



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE DOCE ESPECIES VEGETALES NATIVAS DEL SUR DEL ECUADOR: *Adiantum poiretti* (Culantrillo), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuna eggersii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa), *Verbena litoralis* (Verbena), *Justicia colorata* (Insulina), *Oreocalix grandiflora* (Cucharillo), *Baccharis genistelloides* (Tres filos), *Artocarpus altilis* (Fruto del pan), *Costus comosus* (Caña agria), *Piper crassinervium* (Guabiduca) y *Croton wagneri* (Mosquera).

Tesis previa a la obtención del
Título de Ingeniera Química

AUTORA:

Zayda Lorena Burneo Palacios

DIRECTORA:

Ing. Ximena Verónica Jaramillo Fierro

Loja – Ecuador

2009



CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN

Ing.

Ximena Jaramillo.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Investigación: **“Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del Sur del Ecuador: *Adiantum poiretti* (Culantrillo), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuna eggertii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa), *Verbena litoralis* (Verbena), *Justicia colorata* (Insulina), *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo), *Baccharis genistelloides* (Tres filos), *Artocarpus altilis* (Fruto del pan), *Costus comosus* (Caña agria), *Piper crassinervium* (Guabiduca) y *Croton wagneri*”** realizado por la egresada Zayda Lorena Burneo Palacios, ha sido revisado y se ajusta a los requisitos legales exigidos por la Escuela de Ingeniería Química, por lo que autorizo su presentación.

Loja, Octubre de 2009

Ing. Ximena Jaramillo Fierro

DIRECTORA DE TESIS



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA

AUTORIA

Las ideas, conceptos y contenidos vertidos en la presente investigación son de responsabilidad exclusiva de la autora.

Zayda Lorena Burneo Palacios



DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a la memoria de mi padre quien con inmensa sabiduría siempre supo darme ejemplo de perseverancia y dedicación.

A mi madre por su apoyo, cariño y bondad incondicional;

A mi tierno y amado hijito, por llenar de alegría y ternura mi vida;

A mi esposo por brindarme su apoyo e incentivo incondicional;

A mis hermanos y sobrinos.

Lorena



AGRADECIMIENTO

Le doy gracias infinitas a Dios por guiar mis pasos en cada momento de mi vida.

Mi sincero agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja, que a través de la Planta de Productos Naturales, facilitó los medios necesarios para realizar mi proyecto de Tesis.

A todos y cada uno de los docentes investigadores y becarios que forman parte del Instituto de Química Aplicada, quienes me brindaron su apoyo incondicional para la culminación de este trabajo.

Mi gratitud a mi directora de tesis Ing. Ximena Jaramillo Fierro, quien supo brindarme su orientación, apoyo y amistad durante todo este proceso.

Al Laboratorio de Química Instrumental, de manera especial al Ing. Geovanny Figueroa y al Centro de Biología Celular y Molecular en la persona del Ing. Francisco Gordillo por facilitarme el uso de equipos para el desarrollo del presente trabajo.

A la Escuela de Ingeniería Química, así como a todo el personal docente que a lo largo de mi formación profesional supieron brindarme sus enseñanzas, consejos, así como un constante estímulo de superación.

A todos mis compañeros con los que compartí mi vida estudiantil, especialmente a Cisne, por haberme brindado siempre su apoyo.



CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Zayda Lorena Burneo Palacios, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Loja, Octubre de 2009

Zayda Lorena Burneo Palacios

C.I. 1103649289



ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	I
AUTORÍA.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
CESIÓN DE DERECHOS.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	XII
CAPITULO I. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROYECTO	1
Introducción.....	2
Justificación.....	4
Objetivos de la Investigación.....	5
Fin del proyecto.....	5
Hipótesis de trabajo.....	6
Diseño experimental.....	6
CAPITULO II. DESCRIPCIÓN BIBLIOGRAFICA	7



2.1	Historia de los Antioxidantes.....	8
2.2	Los Antioxidantes y las Reacciones de Oxidación.....	8
2.2.1	Antioxidantes primarios.....	9
2.2.2	Antioxidantes secundarios.....	9
2.2.3	Antioxidantes terciarios.....	9
2.3	Especies reactivas del oxígeno (ROS) y Radicales libres.....	9
2.4	Antioxidantes vegetales.....	11
2.5	Especies vegetales en Estudio.....	12
2.5.1	<i>Neonelsonia acuminata</i> (Zanahoria blanca).....	13
2.5.2	<i>Siparuna eggersii</i> (Monte de oso).....	14
2.5.3	<i>Ilex guayusa</i> (Guayusa).....	15
2.5.4	<i>Piper crassinervium</i> (Guabiduca).....	16
2.5.5	<i>Croton wagneri</i> (Mosquera).....	17
2.5.6	<i>Baccharis genistelloides</i> (Tres fillos).....	18
2.5.7	<i>Costus comosus</i> (Caña agria).....	19
2.5.8	<i>Verbena litoralis</i> (Verbena).....	20
2.5.9	<i>Oreocallis grandiflora</i> (Cucharillo).....	21
2.5.10	<i>Artocarpus altilis</i> (Fruto del Pan).....	22
2.5.11	<i>Adiantum poiretti</i> (Culantrillo).....	23
2.5.12	<i>Justicia colorata</i> (insulina).....	24
	CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL	25



3.1	Área de Recolección.....	26
3.2	Obtención de los Extractos.....	26
3.3	Determinación de Actividad Antioxidante.....	28
	3.3.1 Método DPPH.....	28
	3.3.2 Método TEAC.....	29
3.4	Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales.....	30
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		31
4.1	Análisis Estadístico.....	32
4.2	Discusión General.....	33
	4.2.1 Evaluación de la Actividad Antioxidante por los métodos DPPH Y TEAC.....	33
	4.2.1.2 Comparación de Resultados de IC ₅₀ de los extractos Metanólicos.....	34
	4.2.2 Contenidos de Compuestos Fenólicos totales (CFT) de los Extractos metanólicos.....	35



CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.1 Conclusiones.....	39
5.2 Recomendaciones.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41
ANEXOS.....	45



INDICE DE FIGURAS

Figura.1	Fotografía de <i>Neonelsonia acuminata</i> , tomada del Herbario de la Planta de Productos Naturales. UTPL.....	13
Figura.2	Fotografía de <i>Siparuna eggersii</i> , tomada del Herbario de la Planta de Productos Naturales. UTPL.....	14
Figura.3	Fotografía de <i>Ilex guayusa</i> , tomada en la zona de recolección.....	15
Figura.4	Fotografía de <i>Piper crassinervium</i> , tomada en la zona de recolección.....	16
Figura.5	Fotografía de <i>Croton wagneri</i> , tomada en la zona de recolección.....	17
Figura.6	Fotografía de <i>Baccharis genistelloides</i> , tomada en la zona de recolección.....	18
Figura.7	Fotografía de <i>Costus comosus</i> , tomada en la zona de recolección.....	19
Figura.8	Fotografía de <i>Verbena litoralis</i> , tomada en la zona de recolección.....	20
Figura.9	Fotografía de <i>Oreocallis grandiflora</i> , tomada en la zona de recolección.....	21
Figura.10	Fotografía de <i>Artocarpus Altilis</i> , tomada en la zona de recolección.....	22
Figura.11	Fotografía de <i>Adiantum poiretti</i> , tomada en la zona de recolección.....	23
Figura.12	Fotografía de <i>Justicia Colorata</i> , tomada en la zona de recolección.....	24
Figura.13	Diagrama de flujo del proceso de obtención de extractos totales.....	27



Figura.14	Comparación de los valores IC_{50} (ug/ml) obtenidos mediante los métodos DPPH y TEAC.....	35
Figura.15	Contenido de Compuestos Fenólicos Totales (CFT).....	36



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (ROS).....	10
Tabla 2.	Lugares de recolección de las especies vegetales en estudio.....	26
Tabla 3.	Valores IC ₅₀ (ug/ml) de la actividad antioxidante mediante el método DPPH.....	34
Tabla 4.	Valores IC ₅₀ (ug/ml) de la actividad antioxidante mediante el método TEAC.....	34
Tabla 5.	Valores GAEs/gE a partir del ensayo CFT.....	36



RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de 12 plantas usadas en la medicina tradicional, a través de los ensayos de decoloramiento del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrihidracilo) y ABTS* (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico); y el contenido de fenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteu, las especies evaluadas fueron: *Adiantum poiretti* (Culantrillo), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuna eggersii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa), *Verbena litoralis* (Verbena), *Justicia colorata* (Insulina), *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo), *Baccharis genistelloides* (Tres filis), *Artocarpus altilis* (Fruto del pan), *Costus comosus* (Caña agria), *Piper crassinervium* (Guabiduca) y *Croton wagneri* (Mosquera).

Se realizó una comparación con los estándares respectivos DPPH (α -Tocoferol); ABTS (TROLOX) y para fenoles totales (ácido gálico), los resultados de la actividad antioxidante indican que todos los extractos fueron capaces de captar radicales DPPH y ABTS de una manera dependiente de la concentración de tal manera que se obtuvieron resultados comparables en ambos métodos. Sin embargo, los extractos metanólicos que mejor respuesta dieron tanto para DPPH y TEAC, con un nivel de confianza del 95% fueron: *Verbena litoralis*, *Oreocallis grandiflora*, *Siparuna eggersii* e *Ilex guayusa*, mientras que *Justicia colorata*, *Adiantum poiretti*, *Neonelsonia acuminata* y *Artocarpus altilis*, *Baccharis genistelloides*, *Costus comosus*, *Croton wagneri* y *Piper crassinervium* muestran una actividad antioxidante inferior.

