



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

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

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar por el grado académico de:
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: HUILMAR ADRIÁN RODRÍGUEZ TORRES

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

Riobamba-Ecuador

2020

© 2020, **Huilmar Adrián Rodríguez Torres**

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

Yo, Huilmar Adrián Rodríguez Torres, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi responsabilidad y autenticidad así como también los resultados e ideas. A su vez los textos del siguiente documento que son provenientes de otras fuentes, se encuentran citados y referenciados.

Como autor del presente, asumo la total responsabilidad legal y académica de los contenidos del siguiente trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 18 de febrero del 2020

A handwritten signature in blue ink, reading "Huilmar Adrián Rodríguez Torres", is written over a horizontal line.

Huilmar Adrián Rodríguez Torres

C.I. 060412329-9

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

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

	FIRMA	FECHA
BQF. John Marcos Quispillo Moyota, M.Sc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2020-02-18
BQF. Diego Renato Vinuesa Tapia, M.Sc. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACION		2020-02-18
BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, M.sc MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2020-02-18

DEDICATORIA

A mi madre, Patricia Torres, la mujer del júbilo, portadora de la esperanza que a toda costa, me ha brindado su amor, conocimiento, valores, fé y fuerza para enfrentarme y surgir en esta vida.

Huilmar

AGRADECIMIENTO

No tengo palabras para agradecer a Dios, por haberme otorgado a tan magnífica madre, la mujer que me dio la fuerza para soportar los obstáculos de la vida, la valentía para sobrellevar a los momentos más duros, y el conocimiento para ver la verdad.

A mis amigos y amigas Santiago, Jonathan, Cinthya, Evelyn, Jessica, Benjamín, que han sido testigos de mis miedos, de mis preocupaciones así como también de momentos de alegría y gozo, que durante nuestra vida universitaria me han mostrado su apoyo, su cariño, su altruismo y consuelo en las buenas y malas situaciones, haciéndome saber que cuento con ellos como mis hermanos y hermanas de corazón.

Un agradecimiento eterno a mi tutor, mi amigo, mi guía Diego Vinueza, que me ha mostrado su apoyo incondicional, consejos, conocimientos, y amparo como segunda familia que lo considero.

Una sincera gratitud a la BQF. Gisela Pilco, por prestar su conocimiento en el presente trabajo de titulación, así como también en tutorías y representaciones de cuando solía ser becario.

Finalmente, a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por acogerme en sus aulas y espacios de conocimientos, dándome la oportunidad de conocer a excelentes y valiosas personas a lo largo de mi vida académica.

Huilmar

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN.....	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	4

CAPÍTULO I

1	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1.	Familia Rubiaceae	5
1.1.1.	<i>Características</i>	5
1.1.2.	<i>Distribución Global</i>	6
1.1	Género Psychotria	6
1.2.1.	<i>Etnobotánica de la especie Psychotria</i>	7
1.2.2.	<i>Alcaloides de la especie Psychotria</i>	7
1.2.3.	<i>Alcaloides Indol Monoterpénicos</i>	8
1.2.4.	<i>Principales Actividades Biológicas</i>	8
1.3.	Psychotria stenostachya	10
1.3.1	<i>Descripción botánica</i>	11
1.4	Xantina oxidasa (XO).....	11
1.4.1	<i>Estructura de XO</i>	12
1.4.2	<i>Mecanismo de reacción de XO</i>	12
1.5	Hiperuricemia	14
1.5.1.	<i>Epidemiología</i>	14

1.5.2	<i>Etiología</i>	15
1.5.3.	<i>Factores de Riesgo</i>	15
1.5.4.	<i>Tratamiento</i>	15
1.6	Inhibidores de XO	15
1.6.1	<i>Alopurinol</i>	16
1.6.2	<i>Febuxostat</i>	17
1.7	Estrés oxidativo	18
1.7.1.	<i>Fuente exógena</i>	18
1.7.2	<i>Fuente endógena</i>	19
1.8.	Captación de radicales libres	19
1.8.1.	<i>Fuente Endógena</i>	19
1.8.2.	<i>Fuente Exógena</i>	20
1.9.	Autografía	20
1.9.1.	<i>Autografía de contacto</i>	21
1.9.2.	<i>Autografía directa</i>	21
1.9.3.	<i>Autografía en inmersión (superposición de agar)</i>	21
1.10.	Inhibidores de XO	22
1.10.1.	<i>Sistema xantina/xantina oxidasa/NBT</i>	22
1.11.	Determinación de captadores de radicales libres	22
1.11.1.	<i>Método DPPH*</i>	23
1.11.2.	<i>Sistema NADH/metosulfato de fenazina/NBT</i>	23
1.11.3.	<i>Sistema Riboflavina/Luz/NBT</i>	24

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	26
2.2.	Lugar de Investigación	26
2.3.	Recolección del material vegetal	26
2.4.	Identificación botánica	26

2.5.	Equipos, materiales y reactivos	27
2.5.1.	<i>Equipos</i>	27
2.5.2.	<i>Materiales</i>	28
2.5.3.	<i>Reactivos</i>	29
2.6.	Técnicas y métodos	30
2.6.1.	<i>Acondicionamiento de la materia vegetal</i>	30
2.6.2.	<i>Control de calidad</i>	30
2.6.2.1.	<i>Contenido de humedad</i>	30
2.6.3.	<i>Tamizaje fitoquímico</i>	31
2.6.4.	<i>Obtención del extracto total de alcaloides</i>	31
2.6.5.	<i>Cromatografía en capa fina (TLC)</i>	32
2.6.6.	<i>Ensayos Autográficos</i>	32

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS	34
3.1.	Control de calidad del material vegetal	34
3.2.	Tamizaje fitoquímico.....	35
3.3.	Obtención del extracto total de alcaloides	36
3.4.	Cromatografía en capa fina (TLC)	37
3.5.	Ensayos autográficos	38
3.5.1.	<i>Captación de DPPH*</i>	38
3.5.2.	<i>Sistema Riboflavina/Luz/NBT</i>	39
3.5.3.	<i>Sistema NADH/PMS/NBT</i>	40
3.5.4.	<i>Ensayo de Inhibición de xantina oxidasa (XO)</i>	41
3.6.	Discusión.....	42
	CONCLUSIONES.....	43
	RECOMENDACIONES.....	44
	GLOSARIO	

TÉRMINOS

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Lista de equipos utilizados durante la ejecución del trabajo de titulación.....	27
Tabla 2-2:	Lista de materiales utilizados durante la ejecución del trabajo de titulación...	28
Tabla 3-2:	Lista de reactivos utilizados durante la ejecución del trabajo de titulación	29
Tabla 1-3:	Resultados de los parámetros de calidad de <i>P.stenostachya</i>	34
Tabla 2-3:	Resultados del tamizaje fitoquímico de extractos de <i>P.stenostachya</i>	35
Tabla 3-3:	Rendimiento de la extracción total de alcaloides de <i>P. stenostachya</i>	36
Tabla 4-3:	Datos resultantes de la determinación de Rf en TLC del extracto alcaloidal de <i>P.stenostachya</i>	37
Tabla 5-3:	Capacidad de captación DPPH* de ácido ascórbico y los alcaloides totales...	38
Tabla 6-3:	Captación de O ₂ •- Riboflavina/Luz/NBT de taxifolina y Alcaloides totales..	39
Tabla 7-3:	Captación de O ₂ •- modelo NADH/PMS/NBT de taxifolina y Alcaloides totales.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Ilustración botánica de <i>Psychotria stenostachya</i>	10
Figura 2-1: Distribución geográfica en Ecuador de <i>Psychotria stenostachya</i>	11
Figura 3-1: Estructura molecular de xantina oxidasa	12
Figura 4-1: Mecanismo producción de ácido úrico	13
Figura 5-1: Enfermedades derivadas de acumulación de Xantina oxidasa.....	14
Figura 6-1: Estructura química de Alopurinol.....	16
Figura 7-1: Estructura química de Febuxostat	17
Figura 8-1: Mecanismo de reacción de Sistema xantina/xantina oxidasa/NBT	22
Figura 9-1: Estructura del sistema DPPH* y su reducción por un antioxidante.....	23
Figura 10-1: Mecanismo de reacción del NADH/metosulfato de fenazina/NBT	24
Figura 11-1: Mecanismo de reducción de NBT por fotólisis de B ₂	25

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Comparación de concentraciones de ácido ascórbico y alcaloides totales de las áreas de captación de DDPH.....	38
Gráfico 2-3: Comparación de concentraciones de Taxifolina y alcaloides totales de las áreas de captación de $O_2\bullet^-$ por Modelo Rivo flavina/luz/NBT.....	39
Gráfico 3-3: Comparación de concentraciones de Taxifolina y alcaloides totales de las áreas de captación de $O_2\bullet^-$ por Modelo NADH/PMS/NBT.....	40
Gráfico 4-3: Comparación de concentraciones de Alopurinol y alcaloides totales de las áreas de inhibición para Xantina Oxidasa.....	41

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: PLANTA *Psychotria stenostachya*

ANEXO B: CONTROL DE CALIDAD DE *P.stenostachya*

ANEXO C: TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE *P.stenostachya*

ANEXO D: TLC Y OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCALOIDAL *P.stenostachya*

ANEXO E: EXTRACTO ALCALOIDAL BRUTO *P.stenostachya*

ANEXO F: ENSAYOS AUTOGRÁFICOS RESULTADOS *P.stenostachya*

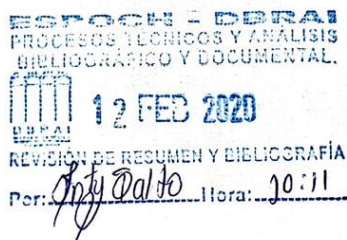
ANEXO G: ENSAYOS AUTOGRÁFICOS CONTROLES POSITIVOS *P.stenostachya*

ANEXO H: GUÍA DE MOVILIDAD *P.stenostachya* OTORGADO POR MAE PASTAZA-
ECUADOR

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue determinar el potencial inhibitorio de la fracción alcaloidal de *Psychotria stenostachya* sobre xantina oxidasa y radical superóxido mediante autografía. En primera instancia, se llevó a cabo un proceso de maceración alcohólica de las hojas de *P. stenostachya* con metanol, para la posterior extracción líquida de alcaloides totales con solventes orgánicos mediante variaciones de pH, alcanzando un rendimiento de 0,76%. A continuación, se separaron los componentes del extracto alcaloidal a través de TLC, utilizando como fase móvil cloroformo/ trietilamina/metanol en proporciones (6:0.5:0.6) y se reveló en una cámara UV a 254 nm. Los ensayos autográficos se realizaron en placas de TLC por medio de la técnica “dot blot”; se sembró 10 µL de cada solución a concentraciones de 100, 50, 10, 5 y 1 µg utilizando como disolvente metanol. Para la evaluación del potencial antioxidante de *P.stenostachya*, se usó ácido ascórbico como estándar para el modelo DPPH*, mientras que para la determinación de captación de radical superóxido se empleó taxifolina como estándar para los modelos RIBOFLAVINA/LUZ/NBT y NADH/PMS/NBT. Finalmente, para la evaluación de capacidad inhibitoria sobre XO se utilizó alopurinol como estándar y xantina como sustrato. De esta manera se distingue entre inhibidor puro de XO y un captador de $O_2^{\cdot -}$. Los resultados se presentaron de forma cualitativa a través de cambios de coloración y diámetro de halo. Con respecto a los datos cuantitativos, estos se registraron mediante el programa GelAnalyzer para determinar el área de inhibición. Como resultado se obtuvo la fracción alcaloidal de *P. stenostachya* teniendo capacidad antioxidante significativa al poder captar radical superóxido; sin embargo, carece de actividad inhibitoria sobre Xantina Oxidasa ya que no presentó reacción. Se recomienda más estudios y análisis con respecto la composición química y estructural de la especie vegetal.

