

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Análisis fitoquímico en extractos de hojas y corteza
de la especie *Cariniana domestica* (C. Mart) Miers
“Colomero”**

POSTULANTE: Univ. ABEL FRANZ GUTIERREZ ESCALERA

TUTORES: GIOVANNA ROCÍO ALMANZA VEGA Ph.D.

MARIBEL LOZANO PALACIOS M.Sc.

LA PAZ – BOLIVIA

Febrero, 2021

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
Análisis fitoquímico en extractos de hojas y corteza
de la especie *Cariniana domestica* (C. Mart) Miers
“Colomero”

POSTULANTE: Univ. ABEL FRANZ GUTIERREZ ESCALERA

TUTORES: GIOVANNA ROCÍO ALMANZA VEGA Ph.D.

MARIBEL LOZANO PALACIOS M.Sc.

TRIBUNAL: YONNY RENÉ FLORES SEGURA Ph.D.

LUIS VALENTÍN MORALES ESCOBAR M.Sc

LA PAZ – BOLIVIA

Febrero, 2021

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi madre Ricarda Escalera Vega, por ser el ejemplo de esfuerzo, dedicación y superación. Por el cariño y el apoyo incondicional, inculcando que es importante la educación para ser una mejor versión.

A mi madrina Martha Bailey, por ser mi segunda madre y siempre impulsarme, apoyarme en los buenos y malos momentos. Y enseñarme que una vida sin Dios es una vida vacía,

Agradecimientos

A mis tutores, Dra. Giovanna Almanza y M.Sc. Maribel Lozano, por haberme permitido realizar mi proyecto de grado dentro el grupo de investigación y compartir sus conocimientos dentro el campo académico. Así también por haber tenido la paciencia del mundo durante el desarrollo de mi proyecto.

A mis tribunales de proyecto de grado Dr Yonny Flores y M.Sc. Luis Morales, por la disponibilidad y siempre contar con ellos en cada etapa del desarrollo del proyecto de grado.

A mis hermanos del alma: Fabiola Valdivieso, Aleyda Huayhua, Noemi Quiroz, Angélica Mendoza, Silvia Mamani, Grover Castañeta, Jose A. Ruiz, Liduvinia Struss. Mis compañeros y cómplices que siempre estuvieron presentes en los buenos y malos momentos.

Al plantel docente y administrativo de la Carrera de Ciencias Químicas, por el apoyo y dedicación a la enseñanza, al compartir sus conocimientos y experiencias. Y además de enseñarnos que “La experiencia ganada en laboratorio nadie te la quita”.

GRACIAS A TODOS

Índice

Resumen.....	1
CAPITULO I.....	3
MARCO INTRODUCTORIO	3
1.1. INTRODUCCION.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	4
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos específicos	5
1.3. Justificación.....	5
CAPITULO II	7
2. Marco teórico.....	7
2.1. Descripción taxonómica de la planta.....	7
2.2. Distribución geográfica.....	7
2.3. Compuestos bioactivos de la especie <i>Cariniana domestica</i>	9
2.4. Análisis fitoquímico preliminar.....	12
2.5. Metabolitos secundarios	13
2.5.1. Terpenos.....	15
2.5.1.1. Triterpenos.....	16
2.5.1.2. Actividad biológica de los triterpenos	17
2.5.2. Saponinas	19
2.5.2.1. Actividad biológica de las saponinas.....	22
2.5.3. Compuestos fenólicos	24
2.5.3.1. Fenoles sencillos y ácidos fenólicos	24
2.5.3.2. Flavonoides.....	25
2.5.3.3. Actividad biológica de compuestos Fenólicos.....	26

2.6.	Análisis de actividad antioxidante.....	27
2.6.1.	Método para la determinación de Fenoles totales	27
2.6.2.	Determinación de actividad antioxidante inhibidora de radicales libres ...	28
2.7.	Técnicas cromatográficas	30
2.7.1.	Cromatografía de adsorción en Sílica Gel F-254.....	30
2.7.2.	Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20	31
2.7.3.	Cromatografía de capa fina	31
2.7.4.	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	32
2.8.	Técnicas espectroscópicas	33
2.8.1.	Espectroscopia UV-Vis.....	33
2.8.2.	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear RMN	34
CAPITULO III.....		36
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	36
3.1.	Material vegetal	36
3.2.	Obtención de extractos	37
3.3.	Análisis fitoquímico preliminar.....	38
3.4.	Perfil cromatográfico.....	41
3.5.	Separación, aislamiento e identificación de metabolitos.....	41
3.5.1.	Aislamiento de metabolitos en extracto de Acetato de Etilo de hojas	42
3.5.2	Separación de fracciones ricas en compuestos fenólicos y saponinas del extracto etanólico de hojas.....	44
3.5.2.	Cuantificación de saponinas mayoritarias por HPLC	47
3.5.4.	Cuantificación de flavonoides totales	49
3.5.5.	Cuantificación de fenoles totales por Folin- Ciocalteu.....	52
3.5.6.	Determinación de la actividad antioxidante mediante la técnica ABTS	54

CAPITULO IV	56
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	56
4.2. Determinación de rendimiento de extracción	56
4.2. Análisis fitoquímico preliminar.....	57
4.3. Perfil cromatográfico.....	59
4.4. Aislamiento e identificación de metabolitos	60
4.4.1. Extracto de acetato de etilo de corteza	60
4.5. Cuantificación de Saponinas mayoritarias	63
4.7. Cuantificación de flavonoides totales.....	66
4.8. Cuantificación de Fenoles Totales (F-C).....	68
4.9. Determinación de la actividad antioxidante	69
CAPÍTULO V	71
CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA	74
Anexos	82

Índice de figuras

Figura 1: Distribución de géneros y especies de la familia Lecythidaceae	8
Figura 2: Mapa de distribución geográfica del Colomero (<i>C. domestica</i>) en Bolivia.	9
Figura 3: compuestos fenólicos aislados de corteza y hojas de Colomero. a) Ácido caféico, b) ácido gálico, c) ácido clorogénico, d) rutina, e) quercetina y f) campferol. ..	10
Figura 4: terpenos aislados de la corteza de Colomero. a) Lupeol, b) b-amirina, c) b-sitosterol y d) estigmasterol.	11
Figura 5: Principales rutas de biosíntesis para la producción de metabolitos secundarios.	14
Figura 6: Unión de isoprenos para la formación de terpenos	15
Figura 7: Clasificación y estructura base de los triterpenos.....	17
Figura 8: Triterpenos con actividad anti-VIH.	18
Figura 9: triterpenos inhibidores de células cancerosas.	19
Figura 10: Estructura base de una saponina monodesmósida.....	20
Figura 11: Estructura base de las geninas presentes en las saponinas	20
Figura 12: tipos de oligosacáridos unidos a una genina	21
Figura 13: Estructura base de los fenoles simples.	24
Figura 14: Clasificación y estructura base de los ácidos fenólicos.....	25
Figura 15: Clasificación estructural de los flavonoides.....	26
Figura 16: Reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con Acido Gálico	27
Figura 17: Reacción de formación del radical ABTS por la adición de un oxidante fuerte	29
Figura 18: Proceso de separación en una columna cromatográfica con Sílica Gel	31
Figura 19: Proceso de separación con Sephadex LH-20. (A) vista interna de dextrano hidroxipropilado, (B) separación por tamaño molecular y (C) vista de una columna de Sephadex LH-2.....	31
Figura 20: Sistema para la elución de placas TLC.	32
Figura 21: a) Recta de calibración empleada para la cuantificación de analitos, b) Desviación de la linealidad debido al empleo de altas concentraciones de analitos.....	34
Figura 22: Punto de muestreo de corteza y hojas de Colomero (<i>C. domestica</i>).	36

Figura 23: Esquema de preparación de extractos de corteza y hojas de Colomero	37
Figura 24: Esquema de preparación de extractos para la identificación de metabolitos secundarios.....	38
Figura 25: Placa TLC de 1) Extracto crudo de AcOEt y 2) Fracción éter de petróleo (20-40): AcOEt 1:1.....	42
Figura 26: Esquema del tratamiento y fraccionamiento (Columna A) del extracto de AcOEt de corteza	43
Figura 27: Placas TLC realizadas a fracciones obtenidas de la Columna A.....	43
Figura 28: Compuesto cristalizado y placa TLC de cristales (C) y sobrenadante (S)....	44
Figura 29: Esquema de tratamientos realizados al extracto etanólico de hojas.. ..	45
Figura 30: Fracciones obtenidas en el proceso de separación realizado al extracto etanólico con éter de petróleo, AcOEt y n-BuOH.....	45
Figura 31: Fraccionamiento de la fase n-butanólico mediante Sephadex LH-20.....	46
Figura 32: Placas TLC de control a fracciones obtenidas por Sephadex LH-20 del extracto n-butanólico.....	46
Figura 33: Esquema de fraccionamiento de la fase de AcOEt obtenido a partir del Extracto Etanólico de Hojas.....	47
Figura 34: Placas TLC de fracción rica en compuestos fenólicos F3 y fracción rica en clorofila F4	47
Figura 35: Proceso experimental realizado para la obtención de patrón de saponinas de Colomero y construcción de curva patrón	49
Figura 36: Curva de calibración obtenida para la cuantificación de saponinas por HPLC.	49
Figura 37: Reacción de quelación de flavonoides con cloruro de Aluminio.....	50
Figura 38: Esquema para la obtención de la curva de calibración con Quercetina.	50
Figura 39: Curva de calibración de Quercetina para la cuantificación de flavonoides totales	51
Figura 40: Extractos y fracciones preparadas para la determinación de flavonoides totales	51
Figura 41: Esquema de preparación de muestras patrón para la determinación de fenoles totales.. ..	52

Figura 42: Muestras patrón de ácido gálico después de la incubación	53
Figura 43: Muestras de extractos crudos y fracciones obtenidas de hojas de <i>C. domestica</i>	53
Figura 44: Muestras preparadas para la medición a 765nm.	53
Figura 45: Muestras estándar de trolox para la construcción de la curva de calibración.	54
Figura 46: Esquema de preparación de muestras para la elaboración de la curva de calibración.	55
Figura 47: Curva de calibración en porcentaje de inhibición respecto al Trolox	55
Figura 48: Comparación de datos de RMN ¹³ C a) Experimental Compuesto 1 y b) Teórico Ac. Arjulongico (Lima et al, 2002).	61
Figura 49: Espectro de carbono 13 del compuesto 1.	61
Figura 50: Cromatograma HPLC de la Fracción rica en saponinas.	64
Figura 51: Cromatograma de la fracción de saponinas obtenida por la técnica de HPLC preparativo, utilizada posteriormente como referencia.	64
Figura 52: Proyección de Cromatograma de la fracción de saponinas de referencia en 3D.	65
Figura 53: Concentración aproximada de saponinas mayoritarias en extractos y fracciones en mg de saponinas/g de extracto seco	66
Figura 54: Concentración de flavonoides totales en [mg/g extracto seco] presentes en extractos y fracciones de hojas de Colomero.	67
Figura 55: Concentración de fenoles totales en extractos crudos y fracciones de hojas de Colomero.	69
Figura 56: Resultados de la actividad antioxidante ABTS en extractos crudos y fracciones de hojas de colomero.	70