Las plantas con compuestos fenólicos más altos a un nivel de confianza del 95%, fueron: *Oreocallis grandiflora*, *Verbena litoralis*, *Siparuna eggersii*, e *Ilex guayusa*, mientras que *Croton wagneri*, *Neonelsonia acuminata*, *Artocarpus Altilis* y *Adiantum poiretti*, obtuvieron niveles de compuestos fenólicos moderados; y, *Justicia colorata*, *Costus comosus*, *Baccharis genistelloides* y *Piper crasinervium*, las especies que tuvieron los valores más bajos.

Los resultados obtenidos muestran que salvo escasas excepciones la actividad antioxidante se relaciona muy bien con el contenido de fenoles totales en las especies vegetales objeto del presente estudio.

La actividad antioxidante de cada tipo de planta fue expresada como Concentración Inhibitoria Media (IC_{50}) y el contenido de fenoles totales en equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (GAEs/gE). Estos valores muestran la potencialidad de los extractos como agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de daños causados por estrés oxidativo.

Palabras clave: Especies vegetales, DPPH, TEAC, Folin-Ciocalteu.



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA

CAPITULO I

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROYECTO



INTRODUCCIÓN

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.^[1] Esto se produce debido a que los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado con capacidad de aparearse, por lo que son muy reactivos, por lo tanto, recorren nuestro organismo intentando robar un electrón de las moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica y lograr su función específica en la célula. La vida biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un estrés oxidativo que puede conducir a diversas enfermedades, tales como envejecimiento, problemas del sistema cardiovascular (arterosclerosis), problemas en el sistema nervioso, daño genético (mutaciones y cánceres)^[2,4]

Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas y su papel principal es terminar con las reacciones de oxidación e inhibir otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Algunas de las sustancias antioxidantes naturales más conocidas son el β -caroteno (pro-vitamina A), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina E (α -tocoferol), el selenio, etc.^[2]

Las evidencias epidemiológicas que asocian el consumo de vegetales y frutas con una menor incidencia de enfermedades crónicas, junto con la mayor preocupación de los consumidores por mantener un estado de salud adecuado, están llevando a las industrias alimentarias a diseñar alimentos funcionales que supongan un aporte extra de estos antioxidantes naturales.^[3]

Muchos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos de origen vegetal se atribuyen en gran medida a la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos los mismos que constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, en donde desempeñan diversas funciones fisiológicas como intervenir en el crecimiento y reproducción de las plantas y en procesos defensivos frente a patógenos, predadores y radiación ultravioleta. La actividad antioxidante de estos compuestos fenólicos radica en la gran facilidad que poseen para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre.^[9]

Numerosos son los métodos que permiten valorar la capacidad antioxidante de una sustancia; sin embargo, debido a la complejidad de los procesos de oxidación y antioxidación, no existe un único método de prueba capaz de reflejar de forma



completa todo el perfil antioxidante de la sustancia, es por ello que en el presente trabajo de investigación se experimentó con algunos de los métodos más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante, así tenemos: los métodos de decoloración DPPH y TEAC que se usan para determinar antioxidantes secundarios mediante el secuestro de los radicales de prueba DPPH y ABTS, respectivamente; y, el método de Folin-Ciocalteu para cuantificar el contenido de compuestos fenólicos en una sustancia.^[4]



JUSTIFICACIÓN

La importancia de investigar especies vegetales se desprende de su uso tradicional. En efecto, la Medicina Tradicional (MT) constituye una fuente primaria para el mantenimiento de la salud. Gran parte de la MT se fundamenta en el uso de extractos vegetales o de sus componentes activos; es por esto que en la actualidad ha tomado mucha fuerza el estudio de su respectiva actividad biológica, especialmente antioxidante luego de descubrir que muchas enfermedades se presentan, en forma asociada, a estados de estrés oxidativo. ^[7,8,9]

El uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva, particularmente como tratamiento para accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas. Los antioxidantes también son ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos con la esperanza de mantener la salud y de prevenir enfermedades tales como el cáncer y la cardiopatía isquémica. Otras aplicaciones a nivel industrial son en forma de conservantes de alimentos y cosméticos y en la prevención de la degradación del caucho y la gasolina. ^[12,13,14]

Numerosos estudios en el mundo, muestran que las plantas son fuente importante de compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos, carotenoides, etc.) es por ello que la Universidad Técnica Particular de Loja (Ecuador) a través de la Planta de Productos Naturales (PPN) busca potenciar el conocimiento milenario de la Región Sur del Ecuador estudiando especies de amplia distribución en el campo de la medicina tradicional en general. Respecto a la evaluación de la actividad antioxidante en la PPN ya se ha realizado una primera determinación de la capacidad antioxidante de los extractos totales de 7 especies vegetales mediante los métodos DPPH y TEAC ^[15] obteniéndose, en varias especies, resultados promisorios que nos llevan a continuar con su investigación fitoquímica y de bioactividad.

Con este preámbulo se ha creído conveniente, para el presente trabajo de investigación, estudiar el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante de estas doce especies vegetales ampliamente utilizadas en la Medicina Tradicional del Sur del Ecuador.



1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante a partir de los extractos totales de doce especies vegetales del Sur del Ecuador: *Adiantum poiretti* (Culantrillo), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuna eggersii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa), *Verbena litoralis* (Verbena), *Justicia colorata* (Insulina), *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo), *Baccharis genistelloides* (Tres filos), *Artocarpus altilis* (Fruto del pan), *Costus comosus* (Caña agria), *Piper crassinervium* (Guabiduca) y *Croton wagneri* (Mosquera).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el contenido de compuestos fenólicos de los extractos totales de doce especies vegetales a través del método de Folin Ciocalteu.
- Determinar la capacidad antioxidante secundaria (interruptora) de los extractos totales de doce especies vegetales a través del método DPPH.
- Determinar la capacidad antioxidante secundaria (interruptora) de los extractos totales de doce especies vegetales a través del método TEAC.

1.3 FIN DEL PROYECTO

El presente trabajo de investigación fue realizado con la finalidad de aportar datos al conocimiento científico en el campo médico y la industria farmacéutica acerca del contenido de compuestos fenólicos totales y de la capacidad antioxidante, esta última expresada en términos de IC₅₀ (Concentración Inhibitoria Media), de los extractos totales de doce especies vegetales usadas en la medicina tradicional de varias comunidades de la Región Sur del Ecuador: *Adiantum poiretti* (Culantrillo), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuna eggersii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa), *Verbena litoralis* (Verbena), *Justicia colorata* (Insulina), *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo), *Baccharis genistelloides* (Tres filos), *Artocarpus altilis* (Fruto del pan), *Costus comosus* (Caña agria), *Piper crassinervium* (Guabiduca) y *Croton wagneri* (Mosquera), procurando de esta manera su aprovechamiento sustentable.



1.4 HIPÓTESIS DEL TRABAJO

H₀₁: Los extractos de las especies vegetales en estudio NO tienen compuestos fenólicos

H₀₂: Los extractos de las especies vegetales en estudio NO tienen capacidad antioxidante secundaria.

H₁₁: Los extractos de las especies vegetales en estudio SI tienen compuestos fenólicos

H₁₂: Los extractos de las especies vegetales en estudio SI tienen capacidad antioxidante secundaria.

1.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

El contenido de compuestos fenólicos totales fue determinado con base a la curva estándar previamente establecida con ácido gálico. Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó un Diseño Simple al Azar teniendo como variable independiente la concentración del extracto, y como variable dependiente la capacidad antioxidante de los extractos, expresada como porcentaje. Ambas variables de estudio nos permitieron realizar una comparación de todos los resultados obtenidos y determinar el IC₅₀, es decir la concentración del antioxidante requerida para inhibir el 50% de la actividad de los radicales de prueba.

Repeticiones Concentración	R ₁	R ₂	R ₃	Total de concentraciones (Y _i .)
C ₁	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y ₁
C ₂	Y ₂₁	Y ₂₂	Y ₂₃	Y ₂
C ₃	Y ₃₁	Y ₃₂	Y ₃₃	Y ₃
C ₄	Y ₄₁	Y ₄₂	Y ₄₃	Y ₄
C ₅	Y ₅₁	Y ₅₂	Y ₅₃	Y ₅
Σ (Y _{.j})	Y _{.1}	Y _{.2}	Y _{.3}	Y _{..}



CAPÍTULO II

Descripción Bibliográfica



2.1 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.^[30]

Las primeras investigaciones sobre el rol de los antioxidantes en biología se centro 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.^[31]

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.^[32]

2.2 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 oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores (Ej: tioles, polifenoles).^[3]

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.^[33]



El sistema anti-oxidante contiene tres grupos principales de antioxidantes: primarios, secundarios y terciarios.

2.2.1 Anti-oxidantes 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:

- Superóxido dismutasa (SOD): convierte O_2 en peróxido de hidrógeno.
- Glutatión peroxidasa (GPx): convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres.
- Proteínas de unión a metales (Ferritina, Ceruloplasmina): Limitan la disponibilidad de Fe necesaria para formar el radical OH.

2.2.2 Antioxidantes secundarios:

Capturan los radicales evitando las reacciones en cadena, por ejemplo: Vitamina E (α -tocoferol), Vitamina C (ascorbato), β -caroteno, Ácido úrico, Bilirrubina, Albúmina.

