## CAPÍTULO II

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se desarrolló en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo:

- Laboratorio de Fitoquímica (Facultad de Ciencias).
- Laboratorio de Química Instrumental (Facultad de Ciencias).
- Laboratorio de Nutrición Animal y Bromatología (Facultad de Ciencias Pecuarias).

#### 2.2 MUESTRAS, EQUIPOS Y REACTIVOS

##### 2.2.1 MUESTRAS

Las muestras de hojas secas y pulverizadas de Quishuar (*Buddleja incana*), Aliso (*Alnus acuminata*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) que se usaron en la presente investigación están detalladas en la TABLA No. 3.

**TABLA No. 2. Muestras de material vegetal usado en la investigación.**

MUESTRA	SITIO DE RECOLECCIÓN	CÓDIGO
Aliso	Facultad de Ciencias - ESPOCH	Aliso 1
	Carretera Lagunas de Atillo - Macas	Aliso 2
Quishuar	Facultad de Ciencias - ESPOCH	Quishuar 1
	Casa Cóndor – vía San Juan-El Arenal	Quishuar 2
Romerillo	Lagunas de Atillo	Romerillo 1
	Parque Polylepis – EL ARENAL	Romerillo 2

### 2.2.2 EQUIPOS

- Balanza Analítica (ADAM Y BOECO)
- Estufa (MEMMERT).
- Mufla (VULCAN Y SNOL)
- Refractómetro (BAUSCH Y LOMB)
- pH metro (HANNA INSTRUMENT Y HANNA WATERPROOF)
- Gps (Garmin map60Scx)
- Espectrofotómetro (PERKIN ELMER LAMDA EZ 201 Y HELYOS  $\beta$ )
- Rotavapor
- Cámara fotográfica (SONY)
- Bomba de vacío
- Refrigeradora (DUREX)

### 2.2.3 REACTIVOS

- Acetona
- Acetato de sodio anhidro
- Ácido acético glacial
- Ácido ascórbico (Vitamina C)
- Ácido gálico
- Ácido clorhídrico
- Ácido fórmico
- Agua destilada
- Ácido sulfúrico
- Alcohol amílico
- Anhídrido acético
- Buffer Acetato de sodio/ácido acético pH 5
- Carbonato de sodio al 20 %
- Catecol (Dihidroxibenceno) 0,5 M
- Cloroformo
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Etanol al 96 % y al 70 %
- Nitrato de plata 0,1 M
- Hidróxido de sodio 0,05 N, 5 N, 1 M, al 20 y al 5 %
- Nitrito de Sodio al 5 %
- Tricloruro de Aluminio al 10 %
- Óxido de aluminio
- Permanganato de potasio 0,1 N
- Polifenoloxidasa (PPO de Pulpa de manzana)
- Quercetina
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Solución de Fehling
- Sílica gel 60 HF254



## 2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS

### 2.3.1 RECOLECCIÓN

La muestra de Aliso (*Alnus acuminata*) se recolectó en las proximidades de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a 2750 m.s.n.m. (Aliso 1) y en la carretera desde las Lagunas de Atillo hacia Macas a 3042 m.s.n.m. (Aliso 2), la muestra de Quishuar (*Buddleja incana*) se recolectó en las proximidades de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a 2750 m.s.n.m. (Quishuar 1) y en la carretera a la altura de la Casa Cóndor, en la vía que conduce de San Juan hacia El Arenal a 3930 m.s.n.m. (Quishuar 2), la muestra de Romerillo (*Hypericum laricifolium*) se recolectó en el sector de las Lagunas de Atillo a 3450 m.s.n.m. (Romerillo 1) y en el parque Polylepis – El Arenal a 4342 m.s.n.m. (Romerillo 2).

**TABLA No. 3. Sitios de recolección de las muestras Aliso, Quishuar y Romerillo.**

Aliso 1	2750 m.s.n.m.	Quishuar 1	2750 m.s.n.m.	Romerillo 1	3450 m.s.n.m.
Aliso 2	3042 m.s.n.m.	Quishuar 2	3930 m.s.n.m.	Romerillo 2	4342 m.s.n.m.

### 2.3.2 PROCESAMIENTO DE MATERIA PRIMA: LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

- Se toman las hojas y se elimina impurezas y cuerpos extraños, sacudiéndola.
- Se lavan con agua sumergiéndolas en un recipiente.
- Se tienden en un espacio ventilado sin la incidencia directa de la luz solar por 7 días.
- Se trituran las hojas recolectando el producto en recipientes por separados.
- Se almacenan las muestras evitando contacto con luz y humedad en recipientes de plásticos oscuros.

### 2.3.3 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO DE ALISO (*Alnus acuminata*), QUISHUAR (*Buddleja incana*) Y ROMERILLO (*Hypericum laricifolium*) COMO DROGAS SECAS

Se aplicó la norma ramal NRSP 309 del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP, 1992) para realizar el control de calidad de las drogas secas en base a los siguientes parámetros (Minsap. 1992):

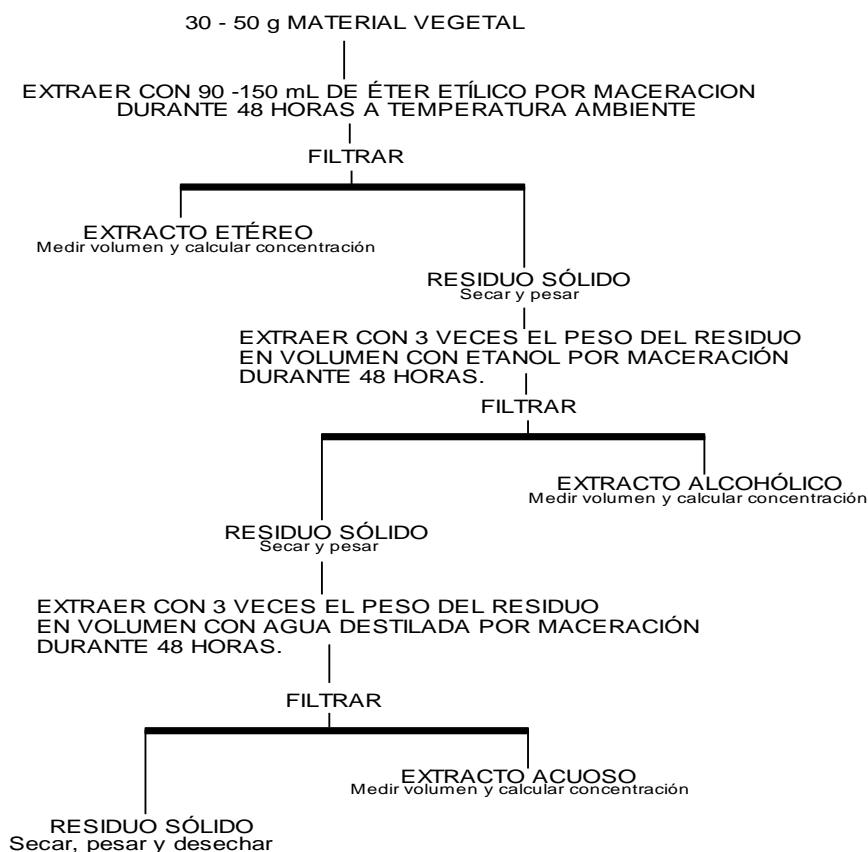
### 2.3.3.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

### 2.3.3.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

### 2.3.3.3 DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA

### 2.3.3.4 DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO

### 2.3.4 ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS



**FUENTE: Normas ramales. Drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 Y 312. MINSAP 1992.**

**FIGURA No. 7. Esquema de las extracciones sucesivas del material vegetal para la aplicación de técnicas de tamizaje fitoquímico.**

### 2.3.5 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

Se aplicó la norma ramal NRSP 312 del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP, 1992) para realizar el control de calidad de los extractos etanólicos en base a los siguientes parámetros:

### 2.3.5.1 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

### 2.3.5.2 DETERMINACIÓN DEL pH

### 2.3.5.3 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

### 2.3.5.4 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

### 2.3.5.5 DETERMINACIÓN DE LOS SÓLIDOS TOTALES

### 2.3.6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El estudio fitoquímico tiene como finalidad aislar e identificar los diferentes tipos de compuestos presentes en la planta.

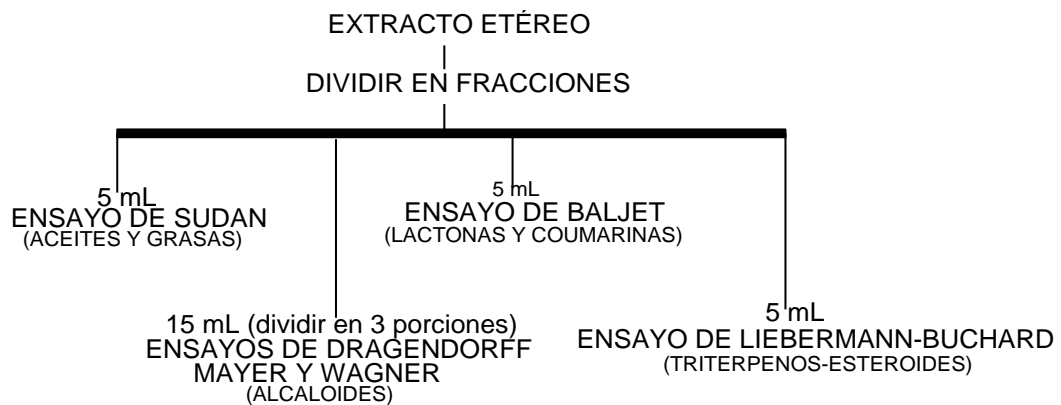


FIGURA No. 8. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etéreo.

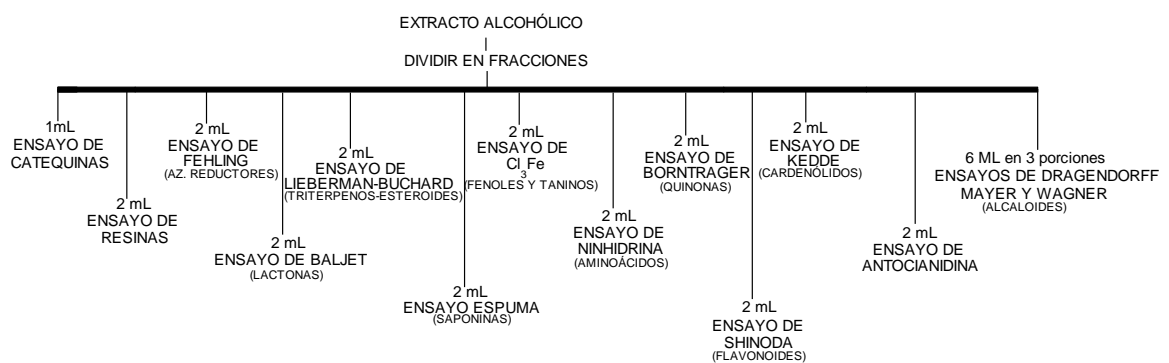
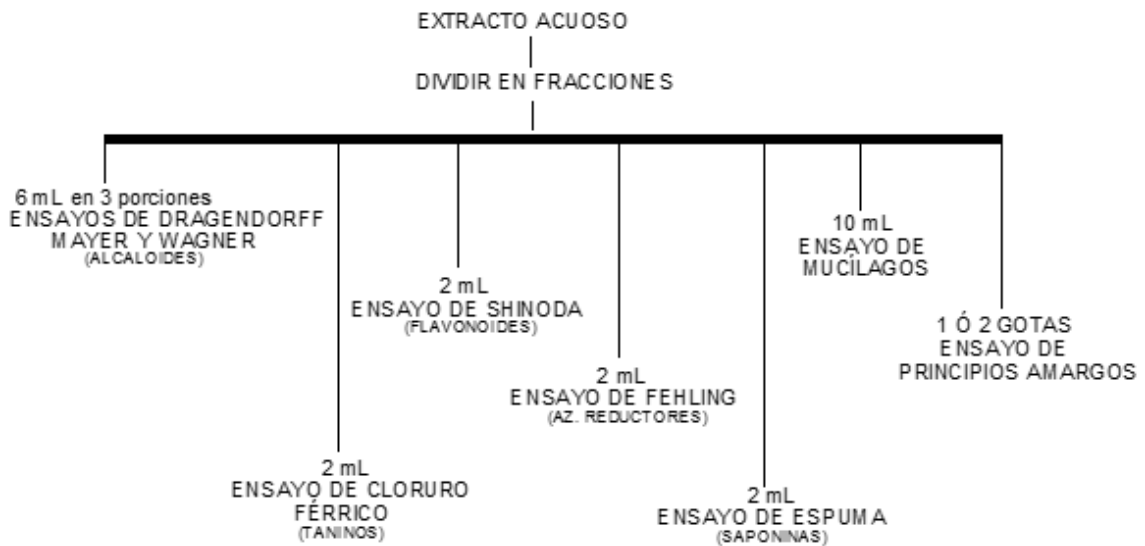


FIGURA No. 9. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.



**FIGURA No. 10. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.**

### 2.3.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

#### 2.3.7.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL MARCADOR QUÍMICO FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO PORCENTAJE DE QUERCETINA (TLC).

##### 1. FUNDAMENTO

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte con 2 fases, la fase móvil es líquida y la fase estacionaria en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

##### 2. PROCEDIMIENTO

- Se prepara la suspensión con sílica gel mezclándola con agua en un vaso de precipitación.
- Se esparce la suspensión de sílica gel sobre una placa de vidrio limpia y seca, distribuyéndola homogéneamente en su superficie.
- Se coloca la placa de sílica en la estufa por el lapso de 1 hora para su activación.
- Se retiran las placas de la estufa y esperamos a que se enfríen.