Índice de tablas

Tabla 1: Descripción taxonómica del Colomero.	7
Tabla 2: Distribución geográfica del Colomero (<i>C. domestica</i>) en Bolivia.....	8
Tabla 3: Clasificación de los terpenos y sus precursores.....	15
Tabla 4: Antioxidantes de naturaleza sintética nocivas para la salud.	28
Tabla 5: Especies Reactivas de Oxígeno.	28
Tabla 6: Clasificación general de las técnicas cromatográfica... ..	30
Tabla 7: Procedimiento experimental para la determinación cualitativa de alcaloides, azúcares reductores, compuestos fenólicos y flavonoides en extracto de corteza y hojas de <i>C. domestica</i>	39
Tabla 8: Procedimiento experimental para la determinación cualitativa de taninos, saponinas y proteínas en extractos de corteza y hojas de <i>C. domestica</i>	40
Tabla 9: Procedimiento experimental para la determinación de glucósidos cardiotónicos y triterpenos en extractos secos de <i>C. domestica</i>	40
Tabla 10: Parámetros utilizados en el HPLC analítico.	48
Tabla 11: rendimientos de extracción de corteza y hojas de Colomero (<i>C. domestica</i>). ..	57
Tabla 12: Resultados obtenidos en el estudio fitoquímico preliminar realizados a extractos de hojas y corteza de Colomero (<i>C. domestica</i>)	58
Tabla 13: Placas TLC realizadas a extractos obtenidos de hojas y corteza.	59
Tabla 14: Concentración aproximada de saponinas en extractos y fracciones.	65
Tabla 15: Contenido de flavonoides totales en extractos crudos y fracciones obtenidas.	67
Tabla 16: Fenoles totales en extractos y fracciones de Colomero (<i>C. domestica</i>).....	68
Tabla 17: Resultados obtenidos de la capacidad antioxidante equivalente al trolox.	70

Índice de anexos

Anexo 1: Carta de solicitud de identificación taxonómica dirigida al Herbario Nacional de Bolivia LPB. Fuente: Elaboración propia.	83
Anexo 2: Carta de confirmación de clasificación taxonómica. Fuente: Herbario Nacional de Bolivia (LPB)	84
Anexo 3: Pesos obtenidos en el proceso de extracción en Corteza y Hojas de la especie Cariniana domestica. Fuente: Elaboración propia.	85
Anexo 4: Rendimientos obtenidos en el proceso de extracción de la especie Cariniana domestica. Fuente: Elaboración propia.	86
Anexo 5: Exclusión de datos para la curva de calibración mediante la Prueba de Grubbs Fuente: Elaboración propia.	87
Anexo 6: Exclusión de datos de muestras según la prueba de Grubbs. Fuente: Elaboracion propia.	88
Anexo 7: Curva de calibración y datos de áreas en extractos crudos y fracciones ricas en saponinas. Fuente: Elaboración propia.	89
Anexo 8: Datos obtenidos para la construcción de la curva de calibración de Ácido Gálico. Fuente: Elaboración propia	90
Anexo 9: Datos obtenidos para la construcción de la curva de calibración con ABTS. Fuente: Elaboración propia	91

Resumen

La especie *Cariniana domestica* (Colomero) perteneciente a la familia Lecitidácea, se encuentra distribuida principalmente en los países de Brasil, Perú y Bolivia donde es conocida por sus usos tradicionales antiinflamatorios, antioxidantes y anticoagulantes. En los últimos años, se ha reportado un estudio sobre la actividad pesticida del extracto acuoso de la especie *C. domestica* que crece en la localidad de Sapecho, ubicado al norte del departamento de La Paz. En función a los antecedentes reportados de la especie, en el presente trabajo se realizó la caracterización fitoquímica en extractos de hojas y corteza de *C. domestica* (Colomero), orientada a la determinación de tipos de metabolitos secundarios, así como a la obtención de compuestos puros mayoritarios y fracciones ricas en componentes bioactivos, como compuestos fenólicos y saponinas.

Así, se realizó inicialmente la obtención de extractos de distinta polaridad con Éter de Petróleo, AcOEt, EtOH, EtOH:H₂O y H₂O de los cuales se realizó un análisis fitoquímico preliminar que mostró la presencia mayoritaria de alcaloides, triterpenos, saponinas, compuestos fenólicos y glucósidos cardiotónicos, dentro los extractos de EtOH, EtOH:H₂O y H₂O de hojas, así como la presencia mayoritaria de compuestos fenólicos y taninos dentro de los extractos de corteza, composición que fue confirmada mediante un análisis cromatográfico mediante placas TLC de los extractos obtenidos.

Con base en el estudio fitoquímico preliminar y el análisis cromatográfico por TLC se seleccionó el extracto de AcOEt de corteza para realizar el aislamiento de un triterpeno mayoritario, por lo que este extracto fue sometido a sucesivas cromatografías en columna con Sílicagel G60, lográndose el aislamiento de un triterpeno cuya estructura fue determinada por comparación con datos bibliográficos de RMN ¹³C como Acido Arjunólico, compuesto que, según reportes científicos, posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e insecticidas.

Para la obtención de fracciones ricas en compuestos fenólicos y saponinas se seleccionó el extracto etanólico de hojas, el cual fue sometido a fraccionamientos sucesivos líquido-

líquido con AcOEt y n-BuOH, además de la fase butanólica se realizó una cromatografía Sephadex lográndose obtener una fracción F1 rica en saponinas y otra F2 rica en compuestos fenólicos. Para comprobar que se obtuvo una fracción rica en saponinas se cuantifico las mismas en los extractos EtOH, EtOH:H₂O, la fase n-BuOH y la F1, utilizando una técnica de cromatografía HPLC, determinando que la fracción F1 contenía una mayor concentración de saponinas (477 mg de saponina/g ES extracto seco).

Para determinar si se obtuvo una fracción rica en compuestos fenólicos, se cuantifico flavonoides, por un método espectroscópico UV/Vis con AlCl₃, y fenólicos totales, por la técnica de Folin- Ciocalteu, en los extractos de AcOEt, EtOH y EtOH:H₂O, así como en las fases de AcOEt y n-BuOH y en la fracción F2. Determinándose, en la cuantificación de flavonoides totales, que la fracción F2 es la más rica en flavonoides, seguida de la fase de AcOEt, de acuerdo a lo esperado en el fraccionamiento. Por otra parte, en la cuantificación de fenoles totales se determinó un mayor contenido de fenoles en el extracto de EtOH:H₂O y fracciones F. AcOEt y F2 (381, 373 y 303 mg de ácido gálico/g ES, respectivamente), sugiriendo que la especie además de flavonoides, posee compuestos fenólicos simples y taninos.

Finalmente, se determinó la capacidad de inhibición de radicales libres por el método de ABTS, de los mismos extractos y compuestos evaluados en su contenido de flavonoides y compuestos fenólicos, determinándose una relación directamente proporcional entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante. Por lo que el extracto de EtOH:H₂O y fracciones F. AcOEt y F2 son las de mayor capacidad antioxidante.

Palabras clave: Análisis fitoquímico, ácido arjunólico, saponinas, flavonoides, fenoles totales, antioxidantes.

CAPITULO I

MARCO INTRODUCTORIO

1.1.INTRODUCCION

Bolivia, por su diversidad vegetal es considerada como uno de los 15 países con mayor diversidad en el mundo. Debido a su ubicación geográfica condiciones de clima, suelos, y humedad, entre otros, ha desarrollado varios tipos de regiones con diferentes ecosistemas (Ministerio de Medio Ambiente y Agua, 2014).

Una región muy importante es la zona Andina tropical que se encuentra al norte de La Paz que abarca un 13,7% de todo el territorio boliviano (Ministerio de Medio Ambiente y Agua, 2014). Los estudios florísticos y vegetativos de esta región se han incrementado en los últimos años debido a que en esta zona se encuentra una diversidad de especies vegetales con interesantes propiedades químicas, biológicas y etnofarmacológicas, lo que genera oportunidades para nuevos estudios de caracterización química de especies de la región, con el fin de encontrar metabolitos secundarios que sean de interés farmacológico, agroindustrial, nutracéutico o cosmético entre otros.

El contenido de metabolitos en una determinada especie puede variar en concentración o netamente en la presencia de algún tipo de metabolito según lo que la planta necesite para sobrevivir a distintas condiciones de clima, suelos o repeler ataques ocasionados por depredadores, etc. Es decir que puede biosintetizar metabolitos que requiera para poder usarlos como mecanismo de defensa ante factores externos, sin embargo también pueden biosintetizar metabolitos que le ayude a atraer insectos para poder realizar la polinización o atraer insectos para su alimentación como es el caso de las plantas carnívoras (Marco, 2006).

El metabolismo secundario de las plantas ha sido estudiado proporcionándonos distintas rutas biosintéticas para determinados metabolitos, por ejemplo: la ruta del ácido mevalónico para compuestos terpénicos y esteroídicos, la ruta del ácido shikímico para la biosíntesis de compuestos fenólicos, etc. Del mismo modo, estos estudios nos han llevado

al descubrimiento de una variedad de compuestos biosintetizados por una ruta biosintética o por la combinación de dos o más rutas de biosíntesis. Pero las investigaciones fueron más allá, llegando a determinar las bondades curativas u otras propiedades que ofrecían en función a la estructura que presentaban, como las actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antitirosinasa, antifúngicas y antimalaricas, entre otras. Muchos de estos compuestos bioactivos, o fracciones enriquecidas en los mismos, sirvieron de base para la producción de fármacos o fitofármacos, como es el caso del desarrollo del producto denominado “Chillkaflam” elaborado en base a una fracción enriquecida en flavonoides de la especie *Baccharis latifolia* (Chillka), entre la UMSA y laboratorios LAFAR (Almanza & Salcedo, 2012).

Es por ello, que el trabajo tiene como principal interés el análisis químico de los metabolitos secundarios presentes en la corteza y hojas de la especie *Cariniana domestica*, un árbol del Norte del departamento de La Paz conocido comúnmente con el nombre de “Colomero”, que según Carlos Pardo, un agrónomo residente en esa localidad, posee propiedades biopesticidas que fueron evaluadas mediante pruebas *in situ*, por otra parte el libro de Cavalcante (2019) reporta que la corteza presenta buena actividad anticoagulante, antioxidante y antiinflamatoria. De la misma forma Janovik, *et. al.*, 2012 informa que la infusión de la planta se utiliza tradicionalmente como remedio antiinflamatorio y antifúngico. Con todos estos antecedentes reportados de la especie, el objetivo final es determinar la cantidad y tipo de metabolitos mayoritarios que contiene, para que con base en esto se pueda aportar a posteriores estudios para el desarrollo de un producto con potencial valor dentro de los campos de la medicina y/o la agroindustria.

1.2.OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Caracterizar la composición fitoquímica en extractos de hojas y corteza de la especie *Cariniana domestica* (Colomero).