2.2.3 Antioxidantes terciarios:

Reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Incluyen enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

2.3 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS) Y RADICALES LIBRES

El término especies reactivas del oxígeno (ROS) es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo HClO, HBrO, O_3 , ONOO⁻, 1O_2 , o H_2O_2 .³⁵ La Tabla# 1 resume las principales especies reactivas del Oxígeno:



Tabla 1. Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (ROS)

Radicales		No radicales	
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$
Hidroperoxilo	$\text{HOO}\cdot$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Superóxido	$\text{O}_2\cdot^-$	Ácido hipocloroso	HClO
Peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	Ácido nitroso	HNO_2
Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$	Catión nitrilo	NO_2^+
Dióxido de nitrógeno	$\text{NO}_2\cdot$	Peroxinitrito	ONOO^-
		Ácido peroxinitroso	ONOOH
		Alquil peroxinitritos	ROONO
		Ozono	O_3
		Ácido hipobromoso	HBrO

Fuente: Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture

Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen uno o más electrones desapareados lo cual los hace altamente inestables y reactivos³⁵. Estos radicales recorren nuestro organismo intentando robar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica mediante reacciones de óxido-reducción.^[36]

Una vez que el RL ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un nuevo RL, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida biológica media del RL es de microsegundos; pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a las moléculas y a las membranas celulares.^[36]

Ante la presencia de radicales libres, el organismo debe neutralizarlos y defenderse, para así evitar la lesión de los tejidos. El problema propiamente dicho, aparece cuando la concentración de estos radicales libres es muy elevada, ya que cuando los mismos se encuentran presentes en el organismo en cantidades adecuadas aportan algunos



beneficios, como ser: la lucha contra bacterias y virus, regulación de la estructura y función de las proteínas, control del tono muscular, etc.^[37]

Las consecuencias del exceso de radicales libres en el organismo, afectan directamente nuestro estado de salud favoreciendo el envejecimiento prematuro y problemas en el sistema cardiovascular y nerviosos, entre otros.^[37]

Existen dos tipos de fuentes de radicales libres:

INTERNOS:

- Ejercicio muy intenso,
- Estrés,
- Algunos procesos metabólicos.

EXTERNOS:

- Mala dieta (mala alimentación)
- Consumo de tabaco,
- Consumo de alcohol,
- Ciertos medicamentos,
- Contaminación,
- Exceso de exposición solar.

2.4 ANTIOXIDANTES VEGETALES

El estudio científico de las plantas medicinales ha contribuido en gran medida a un mejor conocimiento de las propiedades químicas, físicas y biológicas que éstas poseen, permitiendo determinar las concentraciones adecuadas o los componentes directamente responsables de la funcionalidad evidenciada en medicina, en la industria farmacéutica o alimentaria.^[41]

Los compuestos antioxidantes en los vegetales según su naturaleza de solubilización se han dividido en hidrofílicos (compuestos fenólicos y vitamina C) y lipofílicos (carotenoides y vitamina E). La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades rédox, las cuales les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y electrones e inhibidores de oxígeno individual, mientras que la acción antioxidante de la vitamina C se debe a que posee dos electrones libres que pueden ser captados por los ROS los mismos que carecen de un electrón en su estructura molecular. Los carotenoides son desactivadores de moléculas sensibilizadoras excitadas electrónicamente, las cuáles están involucradas en la generación de radicales y oxígeno individual; y la actividad antioxidante de la vitamina E se caracteriza por la donación de hidrógeno.^[41]



Los mecanismos de acción por lo cuáles se ha incrementado el uso de los vegetales se deben a que contribuyen con un amplio espectro de propiedades a la prevención de ciertas enfermedades, un ejemplo de esto son los polifenoles; además, disminuyen la incidencia de enfermedades como el cáncer, arteroesclerosis, etc. Los resultados de innumerables estudios epidemiológicos de los que se infiere el valor protector de ciertas plantas, el redescubrimiento de prácticas ancestrales en varias regiones del mundo, y la fascinación que eso produce en quienes quieren vivir más y mejor nos está impulsando a retomar la medicina tradicional.^[41]

2.5 ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

En el Ecuador encontramos gran diversidad de plantas medicinales, y se conoce que han desarrollado diversos mecanismos de acumulación de químicos protectores como los antioxidantes, metabolitos secundarios que les protege de las condiciones hostiles del clima como los fuertes rayos ultravioleta, así como de una gran variedad de microbios patógenos, incluyendo varias especies de bacterias, hongos y virus que soporta esta zona tropical.^[16]

La Planta de Productos Naturales, ha venido desarrollando un programa de evaluación de plantas usadas en la Medicina Tradicional (MT) de la Región Sur del Ecuador con el objetivo de impulsar y revalorizar el uso de dichas plantas mediante el estudio de sus principios activos. Como resultado de esto actualmente la PPN cuenta con una base de datos de aproximadamente 570 especies medicinales^[16] de las cuales han sido consideradas doce para el presente estudio, por su amplia utilización en la MT. A continuación se describe algunas de sus características principales:



2.5.1 *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca)



Fig. 1 Fotografía de *Neonelsonia acuminata*
Herbario de la Plantas de Productos Naturales.
UTPL

FAMILIA: APIACEAE

PROVINCIAS: Azuay, Bolívar, Loja, Pichincha, Zamora Chinchipe.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Es una planta andina herbácea o perenne^[17]. Con una altura de 60 a 100 cm.¹⁸ El tallo es de forma cilíndrica, las hojas son pinadas, largamente pecioladas y tienen de 3 a 7 foliolos a su vez muy recortados^[19]. Peciolos envainados. Inflorescencias con umbelas compuestas, Fruto lanceolado u oblongo. Las semillas son teretiformes. Se propaga vegetativamente a través de los hijuelos o ramas.^[17]

USOS: Se emplea las hojas para el tratamiento de cólico estomacal.

MODO DE USO: Coccción^[16]



2.5.2 *Siparuna eggersii* (Monte de oso)



Fig 2. Fotografía de *Siparuna eggersii*, Herbario de la Plantas de Productos Naturales. UTPL.

FAMILIA: MONIMIACEAE

PROVINCIAS: Azuay, Bolívar, Guayas, Loja, Pichincha, Zamora Chinchipe.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Arbusto moderadamente pubescente, hojas verticiladas en número de cuatro. Pecíolo de 1.5 a 1.8 cm de largo, lámina verde amarillenta elíptica de 9 a 11 cm por 4 a 5 cm, base obtusa. Ápice apiculado de 0.5 cm de largo, superficie glabra con unos pocos pelos estrellados. Margen denticulado, flores axilares en cada nudo de 2 cm de largo pubescentes cuando son tiernas. Fruto, receptáculo globoso.^[16]

USOS: Se emplea las hojas para el tratamiento de la diabetes, fracturas, reumatismo y afecciones renales

MODO DE USO: Infusión.^[16]



2.5.3. *Ilex guayusa* (Guayusa)



Fig.3 Fotografía de *Ilex guayusa*, zona de recolección.

FAMILIA: AQUIFOLIACEAE

PROVINCIAS: Azuay, Loja, Zamora Chinchipe.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Árbol de 4 a 15 m de altura. Hojas alternas coriáceas, oblango-elípticas 9,5–17 cm de longitud por 3,8–7 de ancho, ápice acuminado y base aguda, margen simple o ligeramente dentado, haz y envés glabros, peciolo corto de 1 cm de largo, estipulas conspicuas.^[19]

USOS: Se emplea las hojas para el tratamiento de la gastritis y fertilidad en la mujer.

MODO DE USO: Infusión.^[16]



2.5.4 *Piper crassinervium* (Guabiduca)



Fig. 4 Fotografía de *Piper crassinervium*, zona de recolección.

FAMILIA: PIPERACEAE

PROVINCIAS: Carchi, Guayas, Zamora-Chinchipec.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Arbusto o arbolito muy ramificado de hasta 4 m, espádice de 5 cm color crema, inflorescencia café verdosa erguidas, espiga color verde amarillento.^[16]

USOS: Se emplea los tallos y las hojas para el tratamiento de la diabetes, gastritis y próstata

MODO DE USO: Infusión.^[16]



2.5.5. *Croton wagneri* (Mosquera)



Fig. 5 Fotografía de *Croton wagneri*, zona de recolección.

FAMILIA: EUPHORBIACEAE

PROVINCIAS: Azuay, Cañar, Loja, Zamora Chinchipe.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Arbusto de hasta 2 m de altura espádice de 5 cm color crema, inflorescencia café verdosa erguidas, espiga color verde amarillento ^[16]

USOS: Se emplea las hojas para el tratamiento de amigdalitis, antiácido, cólico estomacal, diabetes, fiebre y gastritis.

MODO DE USO: Cocción ^[16].



2.5.6. *Baccharis genistelloides* (Tres filos)



Fig. 6. Fotografía de *Baccharis genistelloides*, tomada en la zona de recolección.

FAMILIA: ASTERACEAE

PROVINCIAS: Azuay, Cañar, Loja, Pichincha, Zamora Chinchipe.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Hierba que alcanza hasta 1 m de altura, semileñoso con médula esponjosa. Lámina coreacea extendida a lo largo del tallo formando 3 ángulos, a lo largo de la lámina, bordes sinuados. Nervadura reticulada, inflorescencia sésil en capítulos de 0,5 a 0,8 mm de largo, fruto aquenio con abundante pappus de color blanco.^[16]

USOS: Se emplea las hojas y tallo para el tratamiento de reumatismo, diabetes.