- Se prepara el sistema de solventes para el corrido en la siguiente relación: cloroformo - acetona - ácido fórmico (75 : 16,5 : 8,5 v/v) hasta volumen de 30 mL, y se coloca en una cuba de vidrio.
- Se coloca las gotas de los extractos sobre la placa a 1 cm de distancia del borde inferior con la ayuda de capilares, se espera que las manchas se sequen se repite el procedimiento por 3 a 4 veces, evitando que se mezclen.
- Se introduce la placa dentro de la cuba y se dejó correr el sistema de solventes hasta que alcancen las  $\frac{3}{4}$  partes de la placa.
- Se retira la placa de la cuba y se espera a que se sequen por 5 minutos.
- Se prepara el equipo para el revelado de las placas, encendemos la bomba y la conectamos al aspersor con la salida adecuada de aire para que el revelador sea expulsado en la cantidad suficiente.
- Se coloca la placa en la cámara extractora de gases y roseamos la vainillina al 1 % a una distancia adecuada evitando que se dañe la placa y esperamos hasta que se seque.
- Se aplica por aspersión el ácido sulfúrico al 10 % a una distancia adecuada y esperamos a que se seque la placa.
- Se coloca la placa en el reverbero a temperatura baja y esperamos a que las manchas resalten por acción del calor.
- Se miden la distancia de recorrido del sistema de solventes y de cada mancha desde el centro de la misma hasta el origen de la misma.

### 3. CÁLCULOS

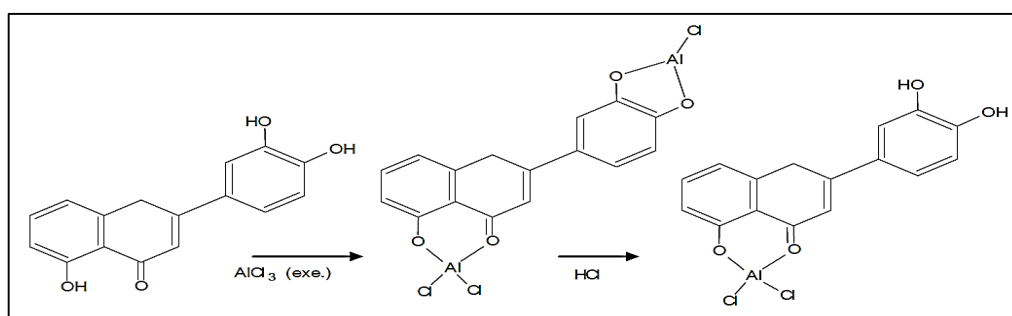
$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por los solventes}}$$

#### 2.3.7.2 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES (MÉTODO DEL $AlCl_3$ )

##### 1. FUNDAMENTO

El  $AlCl_3$  anhidro forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados en medio básico (FIGURA No. 9). Estos quelatos presentan una coloración rosada indicando la presencia de flavonoides. Los valores de flavonoides totales son

expresados en valores de mg del flavonoide empleado como estándar equivalente por gramo de muestra (Palomino L. et al. 2009).



**FIGURA No. 11. Reacción de quelación del ión  $Al^{3+}$  con los flavonoides.**  
FUENTE: Markham, 1968.

## 2. PROCEDIMIENTO

- Se realizan los ensayos en los extractos siguiendo el siguiente esquema:

**TABLA No. 4. Esquema de reactivos para la cuantificación de flavonoides totales por el método del  $AlCl_3$ .**

	<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
Muestras (Extractos)	Aliso 1	500
	Aliso 2	
	Quishuar 1	
	Quishuar 2	
	Romerillo 1	
	Romerillo 2	
	Agua	400
	$NaNO_2$ al 5 %	38
<b>Reposo cerrado a Temperatura ambiente por 5 minutos.</b>		
	$AlCl_3$ al 10 %	38
<b>Reposo cerrado a Temperatura ambiente por 6 minutos.</b>		
	NaOH 1 M	250
	Agua	24

- La absorbancia de la reacción fue medida a una longitud de onda de 510 nm.

## 3. CÁLCULOS

La concentración de flavonoides totales fue establecida mediante una curva de calibración de rutina a concentraciones que fueron desde 20 a 100 ppm, aplicando el mismo esquema de preparación de las muestras. Se determinó la ecuación de la recta para la curva de

calibración en base al estándar de rutina preparado a diferentes concentraciones medidas a 510 nm y obteniendo la siguiente ecuación para la recta:

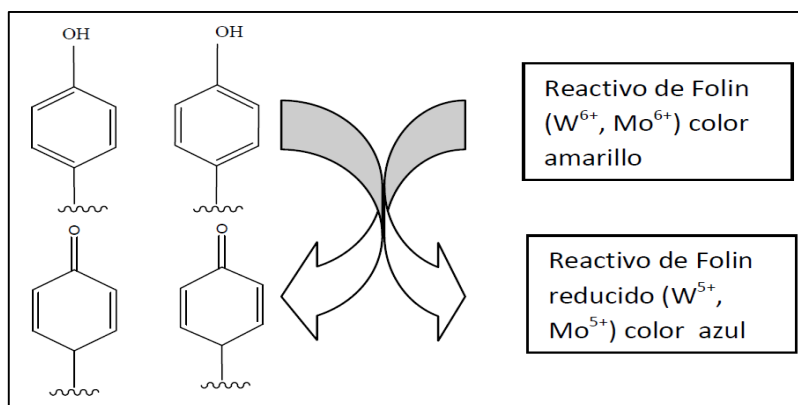
**TABLA No. 5. Ecuación de la recta obtenida para la curva de calibración del estándar de Rutina para la determinación del contenido de flavonoides totales.**

Concentración de Rutina (ppm)	Ecuación de la Recta	R <sup>2</sup>	R
20 - 100	$y = 0,0017x - 0,3876$	0,994	0,9969

### 2.3.7.3 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS (MICROMÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU)

#### 1. FUNDAMENTO

Los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y el ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), que se reduce por oxidación de los fenoles, originando óxidos de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), de color azul. La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes, y posee una absorción máxima a 765 nm (Palomino L. et al. 2009).



**FIGURA No. 12. Reacción de Folin-Ciocalteu.**

#### 2. PROCEDIMIENTO

- Se realiza el ensayo en los extractos preparando las muestras añadiendo 100  $\mu$ L de extracto vegetal, 5000  $\mu$ L de agua, 500  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, 2000  $\mu$ L de carbonato de sodio al 20%.

- Se afora a 10 mL con agua destilada y se deja en reposo por 30 minutos, en oscuridad. Se realizan las lecturas en el espectrofotómetro a 765 nm.

### 3. CÁLCULOS

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó mediante la elaboración de 2 curvas de calibración usando el ácido gálico como estándar de referencia, se prepararon soluciones en concentraciones de 20, 60, 100, 140, 200, 500, 800, 1100, 1400, 1700 y 2 000 ppm y se aplicó el mismo esquema que en la preparación de las muestras.

Se determina la ecuación de la recta para la curva de calibración en base al estándar de ácido gálico preparado a diferentes concentraciones medidas a 765 nm y obteniendo las siguientes ecuaciones para la recta:

**TABLA No. 6. Ecuaciones de la recta obtenidas para las curvas de calibración del estándar de ácido gálico para la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales.**

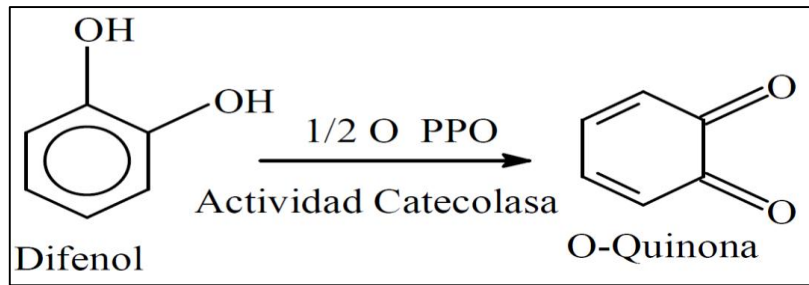
<b>Concentración de ácido Gálico (ppm)</b>	<b>Ecuación de la Recta</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R</b>
20 - 140	$y = 0,001\ 2x - 0,004$	0,998 3	0,999 1
500 - 2 000	$y = 0,000\ 8x + 0,192\ 1$	0,998 2	0,999 1

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

##### 1. FUNDAMENTO

Los métodos disponibles para determinar la susceptibilidad de pardeamiento son la espectrometría de absorción o métodos de reflectancia. Las técnicas de absorción involucran la medida espectrofotométrica sobre soluciones obtenidas después de separar los tejidos y remover los sólidos. Tales medidas estiman los pigmentos solubles y suelen estar presentes cerca de 400 nm, correspondientes a la absorción máxima del catecol. La medida de los pigmentos polimerizados y solubles unidos a membranas puede ser evaluada por medidas de reflectancia sobre la fracción insoluble (Mayor R. et al. 2010).





**FIGURA No. 13. Reacción de la polifenoloxidasas (PPO).**

## 2. PROCEDIMIENTO

### a. Buffer

- Se prepara el buffer de acetato de sodio/ácido acético glacial a un pH 7, las 2 soluciones de acetato de sodio y ácido acético se prepararon por separado a una concentración de 0,2 M.
- Se prepara el ácido acético 0,2 M (Solución A): Se aforó 11,55 mL de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) hasta 1 L con agua destilada.
- Se prepara el acetato de sodio 0,2 M (Solución B): Se diluyó 16,41 g de acetato de sodio anhidro ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) en 1 L de agua destilada.
- Se mezclan las 2 soluciones y se aforan a 100 mL con agua destilada de acuerdo al siguiente esquema:

**TABLA No. 7. Esquema para la elaboración del buffer acetato de sodio/ácido acético A pH 7.**

Solución A	Solución B	pH
1 mL	175 mL	7

- Se mantiene el buffer en refrigeración a una temperatura de  $-6^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### b. Sustrato

- Se usa como sustrato una solución de catecol 0,5 M preparado en el buffer, pesando exactamente 0,275 2 g de catecol ( $\text{PM} = 110,06 \text{ g/mol}$ ), el catecol se prepara para cada análisis ya que se degrada fácilmente por factores ambientales tales como la luz y el oxígeno del aire.

- Se diluyen en 5 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético, cantidad que es suficiente para los ensayos.

c. Extracto enzimático

- Se homogenizan 10 g de pulpa de manzana chilena (*Red delicious*), se mantiene en refrigeración de 4-14°C en 20 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético frío, dentro de un mortero colocado en baño de hielo.
- Se filtra en un embudo frío con algodón y se recolecta en tubos de ensayo fríos que se taparon y se congelaron a -6 °C.
- Se guarda el extracto enzimático hasta su utilización.

d. Determinación de la actividad de la polifenoloxidasas

- Se agrega a la celda del espectrofotómetro 2 400 µL del buffer.
- Se añaden 300 µL de la solución de catecol.
- Se añaden 300 µL del extracto enzimático descongelado en baño de hielo, se mezcla e inmediatamente introducimos en el espectro y medimos el aumento en la absorbancia a 420 nm por 4 minutos en intervalos de 30 segundos.
- Se repite el proceso al minuto, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 2 horas.
- Se calcula la actividad de la enzima con base a la pendiente de la proporción lineal de la curva Absorbancia vs Tiempo.

e. Muestras a ensayar

- Se preparan las muestras a 3 diferentes concentraciones 10 000 ppm, 1 000 ppm y 100 ppm, de modo que al ser agregadas las otras soluciones las concentraciones finales fueron de 1 000, 100 y 10 ppm.
- Se pesan 0,05 g de extracto (muestra) en un balón aforado de 10 mL y se diluye con 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), dando como resultado una solución de concentración a 10 000 ppm.
- Se realizan diluciones al décimo para obtener las soluciones a 1 000 y 100 ppm con el buffer.

f. Antioxidante estándar (vitamina C)

- Se usa la vitamina C como agente antioxidante positivo preparada a las mismas concentraciones que las muestras a ensayar (1000, 100 y 10 ppm).
- Se diluyen 0,05 g de vitamina C en 5 mL de buffer obteniendo la solución a 1000 ppm, se realizan diluciones al décimo para obtener las otras concentraciones a 100 y 10 ppm.

g. Medida de la capacidad antioxidante

- Se aplica el siguiente esquema para medir la capacidad antioxidante:

**TABLA No. 8. Esquema para el ensayo de la capacidad antioxidante.**

<b>Muestras</b>	<b>Blanco</b>	<b>1 000 ppm</b>	<b>100 ppm</b>	<b>10 ppm</b>	<b>Vitamina C</b>
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (mL)</b>				
<b>Buffer</b>	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
<b>Sustrato</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>Muestra</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3*
<b>Extracto Enzimático</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

\*Se debe usar 0,3 mL de DMSO en el Estándar de Vitamina C.

- Se encera el espectrofotómetro UV con el buffer acetato.
- Se adiciona el buffer, el sustrato, la muestra y las enzimas en una celda, la reacción se dio inicio mediante la adición del extracto enzimático y se comienza a leer inmediatamente la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm.
- Se anotan las lecturas de la absorbancia cada 30 segundos desde el comienzo del ensayo hasta que hayan transcurrido 120 segundos obteniéndose 4 lecturas de absorbancia.
- Se leen primero el blanco, luego las diluciones de las muestras desde la menor a la mayor concentración, finalmente la vitamina C como testigo positivo.
- Se repite este procedimiento por 2 ocasiones en cada muestra en ensayo.
- Se considera como inhibición nula la absorbancia correspondiente al blanco, en el que las enzimas actuaron libremente sobre el catecol. Asimismo, se tomó como inhibición absoluta la que presenta la cubeta con el antioxidante de poder previamente probado.
- El porcentaje de inhibición se determina relacionando la lectura del blanco con la lectura de cada uno de los extractos.