1.2.2. Objetivos específicos

- Preparación de extractos de distinta polaridad por maceración en éter de petróleo, acetato de etilo, etanol, etanol-agua y agua a partir del material vegetal seco (corteza y hojas).
- Realizar un estudio fitoquímico preliminar para la identificación de los grupos de metabolitos secundarios en cada uno de los extractos obtenidos.
- Analizar perfiles cromatográficos de los extractos de corteza y hojas, mediante la técnica de cromatografía en capa fina (TLC).
- Aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos.
- Obtener fracciones ricas en saponinas y compuestos fenólicos.
- Cuantificar las saponinas y compuestos fenólicos en extractos y la planta.

1.3. Justificación

Desde la antigüedad se han empleado las plantas como una fuente de alimentación y otros usos, estas también han jugado un papel muy importante dentro de la medicina tradicional que desarrollaron los pueblos originarios para calmar sus dolencias, estos conocimientos se transmitieron de generación en generación hasta la actualidad, siendo aún tomados en cuenta por gran parte de la población. Basados en estos conocimientos, se han desarrollado diversos estudios químicos y biológicos de estas plantas, con el principal afán de encontrar los principios activos responsables de sus propiedades curativas.

El norte del departamento de La Paz, pertenece a los andes tropicales y posee una vasta diversidad de plantas, que en algunos casos han sido aplicadas dentro de la medicina

tradicional, o dentro el campo de la agricultura por los pueblos originarios. La especie *C. domestica* se encuentra distribuida principalmente en Sud América, dentro del territorio boliviano se encuentra en los departamentos de La Paz, Pando, Beni, Cochabamba y Santa Cruz. El uso principal que se le atribuye a esta especie es el uso en carpintería por su alta resistencia a la humedad y al ataque de plagas. Sin embargo en Brasil se emplea la infusión de la corteza como remedio antiinflamatorio y antimicrobiano (Janovik *et al.*, 2012). De esta especie se han realizado investigaciones en Brasil reportándose, en extractos de corteza y hojas, la presencia de terpenos (lupeol, β -amirina, β -sitosterol y estigmasterol) y compuestos fenólicos (Ac. cafeico, Ac. clorogénico, Ac. gálico, campferol, rutina y quercetina) (Janovik *et al.*, 2012); Además se realizó el estudio de la actividad antioxidante mediante pruebas con DPPH, siendo su actividad mayor al patrón de referencia (ácido ascórbico).

Respecto a antecedentes de estudios de la especie *C. domestica* (Colomero) en Bolivia, sólo se conoce el reporte en la localidad de Sapecho, ubicada dentro de la provincia Sud Yungas, de Carlos Pardo agrónomo residente en esa localidad, quien realizó pruebas *in situ* con extractos de la corteza aplicándolos a diversos cultivos, verificando su propiedad como biopesticida. Con base a estos antecedentes, el presente trabajo tiene como principal objetivo el analizar químicamente los diferentes compuestos bioactivos presentes en hojas y corteza de la especie *C. domestica*, para que en base a los resultados de este trabajo se promuevan otros estudios que respalden un potencial uso de esta planta debido al contenido de compuestos bioactivos con propiedades hemolíticas, biopesticidas, antioxidantes y antiinflamatorias, u otras.

CAPITULO II

2. Marco teórico

2.1.Descripción taxonómica de la planta

Tabla 1: Descripción taxonómica del Colomero.

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Lecythidaceae
Genero	<i>Cariniana</i> Casar
Especie	<i>Cariniana domestica</i> Miers

Fuente: <https://www.qbif.org/es/species/3083031>.

2.2.Distribución geográfica

La especie *C. domestica* Miers, pertenece a la familia Lecythidaceae, dicha familia está conformada por 25 géneros y 310 especies, se encuentran distribuidas en la región tropical de Sudamérica, Asia y África (Lima *et al*, 2002).

Las caracterizaciones químicas realizadas a especies de esta familia han reportado la presencia de compuestos fenólicos, terpenos, cumarinas y ácidos grasos, que exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antifúngicas y una importante aplicación en el tratamiento contra las leishmanias (Alconchel Gago *et al.*, 2014, Callisaya A. & Alvarado K., 2016, Limachi Valdez *et al.*, 2009, Oliveira Almeida *et al.*, 2011)

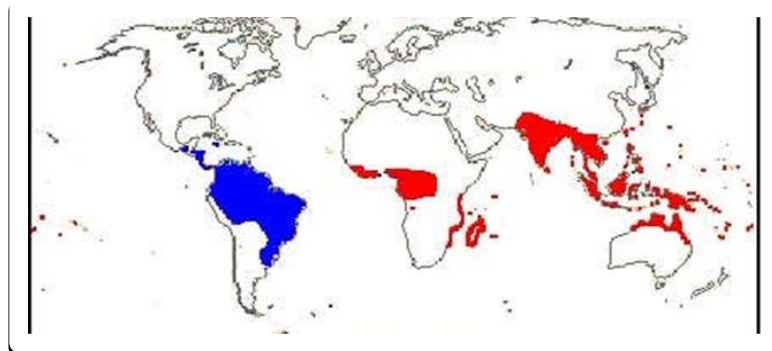


Figura 1: Distribución de géneros y especies de la familia Lecythidaceae. **Fuente:** <http://mobot.org/MOBOT/Reseach/APweb/welcome.html>

En América latina se encuentra dentro de los países de Brasil, Bolivia, Colombia y Perú, debido a la calidad de su madera es comercializada para el uso en carpintería. En Bolivia se encuentra distribuida dentro los departamentos de Pando, La Paz, Beni y Santa Cruz (Mostacedo & Rumiz, 2010).

Tabla 2: Distribución geográfica del Colomero (*C. domestica*) en Bolivia

Departamento	Provincia	Ubicación	
Beni	Vaca Diez	Sudoeste de Riberalta Camino hacia Hamburgo	
	Florida	Laguna Volcanes	
Santa Cruz	Guarayos	Asención de Guarayos hacia La Chonta Camino a Urubicha	
	Ñuflo Chávez	Perseverancia Rio Negro	
	Velazco	Cerro Pelau Bajo Paraguá Santa Rosa de la Roca Guadalupe hacia los Limones	
		Abuná	Nuevo Mundo
		Madre de Dios	El Sena Concesión Mobil Oil
			Pando

		Puerto Rico Conquista
	Nicolás Suarez	Porvenir, Villa Bella a 29Km al sudoeste de cobija
La Paz	Abel Iturralde	Parque Nacional y Arrea Natural de Manejo Integrado Madidi
		Comunidad San José de Uchupiamonas
	Ixiamas	
	Franz Tamayo	Madidi subiendo el Río Tuichi
		Orillas de la laguna Santa Rosa
Sud Yungas	Rio Quiquibey	

Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, 2020.

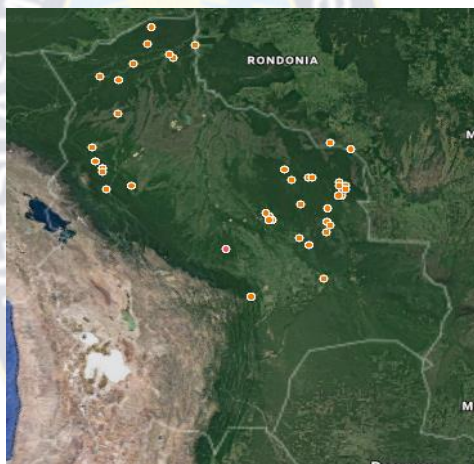


Figura 2: Mapa de distribución geográfica del Colomero (*C. domestica*) en Bolivia.

Fuente: <https://www.gbif.org/es/occurrence/search?offset=120&country=BO&taxon>

2.3. Compuestos bioactivos de la especie *Cariniana domestica*

Los estudios fitoquímicos realizados a la especie *C. domestica* evidenciaron la presencia de: Saponinas, compuestos fenólicos (taninos, flavonoides y flavonas), fitoesteroles, terpenos pentacíclicos, cumarinas y xantonas (Janovik *et al.*, 2012).

Janovik realizó varias publicaciones de la especie, inicialmente el 2009, reportó el contenido de polifenoles, taninos y flavonoides en extractos crudos y fracciones de la corteza, analizados mediante la técnica de HPLC-DAD. Para el año 2011 realizó la cuantifi-

cación de compuestos fenólicos totales y flavonoides en hojas de *C. domestica* y además verificó la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH, siendo la fracción de acetato de etilo la más efectiva con un IC₅₀ entre 5,12±0,34 µg/mL y 14,17±0,32 µg/mL (Janovik *et al.*, 2011). El mismo año realizó el aislamiento de seis compuestos fenólicos en extractos de hojas y corteza mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), los compuestos identificados fueron los ácidos cafeico, gálico y clorogénico, además de la rutina, quercetina y campferol (**Figura 3**) (Janovik, 2011).

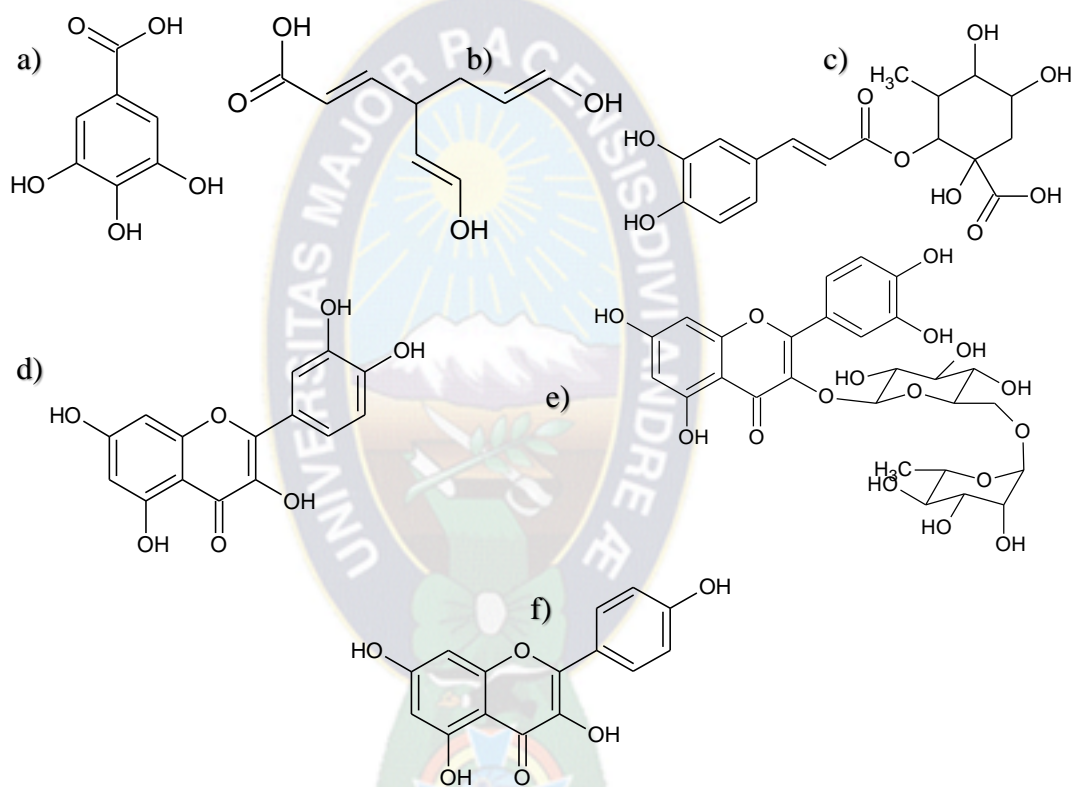


Figura 3: compuestos fenólicos aislados de corteza y hojas de Colomero. a) Ácido caféico, b) ácido gálico, c) ácido clorogénico, d) rutina, e) quercetina y f) campferol. **Fuente:** Janovik, 2011.