Palabras clave: <ALCALOIDE>, <AUTOGRAFÍA>, <ANTIOXIDANTE>, <GEL ANALYZER>, <*Psychotria stenostachya*>, <RADICAL SUPERÓXIDO>, <XANTINA OXIDASA>



SUMMARY

The main objective of this investigation was to determine the inhibitory potential of the alkaloidal fraction of *Psychotria stenostachya* on xanthine oxidase and superoxide radical by autography. In the first instance, an alcoholic maceration process of the leaves of *P. stenostachya* with methanol was carried out, for the subsequent liquid extraction of total alkaloids with organic solvents by means of pH variations, reaching a yield of 0.76%. Next, the components of the alkaloidal extract were separated through TLC, using chloroform / triethylamine / methanol as mobile phase in proportions (6: 0.5: 0.6) and developed in a UV chamber at 254 nm. Autograph tests were performed on TLC plates by means of the "dot blot" technique; 10 μ L of each solution was seeded at concentrations of 100, 50, 10, 5 and 1 μ g using methanol as solvent. For the evaluation of the antioxidant potential of *P. stenostachya*, ascorbic acid was used as a standard for the DPPH * model, while for the determination of superoxide radical uptake taxifoline was used as a standard for the models: RIBOFLAVINA / LUZ / NBT and NADH / PMS / NBT. Finally, allopurinol was used as standard and xanthine as a substrate for the evaluation of inhibitory capacity on XO. In this way, a distinction is made between pure XO inhibitor and a O_2^- scavenger. The results were presented qualitatively through changes in color and halo diameter. With respect to quantitative data, these were recorded using the GelAnalyzer program to determine the area of inhibition. As a result, the alkaloidal fraction of *P. stenostachya* was obtained having significant antioxidant capacity by being able to capture superoxide radical; however, it lacks inhibitory activity on Xanthine Oxidase since it did not show a reaction. It is recommended; more studies and analysis regarding the chemical and structural composition of the plant species.

Keywords: <ALKALOID>, <AUTOGRAPHY>, <ANTIOXIDANT>, <GEL ANALYZER>, <*Psychotria stenostachya*>, <SUPERXIDE RADICAL>, <XANTINE OXIDASE>



INTRODUCCIÓN

Antecedentes

A nivel global, existen varios reportes bibliográficos sobre la hiperuricemia y su tratamiento. Uno de los tratamientos empleados incluye a los alcaloides, que son metabolitos secundarios presentes en la flor de jengibre que en conjunto con los flavonoides presentan actividad inhibitoria de XO por medio del método de Wegner (Dewi et al. 2016). Otro estudio vinculado con la inhibición de la xantina oxidasa como tratamiento de la hiperuricemia, se basa en el mecanismo anti-hiperuricémico del glucomanano de Kojac (KGM) relacionado con la capacidad inhibitoria sobre la enzima y la expresión de ARNm de la xantina oxidasa y adenosina deaminasa en el hígado (Yuan Zhang, 2018).

Otro tratamiento, incluye diferentes tipo de planta como la *Ermiao wan* que contiene alcaloides como la berberina, jatrorrizina, que inhibe la xantina oxidasa (Kong, et. al. 2004). Adicionalmente, se descubrieron dos plantas medicinales con propiedades antihiperuricémicas bien establecidas para el trastorno de hiperuricemia las cuales son la cebolla *Allium cepa* y “pansit-pansitan”; *Peperomia pellucida*, cuyo tratamiento ha demostrado efectos beneficiosos sobre la hiperuricemia y el estrés oxidativo, no obstante inhiben de forma significativa la actividad hepática y la actividad de la xantina oxidasa/xantina deshidrogenasa, con una gran mejora en los biomarcadores del estrés oxidativo (Haidari et al, 2008).

Curiosamente, se ha demostrado que las hojas de *Carica papaya*, contienen sustancias con potente actividad inhibitoria de xantina oxidasa (Azmi et al, 2012). Por otra parte, se da a conocer que el género *Palicourea* es una fuente alterna de compuestos bioactivos, lo controversial con esta información se fundamenta en las pocas investigaciones existentes sobre la actividad biológica de un sinnúmero de especies vegetales, sobre todo en Latinoamérica. Bajo este contexto, los únicos estudios disponibles se centran en la química y las propiedades biológicas de especies de diferentes géneros como *Palicourea* L y *Psychotria* L. (Rubiaceae), siendo el género *Psychotria*, el más grande de la familia de las Rubiaceae, que comprende alrededor de 2000 especies, principalmente encontradas en regiones tropicales y subtropicales del mundo y dentro de la Amazonía Ecuatoriana (Carvalho, 1990).

Gran variedad de las especies de este género posee propiedades antivirales, antifúngicas, antiparasitaria, antiinflamatorias, emético, entre otras bioactividades, siendo los alcaloides los compuestos característicos de este género *Psychotria* (Kishan y Jean-Michel 2006).

Identificación del problema

Los altos niveles de ácido úrico se conocen como hiperuricemia, siendo la gota la enfermedad más relevante, esta se ha incrementado con el pasar del tiempo. La mayoría no la toman en cuenta a pesar de que desde tiempos antiguos se conoce su etiología y su descripción clínica, pero la población adulta solamente le da importancia cuando ya está en etapa avanzada y crónica, no obstante cabe recalcar que no existen datos estadísticos acerca de la información que posee la población sobre la enfermedad.

En el Ecuador, una de sus principales causas es la mala alimentación demostrada por datos estadísticos llevados a cabo por el Instituto nacional de estadística y censo por medio de la encuesta nacional de Salud y nutrición (INEC-ENSANUT), en la cual da a conocer que el 50% de la población lleva una mala alimentación, tomando como principales determinantes, a una dieta no balanceada y el estrés (Rodríguez, 2018).

La enfermedad se da por acción de la xantina oxidasa (XO), esta enzima se encarga de catalizar la oxidación de la hipoxantina y xantina a ácido úrico; porque al ser inhibida, disminuye la acumulación en las articulaciones de ácido úrico, controlando la enfermedad. Actualmente, el tratamiento para la Gota es el alopurinol (análogo de la hipoxantina); el cual reacciona con oxígeno reactivo produciendo aloxantina, más soluble y siendo más fácil de excretar. Además de los síntomas de la enfermedad de la Gota, la utilización continua de alopurinol conlleva a que se presenten efectos contraproducentes para la salud de las personas como deterioro renal, daño hepático, vasculitis, necrosis entre otras. Los fármacos no eliminan la superproducción de ácido úrico; por lo que es necesario encontrar nuevas alternativas para el control y prevención de la gota (Riera, 2015).

Justificación del estudio

El presente proyecto se basa en la determinación de la inhibición de la enzima Xantina Oxidasa (XO), debido a que esta enzima produce especies reactivas de oxígeno durante sus procesos catalíticos y contribuye al desarrollo de enfermedades como hipertensión, trastornos cardiovasculares, daños renales e inclusive diabetes. Así mismo, el estrés oxidativo puede verse potenciado por estados de estrés, mala alimentación, y otros, datos que han sido expuestos por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) por medio la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT).

El estrés oxidativo está implicado en el origen de enfermedades cardiovasculares y elevación de glucosa en sangre lo que puede dar lugar a diabetes. La importancia del proyecto radica en buscar alternativas para el tratamiento de enfermedades causadas por acumulación de ácido úrico. Una alternativa es *P.stenostachya* originaria de América del Sur, debido a que los medicamentos antihiperuricémicos comúnmente prescritos, como alopurinol y probenecid, son aprobados sólo en el tratamiento de la gota, asociada a la urolitiasis, y para la prevención de tumores y síndrome de lisis en el cáncer. Sin embargo, estas drogas pueden presentar un mayor riesgo de reacciones adversas (Juraschek et al., 2011). A pesar de ser un medicamento que previene los ataques de gota y de sus complicaciones, en los primeros días de uso, se produce un efecto paradójico con un mayor riesgo de ataques de artritis gotosa, provocando que se use de manera continua, resultando en reacciones alérgicas, como es el caso del alopurinol en el 5% de los pacientes, manifestándose por erupciones en la piel y en casos más extremos el síndrome de Stevens –Johnson o nefritis intersticial.

Es por ello que se ha visto necesario, el estudio de otras alternativas medicinales como es *Psychotria stenostachya*, que alberga moléculas bioactivas, entre ellas múltiples alcaloides que podrían poseer actividad biológica para el tratamiento de diversas enfermedades como agentes antioxidantes y que pueda contrarrestar y tratar los efectos de las ROS y del estrés oxidativo. Cabe recalcar que si no se controla la elevación de ROS, estas pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes como son los radicales superóxidos (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que dan lugar a múltiples reacciones con otros compuestos del organismo induciendo daño celular. Por lo anterior, se comprende que si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar los efectos tóxicos que posee (Gutiérrez, 2002).

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

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

Objetivos específicos

- Determinar la calidad de materia prima de la especie *Psychotria stenostachya*, por medio de pruebas físicas y tamizaje fitoquímico.
- Obtener mediante extracción líquido-líquido con variación de pH, la fracción alcaloidal de *Psychotria stenostachya*.
- Determinar la porción alcaloidal en el extracto mediante autografía en TLC por inmersión de agar de la planta *Psychotria stenostachya*.
- Evaluar entre los inhibidores de XO y los captadores de superóxido por medio de la generación no enzimática de superóxido (NADH y Riboflavina)

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1. Familia Rubiaceae

3.1.1. *Características*

La familia Rubiaceae es una de las más grandes de las angiospermas con un aproximado de 13,000 especies y dentro de ellas se distribuye en al menos 650 géneros. Generalmente son plantas leñosas y tropicales, y radica mayormente en ser árboles, arbustos perennes hasta hierbas anuales, lianas o epífitas, localizadas en zonas de regiones templadas (Badoc, Patouille y Lacomblez 2005,p.550).

Rubiaceae, data sus inicios desde millones de años atrás. Las especies dentro de esta familia, es compleja de esquematizar por su clasificación taxonómica se lo realiza a base de estudios filogenéticos y quimiotaxonómicos para identificación de metabolitos bioactivos. Dentro de las publicaciones realizadas por estas se disponen de 3 subfamilias, mismas que son Rubioideae, Ixoroideae, Cinchonoideae (Bremer B. y Eriksson 2013, pp. 766-793.).

Como características botánicas se destaca que pueden ser sufrútices, hierbas, enredaderas o lianas, de hábitos terrestres o raras veces epífitas, a veces con rafidios. También poseen hojas opuestas, simples, con estípulas. Sus tallos son tetragonales y con muchos ganchos que permiten que se sujeten a especies circundantes. Con frecuencia estas suelen tener hojas iguales y que forman junto a ellas verticilos de 4 a 12 hojas muy aparentes a manera de interpeciolares. Poseen flores con cáliz muy reducido, en donde tiene entre 4 y 5 segmentos y su corola mayormente se presenta en forma gamopétala agavillada, rotácea o tubulosa de 4 a 5 lóbulos, y con una variedad de color como puede ser roja amarilla, rosada o blanca (Cabañas, 2005).

3.1.2. Distribución Global

La familia Rubiaceae a pesar que es un tipo de planta leñosa, puede adaptarse a varias condiciones ambientales siendo mayormente encontrada y distribuida de manera muy amplia en el planeta, en zonas y regiones tropicales, selvas, bosques húmedos, especies que se desarrollan en zonas templadas son mayormente herbáceas (Bremer B. y Eriksson 2013).

A nivel Latinoamericano la distribución de la familia Rubiaceae se ha observado en zonas de Colombia, Venezuela, Brasil, con alrededor de 2500 especies aproximadamente siendo su hábitat preferible las zonas cálidas (Davis et al. 2009).

Por otro lado, en Ecuador posee en existencia unos 84 géneros de plantas y 557 especies, siendo de todas estas 98 plantas endémicas. Cabe destacar que de todas ellas el 50% se encuentran en peligro de extinción según registros tomados y desarrollados por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y 13% de encontrarse ya extintas (Cornejo y Jaramillo 2000).

3.2. Género Psychotria

El género *Psychotria* es uno de los géneros más grandes de la familia Rubiaceae, con más de 2000 especies, que se dividen entre pantropical y subtropical, teniendo como características botánicas ser arboles pequeños, hierbas o arbustos, y teniendo frutos carnosos de apariencia lisa con hojas de color marrón o verde, poseen un ovario inferior y sus estípulas son mayormente caducas con cresta pequeña y pálida, una corola recta de color blancuzco o verdoso, su ovario con un solo óvulo por lóbulo, sus semillas tienen dos surcos en la superficie ventral plana y usualmente cuatro surcos longitudinales en la parte dorsal. Se encuentran distribuidas entre 700 especies en Neotrópico, y 700 especies entre Asia y Oceanía (Hamilton, 1989, p. 68-94).

En Ecuador se encuentran aproximadamente 50 especies distribuidas en regiones de baja altitud; 7 especies han sido identificadas en los bosques andinos: *P. hartwegiana* Standley, *Cephaelis*

jamesonii Standley, *P. rugulosa* H.B.K. y *P. tinctoria* Ruiz & Pavón (Ulloa y Moller, 2018).