### 3. CÁLCULOS

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = \frac{\Delta A_{420 \text{ nm BLANCO}} - \Delta A_{420 \text{ nm MUESTRA}}}{\Delta A_{420 \text{ nm BLANCO}}} \times 100$$

Siendo:

$\Delta A_{420 \text{ nm}}$  = Diferencia entre la absorbancia final e inicial a 420 nm.

#### 2.3.8 BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN *Artemia salina*

El bioensayo de la toxicidad de los extractos provenientes del materia vegetal en estudio se realizó de acuerdo a lo que recomienda el manual de técnicas d investigación del CYTED (1996).

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LAS DROGAS SECAS DE ALISO (*Alnus acuminata*), QUISHUAR (*Buddleja incana*) y ROMERILLO (*Hypericum laricifolium*).

##### 3.1.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Los resultados obtenidos para la humedad como drogas secas se reportan en el siguiente cuadro:

CUADRO No. 1. Resultados de la determinación de humedad del Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) como drogas secas. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.

Muestra	% de Humedad	Especificación (Farmacopea española 2002)
Aliso 1	9,12 ± 0,08	Hasta 14 %
Aliso 2	9,55 ± 0,22	
Quishuar 1	10,02 ± 0,15	
Quishuar 2	8,95 ± 0,07	
Romerillo 1	9,47 ± 0,22	
Romerillo 2	9,33 ± 0,00	

En el cuadro No.1 se puede apreciar que el contenido de humedad determinado para el Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum Laricifolium*) se encuentran dentro de los límites establecidos por la Farmacopea española en 2002 para productos naturales, la humedad por encima del 14% puede contribuir a hidrolizar los principios activos presentes y al crecimiento bacteriano.

### 3.1.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Las cenizas son un indicativo del contenido de sales minerales presentes en la muestra. Los resultados obtenidos para las cenizas como drogas secas se indican a continuación:

**CUADRO No. 2. Resultados de la determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en HCl del Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) como drogas secas. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.**

Muestra	Cenizas Totales (% en masa)	Cenizas Solubles en Agua (% en masa)	Cenizas Insolubles en HCl (% en masa) Especificación*
Aliso 1	5,87 ± 0,56	3,52 ± 0,09	1,81 ± 0,74
Aliso 2	3,64 ± 0,03	2,36 ± 0,46	1,04 ± 0,50
Quishuar 1	9,20 ± 0,09	5,80 ± 0,24	2,62 ± 0,32
Quishuar 2	6,17 ± 0,11	4,13 ± 0,50	1,91 ± 0,25
Romerillo 1	2,99 ± 0,37	1,98 ± 0,31	0,82 ± 0,20
Romerillo 2	2,97 ± 0,00	1,90 ± 0,49	0,90 ± 0,09
Especificación	≤ 12 %	≤ 7 %	≤ 5 %

\* FARMACOPEA ESPAÑOLA 2002.Q<ZX

Como se observa en el cuadro No.2 los resultados de cuantificación de cenizas se encuentran dentro de los rangos establecidos por la Farmacopea española en 2002 para productos naturales.

Entre la muestra Aliso 1 y la muestra Aliso 2 existe diferencia en la cantidad de cenizas siendo mayor la muestra Aliso 1. El Quishuar 1 tiene mayor contenido de cenizas frente al Quishuar 2, evidenciando que existe diferencia entre las 2 muestras. Entre el Romerillo 1 y el Romerillo 2 no hay diferencia como se observa en el cuadro No. 2, sus resultados son muy similares, siendo casi los mismos.

### 3.2 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS

Las características organolépticas determinadas para los extractos etanólicos se reportan a continuación:

**CUADRO No. 3. Resultados de la determinación de los requisitos organolépticos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) como drogas secas. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.**

Extracto	Olor	Color	Aspecto
Aliso 1	Herbal característico de la planta, a alcohol	Verde oscuro	Líquido oscuro
Aliso 2	Herbal característico de la planta, a alcohol	Verde oscuro	Líquido oscuro
Quishuar 1	Herbal característico de la planta, a alcohol	Verde oscuro	Líquido oscuro
Quishuar 2	Herbal característico de la planta, a alcohol	Verde oscuro	Líquido oscuro
Romerillo 1	Herbal característico de la planta, a alcohol	Verde oscuro	Líquido oscuro
Romerillo 2	Herbal característico de la planta, a alcohol	Verde oscuro	Líquido oscuro

Los resultados que se observan en el cuadro No.3 son las características organolépticas de los extractos alcohólicos de las muestras Aliso 1, Aliso 2, Quishuar 1, Quishuar 2, Romerillo 1 y Romerillo 2, que comparadas entre las 2 muestras de la misma especie vegetal no cambian el olor, color y aspecto ya que tiene las mismas propiedades.

### 3.3 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS - PARÁMETROS FÍSICOS

En el siguiente cuadro se reportan los resultados obtenidos en la determinación de los parámetros físicos de los extractos etanólicos:

**CUADRO No. 4. Resultados de la determinación de los parámetros físicos de los extractos etanólicos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.**

Extracto	pH	Índice de Refracción	Densidad Relativa (g/mL)	Sólidos Totales (%)	° Brix
Aliso 1	5,83	1,365	0,85	8,33	25,7
Aliso 2	5,90	1,371	0,87	8,29	25,2
Quishuar 1	6,20	1,382	0,90	9,07	27,0
Quishuar 2	6,11	1,377	0,88	9,23	27,1
Romerillo 1	5,95	1,367	0,87	8,55	24,9
Romerillo 2	5,87	1,370	0,89	8,72	25,0

Todos los extractos estudiados tienen valores de pH ligeramente ácidos, siendo el más ácido el Aliso 1 con un pH de 5,83; seguido por el Romerillo 2 con 5,87; el Aliso 2 con

5,90; el Romerillo 1 con 5,95; el Quishuar 2 con 6,11 y el Quishuar 1 con un valor de 6,20 siendo el valor más alto de pH.

El resultado del índice de refracción muestra que el valor más alto es el del Quishuar 1 con 1,382; el Quishuar 2 con 1,377; el Aliso 2 con 1,372; el Romerillo 2 con 1,370; El Romerillo 1 con 1,367 y el Aliso 1 con 1,365.

La densidad relativa fue para el Quishuar 1 de 0,90 g/mL, el Romerillo 2 con 0,89 g/mL, el Quishuar 2 con 0,88 g/mL, el Aliso 2 y el Romerillo 1 con 0,87 g/mL y el Aliso 1 con 0,85 g/mL lo que es un indicativo de que todos los extractos son ricos en componentes de naturaleza apolar y la concentración de estos componentes es más abundante en el Aliso 1.

### **3.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

El tamizaje fitoquímico ayuda a determinar cualitativamente la presencia de los principales metabolitos secundarios, se utilizaron pruebas cualitativas mediante cambios en la muestra de ensayo mediante formación de precipitados o cambios de coloración en la muestra de ensayo. Los resultados obtenidos para el tamizaje fitoquímico de los extractos se indican a continuación:



**CUADRO No. 5. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo, etanólico y acuoso de la muestra Aliso 1, Aliso 2, Quishuar 1, Quishuar 2, Romerillo 1 y Romerillo 2. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.**

ENSAYO	METABOLITO	RESULTADOS					
		EXTRACTO ETÉREO		ALISO		QUISHUAR	
		1	2	1	2	1	2
<b>Sudán III</b>	Aceites y grasas	-	-	+++	+++	+++	+++
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	-	-	-	-	-	-
<b>Mayer</b>	Alcaloides	-	-	-	-	-	-
<b>Wagner</b>	Alcaloides	-	-	-	-	-	-
<b>Baljet</b>	Lactonas y cumarinas	-	-	-	-	-	-
<b>L-B</b>	Triterpenos y/o esteroides	+++	+++	+++	+++	++	++
<b>EXTRACTO ALCOHOLICO</b>							
<b>Catequinas</b>	Catequinas	+	+	++	++	++	++
<b>Resinas</b>	Resinas	-	-	-	-	+	+
<b>Fehling</b>	Azúcares reductores	+	+	++	++	++	++
<b>Baljet</b>	Lactonas y cumarinas	++	++	++	++	++	++
<b>L-B</b>	Triterpenos y/o esteroides	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Taninos	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Borntrager</b>	Quinonas	++	++	++	++	++	++
<b>Shinoda</b>	Flavonoides	+	+	+	+	+++	+++
<b>Antocianidina</b>	Flavonoides	-	-	-	-	+++	+++
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	-	-	-	-	-	-
<b>Mayer</b>	Alcaloides	-	-	-	-	-	-
<b>Wagner</b>	Alcaloides	-	-	-	-	-	-
<b>Espuma</b>	Saponinas	-	-	-	-	-	-
<b>EXTRACTO ACUOSO</b>							
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	-	-	-	-	-	-
<b>Mayer</b>	Alcaloides	-	-	-	-	-	-
<b>Wagner</b>	Alcaloides	-	-	-	-	-	-
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Taninos	+++	+++	++	++	+++	+++
<b>Shinoda</b>	Flavonoides	-	-	-	-	+	+
<b>Fehling</b>	Azúcares reductores	-	-	+++	++	+++	+++
<b>Espuma</b>	Saponinas	-	-	-	-	-	-
<b>Mucílagos</b>	Mucílagos	-	-	-	-	-	-
<b>Principios amargos</b>		++	++	++	++	++	++

INTERPRETACIÓN: - NO PRESENCIA  
+ BAJA EVIDENCIA  
++ EVIDENCIA  
+++ ALTA EVIDENCIA

Los resultados del cuadro No.5 para la muestra Aliso 1 y Aliso 2 nos indican la presencia abundante de triterpenos y taninos, otros compuestos existentes fueron: lactonas,

cumarinas, flavonoides, quinonas, azúcares y principios amargos y catequinas para las dos muestras. Ninguna de las muestras reportó la presencia de alcaloides, aceites, grasas, resinas, saponinas y mucilagos, estos resultados son similares para las dos muestras originarias de diferentes altitudes y concuerdan con el análisis fitoquímico realizado en *Alnus acuminata* por Sánchez, I. et al. (2012) y Salama, A. et al. (1989) y en *Alnus glutinosa* por Middleton, P. et al. (2005) que en su estudio destaca la presencia de quinonas, flavonoides, esteroides, taninos y compuestos fenólicos.

Los resultados del cuadro No.5 para las muestras Quishuar 1 y Quishuar 2 nos indican la presencia abundante de aceites, grasas, triterpenos, flavonoides, taninos, azúcares reductores, lactonas, cumarinas, quinonas, catequinas y principios amargos para las dos muestras, ninguna de las muestras que se analizaron dio positivo para alcaloides, resinas, saponinas y mucílagos, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Poma, E. et al. (2009) y Benavides, N. et al. (2011) en *Buddleja incana* en el que resaltan la presencia de terpenos, flavonoides, y derivados de los flavonoides, además Pan, y. et al. (2010) en *Buddleja officinalis* que destacan la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos. Entre las muestras Quishuar 1 y Quishuar 2 no hay diferencia en la presencia de metabolitos secundarios, siendo los resultados iguales pese a la gran diferencia de altitud en la que fueron recolectadas las muestras.

Los resultados del cuadro No.5 para las muestras Romerillo 1 y Romerillo 2 nos indican la presencia abundante de flavonoides, taninos, triterpenos, azúcares reductores, esteroides, lactonas, cumarinas, catequinas, resinas, aceites, grasas y principios amargos; la ausencia de alcaloides, saponinas y mucílagos para las dos muestras, siendo similares a lo reportado por Laines, G. (2010) en el *Hypericum laricifolium* y con Peiró, P. et al. (2010) en *Hypericum perforatum* en para el que indica la presencia de flavonoides, triterpenos y esteroides y con Zou, Y. et al. (2004) en *Hypericum perforatum* que indica la presencia de flavonoides.

Como se puede observar las tres especies vegetales tienen triterpenos, taninos, flavonoides, y ausencia de alcaloides, saponinas y mucílagos. La no presencia de alcaloides en todas las muestras se puede atribuir a que al ser plantas de alta montaña no necesitan protección frente a predadores herbívoros, microorganismos, etc.