En posteriores estudios realizados por Vanessa Janovik *et al.*, 2012, fueron aislados dos triterpenos pentacíclicos y dos fitoesteros de la corteza de *C. domestica* que fueron identificados como lupeol, β-sitosterol, β-amirina y estigmasterol (**Figura 4**), finalmente el extracto crudo de diclorometano fue sometido a un ensayo *in vitro* para la verificación de la actividad antioxidante, el extracto presentó un valor de IC₅₀=16,4±0,06 µg/mL

valor que fue comparado frente al ácido ascórbico con $IC_{50}=9,02\pm 0,21 \mu\text{g/mL}$. Llegando a demostrar que el extracto presenta buena actividad antioxidante.

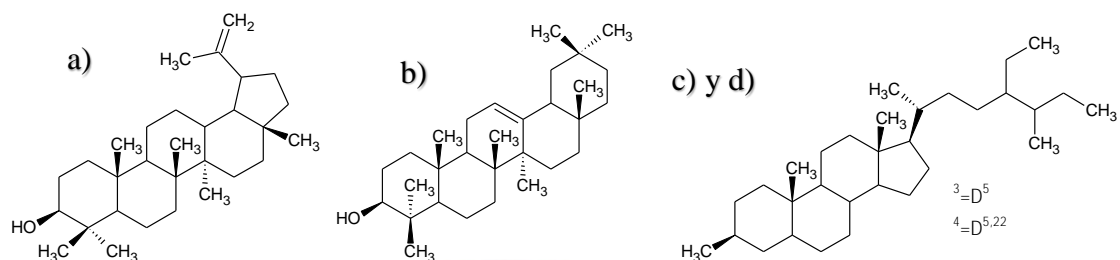


Figura 4: terpenos aislados de la corteza de Colomero. a) Lupeol, b) b-amirina, c) b-sitosterol y d) estigmasterol. **Fuente:** Janovik *et al*, 2012.

El mismo año (2012) se evaluó la actividad antioxidante mediante los ensayos de TBARS y DPPH, además se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos y carotenos en extracto crudo (hidroalcohólico) y fracciones (diclorometano, acetato de etilo y butanol) de corteza. En la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos se empleó la técnica de Folin-Ciocalteu empleando al ácido pirogálico como patrón de referencia, siendo la fracción de acetato de etilo la más alta en contenido de compuestos fenólicos ($309.3\pm 2.73 \mu\text{g/g}$) y la fracción de diclorometano la de menor contenido ($54.6\pm 0.33 \mu\text{g/g}$). Sin embargo la actividad antioxidante, determinada por los métodos de DPPH y TBARS, de la fracción de diclorometano resultó mayor que la de acetato de etilo mL^{-1} respectivamente, mientras que de la fracción de acetato de etilo fue $6.5\pm 0.81 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $11.11\pm 0.85 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (Janovik *et al.*, 2012).

En 2015, se evaluó la efectividad de los extractos crudos de *Calendula officinalis L*, *Nasturtium officinale*; además de extractos crudos y fracciones (diclorometano, acetato de etilo y butanol) de *C. domestica* ante el crecimiento del *Paenibacillus larvae* que produce una seria infección en abejas en etapa larval y vive dentro de las abejas hasta la etapa adulta generando muertes por debilitamiento y como consecuencia grandes pérdidas de colonias (S.G. *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos exhiben que los extractos crudos de *C. officinalis* y de *N. officinale* presentan MIC's de 12.76 y 30.51 mg/mL respectivamente, sin embargo el extracto crudo y la fracción con diclorometano de *C. domestica* no presentaron actividad inhibitoria frente al *P. larvae*, mientras que las fraccio-

nes de acetato de etilo y de butanol presentaron una baja actividad de inhibición de 4.06 y 0.98 mg/mL respectivamente. En el mismo estudio se evaluó la toxicidad, de los extractos y fracciones, en abejas y fue comparada con un experimento aplicando DDT, mostrando que los extractos resultaron no ser muy tóxicos en comparación al DDT (Piana *et al.*, 2015).

Finalmente, en 2018, se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto crudo (hidroalcohólico) y las fracciones (acetato de etilo, diclorometano y butanol) de frutos de *C. domestica* en edemas inducidos en orejas de ratones por aceite de croton. La aplicación fue tópica de extracto crudo, fracciones, y de los compuestos aislados β -sitosterol, lupeol y estigmasterol, en formulaciones en gel. El extracto crudo y las fracciones de diclorometano, n-butanol y acetato de etilo disminuyeron el edema agudo del oído con una inhibición máxima (I_{max}) de 97 ± 2 , 86 ± 1 , 81 ± 4 y $95 \pm 2\%$, respectivamente. El β -sitosterol, el lupeol y el estigmasterol también redujeron el edema en 46 ± 8 , 51 ± 7 y $62 \pm 7\%$, respectivamente (Brum *et al.*, 2019).

2.4. Análisis fitoquímico preliminar

Desde la antigüedad las plantas han sido empleadas por el ser humano para su alimentación y como remedio ante las enfermedades que lo aquejaban, este tipo de plantas las denominaron plantas medicinales (Lock, 1998). La propiedad curativa de una planta medicinal era difícil de explicar, hasta que las caracterizaciones químicas y biológicas realizadas por científicos explicaron que la acción terapéutica de una planta se debe a la presencia de compuestos bioactivos denominados metabolitos secundarios (Perez *et al.*, 2016).

En la actualidad se han desarrollado distintos métodos empleados para la identificación preliminar de los diferentes tipos de metabolitos secundarios de una planta. Estos métodos de identificación consisten en una alteración química a la estructura del metabolito, como la modificación de un grupo funcional, la ruptura de un sistema cíclico o la formación de un complejo y como resultado de estas modificaciones químicas a la estructura del metabolito se puede apreciar un cambio de coloración, formación de precipitado o el

desprendimiento de gases, es lo que se conoce como un análisis fitoquímico preliminar (Coy *et al.*, 2014).

2.5. Metabolitos secundarios

Los metabolitos que se encuentran dentro de un organismo vivo son producto de un conjunto de reacciones biológicas, proceso se denomina **metabolismo**, y pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Compuestos derivados del metabolismo primario (metabolitos primarios), son esenciales para el funcionamiento de los organismos, en esta etapa son consumidos la mayor parte del contenido de carbono, nitrógeno y energía para la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos (Avalos & Perez, 2009).
- Compuestos derivados del metabolismo secundario (metabolitos secundarios), a diferencia de los metabolitos primarios estos no son esenciales para la vida como tal, las plantas destinan gran parte de la energía y del carbono asimilado para la biosíntesis de estos metabolitos, se producen de manera restringida (están delimitados entre grupos taxonómicos) y normalmente son producidos en pocas cantidades (Marco, 2006).

En la naturaleza existe un mayor porcentaje de los productos provenientes del metabolismo primario, sin embargo dentro de un organismo vegetal existen una variedad de compuestos derivados del metabolismo secundario, que son producidos como mecanismos de defensa ante procesos de estrés biótico y abiótico, que le permiten una mejor adaptación a la planta dentro del entorno en el que se desarrolla (Acero & Mingarro, 2016).

Los metabolitos secundarios tienen funciones específicas dentro de la planta como dar coloración a flores y frutos para atraer a insectos que ayuden a la reproducción y por tanto preservación de la especie. Además pueden tener propiedades protectoras ante

predadores y actuar como repelentes, dándoles olores y sabores que puedan ser desagradables para la amenaza, así como tener la capacidad de defensa ante otros factores patógenos que amenacen con el desarrollo de la planta, actuando como biopesticidas (Acero & Mingarro, 2016; Marcano & Hasegawa, 2018; Marco, 2006).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (**Figura 5**) y pueden ser agrupadas en tres grandes: Ruta del ácido mevalónico para terpenoides, ruta del ácido shikímico para compuestos fenólicos y ruta del metabolismo del nitrógeno (aminoácidos) para alcaloides (Acero & Mingarro, 2016).

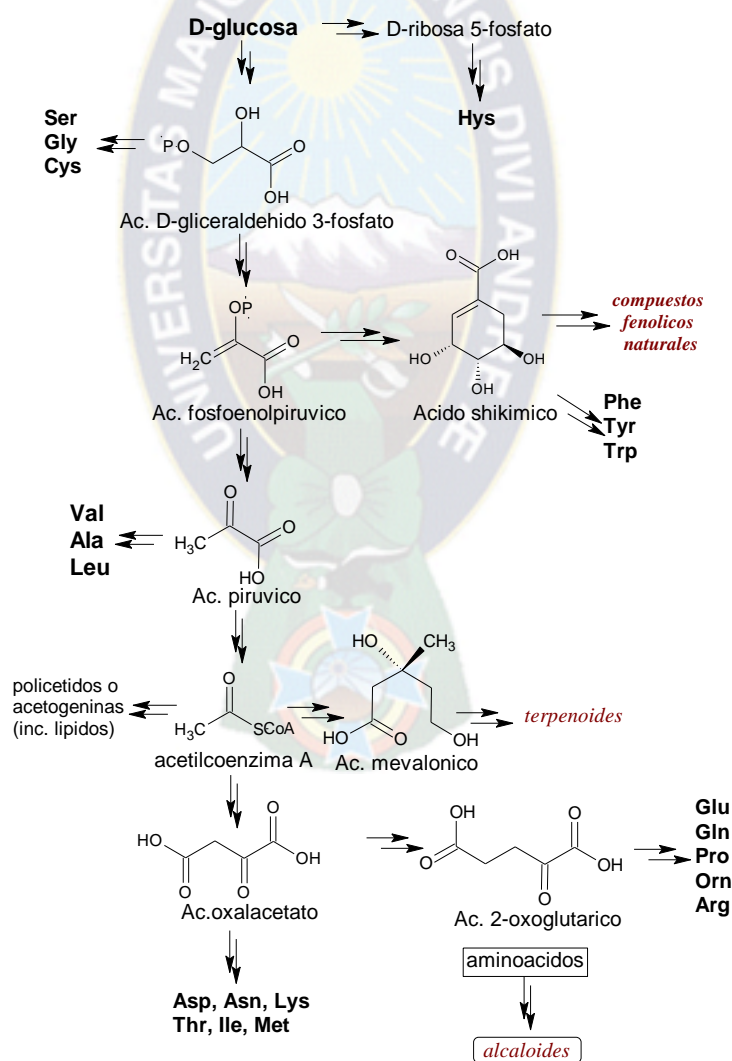


Figura 5: Principales rutas de biosíntesis para la producción de metabolitos secundarios. **Fuente:** Marco, 2006

2.5.1. Terpenos

Los terpenos son producto del metabolismo secundario provienen de la ruta del ácido mevalónico y en otros casos de la ruta del fosfato de desoxixilulosa (Dewik, 2001), son de una gran diversidad estructural y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, su presencia generalmente se debe a factores genéticos de la especie y climáticos; según Marco, hasta el año 2006 fueron reportados más de 30.000 compuestos terpénicos. Además presentan una amplia variedad de grupos funcionales que se encuentran como sustituyentes o forman parte del esqueleto carbonado, en primer lugar tenemos a los grupos oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, acetales, etc.), seguido de los compuestos terpénicos que involucran a halógenos y azufre, elementos que generalmente se encuentran en compuestos de origen marino, y por último tenemos a los terpenos con átomos de nitrógeno y estas son clasificados como alcaloides o pseudoalcaloides (Marcano & Hasegawa, 2018).