3.2.1. Etnobotánica de la especie *Psychotria*

La utilidad que llevan a cabo en el mundo de la medicina son varias ya sirven para el tratamiento de patologías desde a nivel del aparato respiratorio hasta periodos de posparto, siendo usadas a manera de infusiones o en decocción. Mientras que su uso en forma de baño es para tratamientos externos como dolores de cabeza, fiebre y también tratar lesiones dérmicas. De esta manera podemos apreciar que estos usos son de tipo medicinal aunque también destacan como alimento dentro de nuestro país (Frescura et al., 2013: p. 23).

A parte de los usos ya mencionados también cuenta a la especie de *Psychotria* como una planta utilizada para deshacer maleficios, curar el mal aire, deshacer la mala suerte, atraer buenas energías, y eliminar espíritus todo esto entrando en el mundo de la parapsicología y de los shamanes, tomando en cuenta que aquí en nuestro país utilizan una especie conocida como *Psychotria viridis* para elaborar el brebaje conocido como “ayahuasca” por poblaciones indios propios de nuestras tierras (De la Torre et al. 2008: pp. 551-555).

3.2.2. Alcaloides de la especie *Psychotria*

Dentro de la familia y especie de plantas podemos encontrar alcaloides de gran importancia biológica y médica siendo los alcaloides indólicos monoterpénicos uno de los grupos más grandes y heterogéneo que contiene metabolitos secundarios y dentro de ellos nitrógeno en la clase de compuestos que pueda contener además se encuentran en especies como *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Psychotria*, entre otras. Dentro de su composición se puede encontrar una síntesis de triptamina adicionado con un secoiridoide para producción de sustancia intermedia central, por otra parte la estrictosidina, es aquella que puede convertirse por una serie de reacciones oxidativas, de sustitución y también de reordenamiento a muchos alcaloides indólicos monoterpénicos todas biológicamente activas y que han demostrado e identificado su naturaleza. Al tener una gran complejidad su utilidad es igualada a la misma en el ámbito medicinal, para

poder tratar enfermedades humanas, como son desórdenes neurológicos, cánceres, trastornos cardiovasculares, entre otras. Además, últimamente se demostró que la conolidina, que es una AMI poco común, posee potentes propiedades analgésicas no opiáceas que podría ser una alternativa prometedora a opiáceos para tratar el dolor (Kishan y Jean-Michel 2006).

No obstante, a parte de los compuestos que se mencionaron, existen otro tipo de alcaloides como lo son los alcaloides de quinolina extraídos de *P. glumerullata*, también se aisló los alcaloides de benzoquinolizidina extraído de *P.klugii* siendo estos alcaloides *O-demetilicefalina*, *cefalina*, *isocefalina* (Yang et al., 2016: pp. 1-3).

3.2.3. Alcaloides Indol Monoterpénicos

Los alcaloides Indol Monoterpénicos, también conocidos como (MIAs) son los principales alcaloides del género *Psychotria*, mismos que son el resultado de la biosíntesis de los terpenoides iridoides, triptófano y la secologanina, otorgándoles actividades biológicas como antiarrítmicos, antipalúdicos, entre otros. Uno de los primeros alcaloides monoterpénicos aislado fue el (N-β-D-glucopiranosil vincosamida) a partir de las hojas de *P. leiocarpa* dando como resultado que una exposición extensa de luz y el tiempo de vida de la planta influye en la acumulación del alcaloide (Carvalho et al., 2016, p. 234).

3.2.4. Principales Actividades Biológicas

1.2.4.1 Antioxidante

Varios estudios han puesto en plan de sugerir que antioxidantes poseen las características de exhibir actividades biológicas, incluyendo acciones antialérgicas, antivirales, antiinflamatorias y vasodilatadoras. Los efectos protectores de los antioxidantes se atribuyen a su capacidad de suprimir la formación de especies reactivas de oxígenos también conocidos como ROS. Mediante la inhibición de algunas enzimas u oligoelementos quelantes implicados en la producción de radicales libres, la búsqueda de especies de radicales y más especialmente de ROS, son indicios

para investigación, descubrimiento y la mejora de la regulación de la defensa antioxidante, siendo la especie *P. umbellata* unas de que les aplicaron ensayos y que se comprobó que poseía actividad antioxidante (K. Sachidanandam, 2005).

1.2.4.2. Analgésica

La actividad analgésica, una de las principales, para aliviar espasmos, contusiones y dolores por traumatismos fue aislada por partes de hojas y flores de la especie *P. colorata*, en donde fue puesta a prueba en animales con dolores de movimiento y dando a conocer que poseía dicha actividad y gran efectividad, comparándose a la de los opioides (Elisabetsky et al., 1995, p. 75).

1.2.4.3. Citotóxica

La actividad citotóxica fue aislada desde la especie *P. fosteriana*, donde se encuentran cuatro tipo de alcaloides de poliindolina con actividad citotóxica, la prueba fue realizada en células hepáticas en ratas con carcinoma (Carvalho et al., 2016, p. 242).

1.2.4.4. Antiviral

Alcaloides como los de la Ipecac, la emetina, que poseía actividad antiviral, fueron aislados de la especie *P. ipecacuana*, el ensayo realizado a este, fue al inhibir la replicación del VIH-1, en el proceso de la transcriptasa inversa, obteniendo como resultado de disminución de modelos celulares en un 80% en infección por VIH (Calixto et al., 2016, p. 1371).

3.3. *Psychotria stenostachya*



Figura 1-1: *Psychotria stenostachya*

Fuente: (Bioweb, PUCE., 2018)

Psychotria stenostachya también conocida como “Obenkawe” en la lengua waorani wao tededo al estar ubicadas en zonas de la población de esta cultura, Pastaza, Orellana, Napo es decir región norte amazónico y siendo la región más idónea para su crecimiento tomando en cuenta que en parte de la costa norte ecuatoriana también. Dentro del Ecuador se encuentra ampliamente distribuida en tierra firme y las planicies mal drenadas y es utilizada para tratar hemorragias menstruales siendo usada la corteza mientras que las hojas son utilizadas como tinte, tratamiento de mordedura de serpientes y dolores gastrointestinales, pero al usarlos como infusiones puede servir como tratamiento para leishmaniasis y enfermedades cardiovasculares. Por otra parte sus frutos son usados como alimento para aves. Y otro dato curioso a cerca de esta planta es el uso que le otorga al combinarse con la bebida “yaje” proveniente de *Banisteriopsis caapi* para inducir al vómito. (De la Torre et al. 2008: pp. 554).

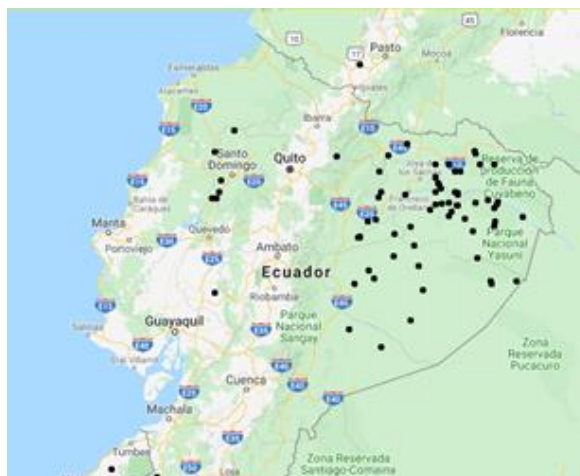


Figura 2-1: Distribución geográfica de la especie *Psychotria stenostachya* en Ecuador

Fuente: (Bioweb, PUCE., 2018)

3.3.1. Descripción botánica

Es un arbusto de 2 o 4 metros de altura con hojas simples y opuestas siendo de forma elípticas con nervios secundarios equidistantes y arqueados. Su nervadura es oblicua y sus estípulas bilobadas a ambos lados. Posee inflorescencia en la panícula terminal, su flor es sésil con corola pentámera tubular, el fruto de esta planta es a manera de globo y de color roja que al madurar termina con una semilla en su centro (Pérez, 2014).

3.4. Xantina oxidasa (XO)

Su descubrimiento data desde el año 1902 en donde Schardinger demuestra que en la leche bovina existe una enzima capaz de oxidar ácidos a partir de aldehído, poniéndole de nombre “enzima Schardinger”. A partir de este estudio Morgan demuestra en 1922 que hay la presencia de una enzima que oxida xantina e hipoxantina, llamándola “XO”. Una vez descubierta pudo ser ampliamente definida y distinguida por Booth en 1938 demostrando con evidencias de que la enzima Schardinger se trataba de la misma XO, como una isoforma de homodímero xantina oxidorreductasa (XOR) con un peso molecular equivalente a 290 kDa (Kostić et al., 2015, p. 2).

3.4.1. Estructura de XO

Dentro de la estructura se aprecia a familia de las proteínas de molibdeno, cuya conformación consta de dos sitios separados para su unión, conteniendo un molibdeno, dinucleótidos de adenina flavina (FAD) y dos centros I Y II (Fe-S), de esta manera se posee tres dominios respectivamente de potencial redox (Kostić y Maiuolo et al., 2016, p. 5).

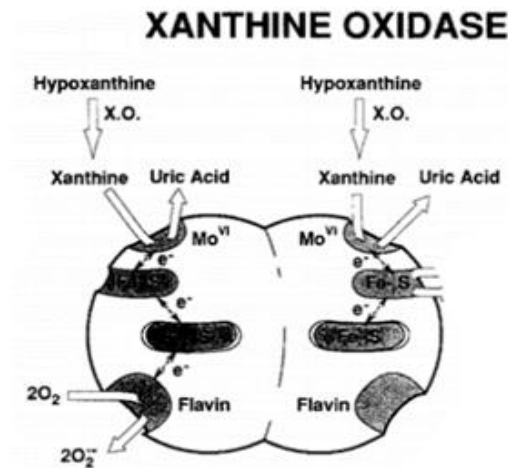


Figura 3-1: Estructura molecular de xantina oxidasa

Fuente: (Salaris, 1991)

3.4.2. Mecanismo de reacción de XO

El mecanismo que realiza es de la catalización de hipoxantina y xantina como sustratos, por medio de hidroxilación oxidativa, para generar ácido úrico y redox de O_2 en centro de la flavina, dando lugar a radical superóxido y peróxido de hidrógeno, todo esto durante el metabolismo de las purinas (Ojha et al. 2017: p. 4-5).

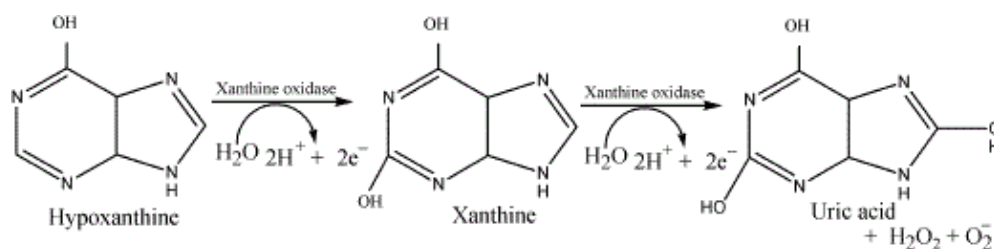


Figura 4-1: Mecanismo producción de ácido úrico

Fuente: (Tamta, 2005)

El mecanismo de acción de la XO se enfoca principalmente en la degradación de purinas y nucleótidos cuando se da la actividad de renovación de ácidos nucleicos endógenos y a su vez de transformación de las purinas en ácido úrico durante el proceso (Bhagavan y Ha, 2015, p. 476).

El proceso de hidrólisis que se lleva a cabo en los ácidos nucleicos del organismo, genera mononucleótidos, por medio de enzimas endógenas y exógenas que rompen los enlaces, luego de ello son degradados a nucleósidos, por medio de la enzima 5'-nucleotidasa liberando así guanosina (GMP) y adenosina (AMP). Por otro lado al ser liberados, sus vías de metabolización son diferentes, el grupo amino del AMP se erradica por desaminación formando iosina, luego, actúa la nucleotidasa generando HX, cuya función es transformar la guanosina en guanina. La oxidación de HX por XO da lugar a xantina, mientras que la guanina es desaminada para dar xantina y finalmente se oxida por la enzima xantina oxidasa para producir ácido úrico (Maiuolo et al., 2016, p. 8).

A su vez en la oxidación de purinas, el Molibdeno recepta electrones provocando su reducción a Mo^{6+} a Mo^{4+} formando un complejo $\text{LMo(IV)-O-(SH)(OP)}$; la transferencia de los electrones de Molibdeno desde su centro hacia afuera implica que la molécula de H_2O haga desplazar el complejo de la enzima-sustrato para dar lugar a Mo-OH , al mismo tiempo se da una semirreacción oxidativa, trasladando los electrones del FAD al NAD^+ para producir deshidrogenasa u O_2 si fuese el caso de producir oxidasa. Finalmente en la hidroxilación de HX se genera xantina y con la adición del grupo hidroxilo (OH) forma el ácido úrico (Cao, Pauff, & Hille, 2010, p. 28044).