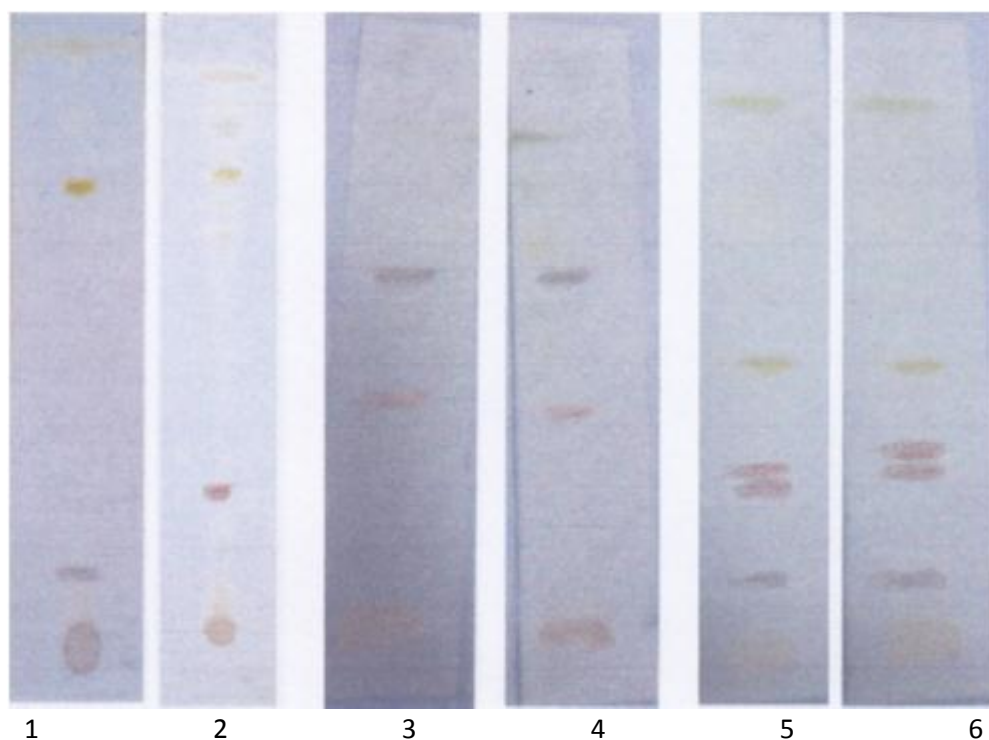
### 3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

#### 3.5.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL MARCADOR QUÍMICO FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADO COMO PRESENCIA DE QUERCETINA

El análisis cromatográfico permite separar e identificar compuestos contenidos en una mezcla mediante el cálculo de los Rf de cada una de las manchas.

CUADRO No.6. Análisis por TLC de los extractos etanólicos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) Y Romerillo (*Hypericum Laricifolium*) para identificar flavonoides. Laboratorio de fitoquímica. ESPOCH, noviembre 2013.

Muestra	Banda	Rf	Compuesto
Aliso 1	1	0,14	Flavonoide glicosilado
	2	0,28	Quercetina
Aliso 2	1	0,28	Quercetina
	2	0,82	Flavonona e isoflavona
	3	0,92	-
Quishuar 1	1	0,43	Quercetina
	2	0,69	Flavonol y Flavonona
Quishuar 2	1	0,43	Quercetina
	2	0,69	Flavonol y Flavonova
Romerillo 1	1	0,14	Flavonoide glicosilado
	2	0,29	Rutina o Kaempferol
	3	0,31	Ácido cafeico
	4	0,43	Quercetina
Romerillo 2	1	0,14	Flavonoide glicosilado
	2	0,29	Rutina o Kaempferol
	3	0,31	Ácido cafeico
	4	0,43	Quercetina



**FIGURA No. 14. Cromatografía en capa fina de sílica gel HF<sub>254</sub>, en el sistema de solventes: Cloroformo-Acetona-Ácido fórmico (75 : 16,5 : 8,5 v/v).**

- 1. Extracto etanólico de Aliso - Facultad de Ciencias ESPOCH**
- 2. Extracto etanólico de Aliso - Carretera lagunas de Atillo-Macas**
- 3. Extracto etanólico de Quishuar - Facultad de Ciencias ESPOCH**
- 4. Extracto etanólico de Quishuar - Casa Cóndor-Vía San Juan-El Arenal**
- 5. Extracto etanólico de Romerillo - Lagunas de Atillo**
- 6. Extracto etanólico de Romerillo - Parque Polylepis-El Arenal**

**Revelador: Sulfato de cerio**

De acuerdo a los Rf encontrados en bibliografía según Wagner, H. et al. (1996) y comparados con los Rf calculados se pudo determinar en el Aliso 1 la posible presencia de flavonoides glicosilados y quercetina. En el Aliso 2 la posible presencia de quercetina y flavona e isoflavona. Estas muestras tienen en común la presencia de quercetina y se diferencia en el segundo metabolito encontrado, este resultado puede deberse a la diferencia de sus hábitats como es el Aliso 1 ubicado en la ciudad de Riobamba con una altitud menor, un clima seco, menor humedad en comparación al Aliso 2 que está en la carretera que conduce desde Las Lagunas de Atillo hacia Macas. En las muestras de Quishuar 1 y Quishuar 2 se evidencia los mismos resultados, probablemente la presencia de quercetina, flavonol y flavonona. En el Romerillo 1 y Romerillo 2 se tiene la posible presencia de flavonoide glicosilado, rutina o keampferol, ácido cafeico y quercetina.

En el Aliso existen pequeñas variaciones debido a que presentan una banda diferente luego del revelado, el Quishuar y el Romerillo presentan las mismas bandas no existiendo variaciones en sus muestras. Estos resultados son muy importantes porque de la presencia de flavonoides y sus derivados, que serán los responsables de la actividad antioxidante presente en las muestras.

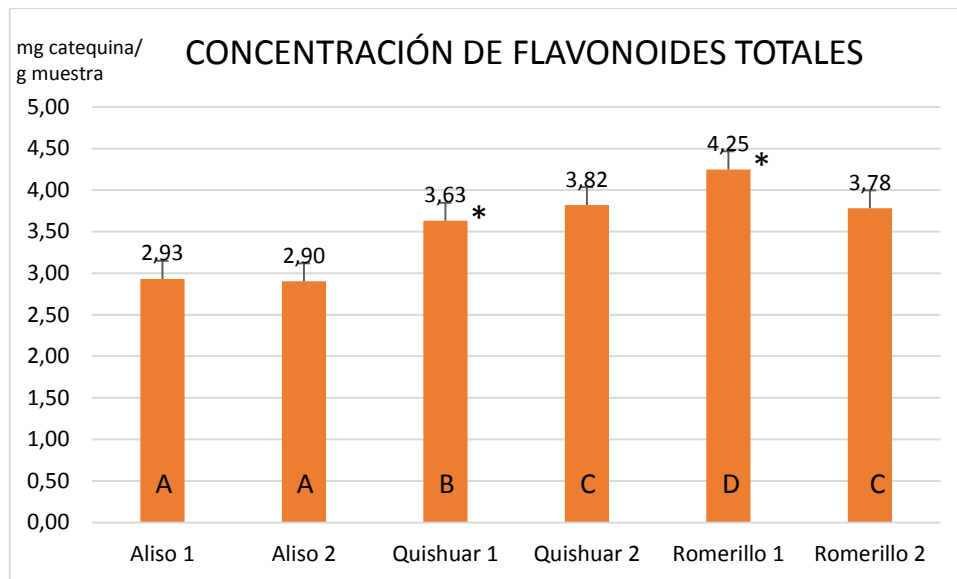
### 3.5.2 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES (MÉTODO DEL $\text{AlCl}_3$ )

El  $\text{AlCl}_3$  anhidro forma quelatos con flavonoides en medio básico, estos quelatos presentan una coloración rosada indicando la presencia de flavonoides.

En el anexo No.1, se indican las lecturas de las absorbancias y concentraciones determinadas por espectroscopia UV para la elaboración de la curva de calibración usando catequina como patrón realizando la lectura a 510 nm, para la determinación de flavonoides totales en los extractos etanólicos, los resultados se indican a continuación:

**CUADRO No. 7. Resultados de la concentración de flavonoides totales expresados en mg de catequina/g de muestra determinados en los extractos etanólicos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.**

Muestras	Absorbancia	Concentración en ppm ( $\mu\text{g}$ de Catequina/mL de extracto)	Contenido de Flavonoides totales en mg de Catequina por g de Muestra
Aliso 1	0,320	293,11	2,93
Aliso 2	0,317	290,28	2,90
Quishuar 1	0,395	363,86	3,63
Quishuar 2	0,415	382,73	3,82
Romerillo 1	0,460	425,18	4,25
Romerillo 2	0,410	378,01	3,78



\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C, D. N = 4. p-VALOR > 0,05.

**GRÁFICO No.1. Concentración de flavonoides totales extraídos en los extractos etanólicos expresados en mg de catequina por g de muestra. Laboratorio de Química Instrumental. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.**

En los resultados indicados en el cuadro No.7 y representados en el gráfico No.1 se observa que el contenido de Flavonoides Totales el Romerillo 1 es de 4,25 mg/g de muestra, siendo el más alto para las muestras analizadas, seguido por el Romerillo 2 con 3,75 mg/g, el Quishuar 2 con 3,82 mg/g, el Quishuar 1 con 3,63 mg/g, el Aliso 1 con 2,93 mg/g y por último el Aliso 2 con 2,90 mg/g. Con el Test de Tukey (Anexo No.12) a nivel de significancia del 95,00 % se estableció que las muestras Quishuar 1 y Romerillo 1 son estadísticamente diferentes con p-Valor < 0,05.

La concentración de flavonoides totales reportado para las muestras Aliso 1 y Aliso 2 son menores al valor de 21,00 mg/g reportado por Tamas, M. et al. (2008) en *Alnus glutinosa* originaria de Rumania, entre Aliso 1 y Aliso 2, aunque son provenientes de ecosistemas diferentes no existe diferencia significativa sobre el contenido de flavonoides, con esto se puede decir que aunque las condiciones ambientales son diferentes en los ecosistemas del que provienen las 2 muestras, no varían su contenido de flavonoides.

Los resultados de los análisis de Flavonoides totales en las muestras Quishuar 1 y Quishuar 2 son mayores a 1,1286 mg/g de muestra determinados por Poma, E. et al. (2009), pudiéndose atribuir el resultado a la altitud de la que las muestras son originarias y según Caldwell, M. et al. (1989) por el mecanismo de adaptación a la radiación UV-B

que provoca el aumento de la producción de metabolitos secundarios tales como fenoles y flavonoides siendo las especies vegetales usadas en esta investigación más ricas en flavonoides y sin una diferencia representativa entre el Quishuar 1 y Quishuar 2 pese a existir gran diferencia entre la altitud de la zona originaria de las muestras, en la investigación realizada por Benavides, N. et al. (2011) dan resultados de 7,73mg/g de muestra en el extracto metanólico de *Buddleja incana* y en la investigación de Pan, Y. et al. (2010) realizado en *Buddleja officinalis* tiene resultados de 75,33 mg/g de muestra y 62,56 mg/g de muestra en la extracción asistida por microondas y en la extracción en Soxhlet respectivamente, estos resultados se pueden atribuir al método de extracción usado en las investigaciones citadas.

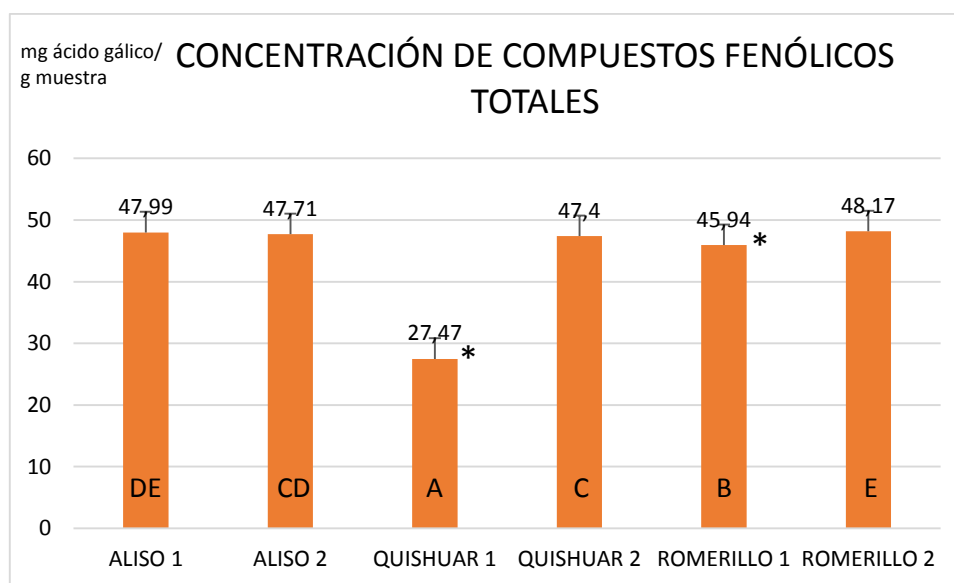
Los resultados de la concentración de flavonoides totales en Romerillo 1 y Romerillo 2 tienen una ligera diferencia entre sí, siendo el más rico en flavonoides el Romerillo 1 originario de Las Lagunas de Atillo. Bergonzi M. et al. (2001) destaca la presencia de flavonoides en el *Hypericum perforatum*, con lo que se confirma la presencia de flavonoides dentro de este género, en el estudio llevado a cabo por Zheleva, D. et al. (2008) en *Hypericum cerastoides* da como resultado 12,2 mg de hiperosido/g de muestra explicándose este valor superior a la diferencia de especie y a los reactivos usados.

### 3.5.3 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS (MICROMÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU)

El método de Folin-Ciocalteu se usa para determinar el contenido total de compuestos fenólicos en el análisis de plantas y alimentos, es útil para evaluar estos materiales porque contienen muchas clases de compuestos fenólicos. En el anexo No.2, se presentan los datos empleados para elaborar las curvas de calibración usando ácido gálico como patrón medido a 765 nm. Los resultados determinados para los compuestos fenólicos fueron:

**CUADRO No.8. Resultados de la concentración de compuestos fenólicos totales expresados en mg de ácido gálico/g de muestra determinados en los extractos etanólicos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.**

Muestras	Absorbancia	Concentración en ppm ( $\mu\text{g}$ de Ácido Gálico/mL de extracto)	Contenido de Compuestos Fenólicos Totales en mg de Ácido Gálico por g de Muestra
Aliso 1	4,031	4799,45	47,99
Aliso 2	4,009	4771,12	47,71
Quishuar 1	2,390	2747,37	27,47
Quishuar 2	3,984	4740,29	47,40
Romerillo 1	3,867	4594,46	45,94
Romerillo 2	4,046	4817,79	48,17



\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C, D, E. N = 5. p-VALOR > 0,05.