Toda la familia de los terpenoides tiene como precursor biosintético a la unidad de isopreno unidos de forma asimétrica (1-4) de cabeza cola **Figura 6**, y todas obedecen a la regla de $(C_5)_n$. Estos compuestos se encuentran clasificados en función al número de unidades de isopreno que conforman la estructura **ver tabla 3**.

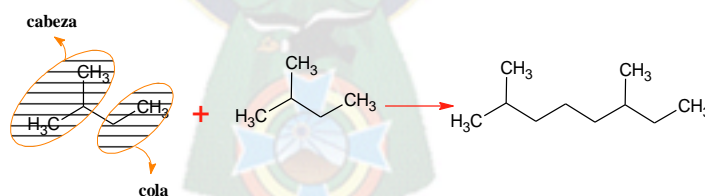


Figura 6: Unión de isoprenos para la formación de terpenos. **Fuente:** Kuklinski, 1999

Tabla 3: Clasificación de los terpenos y sus precursores.

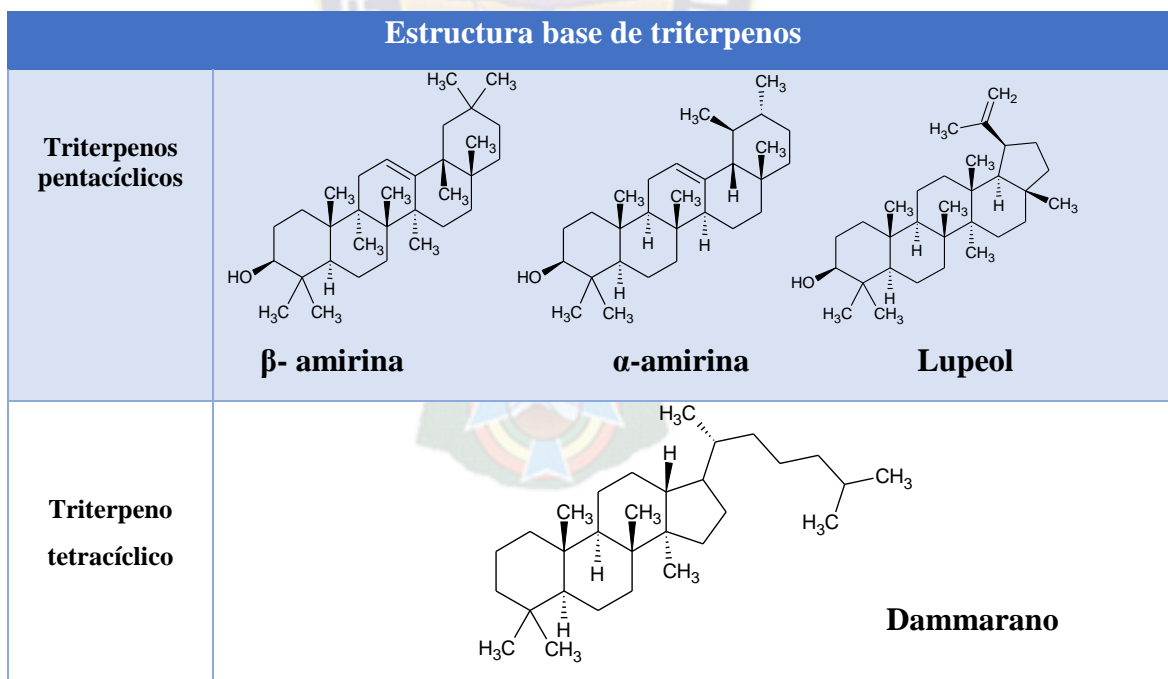
Terpeno	Nº de carbonos	Nº de isopreno	Precursor
Monoterpeno	10	2	Geranil PP
Sesquiterpeno	15	3	Farnesil PP
Diterpeno	20	4	Geranil-Geranil PP
Triterpeno	30	6	Escualeno
Tetraterpeno	40	8	15-cis fitoeno

PP=Piro fosfato **Fuente:** Kuklinski, 1999.

2.5.1.1. Triterpenos

Los triterpenos son uno de los grupos con mayor diversidad estructural, hasta el año 2014 se han encontrado más de 20.000 compuestos triterpénicos con una diversa aplicación dentro de la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética; los triterpenos simples pueden actuar potencialmente como moléculas de señalización, mientras que los triterpenos complejos como las saponinas presentan actividades protectoras ante patógenos y plagas (Ghosh, 2016; Thimmappa *et al.*, 2014).

Este diverso grupo de metabolitos son biosintetizados por la ruta del ácido mevalónico y tienen como precursor al escualeno, su diversidad estructural se debe principalmente al esqueleto base que presenta. Existen los esqueletos triterpénicos pentacíclicos (lupeol, α -amirina y β -amirina), tetracíclicos (dammarano) y esteroidales (espirostanos y furostanos) (Kuklinski, 1999) **Figura 7.**



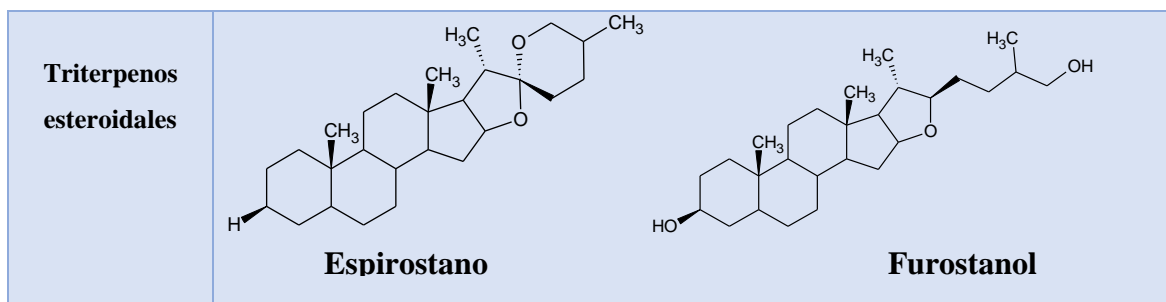


Figura 7: Clasificación y estructura base de los triterpenos. **Fuente:** Kuklinski, 1999.

Otro aspecto muy importante son los grupos sustituyentes que puede presentar el esqueleto base, que pueden ser hidroxilo, carboxilo, carbonilo, alquilo, malonilo y glicosilo (Ghosh, 2016)

2.5.1.2. Actividad biológica de los triterpenos

La diversidad estructural de los triterpenos condujo a que este tipo de metabolitos sean aplicados dentro del campo de la medicina tradicional y la medicina con tecnología sofisticada por sus efectos analgésicos, hepatoprotectores, antitumorales, antiinflamatorios, antioxidantes y efectores del sistema inmune (Fernández, 2014).

a. Efecto antiinflamatorio

Uno de los triterpenos con mayor valor farmacéutico en cuanto a la actividad antiinflamatoria es el ácido ursólico, que ha sido evaluado frente a modelos celulares tanto *in vitro* como *in vivo*, demostrando su capacidad en la reducción de la inflamación producida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, péptidos β -amiloide, ácido kaínico y otros. Además, este es importante ante la inhibición de inflamaciones producidas en el cerebro, evitando así las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, depresión, lesión cerebral traumática y envejecimiento (Ramos-Hryb *et al.*, 2017).

b. Efecto contra el Virus de Inmunodeficiencia Humana VIH

En la revisión bibliográfica realizada por Macías *et al.*, 2010, fueron reportados 71 triterpenos activos de diferentes fuentes vegetales empleados en el tratamiento contra el

Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), en estos estudios se ha determinado que el mecanismo de acción de los triterpenos a nivel molecular es principalmente de inhibición de la interacción virus-célula, adsorción dentro de la célula y replicación del ARN del virus del VIH.

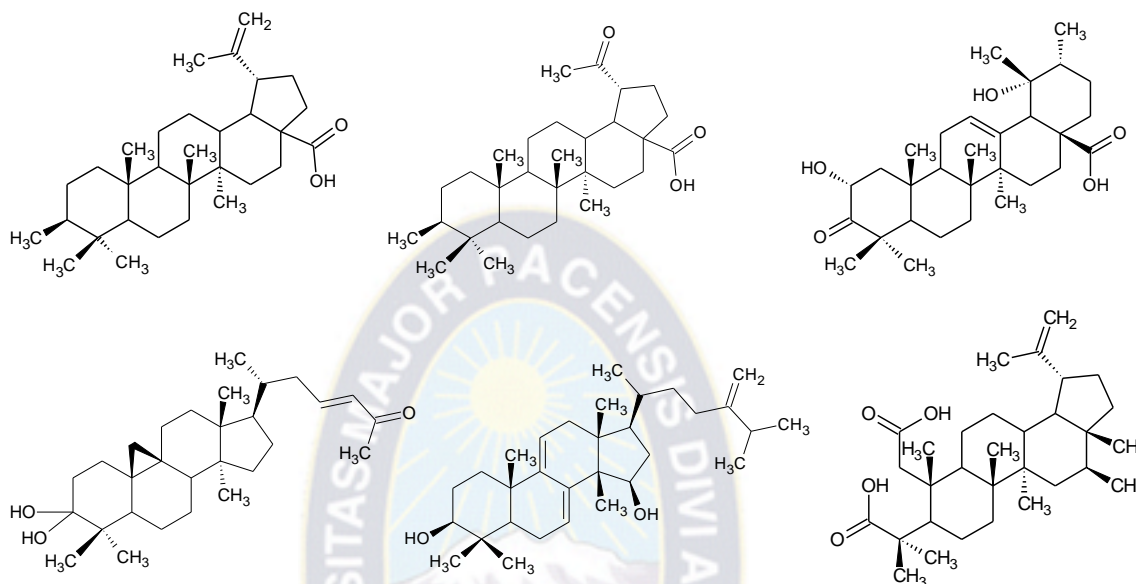


Figura 8: Triterpenos con actividad anti-VIH. **Fuente:** Macías *et al.*, 2010.

c. Efecto anti-cáncer

Los estudios químicos, farmacológicos y fármaco-cinéticos realizados a las drogas vegetales, han llevado a encontrar moléculas bioactivas contra diversos males que afectan a la población, entre estos el cáncer. El cáncer es una de las principales causas de la mortalidad mundial (Siegel *et al.*, 2016), afecta a las células somáticas, que son encargadas del desarrollo y crecimiento de órganos en un ser pluricelular, estas sufren procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), dentro el continente americano el cáncer es la segunda causa de mortalidad dentro la población, en 2018 se han reportado 3,8 millones de nuevos casos y 1,4 millones de personas fallecidas por esta enfermedad (OPS, 2020).