3.5. Hiperuricemia

Es la condición clínica en donde existen niveles elevados de ácido úrico en sangre, producto de una alteración en el metabolismo de las purinas, teniendo como valores de referencia de 5,7 mg/dL para mujeres y 7,0 mg/dL en hombres. Y por ende da lugar a varias patologías tomando en cuenta que es el factor de riesgo más relevante para el desarrollo de la enfermedad llamado Gota, que se destaca por la acumulación de ácido úrico en las articulaciones (Gondim et al., 2001, p. 463).

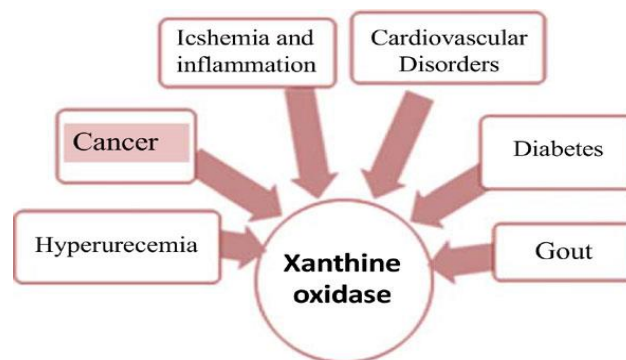


Figura 5-1: Enfermedades derivadas de acumulación de Xantina oxidasa

Fuente: (Gibblings 2010)

3.5.1. Epidemiología

A nivel mundial la prevalencia de la enfermedad de la gota se encuentra en el 0,1% al 10% en países como América del Norte, Europa Occidental (Chen, Lü, & Yao, 2016, pp. 2503-2505). Con lo que respecta al género, por cada 10 mujeres y hombres, 3 mujeres y 4 hombres desarrollan trastornos derivados de hiperuricemia y el 10% de estos desarrollan gota (Sancho, 1980, p. 101).

3.5.2. Etiología

Las causas principales para hiperuricemia son de carácter genético con un 90% de los casos, también de estrés en la vida cotidiana y mala alimentación. Todos estos contribuyen en la alteración del metabolismo de purinas y por supuesto, del incremento de ácido úrico sérico (Sancho et al., 1980, p. 101).

3.5.3. Factores de Riesgo

Dentro de los factores de riesgo para la hiperuricemia se encuentran los factores modificables como lo son la edad, socio-económico, etnia, genes. Mientras que los que no son modificables se tienen al tipo de alimentación, consumo de drogas, tabaco y alcohol (Chalès et al., 2017, pp. 4-7).

3.5.4. Tratamiento

Para contrarrestar los niveles elevados de ácido úrico se utilizan medicamentos uricostáticos como lo son el alopurinol y febuxostat, en donde actuando inhibiendo de manera competitiva con la XO, de esta manera reducen los niveles de ácido úrico en sangre, cabe destacar que medicamentos uricosúricos ayudan a una facilidad para la excreción como el probenecid (Bove et al., 2017, p. 24).

3.6. Inhibidores de XO

Cuando el organismo presenta altos niveles de XO, es decir concentraciones elevadas de UA, se desencadena el estrés oxidativo, el cual es la principal causa para varias patologías de índole vascular; cabe recalcar que XOR representa un papel importante, que limita el metabolismo de las purinas, por ello los inhibidores de XO, poseen una función fundamental para reducir los niveles que se encuentran presentes en sangre y a la vez del estrés oxidativo (Kostić et al., 2015)

3.6.1. Alopurinol

El alopurinol es un medicamento eficaz inhibidor de la XO, y siendo el primero en ser descubierto por Gertrude Elion y Gerge Hitchings en 1940. Luego de severas pruebas de efectividad fue aprobada en 1966 por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA). Y desde ese tiempo ha sido utilizada para tratamiento de gota e hiperuricemia e inclusive de condiciones asociadas a la isquemia y lesión por reperfusión (Chen et al., 2016, p. 2507; Klein et al., 1996).

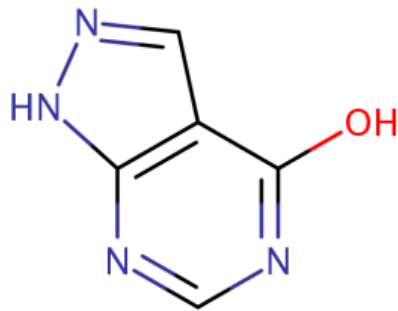


Figura 6-1: Estructura química de Alopurinol

Fuente: (Sielc 2018)

3.6.1.1. Mecanismo de acción

Al ser metabolizado por el hígado, se libera su metabolito activo, el oxipurinol también conocido como aloxantina, que ejerce su acción como un inhibidor competitivo con el sitio de unión de la enzima XO. De esta manera disminuye la transformación de hipoxantina a ácido úrico. Como restante de ello queda un nivel elevado de concentración de xantina e hipoxantina a nivel sanguíneo produciendo inhibición por retroalimentación de síntesis de purinas y a la vez de niveles de ácido úrico sérico (Ojha et al. 2017: p. 5-7).

3.6.1.2. Efectos adversos

El medicamento alopurinol presenta gran hepatotoxicidad, también síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis, neuritis periférica, nefritis intersticial, también un grave deterioro renal por el metabolismo de pirimidina, además en embarazo pueden surgir malformaciones congénitas. La toxicidad de este medicamento radica en la acumulación de oxipurinol, esto, en conjunto de factores inmunológicos puede modificar las proteínas celulares. Pueden transcurrir meses o años de la medicación para que puedan surgir este tipo de efectos (Ojha et al. 2017: p. 8; Chen, Lü y Yao 2016: p. 2507).

3.6.2. Febuxostat

El medicamento febuxostat es un inhibidor selectivo de XO no análogo de purinas. Sintetizado en un instituto de Teijin, aprobado por FDA en 2009. Es prescrito mayormente para pacientes que presentan intolerancia a alopurinol, pero se debe tener en cuenta la insuficiencia renal que pueda tener el paciente (Hosoya et al., 2014, p. 2).

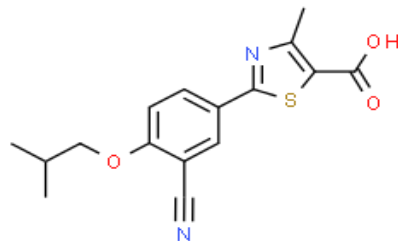


Figura 7-1: Estructura química de Febuxostat

Fuente: (Royal society of chemistry, 2018)

1.6.2.1. Mecanismo de acción

Su mecanismo de acción consta en el bloqueo del centro activo molibdeno-pterina en el complejo enzimático. Se distingue del anterior medicamento por inhibir la forma reducida de la enzima XO, acoplándose al complejo de manera estable con la enzima ya sea reducida u oxidada, impidiendo la producción de ROS (Ragab et al., 2017; Chen et al., 2016).

1.6.2.2. Efectos Adversos

La principal reacción del febuxostat es hipersensibilidad hepática o renal, adicionalmente erupciones en la piel leves y solamente graves a personas con antecedentes de efectos adversos al alopurinol, como pueden ser trastornos cardiovasculares, es por ello que La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) recomienda que antes de prescribir este medicamento se haga un seguimiento farmacoterapéutico y ensayos de seguridad del paciente teniendo en cuenta que no tenga alguna enfermedad cardiovascular (Ragab et al., 2017).

3.7. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el desequilibrio mediado por radicales libres que se da por una disminución de antioxidantes dentro de las células causando daños dentro de moléculas de la célula, como orgánulos y ácidos nucleicos. (Parejo et al. 2002: p. 6862). Por ello, es importante conocer que los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) al encontrarse en mayor concentración generan degradación de proteínas, oxidación de enzimas (Pisoschi 2015: p. 55)

3.7.1. Fuente exógena

Como fuentes exógenas de radicales libres se tiene en todo lugar que nos puede rodear comenzando desde la contaminación del medio ambiente con humo de industrias como residuo de incineraciones, solventes industriales, tabaco, alcohol, alimentos sobrecosidos, radiación entre

otros. Todos estos al llegar a metabolizarse dentro del organismo dan lugar a los radicales libres (Liguori et al. 2018: p. 758).

3.7.2. Fuente endógena

La fuente endógena de ROS y radicales libres se dan de manera natural como lo son la respiración celular, la respuesta inmune antes infecciones, la metabolización de alimentos son uno de los principales que son generadores de especies reactivas pero que son necesarias para mantener al ser humano con vida, sano y funcional. Durante estos procedimientos al generarse ROS a partir del O_2 , se forma anion superóxido ($O_2 \cdot -$), dentro del orgánulo, la mitocondria, en el cual se da el transporte de electrones, radical hidroxilo ($OH \cdot$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Birben et al, 2012, p. 9).

3.8. Captación de radicales libres

Los antioxidantes también conocidos por su función como captadores de radicales libres se encuentra de manera natural dentro de nuestro organismo (endógeno) y la otra fuente que proviene de mayormente los alimentos que ingerimos (exógeno) para poder contrarrestar los efectos de radicales libres y ROS que se encuentren en exceso. Al existir un alto grado de factores de riesgo para múltiples enfermedades, se ha puesto a cabo el estudio de obtención de antioxidantes naturales como se los puede encontrar en plantas, frutas vegetales, que según estudios poseen un alto grado de acción antioxidante que ayudarían a combatir las ROS, y así poder reducir la tasa de mortalidad derivada de enfermedades causadas por el factor de hiperuricemia, fomentando la buena alimentación y el uso racional de medicamentos que tratan estos trastornos a causa de sus efectos adversos a largo plazo (Lobo et al., 2010: p. 123).

3.8.1. Fuente Endógena

Los antioxidantes que se tienen dentro del organismo a manera de enzimas, algunos ejemplos de estas son el glutatión peroxidasa (GSH-Px) que convierte los (H_2O_2) y ($OH \cdot$) en formas no toxicas por oxidación reducida en disulfuro de glutatión , otra fuente es la enzima superóxido dismutasa (SOD) que convierte el anión superóxido en H_2O_2 , descomponiéndose la misma en H_2O y O_2 , Por

otro lado se tiene a la enzima catalasa (CAT) que evita la producción de radicales (OH). No obstante hay que recordar que los ya antes mencionados son enzimáticos pero de igual manera de allí se tiene también antioxidantes no enzimáticos que son aquellas que interactúan con las ROS y finalizan su cadena de reacción, como lo son la albúmina, la bilirrubina y tocoferol, representando en un 80% de su poder antioxidante dentro del plasma celular (Liguori et al., 2018: p. 758).

3.8.2. Fuente Exógena

Dentro de los antioxidantes exógenos podemos destacar a la vitamina C y E cuya función es eliminar el anión hidroxilo y superóxido y la intervención en la peroxidación lipídica en las membranas de la célula respectivamente. También se pueden destacar a los antioxidantes fenólicos como son zinc, flavonoides, resveratrol, lecitinas, selenio (Liguori et al., 2018: p. 758).

3.8.2.1. Clases

Se tiene antioxidantes naturales y sintéticos. Dentro de los naturales son aquellos que contienen aceites y grasas para elaboración de alimentos, medicamentos y suplementos. Por otro lado, los sintéticos son elaborados a partir de compuestos fenólicos, como el hidroxitolueno butilado (BHT) y el hidroxianisol butilado (BHA) son también utilizados para elaboración de medicamentos e inclusive como aditivos para ciertos alimentos procesados, pero debido a su inestabilidad y volatilidad, las grandes industrias están inclinándose a la utilización de fuentes naturales de antioxidantes (Liguori et al., 2018: p. 758).

3.9. Autografía

Autografía, es un método que se utiliza para poder detectar actividades antimicrobianas, enzimáticas, antifúngicas y antioxidantes. Y a su vez separar compuestos usando métodos como Cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC)

cromatografía laminar de rendimiento óptimo (OPLC) y la electrocromatografía capilar (CEC). El método posee un alto grado de sensibilidad en combinación de la separación cromatográfica y determinación de actividad in situ, facilita la localización y aislamiento de compuestos activos en una mezcla, teniendo como ventajas un rendimiento de tiempo y bajo costo económico de consumo (Ramallo, Zacchino, & Furlan, 2006, pp. 15-16).

3.9.1. Autografía de contacto

En este tipo de autografía la placa de TLC con la mezcla de compuestos se siembra sobre el agar luego se lo deja que se solidifique para que posterior a ello mediante difusión los compuestos de la placa que posean, se fijan y pueda luego retirarse e incubarla. Las zonas de halos de inhibición se podrán distinguir, donde se podrán apreciar por la actividad que se encontraba en contacto con la capa del agar (Choma y Grzelak, 2011, p. 2685).