**GRÁFICO No.2. Concentración de compuestos fenólicos totales extraídos en los extractos etanólicos expresados en mg de ácido gálico por g de muestra. Laboratorio de Química Instrumental. Facultad de Ciencias. ESPOCH, noviembre del 2013.**

Los resultados reportados en el cuadro No.8 y representados en el gráfico No.2 para el contenido de compuestos fenólicos totales en función del ácido gálico fueron para el Romerillo 2 de 48,17 mg/g de muestra, Aliso 1 de 47,99 mg/g de muestra, el Aliso 2 con 47,71 mg/g de muestra, el Quishuar 2 con 47,40 mg/g de muestra, el Romerillo 1 con 45,94 mg/g de muestra y el Quishuar 1 con 27,47 mg/g de muestra. Con el Test de Tukey (Anexo No.11) a nivel de significancia del 95,00 % se estableció que las muestras Quishuar 1 y Romerillo 1 son estadísticamente diferentes con p-Valor < 0,05.



Los resultados de Aliso 1 que se encuentra en la ESPOCH a la altura de 2750 m.s.n.m. y el Aliso 2 ubicado en la carretera que va desde Las Lagunas de Atillo hacia Macas a una altura de 3042 m.s.n.m. tienen similar concentración de compuestos fenólicos. En estudios realizados en la corteza de *Alnus incana* por Stevic, T. et al. (2010) reportan resultados de 316,2 mg/g siendo mayor estos resultados al de las muestras estudiadas en la presente investigación. Mushkina, O. et al. (2013) encuentra cantidades representativas de compuestos fenólicos en *Alnus glutinosa* y *Alnus incana*.

El valor de la muestra Quishuar 1 que se encuentra en la ESPOCH a la altura de 2750 m.s.n.m. es menor a la muestra de Quishuar 2 que se ubica alrededor de La Casa Cóndor a una altura de 3930 m.s.n.m. posiblemente esta diferencia de compuestos fenólicos se debe a la diferencia de altura existente entre los sitios de recolección y por ende a la radiación UV a la que están expuestos, que según Caldwell, M. et al. (1989) provoca un aumento en la producción de fenoles y absorben radiación. Los resultados de Quishuar 1 y Quishuar 2 son menores a los determinados por Poma, E. et al. (2009) de 117,8 mg/g de muestra, estos resultados fueron obtenidos por un método diferente al usado en la presente investigación, el estudio se realiza en especies del Perú, pudiéndose deber a la diferencia de altitud, la radiación UV, la humedad, condiciones ambientales. Benavides, N. et al (2011) reporta 15,95mg/g de muestra siendo menor al obtenido en las muestras Quishuar 1 y 2. Pan, Y. et al. (2010) para *Buddleja officinalis* reporta valores de 113,56 mg/g d muestra y 100,94 mg/g de muestra en la extracción asistida por microondas y en la extracción en un aparato Soxhlet respectivamente, dejando evidencia que los resultados obtenidos son correctos en comparación con otros estudios.

El resultado de compuestos fenólicos totales de Romerillo 2 recolectado a una altitud de 4342 m.s.n.m. en el parque Polylepis es mayor al del Romerillo 1 recolectado a una altitud de 3450 m.s.n.m. en Las Lagunas de Atillo, se atribuye la diferencia de compuestos fenólicos a las condiciones de los ecosistemas diferentes en los que se recolectaron las muestras , en el bosque Polylepis se registra una mayor exposición a la radiación UV, un ambiente demasiado seco, fuertes corrientes de viento, mientras que en Las Lagunas de Atillo las condiciones ambientales son de mayor humedad y altitud menor. No se encontraron resultados comparables para las muestras de *Hypericum laricifolium* por el método realizado en esta investigación, existen investigaciones con otros métodos, Dadé, et al. (2009) reporta para el *Hypericum connatum* 2.07 micromol eq Ac cafeico/mg como

resultado de la prueba de compuestos fenólicos totales, además en bibliografía se cita la presencia de fenoles por lo que se ve reflejado en estos resultados.

Según He J. et al. (1993) la concentración de compuestos fenólicos no depende únicamente de la altitud a la que se encuentran las plantas, existen otros factores que van a influir en las plantas de alta montaña como son el tamaño de las hojas, que posean cromóforos o moléculas susceptibles al efecto dañino de la radiación UV, orientación vertical u orientación horizontal de las hojas lo que influirá en la capacidad de interceptar este tipo de radiación, por lo tanto plantas con tallos y hojas pequeños y delgados como los del *Hypericum laricifolium* van a recibir menor radiación en comparación con *Buddleja incana* y *Alnus acuminata* que son árboles grandes, con hojas largas, anchas y dispuestas verticalmente.

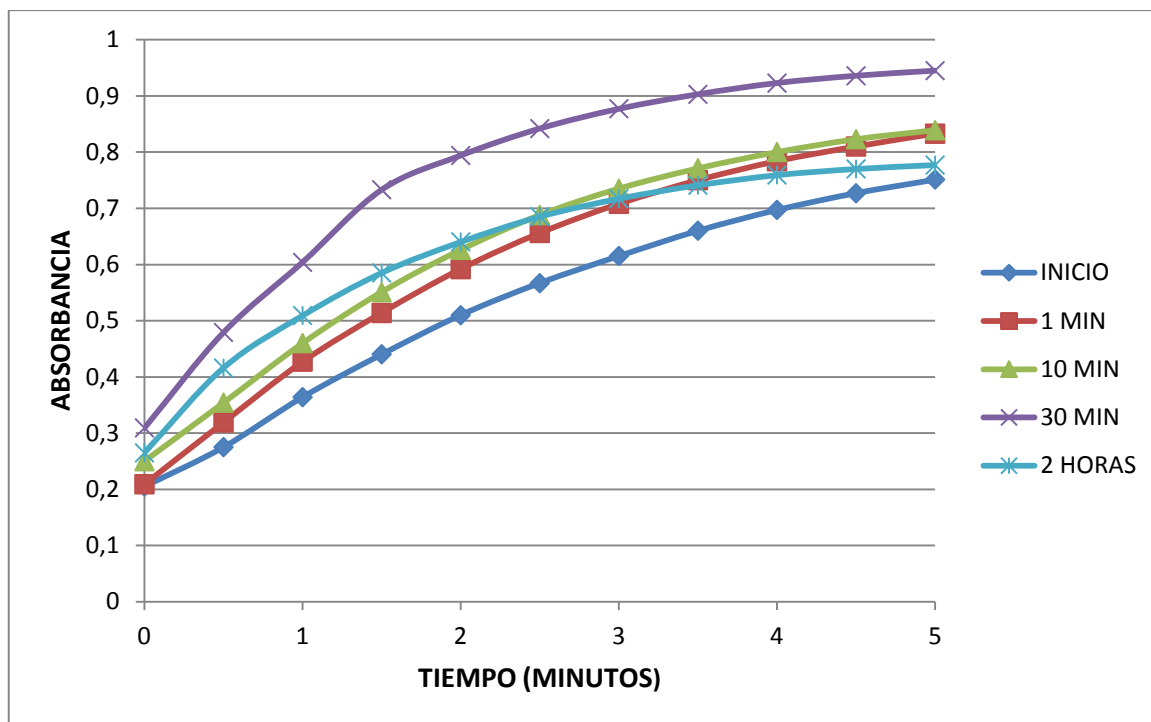
### 3.5.4 ENSAYO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE SEGÚN EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA.

#### 3.5.4.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA POLIFENOLOXIDASA (PPO)

La determinación de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas permitió establecer el tiempo de actividad constante de la enzima, para realizar las mediciones del ensayo con un mismo extracto y en las mismas condiciones para cada prueba.

**CUADRO No. 9. Actividad enzimática (Abs/minuto) de la polifenoloxidasas (PPO) medida para diferentes tiempos de congelación a -6 °C. Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Pecuarias. ESPOCH, octubre del 2013.**

Tiempo (min)	Absorbancia				
	Inicio	1 min	10 min	30 min	2 Horas
0	0,205	0,209	0,250	0,309	0,265
0,5	0,275	0,319	0,354	0,479	0,416
1	0,364	0,427	0,46	0,604	0,509
1,5	0,44	0,514	0,551	0,733	0,585
2	0,51	0,592	0,626	0,794	0,64
2,5	0,567	0,656	0,688	0,842	0,685
3	0,615	0,708	0,735	0,877	0,717
3,5	0,66	0,75	0,771	0,903	0,741
4	0,697	0,784	0,8	0,923	0,759
4,5	0,727	0,81	0,823	0,936	0,77
5	0,751	0,833	0,839	0,945	0,777



**GRÁFICO No. 3. Curvas de la actividad enzimática de la polifenoloxidasa (PPO) medidas después de diferentes tiempos de congelación a -6 °C. Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Pecuarias. ESPOCH, octubre del 2013.**

En el gráfico No.3 se observa la actividad de la PPO después de diferentes periodos de congelación a -6°C, se puede establecer que la actividad se logró mantener ligeramente estable hasta un lapso de 2 horas, produciéndose un leve incremento a los 10 minutos de congelación y a las 2 horas se produjo un ligero descenso, pero todas las curvas presentaron una aproximación en la tendencia exceptuando la de los 30 minutos cuya actividad no se apega a la tendencia de las demás curvas, hay que indicar que el tiempo de congelación es un factor determinante para mantener la estabilidad.

Se recomienda determinar la actividad de la enzima estableciendo distintos periodos (minutos) por el lapso de 2 horas con el fin de establecer los factores que influyen en su actividad y lograr un mejor control de los mismos.

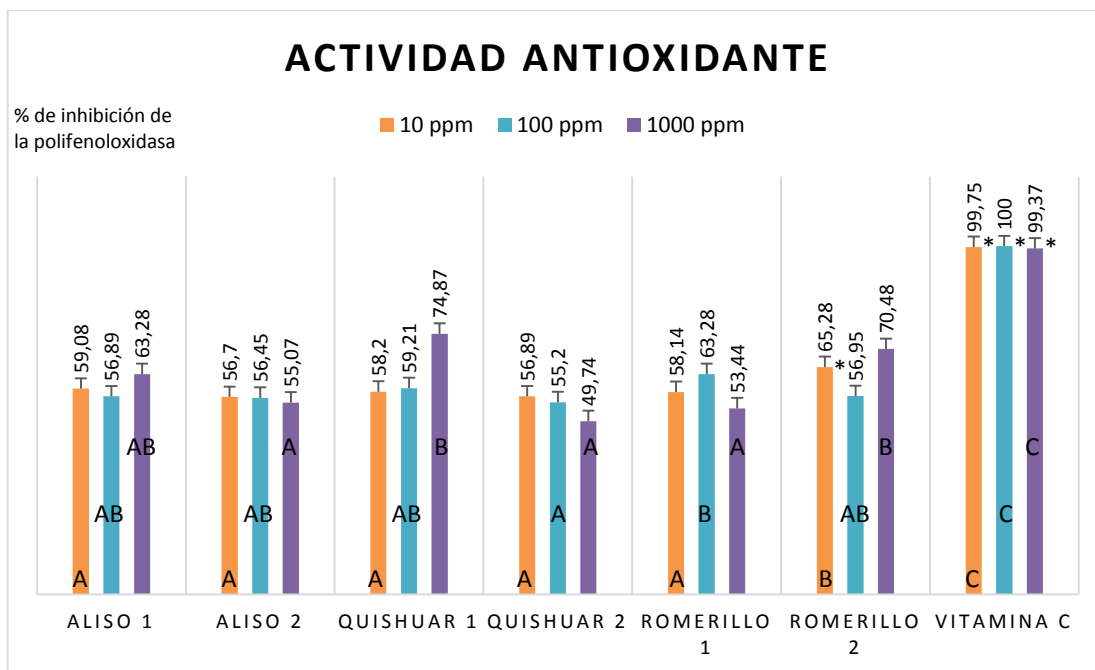
#### 3.5.4.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

La actividad antioxidante total se expresó como porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasa, los resultados de la determinación en cada muestra se comparó frente a la vitamina C, considerada como antioxidante de poder ya probado, los resultados se reportan a continuación:

**CUADRO No.10. Resultados de la determinación de la actividad antioxidante total (AAT) expresada como porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasas (PPO) encontrados para las muestras de Aliso 1 y 2, Quishuar 1 y 2, Romerillo 1 y 2 en concentraciones de 10, 100 y 1 000 ppm. Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Pecuarias. ESPOCH, noviembre del 2013.**

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (ppm)</b>	<b><math>\Delta</math> Absorbancia</b>	<b>% Inhibición de la PPO</b>
<b>Blanco</b>	-	0,798	0,00
<b>Aliso 1</b>	10	0,326 $\pm$ 0,1	59,08
	100	0,344 $\pm$ 0,01	56,89
	1 000	0,293 $\pm$ 0,02	63,28
<b>Aliso 2</b>	10	0,345 $\pm$ 0,03	56,70
	100	0,347 $\pm$ 0,00	56,45
	1 000	0,358 $\pm$ 0,02	55,07
<b>Quishuar 1</b>	10	0,333 $\pm$ 0,01	58,20
	100	0,325 $\pm$ 0,00	59,21
	1 000	0,200 $\pm$ 0,07	74,87
<b>Quishuar 2</b>	10	0,344 $\pm$ 0,01	56,89
	100	0,357 $\pm$ 0,01	55,20
	1 000	0,401 $\pm$ 0,01	49,74
<b>Romerillo 1</b>	10	0,334 $\pm$ 0,01	58,14
	100	0,293 $\pm$ 0,01	63,28
	1 000	0,371 $\pm$ 0,01	53,44
<b>Romerillo 2</b>	10	0,277 $\pm$ 0,01	65,28
	100	0,343 $\pm$ 0,05	56,95
	1 000	0,235 $\pm$ 0,06	70,48
<b>Vitamina C</b>	10	0,002 $\pm$ 0,0	99,75
	100	0,000 $\pm$ 0,0	100
	1 000	0,005 $\pm$ 0,0	99,37

N = 3;  $\pm$  DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES.  
p-Valor < 0,05.