Los triterpenos han sido ampliamente estudiados en este campo, estableciéndose mecanismos de acción en células cancerígenas mediante pruebas “*in vivo*” de cuatro triterpenos (ácido betunílico, ácido oleanólico, ácido ursólico y curcubacina B) (**Figura 9**). Los

principales mecanismos que coadyuvan con la actividad anti-cancerígena son: la inducción apoptótica, la inhibición de proliferación de células cancerígenas, antitumorales, antiangiogénicas. Sin embargo estas no afectan a células y tejidos sanos (Reyes, 2007).

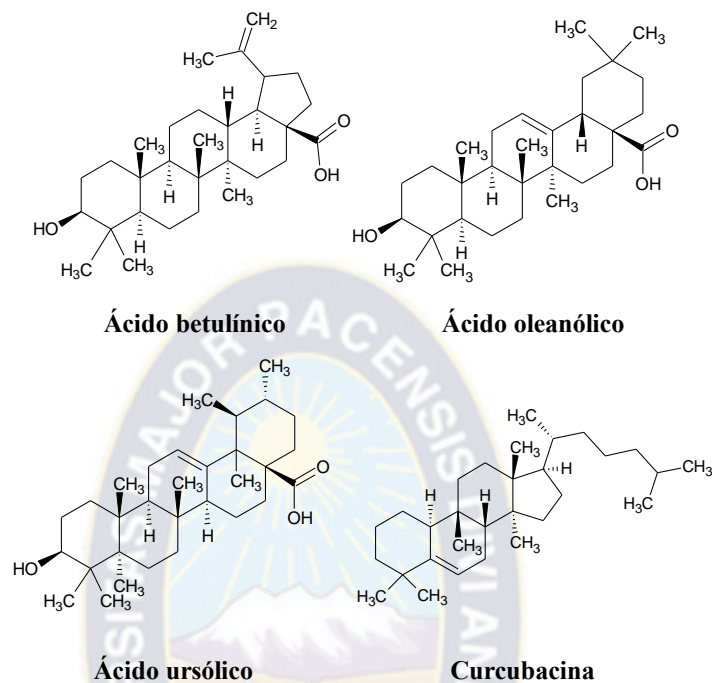


Figura 9: triterpenos inhibidores de células cancerosas. **Fuente:** Reyes, 2007.

2.5.2. Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios de elevado peso molecular, con características bivalentes o anfóteras debido a que están conformados por una parte apolar (aglicona o genina) unida a una parte polar (monosacáridos u oligosacáridos) mediante un enlace glicosídico (**Figura 10**). En función al número de uniones de azúcares con la genina, estas pueden ser denominadas mono-, di- o tri-desmosídicas; de este modo las saponinas monodesmosídicas tienen solo una unión glicosídica, conteniendo normalmente un oligosacárido unido al carbono 3 de su genina mediante un enlace de tipo éter. Mientras que, las saponinas bidesmosídicas tienen unidos dos oligosacáridos a su genina, un oligosacárido se encuentra unido al carbono 3 mediante enlace de tipo éter, mientras que el otro oligosacárido se encuentra unido al carbono 28 mediante un enlace de tipo éster (**Figura 10**) (Ahumada *et al.*, 2016 Bruni, 1999 Galarraga, 2011).

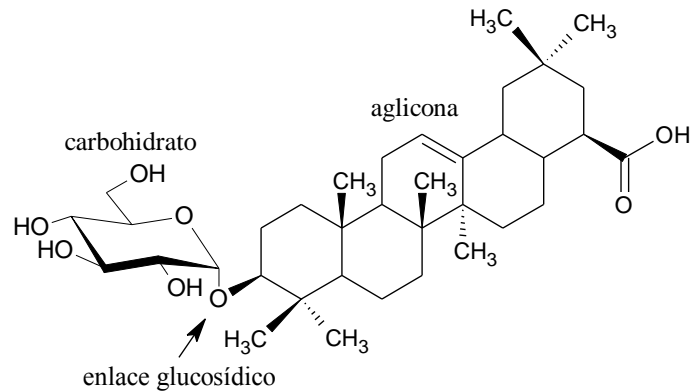


Figura 10: Estructura base de una saponina monodesmósida. **Fuente:** Ahumada *et al*, 2016

Las saponinas se clasifican en dos grandes grupos en función de la genina que presentan. En el primer grupo se encuentran las saponinas con genina de tipo esteroidal (**Figura 11**) que son muy frecuentes en las angiospermas monocotiledóneas. El segundo grupo son las saponinas con genina triterpénica, este tipo de saponinas son muy frecuentes en las angiospermas dicotiledóneas. Existe un tercer grupo conocidas con aminas esteroidales (**Figura 11**) que por algunos autores son considerados como saponinas esteroalcaloidales, mientras que otros autores los clasifican como pseudoalcaloides (Bruneton, 1999).

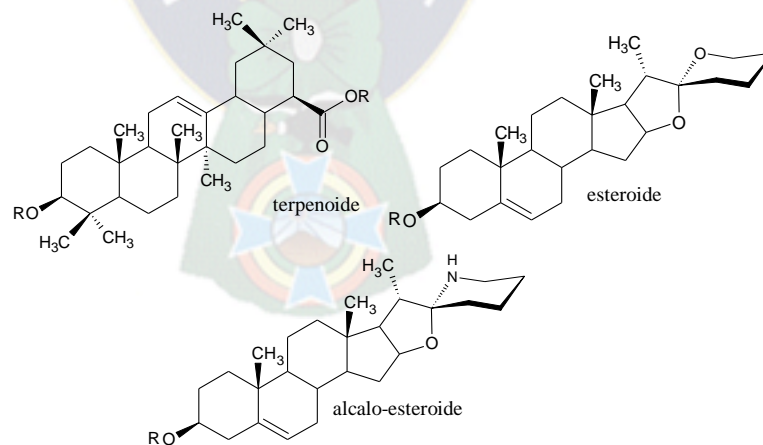


Figura 11: Estructura base de las geninas presentes en las saponinas. **Fuente:** Bruneton, 1999.

Las saponinas generalmente están constituidas por una o dos cadenas de oligosacáridos unidos a su genina, aunque en algunos casos solamente se encuentran conformadas por uno o dos monosacáridos. Una saponina puede contener oligosacáridos de hasta 11 uni-

dades de monosacáridos, sin embargo es muy común encontrar saponinas con oligosacáridos de 3 a 5 unidades de monosacáridos; estos oligosacáridos pueden estar ordenados de forma lineal o ramificada (**Figura 12**) (Evans, 2009)

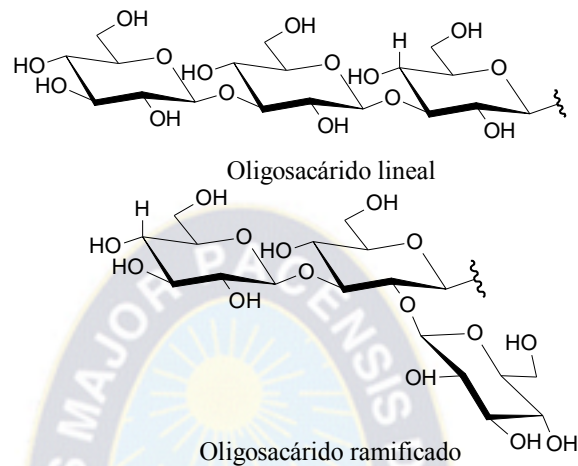


Figura 12: tipos de oligosacáridos unidos a una genina. **Fuente:** Evans, 2009

Este tipo de metabolitos, son biosintetizados generalmente por plantas superiores que durante mucho tiempo y en distintas partes de mundo han sido empleados por sus propiedades detergentes. Esta propiedad es característica de las saponinas, ya que rompen la tensión superficial de las soluciones acuosas formando una espuma estable en el tiempo y es por ello por lo que son considerados como tenso-activos naturales (Evans, 2009; Kuklinski, 1999).

También son caracterizadas por sus propiedades hemolíticas a causa de las saponinas con genina de tipo esteroidal que tienen mayor índice de hemólisis que las saponinas con geninas triterpénicas. Cuando una solución acuosa de saponinas es puesta en contacto directo al torrente sanguíneo esta es altamente tóxica, por otro lado, si esta es suministrada por vía oral la toxicidad es menor debido a la escasa biodisponibilidad en el organismo, por tanto, estos metabolitos no llegan con gran impacto al torrente sanguíneo. Son altamente tóxicos para los animales de sangre fría en especial los peces, esto daría como explicación de la aplicación de saponinas en bajas concentraciones (1-5ppm) como uso tradicional en la pesca, siendo esta la concentración necesaria para romper los

capilares branquiales interrumpiendo así la respiración y el equilibrio osmótico (Capasso *et al.*, 2011).

2.5.2.1. Actividad biológica de las saponinas

Las saponinas presentan varias propiedades biológicas, las más conocidas son la hemolítica y la tensoactiva pero a medida que se fue estudiando este tipo de metabolitos se reportaron otras actividades como antiadipogénica, inmunoadyuvante, citotóxica, antifúngica, antiinflamatoria, hipocolesterolemia, surfactante, antioxidante y molusquicida. Todas estas actividades pueden ser variantes en función a la estructura del metabolito.

a. Tenso-activos naturales

Este tipo de metabolitos son biosintetizados generalmente por plantas superiores, que durante mucho tiempo y en distintas partes de mundo han sido empleadas como detergentes. Esta propiedad es característica de las saponinas, ya que rompen la tensión superficial de las soluciones acuosas formando una espuma estable en el tiempo y es por ello por lo que son considerados como tenso-activos naturales (Evans, 2009; Kuklinski, 1999).

b. Actividad hemolítica

Las saponinas presentan actividad hemolítica, con esto nos referimos que se produce la ruptura de la membrana del eritrocito generando la liberación de la hemoglobina. La ruptura se debe a la interacción de la aglicona de la saponina con los esteroides que rodean a la membrana del eritrocito (Hernandez & Hermosilla, 2014).

Por tanto la capacidad de hemólisis de una saponina está en función a la estructura que presenta, una saponina monodesmosídica tendrá mayor actividad que una saponina b o tridesmosídica ya que el número de azúcares que rodea a la aglicona hace que la molécula sea de mayor tamaño generando un impedimento estérico que dificulta la interacción de la aglicona con la membrana del eritrocito (Hernandez & Hermosilla, 2014).