3.9.2. Autografía directa

La placa de TLC con la mezcla de componentes previamente preparada es sumergida en suspensión de interés, para incubarse y poder observar las zonas en donde no hubo actividad alguna que correspondan a la actividad biológica esperada. El principio de este método se basa en que una placa desarrollada de TLC se sumerge en una suspensión de reacción. Los lugares en donde se detecta actividad biológica se muestran como zonas de inhibición (Rivas-Morales, 2016, p. 88).

3.9.3. Autografía en inmersión (superposición de agar)

Aquella técnica que combina la autografía de contacto por poseer el agar y mantenerlo en la superficie de la placa de TLC y una transferencia de compuestos de la placa de agar, una vez que

es cubierta se gelifica, y continua con la siembra de la enzima teniendo en cuenta que el agar debe mantenerse bajo temperaturas de 45°C (Choma y Grzelak, 2011, p. 2686).

3.10. Inhibidores de XO

3.10.1. Sistema xantina/xantina oxidasa/NBT

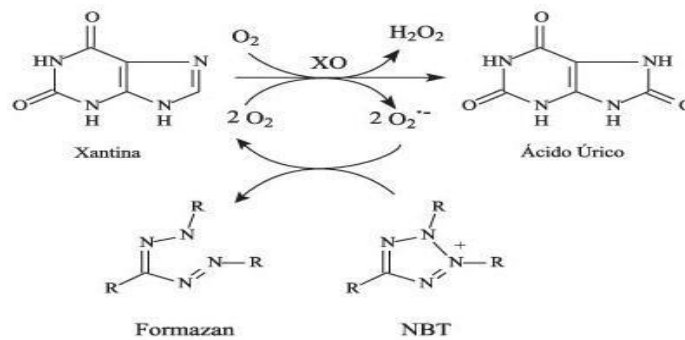


Figura 8-1: Mecanismo de reacción de Sistema xantina/xantina oxidasa/NBT

Fuente: (Alves et al., 2010)

Este método se basa en la aplicación de una solución que contiene la enzima XO y NBT; donde se genera oxidación de Xantina Oxidasa produciendo radicales superóxido, que reducen el reactivo NBT con una coloración que cambia de amarillo pálido a un formazán púrpura intenso. Las sustancias que son capaces de inhibir la reacción de la enzima evitarán que se produzca O_2 y por ende formaran formazán (Ramallo et al. 2006, p. 17).

3.11. Determinación de captadores de radicales libres

El descubrir métodos de detección de ROS para la comunidad científica no ha sido fácil por la complejidad de reacciones que poseen los mismos por el tipo de especies químicas que puedan estar presentes. Esto complica más aún en el ámbito experimental y de desarrollo de sistemas que colaboren a entender el comportamiento de los ROS para así poder con exactitud como inhibirlas (Greenwald, 2018, p. 117).

3.11.1. Método DPPH*

Método desarrollado por el año 1958 por el investigador Marsden Blois, en donde da a conocer que este método se basa en la utilización del radical libre de DPPH* para poder examinar y evaluar el potencial antioxidante de un compuesto o del extracto como tal para la captación de radical DPPH*, además de ello presenta excelente estabilidad (Oliveira, 2015, p. 36).

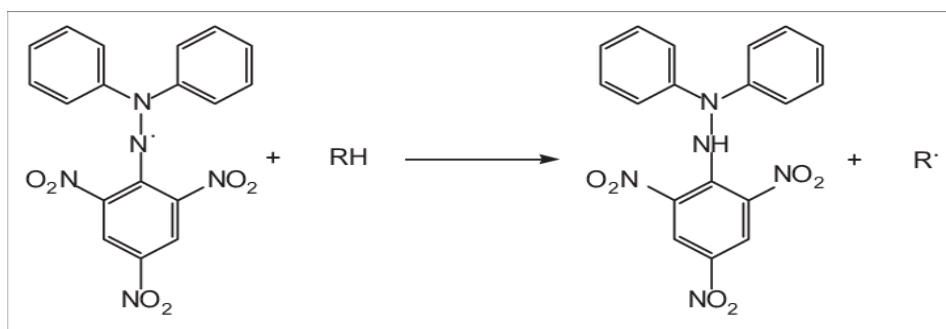


Figura 9-1: Estructura del sistema DPPH* y su reducción por un antioxidante

Fuente: Gupta, 2012

El método consta de medir la capacidad para captar radicales libres por antioxidantes. Un electrón del átomo de nitrógeno en el sistema DPPH* se reduce al captar el átomo de H del antioxidante dando lugar a hidracina (Kedare y Singh 2011: p. 412-413).

El ensayo se basa en la medición de la capacidad de captación de radicales libres por parte de sustancias antioxidantes. El electrón del átomo de nitrógeno en el DPPH* se reduce al recibir un átomo de hidrógeno del antioxidante para dar lugar a la hidracina (Kedare y Singh 2011: p. 412-413). Esto se puede evidenciar por el cambio de coloración violáceo propio del DPPH* a un amarillento pálido por presencia de ácido pícrico (Molyneux, 2004, p. 212).

3.11.2. Sistema NADH/metosulfato de fenazina/NBT

Este sistema evalúa la capacidad para la captación de radicales superóxido, dividiéndose en dos etapas, una la oxidación de NADH por medio de PMS y la segunda la reducción de NBT por transferencia de electrones que provienen del anión superóxido para generar formazán púrpura

con 570nm, la disminución de esta a 560nm con el uso del antioxidante da a conocer que hay consumo de O₂ en la reacción (Zapata, 1996, p. 410).

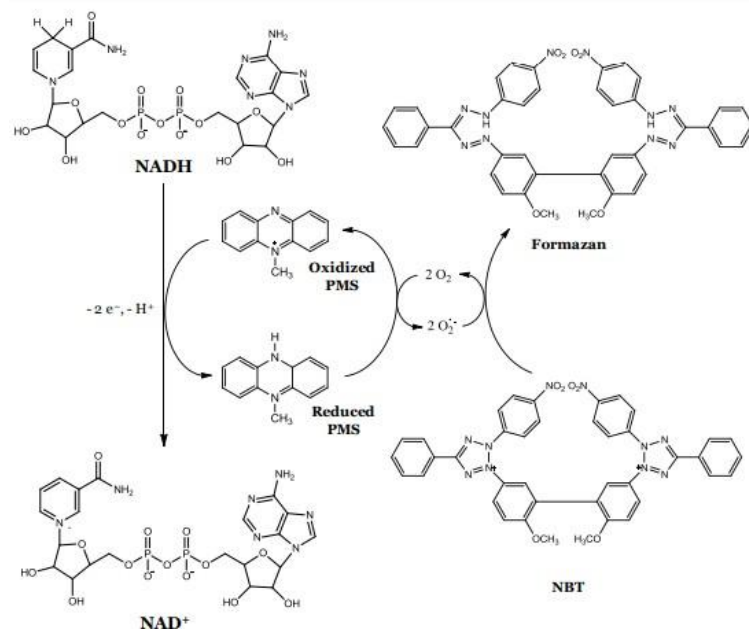


Figura 10-1: Mecanismo de reacción del NADH/metosulfato de fenazina/NBT

Fuente: (Lino, 2014)

3.11.3. Sistema Riboflavina/Luz/NBT

Este sistema por realizado y desarrollado en el año de 1971 por Beuchamp y Fridovich para encontrar de manera indirecta la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que se basa en capacidad de poder inhibir las reacciones realizadas por aniones superóxido (Cheng et al., 2015; p. 272).

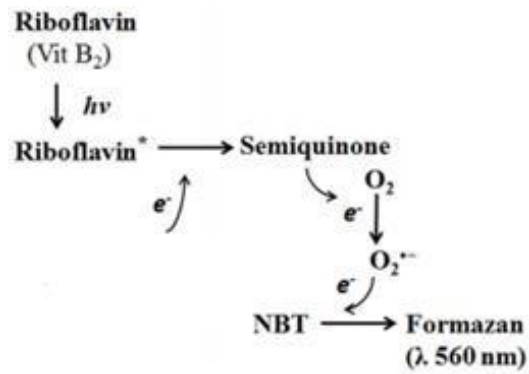


Figura 11-1: Mecanismo de reducción de NBT por fotólisis de B₂

Fuente: (Cheng et al. 2015)

El método se basa en el análisis por medición de la inhibición de fotoreducción de nitroazul de tetrazolio (NBT). En donde se tiene varias reacciones primero la Riboflavina exaltada fitoquímicamente se reduce a metionina y luego en una semiquinona donando un electrón al O₂ para formar la fuente de superóxido, mismo que se convierte en NBT tomando una coloración formazán morada (Piacham et al., 2003, p. 1254).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de Investigación

El presente trabajo de titulación se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en Riobamba.

2.2. Recolección del material vegetal

Para la recolección del espécimen se dirigió un oficio al Ministerio del Ambiente, ubicado en la ciudad del Puyo; mismo que autorizó y entregó el acta de movilización de especímenes de vida silvestre Nro. DPAP-UPN-VC-2019-064 en calidad de Investigación del Convenio Marco de Acceso a Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2018-0086 delegado como "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU USO POTENCIAL Y SOSTENIBLE con lo cual se pudo proseguir a recolectar las hojas de *Psychotria stenostachya* en estado de fructificación desde el cantón Santa Clara, perteneciente a la provincia de Pastaza. Alrededor de las 4 pm en el mes de Diciembre del 2019.

2.3. Identificación botánica

La identificación del espécimen fue determinada por el Ing. Jorge Caranqui, botánico responsable del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

2.4. Equipos, materiales y reactivos

2.4.1. Equipos

Tabla 1-2: Lista de equipos utilizados durante la ejecución del trabajo de titulación

Acondicionamiento de la especie vegetal			Tamizaje Fitoquímico
Estufa de convección	Molino “Arthur. Thomas”	Balanza Analítica	Sorbona Refrigeradora
Control de Calidad			
Estufa “Memmert SNB”	Reverbero de doble hornilla	Mufla	Balanza analítica
Obtención del extracto de alcaloides totales			Almacenamiento de Reactivos y muestras
Sonicador	Rotavapor “Heidolph”	pH-metro	Congelador-Refrigeradora
Ensayos autográficos			
Termoagitador magnético “Thermo”	Centrifuga	Agitador Vortex	Lámpara fluorescente 20watts
Termómetro digital	Pipeta automática “Thermo Scientific”	Cámara UV	“Gel Analyzer” Software

Realizado por: Rodríguez, Huilmar. 2020

2.4.2. Materiales

Tabla 2-2: Lista de materiales utilizados durante la ejecución del trabajo de titulación

Control de Calidad			
Papel filtro	Embudo	Trípode	Desecador
Crisoles de porcelana	Pinza de crisol		
Tamizaje fitoquímico			
Tubos de ensayo y gradilla	Envases de vidrio de color ámbar de 500 ml	Pipetas pasteur	Pipetas graduadas de 5 ml y 10 ml
Obtención de extracto de alcaloides totales			
Balón de destilación esmerilado "Heidolph"	Envases de vidrio de color ámbar de 1000 ml	Embudo de decantación	Vaso de precipitación de 500 ml
Ensayos autográficos			
Placas TLC silicagel de 7x2	Puntas amarillas para pipeta	capilares	Papel aluminio
Vaso de precipitación de 250 ml y 500 ml	Erlenmeyer de 50 ml	Balón de aforo de 1000 ml	Embudo

Realizado por: Rodríguez, Huilmar. 2020

2.4.3. Reactivos

Tabla 3-2: Lista de reactivos utilizados durante la ejecución del trabajo de titulación

Control de Calidad			
Nitrato de plata 0,1 mol/L	Agua destilada	Ácido clorhídrico al 10%	Ácido nítrico
Tamizaje fitoquímico			
Éter dietílico	Etanol 96%	Agua destilada	Reactivo de dragendorff
Reactivo de Mayer	Reactivo de Wagner	Ácido clorhídrico concentrado	Alcohol amílico
Reactivo de Brontrager	Reactivo de Shinoda	Reactivo de Liebermann-Burchard	Reactivo de FeCl ₃
Reactivo de Baljet	Reactivo de Fheling	Reactivo de Ninhidrina	Carbonato de sodio
Metanol	Agua Destilada	Solución acuosa de Sudán IV	Solución acuosa de Sudán III
Obtención de extracto de alcaloides totales			
Hidróxido de amonio	Acetato de etilo 25%	Goma Arabiga	Ácido Sulfúrico al 2%
Sulfato de sodio anhidro	Éter de petróleo	Metanol	
Ensayos autográficos			
Solución de DPPH*	Agar (5 mg/ml)	Ácido ascórbico	EDTA
Solución de NBT	Agua destilada	Fosfato monopotásico	Fosfato dipotásico
Rivoflavina	Taxifolina	Solución NADH	Fenofosfato de fenazina (PMS)
Cloroformo y Trietilamina	Xantina (sustrato)	Solución de Xantina Oxidasa	Alopurinol

Realizado por: Rodríguez, Huilmar. 2020)

2.5. Técnicas y métodos

2.5.1. Acondicionamiento de la materia vegetal

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

2.5.2. Control de calidad

2.5.2.1. Contenido de humedad

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

2.5.2.2. Cenizas totales

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

2.5.2.3. Cenizas solubles en agua

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

2.5.2.4. *Cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

A través del método gravimétrico se hace la determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico, se procedió en base al escrito de las Normas Ramales de Miranda.