\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C. N = 3. p-VALOR < 0,05.

**GRÁFICO No. 4.** Actividad antioxidante expresada por porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasasa de los extractos etanólicos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) en concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Pecuarias. ESPOCH, noviembre del 2013.

En el cuadro No.10 y en el gráfico No.4 se reportan los resultados de la determinación de la Actividad Antioxidante por Inhibición de la Polifenol oxidasa que nos indican a la concentración de 10 ppm el Romerillo 2 presentó el porcentaje más alto de inhibición con 65,28% en comparación al estándar de vitamina C que a la misma concentración alcanzó el 99,75%, seguido por el aliso 1 con 59,08%, Quishuar 1 con 58,2%, Romerillo 1 con 58,14 %, Quishuar 2 con 56,89% y el Aliso 2 con 56,7%. Con el Test de Tukey (Anexo No.10) a nivel de significancia del 95,00 % se estableció que a la concentración de 10 ppm las muestras Romerillo 2 y Vitamina C son estadísticamente diferentes con p-Valor < 0,05. A la concentración de 100 y 1000 ppm la muestra de Vitamina C es estadísticamente diferente con p-Valor < 0,05.

Con la concentración de 100 ppm el Romerillo 1 presenta la mayor capacidad antioxidante con 63,28 % en comparación con la vitamina C de 100 %, seguido por el Quishuar 1 con 59,21 %, el Romerillo 2 con 56,95 %, el Aliso 1 con 56,89 %, El Aliso 2 con 56,45 % y el Quishuar 2 con 55,2 %.

En las muestras con 1000 ppm el mejor porcentaje lo tuvo el Quishuar 1 con 74,87 % frente al de la vitamina C que fue de 99,37 %, seguido por el Romerillo 2 con 70,48 %,

el Aliso 1 con 63,28 %, el Aliso 2 con 55,07 %, el Romerillo 1 con 53,44 % y el Quishuar 2 con 49,74%.

La actividad antioxidante determinada con el método de inhibición de la PPO comparada entre el Aliso 1 y el Aliso 2 es muy parecida, no hay mucha variación siendo el Aliso 1 ligeramente superior al Aliso 2 en actividad antioxidante, concentración de flavonoides totales y en concentración de polifenoles totales, concluyéndose que entre las muestras de *Alnus acuminata* tiene mayor actividad antioxidante la que se encuentra a 2750 m.s.n.m. en la ESPOCH y no la que se encuentra a 3042 m.s.n.m. y se puede analizar que en estos resultados se debe a que en donde se encuentra ubicado la ESPOCH es de clima seco, casi nunca existe niebla, es un ambiente con mayor estrés si lo comparamos con la carretera que conduce a Macas en la que llueve frecuentemente, es húmedo, niebla con frecuencia lo que va a influir en la menor radiación que recibe su vegetación.

La Actividad antioxidante del Quishuar 1 es superior a la obtenida del Quishuar 2 en todas las concentraciones, teniendo el mejor resultado a la concentración de 1000 ppm, la concentración de flavonoides totales es similar entre las dos muestras, la concentración de compuestos fenólicos totales es mayor en el Quishuar 2 que se encuentra a altitud mucho mayor que el Quishuar 1, se concluye que tiene mejor actividad antioxidante la muestra que está a 2750 m.s.n.m. en la ESPOCH que es un lugar más seco, con exposición casi durante todo el día a la radiación UV, tiene mayor estrés ambiental que comparado con el sector de la Casa Cóndor pese a estar a mayor altura tiene precipitaciones frecuentes, un clima cambiante, corrientes de viento, niebla, está atravesado por riachuelos lo que brinda un ambiente con menor estrés para su vegetación y poder soportar de mejor manera la radiación.

Comparando las muestras de *Hypericum laricifolium* existe una diferencia no tan fuerte en la actividad antioxidante siendo mejor la actividad del Romerillo 2, los resultados de la compuestos fenólicos totales son muy parecidos y en los resultados de flavonoides totales es algo superior el Romerillo 1, se puede concluir que es mejor el Romerillo 2 y esto se debe a la altitud de 4342 m.s.n.m. del que proviene en el que soporta condiciones mayores de radiación, fuertes corrientes de viendo, un terreno árido siendo diferente al sector de Las Lagunas de Atillo en el que existen frecuentes precipitaciones, niebla, humedad lo que va a brindar mejores condiciones a la vegetación.

### 3.6 BIOENSAYO DE TOXICIDAD

**CUADRO No. 11. Resultados de número de nauplios vivos en ensayo de biotoxicidad de los extractos etanólicos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) en *Artemia salina*. Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba, enero 2014.**

	1000 ppm			100 ppm			10 ppm		
Blanco	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Aliso 1	0	0	0	9	10	10	10	10	10
Aliso 2	0	0	0	8	10	10	10	10	10
Quishuar 1	0	0	0	9	9	10	10	10	10
Quishuar 2	0	0	0	9	10	10	10	10	10
Romerillo 1	0	0	0	9	8	10	10	10	10
Romerillo 2	0	0	0	9	7	10	10	10	10

\*En cada tubo inicialmente se encontraban 10 nauplios vivos

**CUADRO No. 12. Resultados de concentración letal media de los extractos etanólicos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) en *Artemia salina*. Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba, enero 2014.**

Muestra	CL <sub>50</sub> (ppm)
Aliso 1	33
Aliso 2	34
Quishuar 1	34
Quishuar 2	33
Romerillo 1	36
Romerillo 2	38

Los resultados del cuadro No.11 muestran la sobrevivencia de 29 nauplios de 30 iniciales en la concentración 100 ppm del extracto Aliso 1, mientras que en el extracto de Aliso 2 a concentración de 100 ppm se observó la supervivencia de 28 nauplios de 30 iniciales; en el extracto Quishuar 1 los resultados son de 28 nauplios de 30 iniciales, mientras que en el Quishuar 2 indica la supervivencia de 29 nauplios vivos de 30 iniciales; en el Romerillo 1 existen 27 vivos de 30 nauplios iniciales y en el Romerillo 2 quedan 26 vivos de 30 nauplios iniciales. En el cuadro No.12 se indica la concentración letal media, el Romerillo 2 fue mayor (38 ppm), seguida por el Romerillo 1 (36 ppm), el Aliso 2 y el

Quishuar 1 tuvieron la misma concentración letal media (34 ppm) y por último el Aliso 1 y el Quishuar 2 con la misma concentración letal media (33 ppm), además Stevic, T. et al. (2010) determina una baja toxicidad en los extractos de la corteza de *Alnus incana*.

La toxicidad alta de los extractos etanólicos de Aliso, Quishuar y Romerillo posiblemente se debe a que la *Artemia salina* tiene su hábitat natural en el mar y no está preparada para los compuestos químicos presentes en plantas de altura, que no son naturales en el entorno en el que normalmente se desarrolla la *Artemia salina*. Para la obtención de los resultados se utilizó el arreglo de Reed y Muench, establecido en el arreglo logarítmico para calcular la DL50, usada para disminuir el uso de recursos y animales de experimentación.



## CONCLUSIONES

1. La recolección de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) se realizó en diferentes sitios de la región andina ecuatoriana con alturas diferentes que van desde los 2750 m.s.n.m. hasta los 4342 m.s.n.m.

2. El tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de Aliso (*Alnus acuminata*) identificó triterpenos taninos, lactonas, cumarinas, flavonoides, catequinas, en los extractos de Quishuar (*Buddleja incana*) se identificó aceites, grasas, triterpenos, flavonoides, taninos, azúcares reductores, lactonas, cumarinas, quinonas, catequinas y en los extractos de Romerillo (*Hypericum laricifolium*) se identificó flavonoides, taninos, triterpenos, azúcares reductores, lactonas, cumarinas, catequinas, resinas, aceites grasas y principios amargos.

3. Se preparó los extractos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) dentro de los parámetros de calidad correspondientes.

4. Todas las muestras presentan flavonoides, compuestos fenólicos y actividad antioxidante, no existe una relación entre el contenido de flavonoides, compuestos fenólicos y la actividad antioxidante por lo que un alto contenido de estos compuestos no significa una mayor actividad antioxidante y no depende exclusivamente de la altitud a la que se encuentren las plantas, va a depender de la nubosidad, el tamaño y orientación de sus hojas, precipitaciones.

5. La biotoxicidad de los extractos etanólicos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) frente a *Artemia salina* fueron de Aliso 1 de 33 ppm, Aliso 2 de 34 ppm, Quishuar 1 de 34 ppm, Quishuar 2 de 33 ppm, Romerillo 1 de 36 ppm y Romerillo 2 de 38 ppm.

6. Se determinó la actividad antioxidante de los extractos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) recolectadas a diferentes altitudes, se acepta la hipótesis planteada ya que los extractos de Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum Laricifolium*) poseen actividad antioxidante representativa frente a la vitamina C.

## RECOMENDACIONES

- 1.- Identificar el grupo de compuestos responsables de la actividad antioxidante.
- 2.- Realizar investigaciones en Aliso (*Alnus acuminata*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) por su considerable actividad antioxidante ya que se analizó únicamente un extracto vegetal frente a un metabolito de vitamina C.
- 3.- Para aplicaciones en la industria se recomienda *Alnus acuminata* y *Buddleja incanna* por tener mayor follaje, su hábitat es más accesible y se encuentra en mayores cantidades.

## BIBLIOGRAFÍA

- **ALISO**  
<http://aty.hipatia.net/elgg/andrea/weblog/2342.html>  
2013/09/18
- **ALISO**  
<http://www.ecoviajes.freeservers.com/aliso.htm>  
2013/09/18
- **AMAGUAYO, Samantha.** Elaboración de tabletas adelgazantes a partir de tres plantas existentes en la Provincia de Chimborazo a escala piloto. (Tesis) (Bioq. Farm.). ESPOCH, Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador., 2013, pp. 65-7
- **ANDRADE, Otto.** Factibilidad de cultivo de tres cepas de Artemia (*Artemia salina*) en sistemas de aprovechamiento de sal por evaporación solar. (Tesis). U. E. Maestro Orlando Enrique Rodríguez. Facultad de Biología. San Francisco-Zulia., 2012. pp 6,7.
- **ANTIOXIDANTES**  
<http://www.alimentacionsana.com.ar/actualizaciones/nutraceuticos.htm>  
2013/09/18
- **ANTIOXIDANTES**  
<http://www.salud180.com/salud-z/antioxidantes>  
2013/09/18
- **ANTIOXIDANTES EN SU DIETA**  
<http://geosalud.com/Nutricion/antioxidantes.htm>  
2013/09/18

- **ARBOLES DE LOS ECOSISTEMAS FORESTALES ANDINOS**  
<http://www.infoandina.org/sites/default/files/recursos/Arboles%20de%20los%20ecosistemas%20forestales%20andinos.pdf>  
 2013/09/18
- **ÁVALOS, Adolfo. y otros.** Metabolismo secundario de plantas. (Serie Fisiología Vegetal) (Madrid-España), No. 3, Vol. 2, 2009. pp. 134-135.
- **BENAVIDES, Nathaly. y otros.** Obtención de Extractos de Plantas que Estimulan la Proliferación de una Línea Humana de Células Madre Mesenquimales. (Revista de la Universidad Científica del Sur) (Perú), No. 2, Vol. 8, mayo 2011. pp. 89, 91-92.
- **BERGONZI, María. y otros.** Variability in the Content of the Constituents of *Hypericum perforatum* L. and Some Commercial Extracts. (Drug Development and Industrial Pharmacy) (Italia), No. 6, Vol. 27, julio 2001. pp. 491.
- **BOOTS, Agnes. y otros.** Health Effects of Quercetin: From Antioxidant to Nutraceutical. (European Journal of Pharmacology) (Países Bajos). No. 2-3, Vol. 585. 2008. pp. 325.
- **CALDWELL, Matyn. y otros.** Internal filters: Prospects for UV-acclimation in higher plants. (Physiologia Plantarum), No. 3, Vol. 58, Abril 2006. pp. 445.
- **CONFORTI, Filomena. y otros.** Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. (Fitoterapia) (Italia), No. 6, Vol. 73, octubre 2002. pp. 479.
- **CONSTITUENTS OF *Hypericum laricifolium* AND THEIR CYCLOOXYGENASE (COX) ENZYME ACTIVITIES**  
<http://www.torna.do/s/Constituents-of-Hypericum-laricifolium-and-their-cyclooxygenase-COX-enzyme-activities/>  
 2014/02/10