Además, las saponinas con genina de tipo esteroidal tienen un mayor índice de hemólisis que las saponinas con geninas triterpénicas. Por sus propiedades hemolíticas, cuando una solución acuosa de saponinas es puesta en contacto directo al torrente sanguíneo esta puede ser altamente tóxica, por otro lado, si esta es suministrada por vía oral la toxicidad es menor debido a la escasa biodisponibilidad en el organismo, por tanto, estos metabolitos no llegan con gran impacto al torrente sanguíneo. Por otra parte, son altamente tóxicas para los animales de sangre fría en especial los peces, esto explicaría la aplicación de saponinas en bajas concentraciones (1-5ppm) como uso tradicional en la pesca, siendo esta la concentración necesaria para romper los capilares branquiales interrumpiendo así la respiración y el equilibrio osmótico (Capasso *et al.*, 2011).

c. Actividad antifúngica y antibacteriana

Estas actividades tienen cierta similitud con la actividad hemolítica, la estructura de la saponina es fundamental para la ruptura de la membrana del microorganismo. Las saponinas con mayor actividad ante fitopatógenos son las monodesmosídicas y esta actividad se incrementa cuando el oligosacárido contiene 4 o 5 unidades de monosacáridos salvo algunas excepciones (Bruneton, 1993).

Respecto a la actividad antibacteriana, las saponinas interactúan con los lípidos u otros esteroides presentes en la membrana bacteriana rompiéndola y generando así la muerte celular (Santos *et al.*, 2005), algunas veces las saponinas resultaron ser activas en los ensayos *in vitro* frente a virus (actividad antiviral).

d. Actividad antiinflamatoria

Una aplicación que se le adiciona a las saponinas es la actividad antiinflamatoria, pueden actuar como inhibidores de la degradación de los corticoides, e interferir con el metabolismo de los mediadores de la inflamación. Esta propiedad se ha comprobado con saponinas aisladas de *Solidago virgaurea L.*, que presentan geninas triterpénicas ácidas (Bruneton, 1993).

La actividad puede tener distintas causas (inhibición de la degradación de corticoides, interferencia con el metabolismo de mediadores de la inflamación, etc.) pero normalmente se debe a la genina principalmente triterpénica (Bruneton, 1993).

2.5.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos pueden ser biosintetizados principalmente por dos rutas: la ruta del ácido shikímico (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas y taninos) y por la ruta del ácido mevalónico (antraquinonas y heterósidos antracénicos) (Kuklinski, 1999).

2.5.3.1. Fenoles sencillos y ácidos fenólicos

Los fenoles simples y ácidos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en plantas superiores y helechos (Porras & Lopez, 2009). Los fenoles sencillos estructuralmente están conformados por un anillo aromático unido a 2 o 3 grupos hidroxilo (**Figura 13**), mientras que los ácidos fenólicos pueden ser clasificados en dos grupos, los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos (Peñarrieta *et al*, 2014)

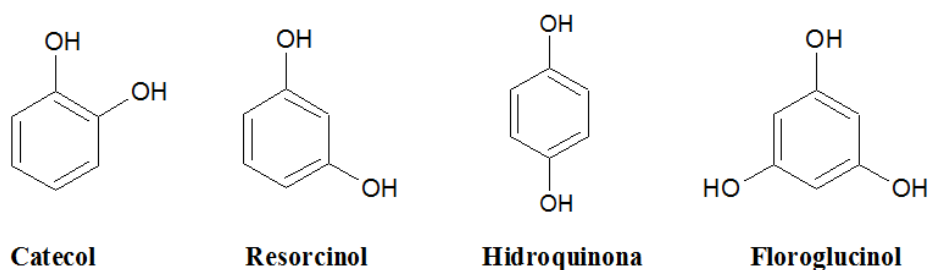


Figura 13: Estructura base de los fenoles simples. **Fuente:** Peñarrieta *et al*, 2014.

Los ácidos hidroxibenzoicos, por un lado, son aquellos metabolitos que tienen un grupo ácido unido a un anillo fenólico y conforman una estructura de tipo C6-C1. Entre ellos los más comunes son los ácidos p-hidroxibenzoico, gálico y vinílico. Sin embargo los ácidos hidroxicinámicos forman una estructura base C6-C3, los más comunes son los

ácidos cumárico, caféico y ferúlico que a su vez estas se encuentran conjugados con ácido tartárico o con el ácido quínico, rara vez estos se encuentran en estado libre (Valencia *et al*, 2017)

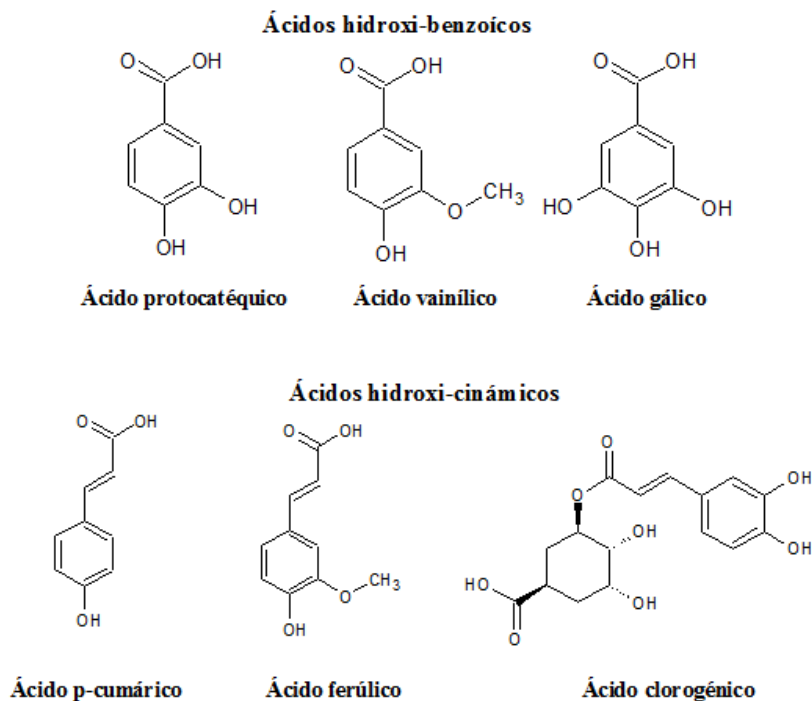


Figura 14: Clasificación y estructura base de los ácidos fenólicos. **Fuente:** Peñarrieta *et al*, 2014.

2.5.3.2. Flavonoides

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, hojas, flores y cortezas de plantas superiores (Marco, 2006; Zaragoza *et al.*, 2002); hasta el año 2012 se reportaron alrededor de 10.000 variantes estructurales nuevas (Weston & Mathesius, 2013). Estos metabolitos se clasifican en siete grupos (**Figura 15**), la mayoría de estos compuestos son responsables de la coloración que pueda presentar los distintos órganos de la planta, y principalmente de la coloración amarilla en flores. Además, estos pueden presentar coloraciones naranja, rosadas y azules, particularmente cuando contienen antocianinas que cumplen diversas funciones dentro la planta, como ser protectoras ante la radiación UV, antioxidante y quelantes de elementos metálicos (Capasso, 2011)

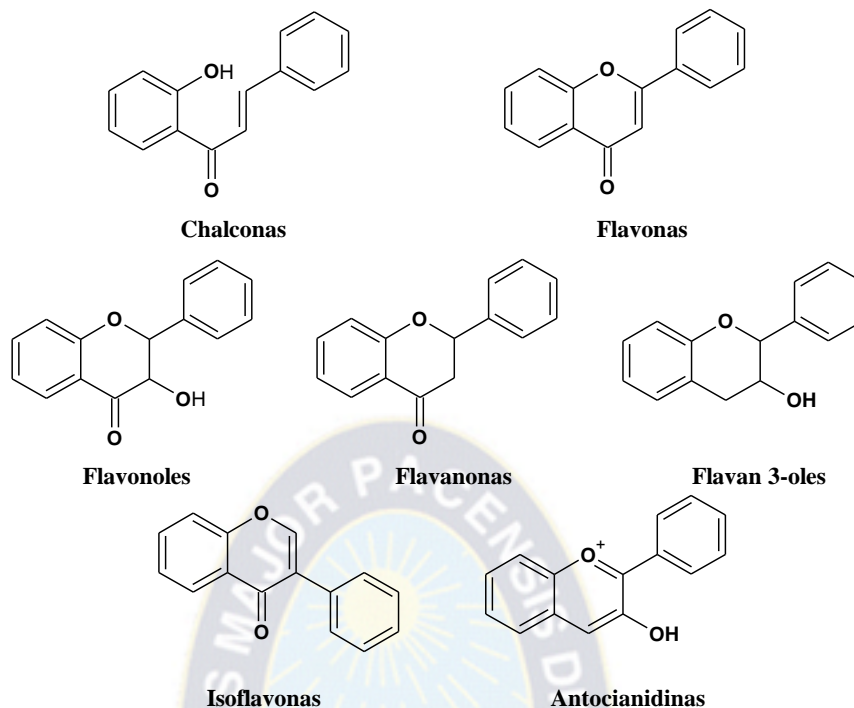


Figura 15: Clasificación estructural de los flavonoides. **Fuente:** Marco, 2006.

2.5.3.3. Actividad biológica de compuestos Fenólicos

El gran interés por los compuestos fenólicos surge por su actividad antioxidante, por la que pueden ser aplicados en alimentos debido a la retardación de la peroxidación lipídica mejorando así la calidad y el valor nutricional de los alimentos, o por sus actividades antiinflamatoria, antialérgicas, antimicrobiana, anticancerígenas, entre otras, que apoyan un uso medicinal (Valencia *et al*, 2017;Rivas *et al*, 2017).

Los compuestos fenólicos como antioxidantes son reguladores del estrés oxidativo producido a nivel celular eliminando así especies reactivas de oxígeno o nitrógeno que provocan el desequilibrio de la célula. El principal mecanismo de estos compuestos para la regulación de estas especies reactivas es la donación de un átomo de hidrogeno que por consecuencia forma un radical fenóxido, más estable y de menor impacto para las células (Valencia *et al*, 2017).

2.6. Análisis de actividad antioxidante

2.6.1. Método para la determinación de Fenoles totales

El método empleado para la cuantificación de fenoles totales es denominado Folin-Ciocalteu (F-C) que en la antigüedad se empleaba para la determinación de tirosina y proteínas pero con el paso del tiempo se fue modificando para la determinación del contenido de compuestos fenólicos (Muñoz *et al*, 2017).