2.5.3. *Tamizaje fitoquímico*

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

2.5.4. *Obtención del extracto total de alcaloides*

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

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

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

y se procede a pesar. Para desarrollar los ensayos se reconstituyo con metanol absoluto.

2.5.5. *Cromatografía en capa fina (TLC)*

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

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

2.5.6. *Ensayos Autográficos*

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

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

2.5.6.1. *Modelo DPPH**

Posterior de sembrar, la placa fue sumergida por un lapso de 5 segundos en la solución etanólica de DPPH• (0.2 mM), se secó al ambiente; el resultado se verifica cuando existe manchas amarillas únicamente en los lugares de actividad con un fondo púrpura; como estándar se empleó el ácido ascórbico por su actividad antioxidante. Los casos se probaron las siguientes cantidades de muestra: 1, 5, 10, 50 y 100 µg.

2.5.6.2. *Modelo riboflavina/luz/NBT*

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

de NBT (0.22 mg/mL) y solución de riboflavina (0.0125 mg/mL) previamente filtrada, obteniendo la solución. Aproximadamente 5 mL de la solución de riboflavina fue distribuido sobre la placa TLC, se dejó solidificar el agar en un lugar libre de luz, para que la reacción comience consecuentemente se empleó una lámpara fluorescente de 20 W. Las zonas muestran color claro con un fondo morado cuando existe captación de radicales superóxido, se corroboró con el estándar usado que fue la taxifolina.

2.5.6.3. Modelo NADH/ NBT/metosulfato de fenazina (PMS)

El agua destilada y la mezcla de EDTA (1 mM), PBS (50 mM) pH 7,9, se colocó el agar (1 mg/mL) el cual fue disuelto a 80 °C, la solución se enfrió hasta 60°C para colocar la solución de NADH (0.117 mg/mL) y NBT (0.22 mg/mL) , dando como resultado la solución de NADH. Sobre cada una de las placas de TLC fue distribuida la solución preparada de NADH tanto *P. stenostachya* como de la taxifolina usada como referencia, para luego solidificar las placas fueron sumergidas en la solución de PMS (2.7 µM) a temperatura ambiente durante 20 minutos en un ambiente oscuro. Al existir una captación de radicales superóxido se presentan manchas color claro con un fondo púrpura.

2.5.6.4. Modelo de inhibición XO

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

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

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

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

En el siguiente capítulo se puede apreciar los resultados obtenidos a través de los métodos y técnicas descritos en el capítulo II.

3.1. Control de calidad del material vegetal

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

	Humedad (%)	Cenizas totales (%)	Cenizas solubles en agua (%)	Cenizas insolubles en ácido (%)
<i>Psychotria stenostachya</i>	7.3421±0.0051	6.1423±0.0020	3.7711±0.0012	1.2312±0.0231
Referencia				
Farmacopea Británica 2012	10-12	Hasta 12	7	3

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2020)

En la tabla 1-3 se puede apreciar los resultados del control de calidad que se realizó a la especie, se puede destacar los resultados se encuentran bajo parámetros idóneos según la Farmacopea Europea 2012, teniendo un valor de humedad de 7.3421% mismo contribuye a la seguridad y calidad, ya que la humedad provoca degradación de los principios activos y crecimiento de microorganismos dañinos. Luego se tiene valores de cenizas totales de 6.1423%, cenizas solubles en agua con un valor de 3.7711% y cenizas insolubles en ácido con un valor de 1.2312%, conociendo que este parámetro de calidad permite saber que en la planta hayan compuestos orgánicos e inorgánicos como cloruros, carbonatos, fosfatos y minerales (Kunle et al., 2012, p. 10

3.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se ejecutó a través de valoraciones de coloración y precipitación para detectar la presencia de metabolitos secundarios presentes en los extractos alcohólico, etéreo y acuoso con uso de solventes orgánicos como etanol, éter etílico y agua destilada respectivamente en hojas secas de *P. stenostachya*.

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

TAMIZAJE FITOQUÍMICO				
Ensayos	Extracto Acuoso	Extracto Alcohólico	Extracto Etéreo	Metabolitos
Wagner	++	+++	-	Alcaloides
Mayer	+++	+	-	Alcaloides
Dragendorff	+++	+++	-	Alcaloides
Espuma	-	-	NA	Saponinas
Cloruro férrico	++	++	NA	Taninos y fenoles
Resinas	NA	-	NA	Resinas
Fheling	+++	+++	NA	Azúcares reductores
Mucilagos	-	NA	NA	Mucílagos
Ninhidrina	NA	-	NA	Aminoácidos
Borntrager	NA	+++	NA	Quinonas
Liebermann-Burchard	NA	+++	++	Esteroides/Terp enoides
Shinoda	+	+++	NA	Flavonoides
Baljet	NA	++	++	Lactonas y cumarinas
Catequinas	NA	+	NA	Catequinas
Sudan	NA	NA	++	Aceites y grasa
Principios amargos	-	NA	NA	

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

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2020.

En la tabla 2-3, se puede observar los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de los tres extractos realizados (acuoso, alcohólico y etéreo) pertenecientes a la especie *P. stenostachya*. Dentro de estos resultados se puede destacar la presencia de alcaloides gracias a los ensayos de Wagner, Mayer y Dragendorff, también se denota presencia de taninos terpenoides, fenoles, azúcares reductores y flavonoides.

Con respecto a estos hallazgos descritos, se puede acotar que existen investigaciones donde identificaron los compuestos triterpenos pentacíclicos, ácido ursólico y oleanólico; los esteroides 24-metilen-cicloartanol, estigmasterol y β -sitosterol; los esteroides glicosilados 3-O- β -D-glucosil- β -sitosterol y 3-O- β -D-glucosil-estigmasterol; un triterpeno poliinsaturado, escualeno; los ésteres de glicerol el 4-metil-epi-quinato y dos alcaloides indólicos, N, N-dimetiltriptamina (DMT) siendo este último un alcaloide que se encuentra en gran concentración en las especies *P. viridis* y *B. caapi* (Soares et al. 2017: pp. 930- 932).

3.3. Obtención del extracto total de alcaloides

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

Material vegetal	Peso de la muestra vegetal seca (g)	Solvente de extracción*	Extracto total de alcaloides (mg)	Rendimiento (%)
Hojas de <i>P. stenostachya</i>	50	Metanol 500 mL	380	0.76

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2020)

El rendimiento de las hojas de *Psychotria stenostachya* fue de 0,76%, por medio de la extracción líquido-líquido con solventes orgánicos para la realización de la acidificación, reconstitución desengrasado y basificación. Cabe destacar que el rendimiento depende de varios factores como la presión a la que se encuentre la planta, la temperatura a la que se expone, la luz, su procedimiento de extracción e inclusive de la naturaleza del solvente a utilizar todo estos pueden afectar significativamente el rendimiento con el que se extrae y por ende los metabolitos de importancia investigativa.

3.4. Cromatografía en capa fina (TLC)

Tabla 4-3: Datos resultantes de la determinación de Rf en TLC del extracto alcaloidal de *P. stenostachya*.

Extracto alcaloidal	d _{FM} (cm)	d _R (cm)	Rf
Alcaloides totales de <i>P. stenostachya</i>	3.9	2.3	0.589

Realizado por: Huilmar Rodríguez, 2020

El Rf que presentó *P.stenostachya* fue de 0,589 por lo que, probablemente los compuestos identificados se traten de una amina, de manera más específica, de compuestos derivados de la monoamina triptamina (Pereira, 2013, p: 5).

Adicionalmente, se conocen estudios donde demuestran que el género *Psychotria* es caracterizado por presencia de alcaloides cuyo principal aminoácido es el triptófano (Martins y Nunez, 2015a, p. 13428). Lo cual tiene una relación a fin, con el resultado obtenido a base de la cromatografía en capa fina.

3.5. Ensayos autográficos

A continuación se podrá observar los datos en unidades arbitrarias sobre las áreas calculadas de inhibición por medio del programa GelAnalyzer en donde nos dará por concentración en μg los datos de concentraciones en comparación sobre un estándar y la placa de la muestra preparada e incorporada de alcaloides totales de *P. stenostachya*.

3.5.1. Captación de DPPH*

Tabla 5-3: Capacidad de captación DPPH* de ácido ascórbico y los alcaloides totales

μg	<u>Áreas de inhibición</u>	
	Ácido ascórbico	Alcaloides totales de <i>P.stenostachya</i>
100	17582	28032
50	16072	27400
10	9334	23385
5	8514	21736
1	5241	7520

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2019.

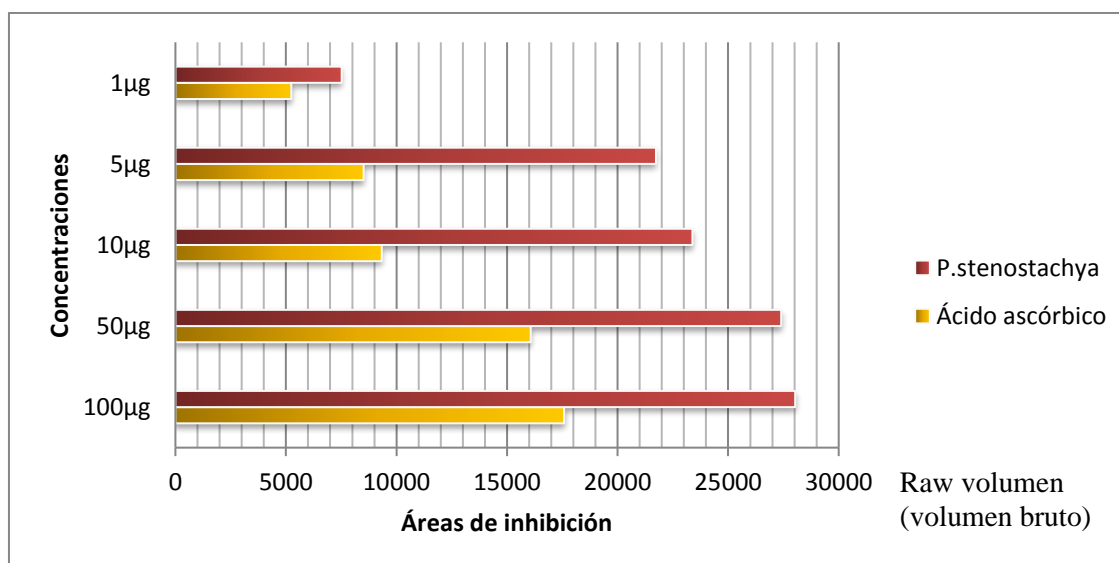


Gráfico 1-3: Comparación de concentraciones de ácido ascórbico y alcaloides totales de las áreas de captación de DPPH*

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2020.

En el gráfico 1-3 se puede observar gracias a la prueba autográfica la relación entre los resultados del control positivo y la muestra ensayada, las cuales, indica una gran capacidad de captación de radicales libres por parte de la muestra ensayada. Adicionalmente se aprecia que posee una actividad muy pronunciada sobrepasando al control positivo (ácido ascórbico). De esta manera se da a conocer que la fracción alcaloidal actúa como captador de radicales libres, por lo tanto se puede decir que posee actividad antioxidante.

3.5.2. Sistema Riboflavina/Luz/NBT

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

μg	<u>Áreas de inhibición</u>	
	Taxifolina	Alcaloides totales de <i>P.stenostachya</i>
100	9461	6422
50	7699	5512
10	5380	3438
5	3183	2842
1	1422	1356

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2020.