MODO DE USO: Cocción.^[16]



2.5.7. *Costus comosus* (caña agria)



Fig. 7 Fotografía de *Costus comosus* zona de recolección.

FAMILIA: COSTACEAE

PROVINCIAS: Loja, Zamora Chinchipe.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Hierba arbustiva, suculenta. Hojas simples, alternas, equidistantes, 50 cm de longitud, 8 cm de ancho con tallos aéreos simples o a veces ramificados en disposición helicoidal. Inflorescencia terminal, con brácteas, un solo estambre funcional (polinífero); 3 sépalos, verdes no petaloideos; 3 pétalos, desiguales ^[16].

USOS: Se emplea los tallos para el tratamiento de cefalea, cólico hepático, diabetes, fiebre, afecciones renales y garganta.

MODO DE USO: Cocción. ^[16]



2.5.8. *Verbena litoralis* (Verbena)



Fig. 8 Fotografía de *Verbena litoralis* zona de recolección.

FAMILIA: VERBENACEAE

PROVINCIAS: Loja, Guayas, Pichincha, Zamora Chinchipe, Azuay.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Es una hierba perenne mide hasta 1 metro de alto. Las hojas son opuestas, simples. Flores pequeñas, blancas, rosa, púrpuras o azules, con cinco pétalos ^[16].

USOS: Se emplea toda la planta para el tratamiento de alopecia, parásitos, cefalea, cólico estomacal, cólico hepático, cólico menstrual, contusiones, dermatitis, desinfectante y cicatrizante, dislipidemia, escorbuto, espanto y gripe.

MODO DE USO: Cocción. ^[16]



2.5.9. *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo)



Fig. 9 Fotografía de *Oreocallis grandiflora* zona de recolección.

FAMILIA: PROTEACEAE

PROVINCIAS: Loja, Zamora Chinchipe, Azuay.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Arbusto de 2 a 3 m de altura de hojas alternas. Estas son coriáceas, simples o compuestas, enteras, dentadas o lobuladas, sin estípulas. Inflorescencias axilares o terminales, frecuentemente en racimos, espigas o cabezuelas. Fruto en folículo, a veces leñoso. Las semillas son aladas en muchas ocasiones.^[16]

USOS: Se emplea las hojas, corteza y flores para el tratamiento de cefalea, cólico hepático, diabetes, fiebre, afecciones renales y tos.

MODO DE USO: Cocción.^[16]



2.5.10. *Artocarpus altilis* (Fruto del Pan)



Fig. 10 Fotografía de *Artocarpus Altilis* en la zona de recolección.

FAMILIA: MORACEAE

PROVINCIAS: Loja, Zamora Chinchipe, Azuay.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Árbol de 4 a 6 m de alto, hojas opuestas. Estas son dentadas, frecuentemente en racimos, espigas o cabezuelas. Fruto en folículo, a veces leñoso. Las semillas son aladas en muchas ocasiones. ^[16]

USOS: Se emplea las hojas, corteza y flores para el tratamiento de diabetes, golpes, dolor del hígado, hernias.

MODO DE USO: Cocción. ^[16]



2.5.11. *Adiantum poiretti* (Culantrillo)



Fig. 11 Fotografía de *Adiantum poiretti*, en la zona de recolección.

FAMILIA: PTERIDACEAE

PROVINCIAS: Azuay, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Pichincha, Tungurahua.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Hierba perenne, hojas son usualmente onduladas, crecen en racimos ^[16].

USOS: Se emplea las hojas, para el tratamiento de diabetes, asma, gripe, pulmonía, riñones.

MODO DE USO: Cocción. ^[16]



2.5.12. *Justicia colorata* (Insulina)



Fig. 12 Fotografía de *Justicia colorata*, en la zona de recolección.

FAMILIA: ACANTHACEAE

PROVINCIAS: Loja, Zamora Chinchipe, El Oro, Bolívar.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Hierba arbustiva. Hojas simples, alternas. Presentan tallos ramificados en disposición helicoidal.^[16]

USOS: Se emplea toda la planta para tratar la hipoglucemia, sus flores pueden ser masticadas obteniendo un sabor agradable.

MODO DE USO: Cocción.^[16]



CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL



3.1 Área de recolección

En la tabla #2 se presentan los lugares de recolección de las especies vegetales en estudio:

Tabla 2. Lugares de recolección de las especies vegetales en estudio

Especie	Nombre común	Lugar de recolección
<i>Adiantum poiretti</i>	Culantrillo	Yangana (Loja)
<i>Neonelsonia acuminata</i>	Zanahoria Blanca	San Lucas (Loja)
<i>Siparuma eggersii</i>	Monte de Oso	Sozoranga (Loja)
<i>Croton wagneri</i>	Mosquera	Vilcabamba (Loja)
<i>Ilex guayusa</i>	Guayusa	San Pedro de Vilcabamba (Loja)
<i>Piper crassinervium</i>	Guabiduca	Chaguarpamba (Loja)
<i>Costus comosus</i>	Caña agria	Vía Jamboe Bajo (Zamora Chinchipe)
<i>Oreocallis grandiflora</i>	Cucharillo	Villonaco (Loja)
<i>Piper crassinervium</i>	Guabiduca	Chaguarpamba (Loja)
<i>Baccharis genistelloides</i>	Tres filis	Barrio Jipiro Alto (Loja)
<i>Justicia colorata</i>	Insulina	Barrio Jipiro Bajo (Loja)
<i>Verbena litorales</i>	Verbena	Sozoranga (Loja)

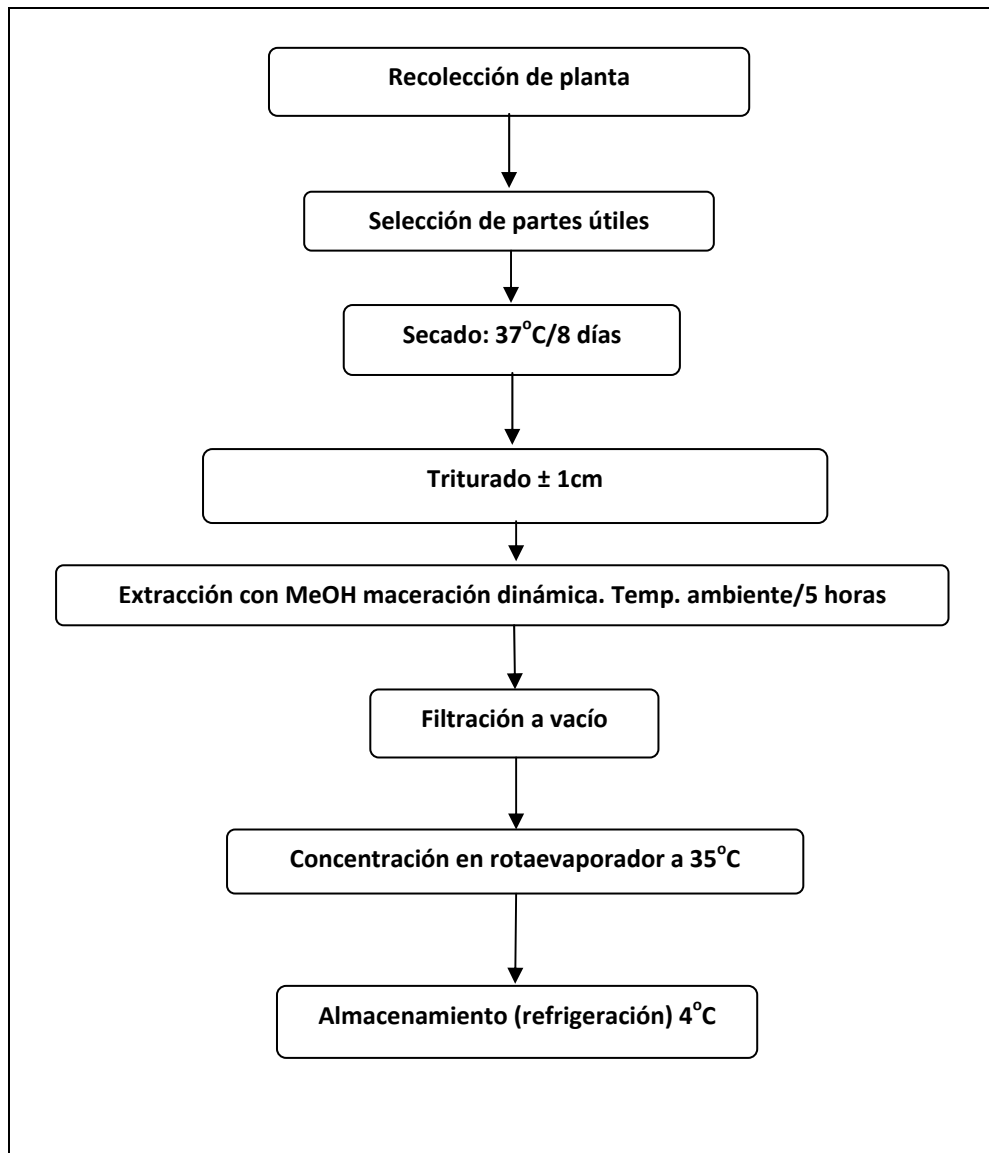
Fuente: La autora

3.2 Obtención de los extractos

Luego de la recolección, se procedió a evaluar e identificar cada especie según las características propias de cada una en el herbario de la UTPL. Posteriormente se seleccionó las partes útiles, eliminando las impurezas adheridas, se secó el material vegetal a 37 grados centígrados durante 8 días. Luego se tritura las plantas reduciéndolas aproximadamente a 1 cm, con el fin de que el solvente (metanol) penetre con mayor facilidad. Para obtener el extracto vegetal se realizó una maceración dinámica a temperatura ambiente por 5 horas, con una relación metanol: planta de 10:1. Se utilizó metanol ya que su alta polaridad y poca selectividad permite obtener un extracto con la mayor parte de sus constituyentes químicos.^[38] Luego se filtró a vacío y se concentró en rotaevaporador a 35°C. Finalmente se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su posterior utilización (Figura 13).