- **CONSUMO DE HOJAS EN FOLÍVOROS FACULTATIVOS Y AVES NO FOLÍVORAS**  
<http://sao.org.co/publicaciones/boletinsao/20%282%29/NC320%282%29Botero&Garcia.pdf>  
 2013/09/18
- **COULADIS, M. y otros.** Antioxidant and cytotoxic activities of Hypericum sp. on brine shrimps and human cancer cell lines. (Phytotherapy Research), No. 8, Vol. 16, diciembre 2002. pp. 719.
- **CUBA. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. (MINSAP).** Droga Cruda. Métodos de Ensayo. NRSP 309. La Habana - Cuba, 1992. pp. 1-7.
- **CYTED.** Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1996. pp. 63-67.
- **DADÉ, Martín. y otros.** Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). (Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas) (Chile), No. 6, Vol. 8, noviembre 2009. pp. 529.
- **DAGLIA, María. y otros.** In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. (Agricultura and Food Chemistry). No. 5, Vol. 48, mayo 2000. Pp. 1449.
- **Determinación de la Actividad Antifúngica Contra *Candida Albicans* y *Aspergillus Niger* De 10 Plantas Medicinales De 3 Departamentos Del Perú**  
[http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/huamani\\_am/html/sdx/huamani\\_am.html](http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/huamani_am/html/sdx/huamani_am.html)  
 2014/02/10
- **EL ALISO EN LOS SISTEMAS SILVOPASTORILES**  
<http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/56519/56519.pdf>  
 2014/02/10

- **GARCIA, Lourdes. y otros.** Plantas con Propiedades antioxidantes. (Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas) (Habana-Cuba), No. 3, Vol. 20, septiembre 2001. pp. 232-233.
- **GREEN TEA POLYPHENOLIC ANTIOXIDANTS AND SKIN PHOTOPROTECTION**  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11351267>  
 2014/02/10
- **HALLIWELL, Barry. y otros.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. (British Journal of Pharmacology), No. 2, Vol. 142, mayo 2004. pp. 231.
- **HE, J. y otros.** Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on rice and pea plants. (Australian Journal of Plant Physiology), No. 2, Vol. 20, 1993. pp. 129, 142.
- ***Hypericum laricifolium* Juss**  
<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=226484>  
 2014/02/10
- **JACOB, Robert.** Three eras of vitamin C discovery. (Sub-cellular Biochemistry) (New York-United States of América), Vol. 1, No. 25, septiembre 1996. pp. 1,16.
- **KELSEY, Natalie. y otros.** Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. (Molecules) (Denver-Usa), No. 11, Vol. 15, noviembre 2010. pp.792.
- **KIZIL, Göksel. y otros.** Antioxidant Activities of Ethanol Extracts of *Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum scabroides*. (Pharmaceutical Biology) (Turquía-Diyarbakir), No. 4, Vol. 46, Marzo 2012, pp. 231, 232.

- **LA EXCELENCIA DE LOS ANTIOXIDANTES**  
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/33797/1/articulo5.pdf> 2013/09/14  
 2014/02/10
- **LAINES, Graciela.** Estudio del efecto Antidepresivo del extracto Hidroalcohólico de hojas de *Hypericum Laricifolium* (Chinchango) en ratones Albinos. (Tesis) (Bioq. Farm.). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de farmacia y Bioquímica. Lima-Perú., 2010. pp. 4-5.
- **LEE, J. y otros.** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. (Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety), No. 1, Vol. 3, noviembre 2004. pp. 21.
- **LETELIER, M. y otros.** *Buddleja globosa* Hope planta Chilena usada por la medicina nativa principalmente como cicatrizante de heridas y antiinflamatorio. (Blacpma) (Los Ángeles-Chile), No. 6, Vol. 5, 2006. pp. 135.
- **LOPÉZ, Victor. y otros.** Actividad Antioxidante de las Plantas Empleadas en la Medicina Tradicional Navarra. (Fitoterapia) (Pamplona-España), No. 1, Vol. 7, 2007. pp. 43-44.
- **LOS BENEFICIOS ANTIOXIDANTES DE LA RESTRICCIÓN CALORICA, DIETA Y SALUD.**  
<http://nutsade.blogspot.com/2011/02/los-beneficios-antioxidantes-de-la.html>  
 2014/02/10
- **MAYOR, Rosa.** Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. (Revista del Instituto Médico Tropical) (Asunción-Paraguay), No. 2, Vol. 5, 2010. pp. 1-6
- **MIDDLETON, Patricia. y otros.** Antioxidant, Antibacterial Activities and General Toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. (Iranian Journal of Pharmaceutical Research) (Escocia-Aberdeen), Vol.2, mayo 2004. pp. 81-86.



- **MUSHKINA, Olga. y otros.** Activity and total phenolic content of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* leaves. (CTA Scientiarum Polonorum) (Polonia), No. 3, Vol. 12, 2013. pp. 3,4.
- **PALADINO, Silvia.** Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera l.*). (Tesis). (M.Sc. Alim.). Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza-Argentina., 2011. pp. 12-15.
- **PALOMINO, Lady. y otros.** Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia Colombia. (VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica) (Medellín-Colombia), No. 3, Vol. 16, septiembre 2009. pp. 1-8.
- **PAN, Yingming. y otros.** Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. (Food Chemistry) (China), No. 2, Vol. 121, 2010. pp. 497–500.
- **PEDREÑO, Yolanda.** Los antioxidantes polifenólicos, un complemento alimenticio saludable. (Revista Eubacteria) (Murcia-España), No. 28, abril 2012. pp. 1-4.
- **PLANTAS MEDICINALES ECUADOR**  
<http://www.institutoesculapio.edu.ec/category/70-fitoterapia.html?download=231>  
2014/02/10
- **POMA, Emilio. y otros.** Diferentes efectos sobre la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos por extractos de *Buddleia incana*. (Revista Científica Universidad Científica del Sur) (Lima-Perú), No. 2, Vol. 6, 2009. pp. 137-138.
- **RESVERATROL UN ANTIOXIDANTE NATURAL**  
<http://suite101.net/article/resveratrol-antioxidante-natural-a43825>  
2014/02/10
- **REYES, Abigail. y otros.** Antioxidantes: La magia de lo natural. (Revista Académica de Investigación Tlatemoani) (San Luis Potosí - México), No. 8, 2011. pp. 7-8.

- **SALAMA, Ahmed. y otros.** Composición química y actividad abortiva de las hojas de *Alnus acuminata*. (Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Bioquímicas) (Colombia-Bogota), No. 17, 1989. pp. 51.
- **SÁNCHEZ, Angel. y otros.** La Fruta Granada Cultivada en España. Murcia-España, La Alberca. 2011, pp. 10-11.
- **SÁNCHEZ, Isidoro. y otros.** La Diversidad Biológica en Cajamarca. Cajamarca-Perú, Visual. 2012, pp. 109.
- **SAZ, Pablo. y otros.** Monográfico de *Hypericum perforatum* L. (Medicina naturista) (España), No. 2, Vol. 4, 2010. pp. 59.
- **SIES, Helmut.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. (Experimental Physiology), No. 2, Vol. 82, marzo 1997. pp. 291.
- **STEVENS, Neil.** La Coenzima Q10. Buenos Aires-Argentina, Sirio S. A, 1998, pp. 21.
- **STEVIC, Tatjana. y otros.** Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activity of *Alnus incana* (L.) ssp. *incana* Moench and *A. viridis* (Chaix) DC ssp. *viridis* Extracts. (Journal of Medicinal Food), No. 3, Vol. 13, junio 2010. pp. 700-701.
- **THE ANALYSIS OF FLAVONOIDS FROM INDIGENOUS SPECIES OF BETULACEAE.**  
<http://www.revistafarmacia.ro/20085/issue52008art11.html#Top>  
 2014/02/07
- **VITICULTURA DE CALIDAD: FACTORES QUE AFECTAN AL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS**  
[http://www.acenologia.com/ciencia59\\_1.htm](http://www.acenologia.com/ciencia59_1.htm)  
 2014/02/07

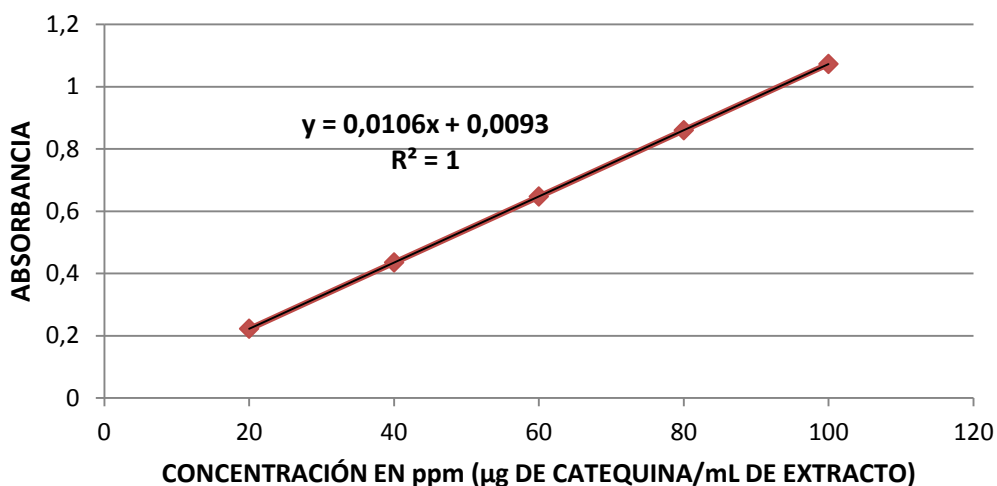
- **WAGNER, Hidebert.** Plant Drug Analysis. 2a. ed. Munich-Alemania, Springer. 1996, pp. 195-210.
- **WOLF, George.** The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. (The Journal of Nutrition), No. 3, Vol. 135, marzo 2005. pp. 363-366.
- **ZHELEVA, Dimitrina. y otros.** Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from *Hypericum* species growing in Bulgaria. (Pharmacognosy Magazine) (India-Mumbai), No. 22, Vol. 6. abril 2010. pp. 74-75.
- **ZOU, Yanping. y otros.** Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro. (Journal of Agricultural and Food Chemistry) (Shanghai-China), No. 16, Vol. 52, 2004. pp. 5032.

## ANEXOS

**ANEXO No. 1. ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE CATEQUINA COMO PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES.**

**CUADRO No. 13. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES USANDO CATEQUINA COMO PATRÓN EN CONCENTRACIONES DE 20, 40, 60, 80 Y 100 PPM. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.**

Concentración (ppm)	Absorbancia a 510 nm
20	0,222
40	0,435
60	0,647
80	0,860
100	1,073

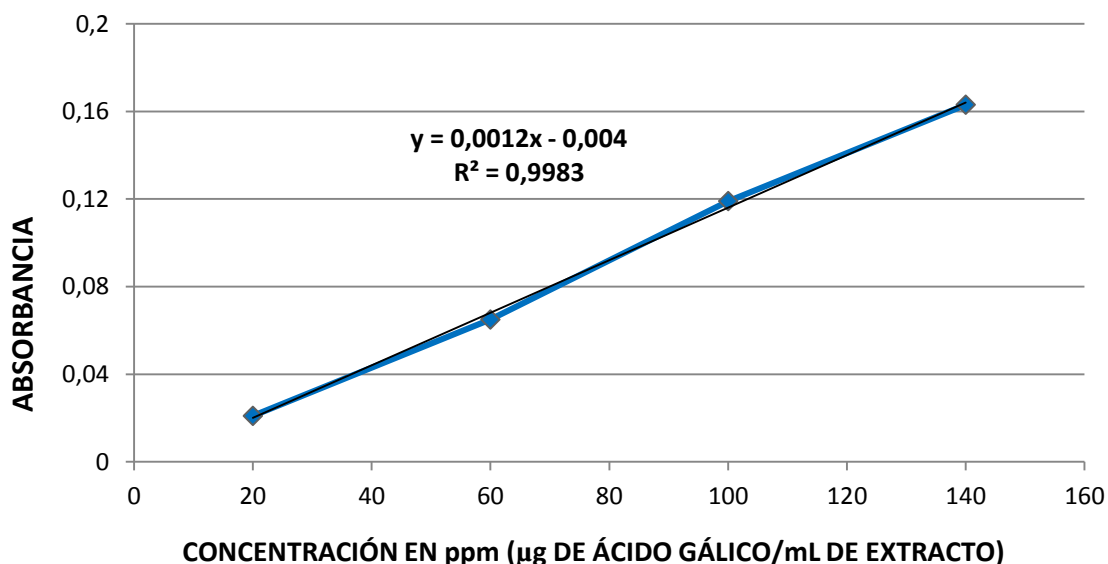


**GRÁFICO No. 5. CURVA DE ABSORBANCIA VS CONCENTRACIÓN DE RUTINA EN CONCENTRACIONES DE 20, 40, 60, 80 Y 100 PPM, PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.**

**ANEXO No. 2. ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.**

**CUADRO No. 14. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES USANDO ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN EN CONCENTRACIONES DE 20, 60, 100 Y 140 PPM. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.**