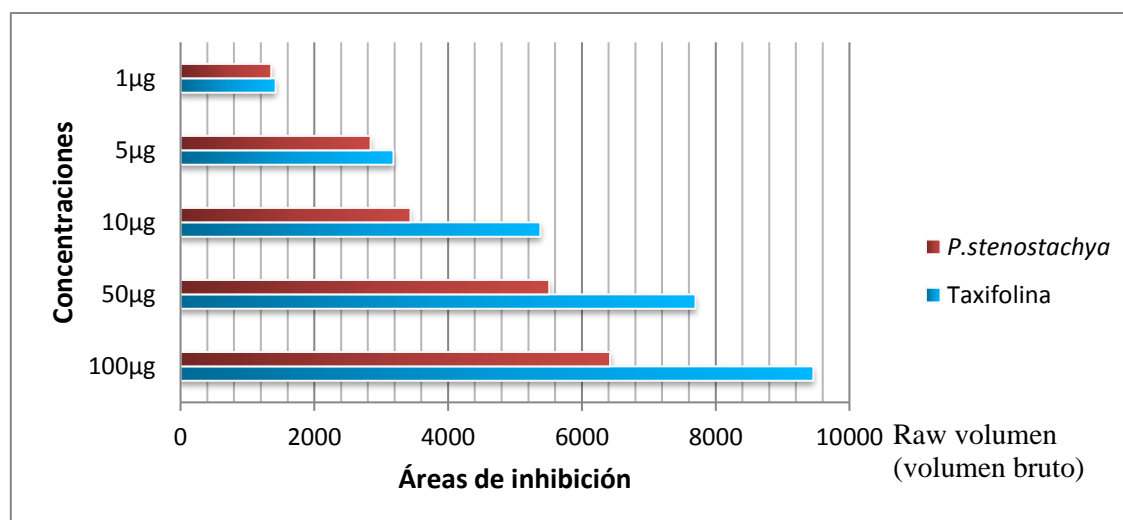


Gráfico 2-3: Comparación de concentraciones de Taxifolina y alcaloides totales de las áreas de captación de $O_2^{\cdot-}$ por Modelo Riboflavina/luz/NBT.

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2020.

Mediante el modelo Rivo flavina/Luz/NBT se pudo evaluar la captación de radical superóxido como se observa en la tabla 2-3, en donde de igual manera que en el ensayo anterior, el valor aumenta proporcionalmente a su concentración. Además, se identificó las áreas de inhibición siendo el control positivo (taxifolina), debido a la presencia de un mayor número de halos bien pronunciados de color claro o amarillento con fondo morado, este fenómeno es indicativo de captación de $O_2^{\cdot -}$.

3.5.3. Sistema NADH/PMS/NBT

Tabla 7-3: Captación de $O_2^{\cdot -}$ modelo NADH/PMS/NBT de taxifolina y Alcaloides totales

µg	Áreas de inhibición	
	Taxifolina	Alcaloides totales de <i>P.stenostachya</i>
100	10405	6595
50	9338	5510
10	7280	4877
5	5213	2400
1	3809	1115

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2020.

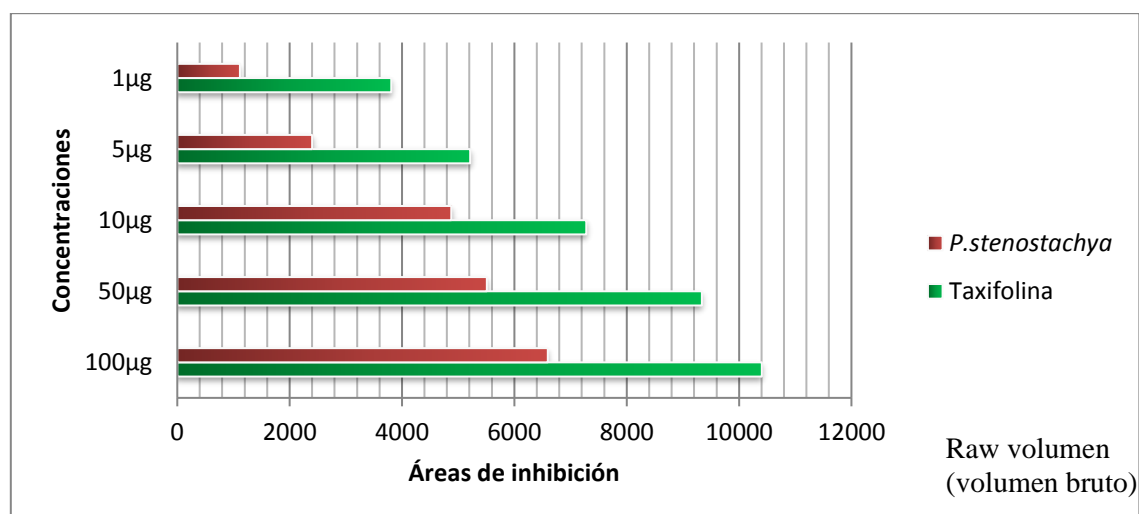


Gráfico 3-3: Comparación de concentraciones de Taxifolina y alcaloides totales de las áreas de captación de $O_2^{\cdot -}$ por Modelo NADH/PMS/NBT

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2020.

En la gráfica 3-3 igualmente se evaluó la captación de radical superóxido por medio del ensayo NADH/PMS/NBT, y en esta gráfica se demuestra que ambos exhiben igual actividad captadora ya que a pesar de que el control positivo (taxifolina) es mucho mayor respecto a la muestra de *P.stenostachya*. No excluye que esta no presente actividad. Sin embargo, sus áreas de inhibición aumentan a medida que sus concentraciones se elevan, presentando una relación proporcional.

3.5.4. Ensayo de Inhibición de xantina oxidasa (XO)

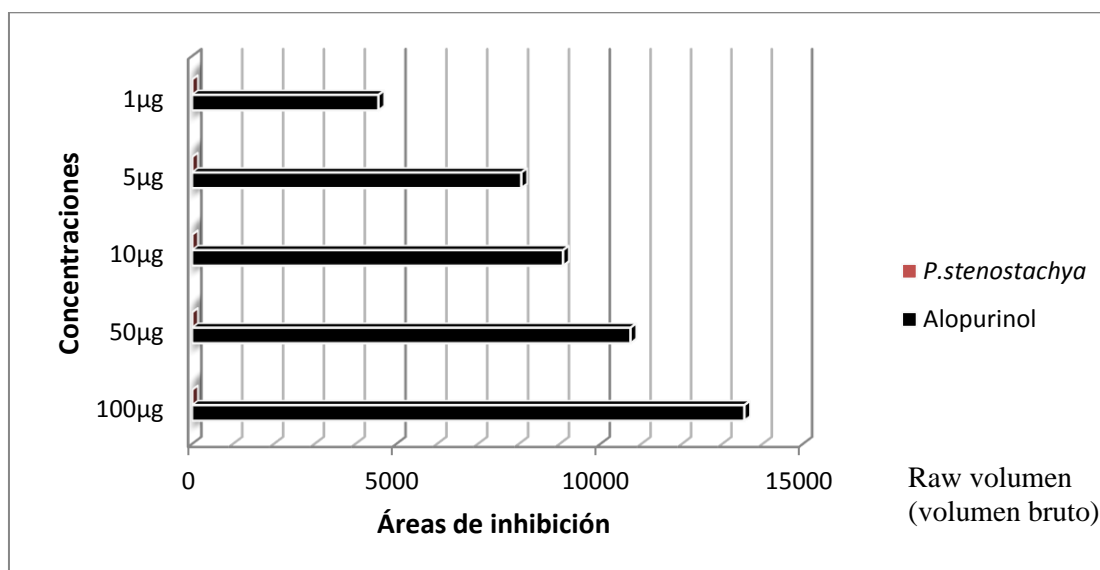


Gráfico 4-3: Comparación de concentraciones de Alopurinol y alcaloides totales de las áreas de inhibición para Xantina Oxidasa

Realizado por: Rodríguez Huilmar, 2020.

En la gráfica 4-3 se aprecia los resultados obtenidos en el ensayo autográfico de inhibición de XO, se observa que el control positivo (Alopurinol) presenta actividad mucho mayor, demostrada por halos de inhibición de color claro luego de ser expuesta a determinado tiempo bajo oscuridad, y presentando un área de inhibición significativamente mayor respecto al nulo efecto de la fracción alcaloidal. Sin embargo a pesar de no poseer actividad frente XO, es importante y destacable su capacidad de captación DPPH* al igual que de radical superóxido. Por lo tanto, se puede decir que su actividad antioxidante sobre radicales libres es predominante.

3.6. Discusión

Los ensayos autográficos y de captación de radicales libres DPPH*, realizados a la especie *P.stenostachya*, presentaron resultados significativos evidenciando su actividad antioxidante y captadora de electrones. Según varios estudios *in sílico*, dentro de la estructura aminoindol perteneciente a las triptaminas, se muestra actividad antioxidante por la presencia del átomo de nitrógeno del anillo de indol de manera intrínseca, por lo que le confiere la capacidad de desarrollar moléculas activas frente a radicales *OH y ROO* (Bentz et al., (2018: p. 6387)

Martins y Nunez, (2015 p. 13428) presentan un estudio referente a los metabolitos secundarios de las especies Rubiaceas, en el cual dan a conocer que el género *Psychotria* a parte de poseer metabolitos con actividades antioxidantes, también poseen actividades analgésicas para tratar dolencias gastrointestinales, siendo acreedora de esta actividad la *P.colorata*, De igual manera prevalece actividades sobre el sistema nervioso central tal como lo representa la especie de planta *P.viridis*, siendo utilizada para la bebida ancestral conocida como “ayahuasca” la cual permite la amplificación de percepciones de los sentidos.

Por otra parte, el potencial antioxidante es una de las principales actividades de los alcaloides dentro del género *Psychotria*, diferentes estudios han reportado que a base de estudios fitoquímicos y cromatografía de alto rendimiento (HPLC), el ensayo de captación de radicales libres (DPPH*) y el ensayo de Blanqueamiento de β -caroteno y 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónicoácido) (ABTS) muestran que, algunos de los alcaloides que se destacan son: polipirrolidinoindoles, quinolinas, y alcaloides indol monoterpénicos. Parte de estos alcaloides también muestran efectos farmacológicos como la inhibición de la agregación plaquetaria humana, la citotoxicidad, y actividad analgésica, así como los efectos antimaláricos y antileishmaniosos (Formagio, 2014, pp. 747-748).

A pesar de que *P. stenostachya* careció de actividad inhibitoria hacia Xantina Oxidasa, destacó en poseer una actividad considerable como antioxidante en escala comparativa con las sustancias de control positivo (taxifolina, y ácido ascórbico) siendo característico de la misma especie *Psychotria*.

CONCLUSIONES

Por medio de los ensayos autográficos de RIBOFLAVINA/LUZ/NBT y NADH/PMS/NBT, se pudo determinar que a partir de la fracción alcaloidal de *P.stenostachya* existió actividad antioxidante, es decir de captadora de radicales libres y superóxido, sin embargo, no exhibió actividad inhibitoria frente a Xantina Oxidasa.

Se verificó la calidad de la materia prima por medio de pruebas como humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y ácido, en donde se pudo apreciar que los valores resultantes fueron favorables, en otros términos, que se encontraban dentro de los rangos establecidos, demostrando idoneidad para los estudios posteriores sin inconveniente alguno.

En el tamizaje fitoquímico se demostró presencia de metabolitos secundarios, tomando como cabecilla los alcaloides propios y característicos de esta familia y especie, luego flavonoides, taninos, quinonas, terpenoides, fenoles y esteroides en el extracto metanólico, acuoso y etéreo de *P. stenostachya*.

La extracción de la fracción alcaloidal de *P.stenostachya* fue obtenida a partir de sus hojas en maceración con metanol. El solvente polar favoreció a la extracción de alcaloides por la naturaleza hidrosoluble que poseen; posterior a ello, se reconstituyó con cambios de pH utilizando solventes orgánicos, teniendo como resultado 380.2 mg de extracto alcaloidal bruto con un rendimiento de 0,76%.

En la cromatografía en capa fina de *P.stenostachya* se observó un r_f de 0,589, valor que según referencia bibliográfica trata de un derivado del triptófano, siendo parte del grupo de compuestos de aminos propias de la especie *Psychotria*.

RECOMENDACIONES

Se recomienda como primer instancia el estudio a fondo sobre *P. stenostachya*, ya que al presentar captación de radicales libres considerable, posiblemente exista más actividades que se puedan destacar, además de realizar estudios farmacológicos con el propósito y visión de medicamentos con menos efectos adversos que los convencionales

Para la recolección de la planta se recomienda tomar en cuenta los factores ambientales y su hábitat, ya que, pueden existir fallos experimentales por la temperatura, su presión o inclusive su estado de fructificación. De igual manera controlar procedimientos como maceración, control, desengrasado, concentrado de la planta, se debe hacer de manera cautelosa y minuciosamente, para tener resultados congruentes.