Fig.13 Diagrama de flujo del proceso de obtención de los extractos totales.



Elaboración: La autora



3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para cada método se consideraron tres ensayos, cada uno por triplicado y con los respectivos controles positivos y negativos.

3.3.1 Método DPPH

La capacidad de un compuesto como depurador de radicales libres puede ser registrada espectrofotométricamente mediante el método de DPPH. Este método se basa en la reducción del radical estable DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) a la forma DPPH-H por acción de una sustancia antioxidante. La reacción es medida a 515 nm y luego por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación del radical libre DPPH•.²⁰ La reacción que describe al método es la siguiente:



En la presente investigación el método DPPH fue ejecutado mediante el siguiente procedimiento general: 1960 µl de una solución de DPPH preparada con metanol a una concentración de 80 µmol fue mezclada con 40 µl de la muestra en una celda de espectrofotómetro y su absorbancia fue ajustada a 0.7 con metanol. Transcurridos 15 minutos se determinó la disminución de la absorbancia (inhibición) a 515 nm. Con este procedimiento se evaluaron cinco concentraciones para cada extracto (10, 50, 100, 500 y 1000 µg/ml) así como los respectivos controles positivo y negativo:

- Control positivo: solución de DPPH (80 µM) + α-tocoferol (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/ml)
- Control negativo: solución DPPH (80 µM) + metanol

El porcentaje de DPPH remanente fue calculado como:

$$\%INH = [(Ac-As)/Ac] \times 100$$

Donde:

Ac = absorbancia del control negativo

As = absorbancia de la muestra

Finalmente se determinó los valores de IC₅₀, es decir la concentración de muestra que causa una disminución en la concentración inicial de DPPH• en un 50%.^[23,24, 25]



3.3.2 Método TEAC

El método TEAC (Capacidad del Antioxidante Equivalente a Trolox), fue desarrollado por primera vez por Miller en 1993. Este método evalúa la capacidad de depuración del radical monocatión preformado $ABTS^{\bullet+}$ (el oxidante). El radical $ABTS^{\bullet+}$ es generado por oxidación con persulfato a partir del ácido 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico) ($ABTS^2-$). El ABTS y el persulfato de potasio reaccionan estequiométricamente en una relación 1:0,5.^[23,24, 25,26]

La proporción de la decoloración como porcentaje de inhibición del $ABTS^{\bullet+}$, es determinada en función de la concentración o del tiempo y se la calcula relacionándola con la actividad del estándar (TROLOX). Bajo las mismas condiciones. Este método puede ser aplicado al estudio de antioxidantes hidrosolubles y liposolubles, compuestos puros y extractos de alimentos.^[27]

Para la ejecución del método preparamos el radical $ABTS^{\bullet+}$ con persulfato de potasio (estos dos reactivos son disueltos en agua para permitir la reacción y la mezcla), dejamos reposar durante 16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente, para obtener una solución reacción de color verde-azulada. Luego de formado el radical $ABTS^{\bullet+}$ se lo diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia comprendida entre 0.7 ($\pm 0,020$) a 734 nm. Posteriormente se prepararon las muestras en un tubo de ensayo, colocando 40 μ l de la solución de extracto a diferentes concentraciones (5, 10, 50, 100 y 500 μ g/ml) y 1960 μ l de la solución de $ABTS^{\bullet+}$; se dejó reposar 6 minutos luego de lo cual se realizaron las lecturas espectrofotométricas a 734 nm. Al mismo tiempo se procedió a evaluar los controles positivo y negativo:

- Control positivo: solución ABTS + α -tocoferol (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 μ g/ml)
- Control negativo: solución ABTS + metanol

El porcentaje de ABTS remanente fue calculado como:

$$\%INH = [(Ac-As)/Ac] \times 100$$

Donde:

Ac = absorbancia del control negativo

As = absorbancia de la muestra



Finalmente se determinó los valores de IC_{50} , es decir la concentración de muestra que causa una disminución en la concentración inicial de $ABTS\bullet^+$ en un 50%.^[23,24,25]

3.4 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales.

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años para medir el contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. Sin embargo, el mecanismo básico del método es una reacción redox por lo que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total.^[39] El método que se utiliza actualmente es una modificación efectuada por Singleton y Rossi (1965). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico.^[39]

Para la ejecución de este método (Singleton y Rossi) se preparo el reactivo de Folin-Ciocalteu a una concentración de 1N en agua destilada, a este reactivo se lo protegió de la luz y se lo colocó en refrigeración hasta su uso. También se preparó una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20% en agua destilada y se la mantuvo en el equipo de ultrasonido hasta su completa disolución. Las muestras fueron preparadas colocando 250 μ l del extracto (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 μ g/ml) en tubos de ensayo, a esto se adicionó 1500 μ l de agua destilada y 125 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló en un vortex y se dejó reposar durante 5 minutos, luego de lo cual se añadieron 250 μ l de la solución de carbonato de sodio. Se dejó reposar por un período de 120 minutos y finalmente se procedió a leer en espectrofotómetro a 760 nm. Al mismo tiempo se evaluaron los respectivos controles. Para el control positivo se utilizó TROLOX en lugar del extracto y para el control negativo agua destilada también en lugar del extracto.

Dado que los resultados debían ser expresados en equivalentes de ácido gálico, fue necesario elaborar previamente la respectiva curva de calibración, para ello se disolvió ácido gálico en agua hasta obtener concentraciones finales de 0.0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 μ g/mL. Una vez preparadas las diluciones se procedió a colocar 250 μ l de cada concentración en tubos de ensayo, a esto se adicionó 1600 μ l de agua destilada y 125 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló en un vortex. Se dejó reposar por un período de 120 minutos y finalmente se procedió a leer en espectrofotómetro a 760 nm.



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|



4.1 ANALISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos en los ensayos DPPH y TEAC fueron transformados a datos derivados es decir porcentajes de inhibición (% INH), los mismos que se obtuvieron con ayuda del programa Microsoft Excel.

Los distintos análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico XLSTAT. Como primera prueba estadística se realizó un análisis ANOVA, para determinar las diferencias entre grupos de concentraciones con un intervalo de confianza de 95%, se utilizó las pruebas de Fisher y Duncan. Posteriormente estos datos fueron evaluados mediante un análisis de regresión logística-modelo logit con un intervalo de confianza del 95%, esto con dos fines, primero obtener la curva de actividad de una muestra dada, y segundo obtener su valor IC_{50} (concentración requerida para disminuir el 50% de oxidación) con los respectivos límites inferior y superior. Dentro de los datos obtenidos con el análisis de regresión logística-modelo logit destaca el valor R^2 (coeficiente de determinación), el cual permite evaluar la proporción de variabilidad de la variable dependiente (en este caso los porcentajes de inhibición), este coeficiente puede presentar valores entre 0 y 1, y mientras más se acerque a 1 los datos se ajustan de mejor manera al modelo de ecuación propuesto.



4.2 DISCUSIÓN GENERAL

Estudios epidemiológicos han mostrado que dietas ricas en alimentos vegetales reducen de forma significativa la incidencia y tasas de mortalidad de enfermedades degenerativas causadas por el estrés oxidativo. Este efecto protector ha sido atribuido principalmente a los compuestos fenólicos y a la actividad antioxidante presentes en dichos alimentos vegetales. Las plantas que han sido objeto del presente estudio, son secuencia de un estudio previo sobre actividad antidiabética y han sido evaluadas para verificar si su potencial terapéutico en el tratamiento de las diabetes está relacionado con efectos antioxidantes, ya que se ha comprobado en los últimos años la implicación que han tenido la especies reactivas de oxígeno (ROS) en la patogénesis de la diabetes mellitus, debido a que destruyen las células β -pancreáticas, y estas presentan un potencial secuestrador muy bajo, lo que puede conllevar a la disminución de las defensas antioxidantes, de tal manera que lo que se desea es ayudar a los pacientes que padecen esta enfermedad a disminuir complicaciones como nefropatía, gangrena, ceguera, etc. [37,39]

4.2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LOS MÉTODOS DPPH Y TEAC

Debido a la naturaleza fitoquímica compleja de los extractos de las plantas con las que se trabajó, se necesitaron diferentes métodos para evaluarlas, por lo tanto, se emplearon los ensayos que comúnmente se utilizan para evaluar los efectos antioxidantes de los extractos metanólicos. La capacidad de secuestro de radicales libres se determinó mediante los métodos DPPH y TEAC. Los efectos antioxidantes de una sustancia en los radicales DPPH• y ABTS•⁺ se deben a la habilidad que ésta posee para donar hidrógenos. Aunque en su mayoría la actividad de los extractos estaban por debajo de los controles positivos (α -Tocoferol y TROLOX), respectivamente, el estudio realizado mostró que los extractos tienen la habilidad protón–donante y podrían servir como inhibidores de los radicales libres, y posiblemente podrían estar actuando como antioxidantes primarios, es decir que interrumpen la cadena oxidativa y previenen la formación de nuevos radicales libres.