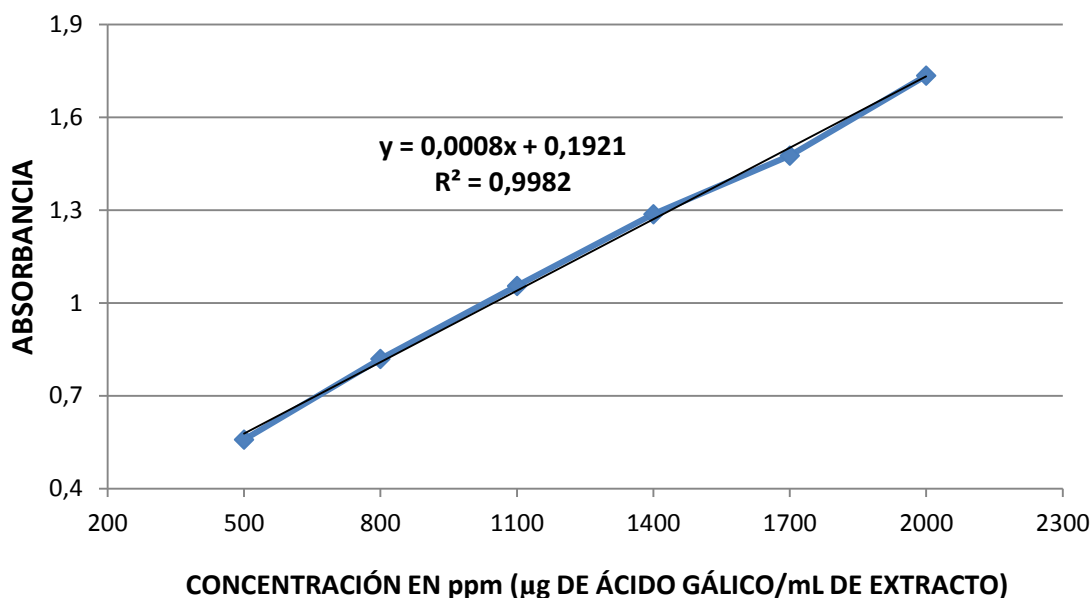
Concentración (ppm)	Absorbancia a 765 nm
20	0,021
60	0,065
100	0,119
140	0,163



**GRÁFICO No. 6. CURVA DE ABSORBANCIA VS CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO EN CONCENTRACIONES DE 20, 60, 100 Y 140 PPM, PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.**

**CUADRO No. 15. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES USANDO ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN EN CONCENTRACIONES DE 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 Y 2 000 PPM. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.**

Concentración (ppm)	Absorbancia a 765 nm
500	0,558
800	0,819
1 100	1,055
1 400	1,287
1 700	1,476
2 000	1,735



**ANEXO No. 3. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.**

---



---

**ALISO**

---



---

**QUISHUAR**

---



---

**ROMERILLO**

---

**FOTOGRAFÍA No. 5. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.**

**ANEXO No. 4. SECADO DE LAS MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.**

---



**SECADO**



**MUESTRA DE ALISO**



**PESADO DE LA MUESTRA**



**MUESTRA Y SOLVENTE**



**MACERACIÓN DEL EXTRACTO**



**SECADO LUEGO DE LA  
EXTRACCIÓN**

---

**FOTOGRAFÍA No. 6. SECADO DE LAS MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.**



**ANEXO No. 5. CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.**

---



**HUMEDAD**



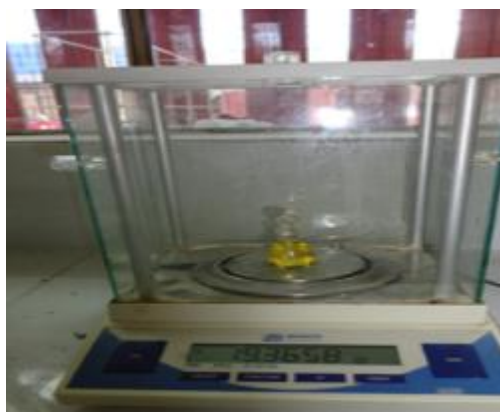
**CENIZAS TOTALES**



**CENIZAS SOLUBLES EN H<sub>2</sub>O E  
INSOLUBLES EN HCl**



**ÍNDICE DE REFRACCIÓN**



**DENSIDAD RELATIVA**



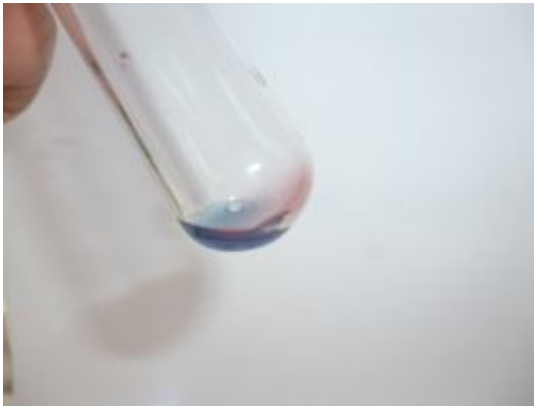
**pH**

---

**FOTOGRAFÍA No. 7. CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.**

**ANEXO No. 6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETÉREO, ETANÓLICO Y ACUOSO.**

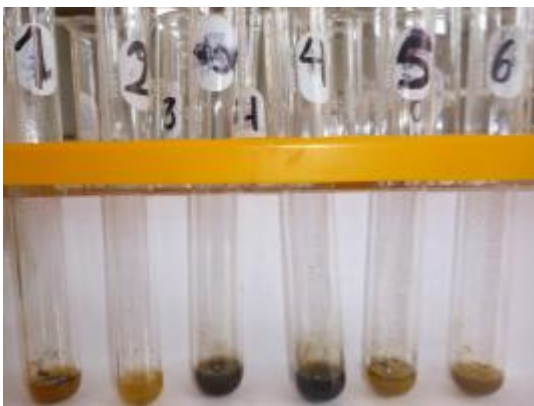
---



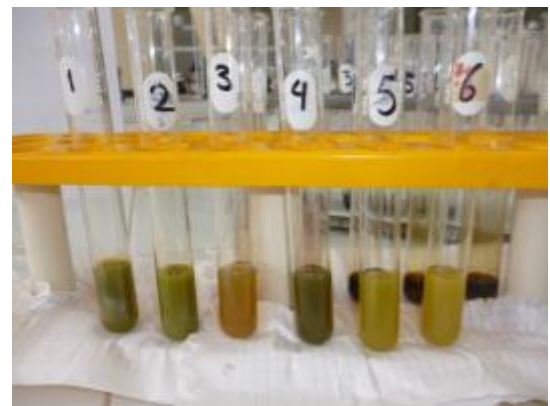
**ENSAYO DE FEHLING**



**ENSAYO DE SHINODA**



**ENSAYO DE ALCALOIDES**



**ENSAYO DE RESINAS**



**ENSAYO DE LIEBERMAN**



**ENSAYO DE SUDÁN**

**FOTOGRAFÍA No. 8. ENSAYOS REALIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN LOS EXTRACTOS.**

**ANEXO No. 7. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES TOTALES.**

---



**PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**



**ENSAYO DE FOLIN-CIOCALTEAU**



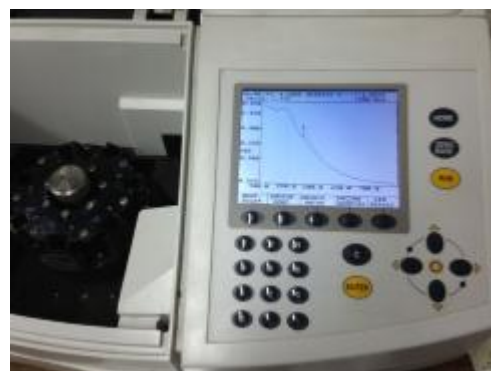
**PATRÓN DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN**



**ENSAYO DE  $AlCl_3$**



**PATRÓN DE RUTINA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN**



**MEDICIÓN DE LA ABSORVANCIA A 765 nm PARA FOLIN Y 520 nm PARA  $AlCl_3$**

**FOTOGRAFÍA No. 9. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU Y  $AlCl_3$ .**

**ANEXO No. 8. EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA PPO.**

---



**PESADO DE LA MANZANA**



**OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE LA MANZANA**



**FILTRACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO**



**REFRIGERACIÓN A -6 °C**

**FOTOGRAFÍA No. 10. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE LA PPO.**

**ANEXO No. 9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

---



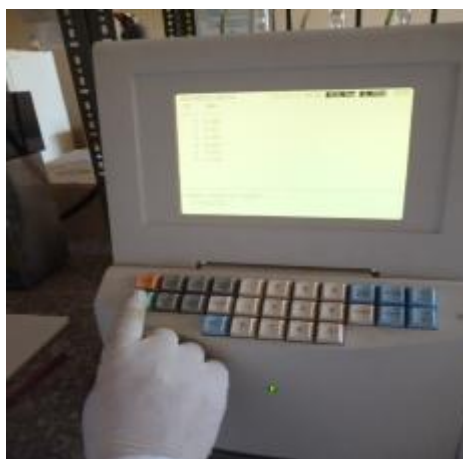
**PRERARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

**OBTENCIÓN DE LAS DILUCIONES**



**DILUCIONES A 10, 100 Y 1 000 ppm**

**LECTURA EN EL UV**



**MEDICION A 420 nm**

**FOTOGRAFÍA No. 11. MÉTODO DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA.**

**ANEXO No. 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE ALISO, QUISHUAR Y ROMERILLO. PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS 19. SOFTWARE LIBRE.**

**CUADRO No. 16. Resultado del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 10 ppm. Programa estadístico Spss 22.**

**ANOVA**

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A 10 ppm

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4405,339	6	734,223	199,427	,000
Dentro de grupos	51,543	14	3,682		
Total	4456,882	20			

**CUADRO No. 17. Resultados de la comparación múltiple de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 10 ppm aplicando la prueba Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.**

**PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A 10 ppm**

HSD Tukey<sup>a</sup>

TIPOS DE MUESTRAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
ALISO 2	3	56,7033		
QUISHUA2	3	56,8933		
ROMERIL1	3	58,1433		
QUISHUA1	3	58,3400		
ALISO 1	3	59,0867		
ROMERIL2	3		65,2900	
VIT C	3			99,7500
Sig.		,729	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**CUADRO No. 18. Resultados del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 100 ppm. Programa estadístico Spss 22.**

**ANOVA**

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A 100 ppm

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4662,750	6	777,125	105,241	,000
Dentro de grupos	103,380	14	7,384		
Total	4766,130	20			

**CUADRO No. 19. Resultado de la comparación múltiple de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 100 ppm aplicando la prueba Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.**

**PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A 100 ppm**

HSD Tukey<sup>a</sup>

TIPOS DE MUESTRAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
QUISHUA2	3	55,1967		
ALISO 2	3	56,4500	56,4500	
ALISO 1	3	56,8900	56,8900	
ROMERIL2	3	56,9500	56,9500	
QUISHUA1	3	59,2067	59,2067	
ROMERIL1	3		63,2800	
VIT C	3			100,0000
Sig.		,564	,090	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**CUADRO No. 20. Resultado del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 1000 ppm. Programa estadístico Spss 22.**

**ANOVA**

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A 1000 ppm

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5274,814	6	879,136	35,052	,000
Dentro de grupos	351,135	14	25,081		
Total	5625,948	20			

**CUADRO No. 21. Resultado de la comparación múltiple de los extractos etanólicos vs la vitamina C a concentración de 1000 ppm aplicando la prueba Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.**

**PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A 1000 ppm**

HSD Tukey<sup>a</sup>

TIPOS DE MUESTRAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
QUISHUA2	3	49,7500		
ROMERIL1	3	53,4467		
ALISO 2	3	55,0733		
ALISO 1	3	63,2800	63,2800	
ROMERIL2	3		70,4900	
QUISHUA1	3		74,8733	
VIT C	3			99,3700
Sig.		,060	,136	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**ANEXO No. 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES, COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE ALISO, QUISHUAR Y ROMERILLO. PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS 19. SOFTWARE LIBRE.**

**CUADRO No. 22. Resultado del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de la concentración de compuestos fenólicos totales de los extractos etanólicos. Programa estadístico Spss 22.**

**ANOVA**

**CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	10067412,240	5	2013482,448	9820,202	,000
Dentro de grupos	2460,417	12	205,035		
Total	10069872,656	17			



**CUADRO No. 23. Resultado de la comparación múltiple de la concentración de compuestos fenólicos totales de los extractos etanólicos aplicando la prueba Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.**

**CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES**

HSD Tukey<sup>a</sup>

TIPOS DE MUESTRAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
QUISHUA1	3	2747,3700				
ROMERIL1	3		4594,4533			
QUISHUA2	3			4740,2867		
ALISO 2	3			4771,1200	4771,1200	
ALISO 1	3				4799,4533	4799,4533
ROMERIL2	3					4817,7867
Sig.		1,000	1,000	,161	,222	,632

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**ANEXO No. 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES, COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE ALISO, QUISHUAR Y ROMERILLO. PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS 19. SOFTWARE LIBRE.**

**CUADRO No. 24. Resultado del análisis de la varianza Anova con un factor, con un nivel de significancia de 0.05 % de la concentración de flavonoides totales de los extractos etanólicos. Programa estadístico Spss 22.**

**ANOVA**

**CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	42958,562	5	8591,712	1616,199	,000
Dentro de grupos	63,792	12	5,316		
Total	43022,354	17			

**CUADRO No. 25. Resultado de la comparación múltiple de la concentración de flavonoides totales de los extractos etanólicos aplicando la prueba Hsd de Tukey con nivel de significancia 0,05 %. Programa estadístico Spss 22.**

**CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES**

HSD Tukey<sup>a</sup>

TIPOS DE MUESTRAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
ALISO 2	3	290,2800			
ALISO 1	3	293,1100			
QUISHUA1	3		363,8600		
ROMERIL2	3			378,0100	
QUISHUA2	3			382,7300	
ROMERIL1	3				425,1800
Sig.		,669	1,000	,196	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.