Finalmente se recomienda que al estar en contacto con solventes y otros químicos relacionados a la investigación, se debe tomar las medidas de bioseguridad adecuadas para evitar cualquier tipo de inconveniente.

GLOSARIO

Abreviaturas

O_2^-	Radical superóxido
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
ABTS	Blanqueamiento de β-caroteno y 2,2-azinobis
ATP	Adenosín trifosfato
ADN	Acido desoxirribonucleico
B ₂	Riboflavina
CAT	Catalasa
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH*	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENSANUT	Encuesta nacional de Salud y nutrición
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HUA	Hiperuricemia
INEC	Instituto nacional de estadística y censo
INMT	indol-N-metiltransferasa
KGM	Glucomanano de Kojac
m	Metro

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

TÉRMINOS

Autografía: Ensayo que combina la cromatografía plana y el método de detección biológica. Siendo una técnica muy certera y económica para análisis químicos de extractos brutos de especies vegetales e identificación de moléculas con actividad farmacológica (Dewanjee et al. 2015: p 75).

Alcaloide: Compuesto orgánico cíclico que posee nitrógeno en estado de oxidación negativo, lo cual le confiere ser de naturaleza básica. Este se deriva mayormente de compuestos biosintéticamente de aminoácidos como: fenilalanina, tirosina, triptófano y lisina (Wieczorek et al., 2015: p. 133).

Antioxidante: Es aquella molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación, es decir la pérdida de electrones, de otras moléculas, generalmente de sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. La oxidación de tales sustratos podrá ser iniciada por dos tipos de especies reactivas los cuales son los radicales libres, y aquellas especies que sin ser radicales libres, son suficientemente reactivas para inducir la oxidación (Umamaheswari. 2007).

Cromatografía en capa delgada (TLC): Análisis cromatográfico planar conocido como autografía es un método biológico. Es un método eficaz y económico para el análisis fitoquímico de las plantas extractos para identificar compuestos bioactivos o metabolitos con importancia biológica. Por lo tanto, puede ser tanto en laboratorios de alto desarrollo como en los de pequeños laboratorios de investigación que tienen un acceso mínimo a equipos sofisticados.(Dewanjee et al. 2015)

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

Especies reactivas de oxígeno

Las ROS o también llamadas especies reactivas de oxígeno son iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos que son generalmente moléculas de pequeño tamaño y altamente reactivas por a la presencia de una capa de electrones de valencia no relacionada (Ardan, 2004)

Hiperuricemia: Estado fisiológico patológico en donde el ácido úrico posee un valor superior a 7,0 mg/dL en hombres y superior a 5,7 mg/dL en mujeres dando a derivar múltiples enfermedades. (Ragab: 2017).

Radical libre: Especie molecular que posee un electrón que no esté unido a otro en un orbita atómico, y su existencia no es de manera dependiente de otro. (Lobo et al., 2010: p. 118).

Radical superóxido: Elemento reactivo generado cuando el O₂ es reducido por un solo electrón en una reacción catalítica de enzimas. (Whaley-Connell et al., 2012: p. 1322).

Taxifolina: Flavonoide que posee un efecto neutralizador para radicales libres, encontrado de manera general en aceite de oliva, uvas, cítricos posee una actividad terapéutica funcionando como hepatoprotector, antitumoral, neuroprotector e inclusive antiinflamatorio. (Razak et al., 2018, p. 2).

Riboflavina: Conocida también como vitamina B2. Es un compuesto hidrosoluble que se encuentra sintetizada por plantas y bacterias, además de que actúa como cofactor en diferentes reacciones metabólicas, la deficiencia de esta causa anemia, problemas cardiovasculares, cáncer entre otros. (Ghosh et al., 2019: p. 201).

Xantina Oxidasa: Se refiere a xantina oxidasa como a una forma de xantina oxido reductasa que genera especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta, es una enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y puede luego catalizar la oxidación de xantina en ácido úrico problema que desencadena patologías. Además esta enzima juega un papel importante en el catabolismo de purinas en algunas especies, incluyendo humanos. (Ardan. 2004)

BIBLIOGRAFÍA

ALMIR RIBEIRO DE CARVALHO, M.G.DE CARVALHO., et al.” Psychotria Genus: Chemical Constituents, Biological Activities, and Synthetic Studies”, *Elsevier, Studies in Natural Products Chemistry* Volume 48, (1990) Pages 231-261

ARDAN T, KOVACEVA J, CEJKOVÁ J. “Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium”. *Acta Histochem* 106 (1): 69–7 (2004).U.S.

AZMI, S.M.N. JAMAL, P. AND AMID, A. “Xanthine Oxidase Inhibitory Activity from Potential Malaysian Medicinal Plant as Remedies for Gout. *International Food Research Journal*” 19((2012.): pp.159-165.

BADOC, A., LACOMBLEZ, C., PATOUILLE, B., et al.”Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition”. *Phytochemistry* (2001) 58, 101–115.

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

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

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

BREMER, B. y ERIKSSON, T. "Time tree of rubiaceae: Phylogeny and dating the family,

subfamilies, and tribes". *International Journal of Plant Sciences*, vol. 170, n°6 (2009), (United State of America -Chicago) pp. 766-793. ISSN 10585893. DOI 10.1086/599077.

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

CABAÑAS, M., LAMONTH E.M., et al. , “Prácticas de Botánica Morfológica y Sistemática” (2005.).

CARMEN ULLOA ULLOA, PETER MOLLER JERGENSEN. “Arbustos y arbustos de los Andes del Ecuador”, (2017), Disponible en: <https://www.efloras.org>.

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

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

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

CHEN., et al. "Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview". *Medical Science Monitor*, vol. 22, 2016, pp. 2501-12, DOI: 10.12659/MSM.899852. Disponible en:

<http://www.medscimonit.com/abstract/index/idart/899852>.

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

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

DAVIS, A., et al. "A Global Assessment of Distribution, Diversity, Endemism, and Taxonomic Effort in the Rubiaceae". *Annals of the Missouri Botanical Garden* [en línea], 2009, (United State of America), 96(1), pp. 68-78. [Consulta: 20 octubre 2019]. ISSN 0026-6493. DOI 10.3417/2006205. Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.3417/2006205>.

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

DEWANJEE, S., GANGOPADHYAY, M., BHATTACHARYA, N., et al., "Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry". *Journal of Pharmaceutical Analysis* [en línea], vol. 5, no. 2, pp. 75-84, (2015). ISSN 20951779. DOI 10.1016/j.jpha.2014.06.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>.

DEWI, A.R., NUR'AINI, I., BAHRI, I.S., et al. "Antihyperuricemic activity of ginger flower (*Etilingera elatior* Jack.) extract in beef broth-induced hyperuricemic rats (*Rattus norvegicus*)". *AIP Conference Proceedings*, (2016) vol. 1755. ISSN 15517616. DOI 10.1063/1.4958573.

ELISABETSKY., et al. "Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 48, n.o 2, 1995, pp. 77-83, DOI: 10.1016/0378-8741(95)01287-N. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037887419501287n>.

FORMAGIO, A., VOLOBUFF, C., et al. "Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in Psychotria Leaf Extracts. Antioxidants",(2014) 3(4), 745–757. doi:10.3390/antiox3040745

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

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

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

HADARI, F., RAHIDI, M., ESHRAGHIAN., et al. "Hypouricemic and antioxidant activities of *Allium Cepa* (Liliaceae) and quercetin in normal and hyperuricemic rats". *Saudi Med J*. 29(11): 1573-1579. (2008).

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

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

JURASCHEK, S., MILLER E., GELBER, A. “Effect of Oral Vitamin C Supplementation on Serum Uric Acid: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials.” *Arthritis Care & Research* (2011). 63 (9).

JUSTO, C. y GUTIÉRREZ, R.V. “DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES”. , vol. 31, no. 2, pp. 126-133. (2002)

K. SACHIDANANDAM, S. C. FAGAN, AND A. ERGUL, “Oxidative stress and cardiovascular disease: antioxidants and unresolved issues,” *Cardiovascular Drug Reviews*, vol. 23, no. 2, pp. 115–132. (2005)

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

KISHAN, G.R. y JEAN-MICHEL, M., “Natural Products” [en línea]. (2006) S.l.: s.n. ISBN 978-3-642-22143-9. Disponible en: <http://lib1.org/ads/69A2168DFCCA6935FB60D5EBAA37045E>.

KLEIN.ANDREW, WON JAE, URVASHI RANGAN., et al., “Allopurinol:discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities”, *department of surgery, 1996, pp.713*. Free Radical Biology and Medicine, 21(5), 713–717. doi:10.1016/0891-5849(96)00158-x

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

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

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

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

MARTINS Y NUNEZ. "Secondary metabolites from Rubiaceae species". *Molecules*, vol. 20, n.o 7, (2015), pp. 13422-95, DOI: 10.3390/molecules200713422. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/13422>.

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

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

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, "GOUT ILLNESS", *Department of Health and Human Services National Institutes of Health*, 8600 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD20894 U.S. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/gout.html>.

NCBI, NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, "Xanthine" U.S. *National Library of Medicine* 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA, Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019820>.

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

OJHA, R., et al. "An updated patent review: xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia and gout (2011-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [en línea], 2015, (India), 27(3), pp. 311-345. [Consulta: 3 octubre 2019]. ISSN 17447674. DOI 10.1080/13543776.2017.1261111. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2017.1261111>.

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

PÉREZ, A.J., C HERNÁNDEZ, H. ROMERO-SALTOS, *Árboles emblemáticos de Yasuní, Ecuador.* (2014)Version 2019.Disponible en: <https://bioweb.bio/floraweb/arbolesyasuni/FichaEspecie/Psychotria%20stenostachya>

PEREIRA, A. "Alcaloides indálicos de las piezas de aire *Psychotria* sp. (*rubiaceae*) y de tiohidantoinas y sus derivados de aminoácidos y r - (+) – limoneno", *universidade federal de Goiás instituto de química*, [en línea], 2013, Disponible en: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/3316/5/Disserta%20a7%20c3%20a3o%20-%20Aline%20Pereira%20Moraes%20-%202013.pdf>

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

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

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

RAGAB, G. ELSHAHALY, M. BARDIN, T. et al. "Gout: al old disease in new perspective", *Pubmed*, (2017), *Sep*;8(5):495-511. doi: 10.1016/j.jare.2017.04.008. Epub 2017 May 10.

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

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

RIERA, R.M., "Superoxide Dismutase a therapeutic candidate for oxidative stress". *Anales De La Real Academia Nacional De Farmacia* (2015) [en línea], vol. 1, pp. 25-36. Disponible en: <http://www.anales.ranf.com/2015/vol1/1542.htm>.

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

SACHIDANANDAM, S. C. FAGAN, AND A. ERGUL, "Oxidative stress and cardiovascular disease: antioxidants and unresolved issues," *Cardiovascular Drug Reviews*, vol. 23, no. 2, pp. 115–132.(2005)

SALARIS C. STEVEN., "Methylene Blue as an Inhibitor of Superoxide Generation by Xanthene Oxidase: A Potential New Drug for the Attenuation of Ischemia/ Rperfusion Injury" Purdue University-Pubs, (1991) pp. 6-7. Weldon School of Biomedical Engineering Faculty Publications, Disponible en: <https://docs.lib.purdue.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1083&context=bmepubs>

SANCHO., et al. "Medicina integral: medicina preventiva y asistencial en el medio rural"

Medicina Integral, vol. 35, n.º 3, IDEPSA, 1980.

SOARES, D., et al. "*Psychotria viridis*: Chemical constituents from leaves and biological properties". *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, vol. 89, nº2, (2017) (Brasil) pp. 927-938. ISSN 16782690. DOI 10.1590/0001-3765201720160411.

UMAMAHESWARI, K. ASOKKUMAR, A. SOMASUNDARAM., et al "Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 109, no. 3, pp. 547–551, (2007)

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

YANG, H., et al. "Chemical Constituents of Plants from the Genus *Psychotria*". *Chemistry and Biodiversity*. vol. 13, nº1 (2016) (China) pp. 807-820. ISSN 16121880. DOI 10.1002/cbdv.201500259.

YANG, C., WANG, H.D. y GUO, Y.S. "A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice." *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 93, no. 2-3, pp. (2004) 325-330. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2004.04.008.

YUAN ZHANG, LILINGDENG, CHUNMEIWU, LIAN ZHENG, GENG ZHONG, "Konjac glucomannan improves hyperuricemia through regulating xanthine oxidase, adenosine deaminase and urate transporters in rats", *Journal of Functional Foods*, (2018) volume 48.

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