4.2.1.2 COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE IC₅₀ DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS

En las Tablas 3 y 4 se muestran los valores IC₅₀ (concentración inhibitoria media) de los doce extractos metanólicos y los respectivos controles positivos. Téngase en cuenta que un menor valor de IC₅₀ significa una mayor actividad antioxidante y viceversa.

Tabla 3. Valores IC₅₀ (ug/ml) de la actividad antioxidante mediante el método DPPH

PLANTA	DPPH		
	IC50	Límite inferior	Límite superior
<i>Verbena litoralis</i>	3,5	1,1	6,8
α -TOCOFEROL	6,7	5,8	7,4
<i>Oreocalix grandiflora</i>	11,9	7,9	16,3
<i>Ilex guayusa</i>	14,9	11,3	18,7
<i>Siparuna eggersii</i>	20,2	14,8	26,2
<i>Justicia colorata</i>	32,8	27,0	39,1
<i>Adiantum poiretii</i>	33,5	27,1	40,5
<i>Neonelsonia acuminata</i>	36,6	28,8	45,3
<i>Artocarpus altilis</i>	43,0	35,2	51,6
<i>Baccharis genistelloides</i>	43,1	34,8	52,3
<i>Costus comosus</i>	64,3	50,6	80,5
<i>Croton wagneri</i>	103,9	85,2	126,4
<i>Piper crasinervium</i>	141,8	116,1	173,4

FUENTE: La autora

Tabla 4. Valores IC₅₀ (ug/ml) de la actividad antioxidante mediante el método TEAC

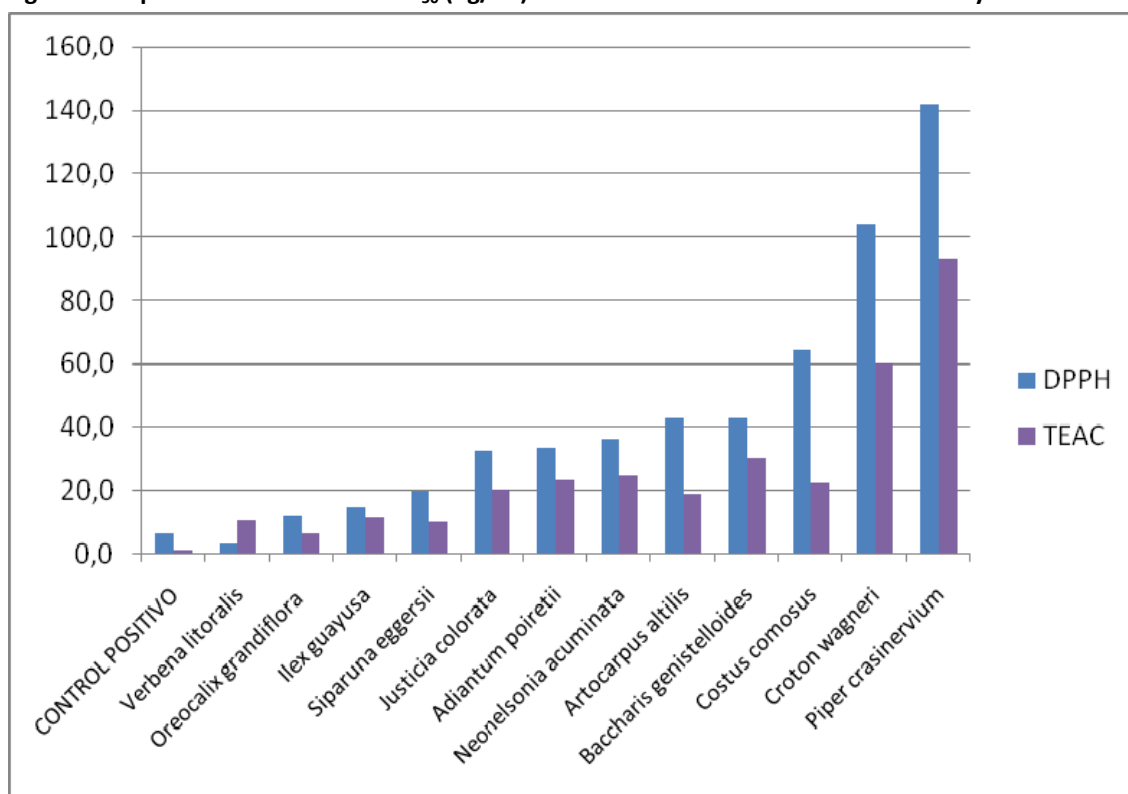
PLANTA	TEAC		
	IC50	Límite inferior	Límite superior
TROLOX	1,3	1,1	1,5
<i>Oreocalix grandiflora</i>	6,6	5,5	7,6
<i>Siparuna eggersii</i>	10,3	8,7	12,2
<i>Verbena litoralis</i>	10,9	9,5	12,6
<i>Ilex guayusa</i>	11,8	10,1	13,9
<i>Artocarpus altilis</i>	19,1	15,6	23,4
<i>Justicia colorata</i>	20,4	16,9	24,5
<i>Costus comosus</i>	22,5	18,6	27,2
<i>Adiantum poiretii</i>	23,3	19,0	28,4
<i>Neonelsonia acuminata</i>	24,9	20,8	29,7
<i>Baccharis genistelloides</i>	30,3	25,3	36,2
<i>Croton wagneri</i>	60,3	49,4	74,0
<i>Piper crasinervium</i>	93,5	76,9	115,1

FUENTE: La autora



Según HUANG, Dejian *et al*, un valor IC_{50} es inversamente proporcional a la actividad antioxidante, es decir, valores mayores de IC_{50} indican una menor actividad antioxidante y viceversa. Por lo tanto con los resultados contenidos en estas tablas podemos observar que con un nivel de confianza del 95%, los extractos metanólicos que mejor respuesta dieron en ambos métodos fueron: *Oreocallis grandiflora*, *Verbena litoralis*, *Siparuna eggersii* e *Ilex guayusa*, mientras *Artocarpus altillis*, *Justicia colorata*, *Adiantum poiretti*, *Costus comosus*, *Neonelsonia acuminata*, *Baccharis genistelloides*, *Croton wagneri* y *Piper crassinervium*, muestran una actividad antioxidante inferior (Fig. 14).

Fig 14. Comparación de los valores IC_{50} (ug/ml) obtenidos mediante los métodos DPPH y TEAC



FUENTE: La autora

4.2.2 CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT) DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS

En la Tabla 5 se resumen los resultados ($\pm SD$) obtenidos por el método de Folin Ciocalteu para las doce plantas y el control positivo. Los resultados están expresados en GAEs/gE, es decir en equivalentes de ácido gálico (mg) por gramo de extracto.



En la Fig.15 se puede observar que con un nivel de confianza del 95%, las plantas con compuestos fenólicos más altos fueron *Oreocalix grandiflora*, *Verbena litoralis*, *Siparuna eggersii*, e *Ilex guayusa*, mientras que *Croton wagneri*, *Neonelsonia acuminata*, *Artocarpus Altilis* y *Adiantum poiretti*, obtuvieron niveles moderados de compuestos fenólicos, siendo *Justicia colorata*, *Costus comosus*, *Baccharis genistelloides* y *Piper crasinervium* las especies que tuvieron los valores más bajos.

Estos resultados muestran que en su mayoría existe una clara correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos de las plantas estudiadas, ya que una especie vegetal con mayor contenido de compuestos fenólicos totales presenta una mayor actividad antioxidante.^[5]

Tabla 5. Valores GAEs/gE a partir del ensayo CFT.

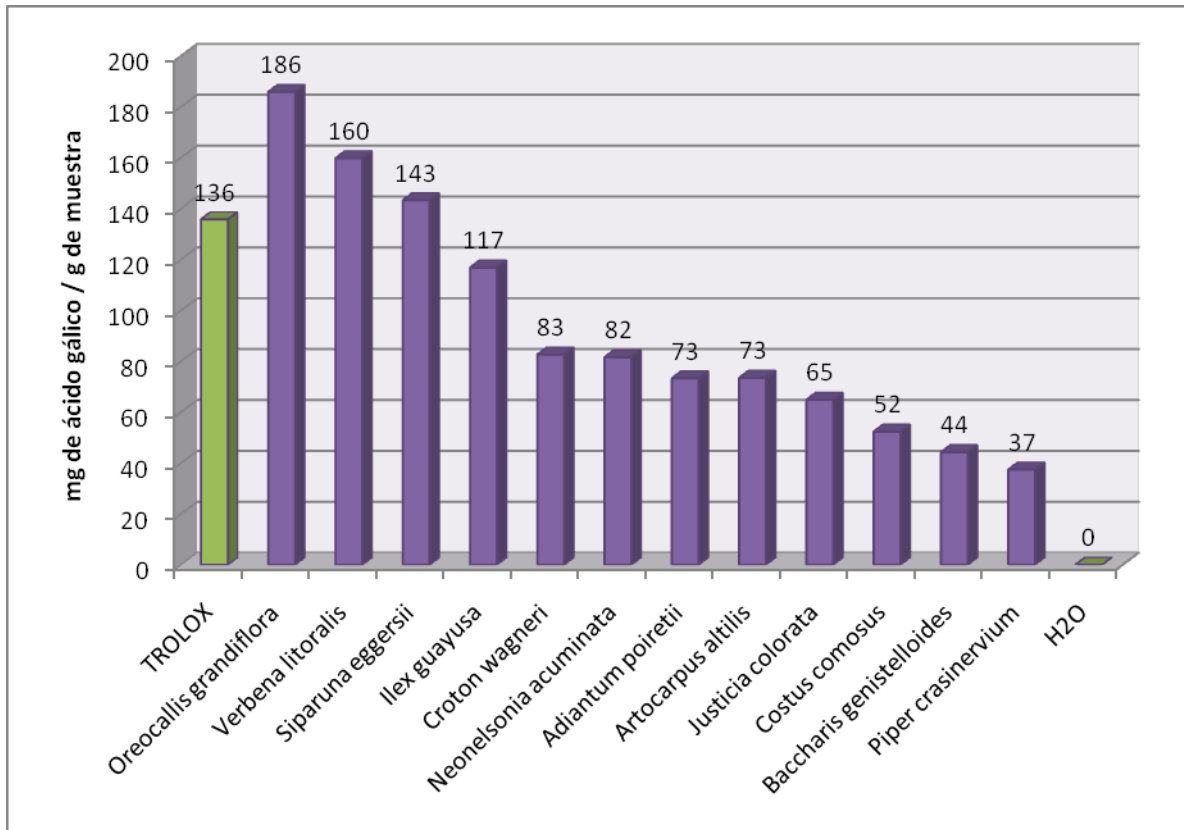
PLANTA	(±SD)
<i>Oreocalix grandiflora</i>	185.9 ± 0.09
<i>Verbena litoralis</i>	159.8 ± 0.08
<i>Siparuna eggersii</i>	143.3 ± 0.06
<i>Ilex guayusa</i>	116.8 ± 0.05
<i>Croton wagneri</i>	82.6 ± 0.04
<i>Neonelsonia acuminata</i>	81.6 ± 0.05
<i>Artocarpus altilis</i>	73.5 ± 0.08
<i>Adiantum poiretii</i>	73.3 ± 0.09
<i>Justicia colorata</i>	64.9 ± 0.07
<i>Costus comosus</i>	52.3 ± 0.08
<i>Baccharis genistelloides</i>	44.3 ± 0.04
<i>Piper crasinervium</i>	37.4 ± 0.04
TROLOX	135.8 ± 0.00

*GAEs/gE: Equivalentes de ácido gálico/gramo extracto

FUENTE: La autora



Fig 15. Contenido de Compuestos Fenólicos Totales (CFT)



FUENTE: La autora

En comparación con los estándares respectivos (α -Tocoferol y Trolox), los resultados de la actividad antioxidante indican que todos los extractos fueron capaces de captar los radicales DPPH y ABTS de una manera dependiente de la concentración (ver Anexo 1 y 2); obteniéndose resultados comparables entre ambos métodos. La actividad antioxidante de cada tipo de planta fue expresada como concentración inhibitoria media (IC₅₀). Esto muestra la potencialidad de los extractos como agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de daños patológicos.



CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



5.1 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se puede ver que existe una alta relación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante. Es probable que esto se deba a que por lo general una planta con mayor contenido de compuestos fenólicos totales presenta una mayor capacidad antioxidante.^[44] No obstante se debe tener en cuenta que la capacidad antioxidante de una planta, se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes. Así pues, un estudio completo de la actividad antioxidante de una planta requiere de la medición de diferentes magnitudes y por ende del desarrollo y la normalización de métodos confiables para cada una de estas magnitudes.^[44]

Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante medida como captación de radicales libres, el ensayo TEAC es uno de los más rápidos, originando resultados reproducibles y coherentes. Además, el TEAC presenta importantes ventajas sobre el método DPPH, ya que muestra varios máximos de absorción y una buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica.

Se pudo determinar el contenido de compuestos fenólicos de los extractos totales de las doce especies vegetales a través del método Folin-Ciocalteu.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la capacidad antioxidante secundaria (interruptora) de los extractos totales de las doce especies vegetales a través de los métodos DPPH y el método TEAC; esto da un indicio sobre la posibilidad de utilizar las especies como plantas promisorias para el aislamiento de sustancias fenólicas con actividad antioxidante.



5.2 RECOMENDACIONES

1. Para lograr establecer un criterio más amplio del efecto antioxidante de las especies *Oreocallis grandiflora*, *Verbena litoralis*, *Siparuna eggersii*, *Ilex guayusa*, es necesario realizar pruebas adicionales como:
 - Realizar fraccionamientos biodirigidos, para determinar qué compuestos específicos (primarios o secundarios), son los responsables de la actividad antioxidante y que compuestos podrían estar interviniendo con la misma, sería importante además determinar la cinética de la reacción, ya que existen ciertos compuestos que reaccionan de manera reversible.
2. Es recomendable utilizar celdas de cuarzo, en las lecturas espectrofotométricas, ya que las celdas de poliestireno se rayan con facilidad, lo que puede resultar en lecturas erróneas al ser utilizadas varias veces.
3. Es importante estandarizar cada ensayo con un control positivo junto con los extractos con el fin minimizar cualquier error de variabilidad en las condiciones de trabajo.
4. Debido a la gran aplicabilidad etnomédica de estas especies como agentes antioxidantes, a las que se les han asignado diversos usos en la medicina tradicional se puede afirmar que son excelentes candidatas para continuar con su estudio a fin de confirmar si su efecto medicinal es debido únicamente a su actividad antioxidante de tal manera que se las pueda usar como agentes terapéuticos alternativos en el tratamiento de otras patologías, especialmente aquellas relacionadas con el estrés oxidativo.
5. Las especies que no tuvieron muy buena actividad, no deben ser descartadas para otros estudios, ya que desde la perspectiva etnomédica han demostrado tener propiedades curativas importantes, lo cual indica que su mecanismo de acción podría ser otro diferente al antioxidante.



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFIA:

1. Matill HA (1947). Antioxidants. *Annu Rev Biochem* 16: 177–192.
2. Lampe JW. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr.* 70:475S- 490S
3. Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82 (2): 291-5.
4. World Health Organization. (1990). Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. Technical Report series 797. Geneva: World Health Organization.
5. Dastmalchi, K. Dorman, D. Kosarb, M. Hiltunen, R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract, *LW T 40, 240* (2007), 239–248
6. Huang, Dejian et al. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53: p. 1841 – 1856.
7. Soler – Rivas, Cristina et al, An Easy and Fast Test to Compare Total Free Radical Scavenger Capacity of Foodstuffs. *Phytochemical Análisis*, 2000. 11: p. 330 – 338.
8. Matill HA (1947). Antioxidants. *Annu Rev Biochem* 16: 177–192.
9. German J. "Food processing and lipid oxidation". *Adv Exp Med Biol* 459: 23–50.
10. Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants". *Exp Physiol* 82 (2): 291-5.
11. Vertuani S, Angusti A1: p. 31-36. , Manfredini S (2004). "The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview". *Curr Pharm Des* 10 (14): 1677–94.
12. Morocho, V., Estudio etnobotánica de especies medicinales en la comunidad indígena Saraguro de la Provincia de Loja, in *Escuela de Ingeniería Agropecuaria*. 2006, Universidad Technical Particular de Loja. : Loja. P. 109.
13. Ordóñez, P. y Vega, M, Estudio Fitoquímica de Especies Vegetales Nativas utilizadas en la Medicina Tradicional de la Provincia de Loja, en *Escuela de Ingeniería Química*. 2006, Universidad Técnica Particular de Loja: Loja.
14. Carrión, P. and Jiménez, H. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos metabólicos de 7 especies vegetales, in *Escuela de Bioquímica y Farmacia*. 2007, Universidad Technical Particular de Loja: Loja.
15. Zaragoza, T., Tene, V., Malagón, O., Armijos, Ch., Burneo, I., Jaramillo, X. 2004. , Bioactividad de aceites esenciales y extractos de plantas medicinales y aromáticas de la Región Sur del Ecuador FUNDACYT – UTPL.
16. Raúl Blas-Sevillano, R.A.J.-O.J.P.B., Inducción Floral de Arracacha. IDESIA (Chile) Enero- Abril 2006.



17. Higuítia, M., El cultivo de la arracacha en la Sabana de Bogotá. Instituto colombiano agropecuario. Bogotá.
18. León, J., Plantas alimenticias andinas. Instituto interamericano de ciencias agrícolas zona andina. Lima
19. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol* 22, 25-30, 1995.
20. Bilia, A. R. et al, Analysis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). *Journal of Chromatography B*, 2004. 812: p. 213-214.
21. Huang, Dejian et al. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53: p. 1841 – 1856.
22. Katalinic, v. et al, Screening of 70 medicinal plant extracts for capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 2006. 94: p. 550–557.
23. Pestchanker, L. J. et al, The sesquiterpene lactone hihidroleucodin in tissue culture from *Artemisia douglasiana*. *Phytochemistry*, 1990. 29(6): p. 1853-1854.
24. Roberta Et Al, Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 1998. 26(9/10): P. 1231–1237.
25. Miller, H.E., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Jaocs*. 48: 91.
26. Taga, M.S., E.E. Miller and D.E. Pratt, 1984. Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Oxidant, *JAOCS*, 61: 928-31.
27. Gazzani, G., A. Papetti, G. Massolini, and M. Daglia, 1998. Antioxidant and Prooxidant Activity of Water Soluble Components of some Common Diet Vegetables and the Effect of Thermal Treatment, *J. Agric. Food Chem.* 46: 4118.
28. Matill HA (1947). Antioxidants. *Annu Rev Biochem* 16: 177–192.
29. German J. "Food processing and lipid oxidation". *Adv Exp Med Biol* 459: 23–50.
30. Jacob R. "Three eras of vitamin C discovery". *Subcell Biochem* 25: 1–16.
31. Wolf G (2005). The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill". *J Nutr* 135 (3): 363-6.
32. Lee J, Koo N, Min DB. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3:21.
33. Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean *Br J Pharmacol*. 142:231- 255.
34. García JC, García B, Morin MA, Céspedes EM, Clapes S, Etienne O. Radicales libres: impacto médico. *BEB (México)* 1993;13(3):75-83.
35. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1989;68:989-98.



36. Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Berte F, Gazzani G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 1449-1454.
37. Prior RL, Wu XL, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-302.
38. Sharapin Nikolai 2000 "Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos" : Extracción de Materias primas Vegetales 27-28
39. Rojas Hidalgo E. Vitaminas y acción antioxidante. 1996. Ed por Merck.
40. Langseth L. Oxidants, antioxidants and disease prevention. LSI Europe. Brussels 1995.
41. Peris JB, Studing G, Vnagloska B. Heterósidos. En: Fitoterapia aplicada. Valencia. M.I.C.O.F, 1995:61-73.
42. Fukumoto, G. Mazza, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48, 2000, 3597-3604.



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA

ANEXOS

**ANEXO 1****Porcentajes de Inhibición respecto a la concentración en el Método DPPH**

<i>Adiantum poiretii</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
10	10,7 ± 3,9
50	64,2 ± 3,4
100	92,0 ± 3,2
500	94,8 ± 4,7
1000	97,3 ± 1,6

<i>Artocarpus altilis</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
10	9,4 ± 0,5
50	47,6 ± 1,8
100	91,6 ± 1,8
500	93,1 ± 5,6
1000	97,8 ± 1,5

<i>Costus comosus</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
10	13,2 ± 6,3
50	45,1 ± 4,5
100	58,8 ± 2,1
500	90,4 ± 1,5
1000	93,2 ± 2,2

<i>Croton wagneri</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
10	7,9 ± 0,9
50	25,9 ± 5,2
100	47,1 ± 0,8
500	88,4 ± 3,9
1000	95,2 ± 4,7

<i>Baccharis genistelloides</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
10	15,5 ± 5,3
50	47,0 ± 5,9
100	79,7 ± 3,4
500	97,3 ± 2,0
1000	97,9 ± 1,2

<i>Ilex guayusa</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
10	31,5 ± 5,6
50	9,8 ± 3,6
100	93,5 ± 4,3
500	96,0 ± 2,4
1000	98,8 ± 1,0

<i>Justicia colorata</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
10.000	13,5 ± 2,6
50	62,3 ± 5,1
100	89,5 ± 1,4
500	99,1 ± 1,4
1000	99,4 ± 1,0

<i>Neonelsonia acuminata</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
10	17,6 ± 2,5
50	50,0 ± 2,7
100	89,7 ± 3,5
500	93,7 ± 1,9
1000	95,9 ± 1,9



<i>Piper crassinervium</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (\pm SD)
10	6,2 \pm 2,3
50	18,8 \pm 1,5
100	38,7 \pm 2,5
500	84,9 \pm 1,3
1000	90,5 \pm 0,8

<i>Siparuna eggersii</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (\pm SD)
10	29,3 \pm 5,5
50	72,2 \pm 2,1
100	90,7 \pm 3,2
500	93,8 \pm 2,0
1000	97,0 \pm 2,0

<i>Oreocallis grandiflora</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (\pm SD)
10	42,2 \pm 4,2
50	84,4 \pm 3,9
100	91,3 \pm 4,0
500	94,6 \pm 2,9
1000	98,4 \pm 0,6

<i>Verbena litoralis</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (\pm SD)
10	61,7 \pm 4,4
50	89,3 \pm 3,9
100	94,9 \pm 1,8
500	94,1 \pm 1,9
1000	95,5 \pm 1,9

CONTROL POSITIVO α -TOCOFEROL	
CONC.(ug/ml)	% INH
3.125	22,9 \pm 3,4
6.25	42,6 \pm 3,5
12.5	76,5 \pm 3,5
25	93,2 \pm 3,7
50	96,3 \pm 2,2

**ANEXO 2****Porcentajes de inhibición respecto a la concentración en el Método TEAC**

<i>Adiantum poiretii</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	17,4 ± 4,3
10	25,2 ± 3,4
50	58,4 ± 5,9
100	94,8 ± 6,1
500	98,9 ± 1,5

<i>Artocarpus altilis</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	17,5 ± 1,8
10	29,4 ± 1,7
50	71,8 ± 0,3
100	96,1 ± 0,5
500	95,5 ± 2,0

<i>Baccharis genistelloides</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	9,0 ± 0,8
10	16,6 ± 1,6
50	55,5 ± 4,2
100	93,8 ± 4,9
500	99,6 ± 0,4

<i>Costus comosus</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	15,0 ± 6,5
10	24,7 ± 6,2
50	64,2 ± 2,3
100	94,2 ± 4,3
500	99,8 ± 0,1

<i>Croton wagneri</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	7,9 ± 2,5
10	13,6 ± 3,6
50	32,6 ± 4,1
100	65,3 ± 5,3
500	97,6 ± 3,9

<i>Ilex guayusa</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	20,4 ± 5,2
10	35,5 ± 5,9
50	96,7 ± 2,0
100	98,7 ± 0,6
500	99,3 ± 0,8

<i>Justicia colorata</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	13,5 ± 4,4
10	23,7 ± 5,2
50	76,9 ± 5,5
100	94,6 ± 2,6
500	97,7 ± 2,2

<i>Neonelsonia acuminata</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	11,0 ± 2,2
10	19,8 ± 4,1
50	64,0 ± 1,0
100	96,0 ± 2,5
500	99,9 ± 0,1



<i>Oreocallis grandiflora</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	39,6 ± 2,6
10	65,6 ± 2,6
50	99,6 ± 0,1
100	99,6 ± 0,0
500	99,6 ± 0,1

<i>Piper crasinervium</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	4,9 ± 1,1
10	7,8 ± 3,0
50	28,3 ± 5,1
100	43,9 ± 1,5
500	95,8 ± 4,0

<i>Siparuna eggersii</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	27,2 ± 1,2
10	43,1 ± 1,8
50	94,2 ± 4,9
100	98,7 ± 0,5
500	99,6 ± 0,4

<i>Verbena litoralis</i>	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
5	20,5 ± 3,8
10	38,0 ± 2,4
50	98,5 ± 0,5
100	99,7 ± 0,0
500	99,8 ± 0,2

CONTROL POSITIVO TROLOX	
CONC.(ug/ml)	% INH (±SD)
0.1	5,0 ± 2,5
0.5	15,1 ± 3,0
1	25,9 ± 2,7
5	97,6 ± 2,1
10	99,9 ± 0,2



ANEXO 3

Resultados del Método FOLÍN-CIOCALTEU

CURVA ESTÁNDAR					PROMEDIO	DESVEST
CONCENTRACIÓN (ug/ml)	ABS	ABS	ABS	ABS		
20	2.15	2.02	2.20	1.94	0.00	0.00
10	1.29	1.00	1.08	0.97	1.08	0.15
5	0.66	0.52	0.54	0.50	0.55	0.07
2.5	0.32	0.25	0.28	0.26	0.28	0.03
1.25	0.16	0.13	0.16	0.14	0.15	0.01
0.625	0.08	0.07	0.08	0.07	0.08	0.01
0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00

ABS: absorbancia

DESVEST: desviación estándar

MUESTRA	1R	2R	3R	4R	PROMEDIO	DESVEST	ug AG	mg AG/g M
	ABS	ABS	ABS	ABS				
<i>Oreocallix grandiflora</i>	2.1	2.0	1.9	2.0	2.0	0.09	18.6	186
<i>Verbena litoralis</i>	1.7	1.7	1.8	1.6	1.7	0.08	16.0	160
<i>Siparuna eggersii</i>	1.3	1.5	1.5	1.6	1.5	0.11	14.3	143
TROLOX	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	0.00	13.6	136
<i>Ilex guayusa</i>	1.3	1.2	1.2	1.5	1.3	0.11	11.7	117
<i>Croton wagneri</i>	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9	0.04	8.3	83
<i>Neonelsonia acuminata</i>	0.9	0.9	1.1	0.9	0.9	0.11	8.2	82
<i>Adiantum poiretii</i>	0.9	0.8	0.7	0.8	0.8	0.09	7.3	73
<i>Artocarpus altilis</i>	0.8	0.8	0.7	0.9	0.8	0.08	7.3	73
<i>Justicia colorata</i>	1.0	0.8	0.6	0.7	0.8	0.14	6.5	65
<i>Costus comosus</i>	0.6	0.5	0.5	0.7	0.6	0.08	5.2	52
<i>Baccharis genistelloides</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.04	4.4	44
<i>Piper crasinervium</i>	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.04	3.7	37
H2O	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	0.0	0

R: Repetición

ABS: absorbancia

DESVEST: desviación estándar