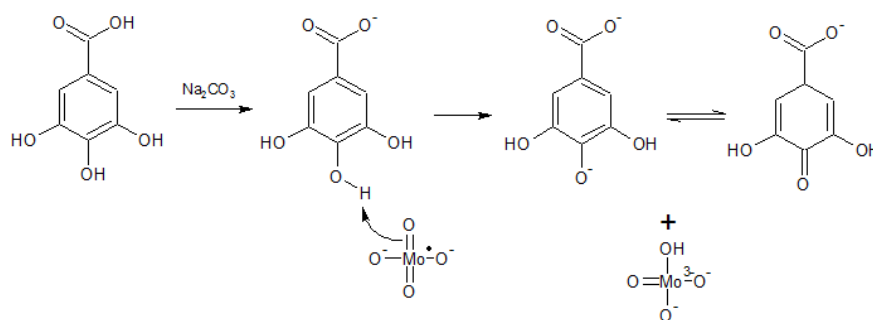


Figura 16: Reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con Acido Gálico. **Fuente:** Adaptación de Muñoz *et al*, 2017.

El reactivo de Folin-Ciocalteu está compuesto por una solución acuosa de fosfotungstato-molibdatos de color amarillo que al reaccionar (reacción de óxido-reducción) con uno o dos electrones da un cambio de coloración en solución tornándose azulado, cambio que puede ser medido en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 760nm. Según Huang *et al*, 2005 para la cuantificación de compuestos fenólicos es necesario regular el medio a un pH cercano a 10 para que los fenolatos formados reaccionen con el reactivo de Folin-Ciocalteu (**Figura 16**).

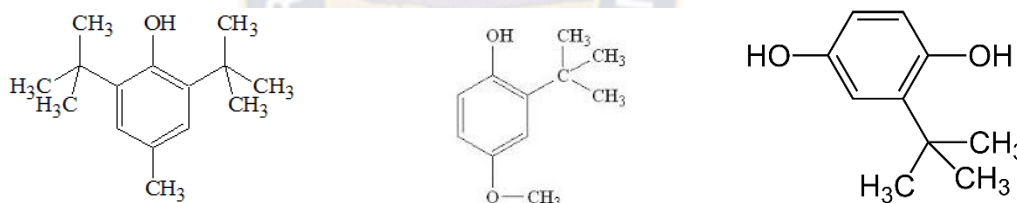
Otros autores mencionan que la cuantificación de compuestos fenólicos dentro de un extracto vegetal es interferida por la presencia de azúcares reductores, aminoácidos y ácido ascórbico dando falsos datos elevados respecto a la concentración de compuestos fenólicos (Ludwing *et al*, 2013).

La cuantificación de fenoles totales está directamente relacionada a la actividad antioxidante debido a los reconocidos mecanismos antioxidantes de los fenoles.

2.6.2. Determinación de actividad antioxidante inhibidora de radicales libres

Los antioxidantes son de naturaleza sintética (BTH, BHA y TBHQ) (**Tabla 4**) o natural (compuestos fenólicos, flavonoides, vitaminas, etc.) (Avello & Suwalsky, 2006), estas sustancias son capaces de dar estabilidad a Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) que pueden formarse a nivel mitocondrial siendo el radical superóxido el principal precursor de la producción de las ERO (**Tabla 5**) dando paso a un estrés oxidativo (EO) a nivel celular de un sistema biológico (Maestro & Borja, 1993; Bonola Gallardo *et al*, 2014; Carvajal, 2019).

Tabla 4: Antioxidantes de naturaleza sintética nocivos para la salud.



Butilhidroxitolueno	Butilhidroxianisol	<i>ter</i> -butilhidroquinona
BTH	BHA	TBHQ

Fuente: Adaptación a Avello & Suwalsky, 2006.

Tabla 5: Especies Reactivas de Oxígeno.

Radicales			
Superóxido	O_2^-	Radical alcoxilo	$RO\cdot$
Hidroxilo	$\cdot OH$	Radical peroxilo	$ROO\cdot$
No radicales			
Peróxido de hidrogeno	H_2O_2	Ozono	O_3
Oxígeno singlete	O_2^1	Peróxido orgánico	$R - OO - R$
Acido hipocloroso	$HOCl$	Ácido hipobromoso	$HBrO$

Fuente: Carvajal, 2019

El interés por el uso de compuestos con actividad antioxidante se encuentra en su aplicación dentro del campo alimenticio como inhibidores de la formación de colores y sabores desagradables en aceites u otro tipo de alimentos (Maestro & Borja, 1993), por otro lado también es de un gran interés dentro el campo de la medicina debido a que la alta concentración de ERO puede ocasionar daños por oxidación a biomoléculas como proteínas, lípidos, ADN, etc. En consecuencia, se desencadenan enfermedades a nivel cardiovascular, gastrointestinal y neurodegenerativas (Bonola *et al*, 2014; Scalbert *et al*, 2005).

Los métodos para la determinación de la actividad antioxidante se basan principalmente en la reacción de grupos cromóforos donde una la variación de la coloración directamente proporcional a la concentración de compuestos fenólicos, sin embargo la actividad antioxidante no se debe principalmente a la suma de actividad que presenta cada componente de la muestra pues también debe considerarse los efectos de sinergismo e inhibición (Kuskoski *et al*, 2005). Existen varias técnicas que son empleadas para la determinación de la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP), de las cuales ABTS y DPPH son los métodos empleados con mayor frecuencia (Kuskoski *et al*, 2005).

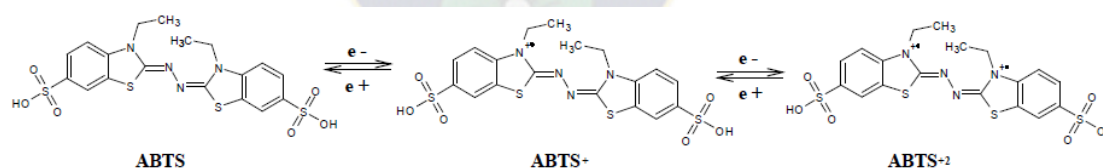


Figura 17: Reacción de formación del radical ABTS por la adición de un oxidante fuerte.

Fuente: Lew *et al*, 2014

El método ABTS consiste en una etapa inicial de la formación del radical intermediario de coloración azul (**Figura 17**), haciendo reaccionar el reactivo con un oxidante fuerte como el persulfato de amonio u otro oxidante fuerte. Cuando esta solución se añade a una determinada muestra esta reduce su coloración por la estabilización del radical mediante la donación de un electrón o de hidrogeno (Huet, 2017).

2.7. Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas son métodos de separación aplicados a mezclas de compuestos, se basa principalmente en la afinidad de compuestos a dos fases, una fase estacionaria de gran área y una fase móvil que fluye a través de la fase estacionaria. Según la técnica cromatográfica la fase estacionaria puede ser solida o líquido y la fase móvil puede ser líquido o gas (Claure, 2005).

Estas técnicas pueden clasificarse de acuerdo a varios factores, pero principalmente va de acuerdo a la interacción de la muestra entre ambas fases (móvil y estacionaria) (Castaños, 2015). A continuación se presenta una clasificación general sobre las técnicas cromatográficas (**Tabla 6**).

Tabla 6: Clasificación general de las técnicas cromatográfica. **Fuente:** <https://www.studocu.com/universidad-nacional/quimica-biorganica-teoria/resumenes/cromatografia/3735697/view>.

Clasificación general	Fase estacionaria	Fase móvil	Mecanismo de separación
Cromatografía líquida (LC)	Solido	Líquido	Adsorción
			Exclusión
	Resina intercambiadora	Líquido	Intercambio iónico
	Líquido	Líquido	Reparto
Cromatografía gaseosa (GC)	Líquido	Gas	Adsorción
	Solido	Gas	Adsorción
Cromatografía de fluido supercríticos (SFC)	Solido-especies orgánicas	Fluido supercrítico	Reparto

2.7.1. Cromatografía de adsorción en Sílica Gel F-254

Esta técnica cromatográfica es denominada también cromatografía de partición basada principalmente en la afinidad a la fase móvil y la fase estacionaria. El procedimiento de separación para mezclas de compuestos o extractos vegetales consiste en introducir la muestra en la parte superior de la columna para empezar con la elución en gradiente, es decir con un aumento de polaridad para que los compuestos vayan saliendo progresivamente con el eluyente de acuerdo a su polaridad. La velocidad de elución es mayor cuanto mayor sea el coeficiente de partición.

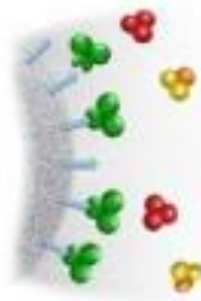


Figura 18: Proceso de separación en una columna cromatográfica con Sílica Gel. **Fuente:** GE Healthcare.

2.7.2. Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20

La técnica cromatográfica Sephadex LH-20 es denominada también cromatografía por exclusión o filtración, esta consiste en una fase estacionaria compacta y porosa formada principalmente por esferas de dextrano hidroxipropilado de una gran estabilidad química y física. En esta técnica el flujo de elución es isocrática es decir que la composición del eluyente permanece constante ya que separa a los componente de la mezcla por tamaño molecular y no por afinidad con el eluyente como en el caso de la columna con sílica gel (GE Healthcare, 2018)

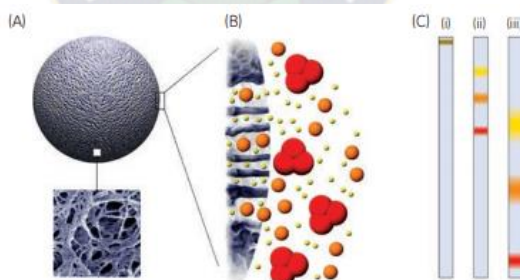


Figura 19: Proceso de separación con Sephadex LH-20. (A) vista interna de dextrano hidroxipropilado, (B) separación por tamaño molecular y (C) vista de una columna de Sephadex LH-20. **Fuente:** GE Healthcare, 2018.

2.7.3. Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica ampliamente usada debido a su rapidez sensibilidad y bajo costo. Principalmente es empleada para la determinación de componentes dentro de una mezcla de compuestos, además para la determinación de la

pureza y naturaleza de un compuesto, el control del avance de una reacción o el avance de la separación de fracciones en una columna cromatográfica (Cai, 2014; Stahl, 1969).

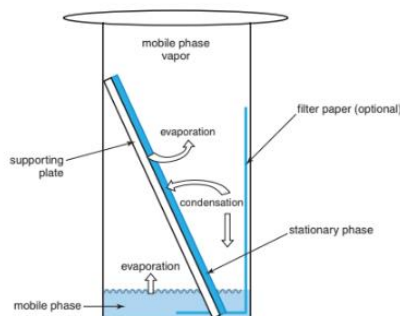


Figura 20: Sistema para la elución de placas TLC. **Fuente:** Cai, 2014.

Esta técnica está consta principalmente con dos fases:

- **fase estacionaria**, pueden ser de soporte de vidrio, aluminio o de plástico (PET). las placas cromatográficas comúnmente utilizadas tienen como material adsorbente la Silica 60, pero también existen placas cromatográficas con material adsorbente de: celulosa, alúmina y poliamida que pueden ser empleados de acuerdo con la naturaleza de los compuestos en estudio (Cai, 2014).
- **fase móvil**, es la parte más importante ya que esta tiene mayor influencia dentro de esta técnica. Generalmente está constituido por un solo componente pero puede llegar a mezclas hasta de cinco componentes, la fase móvil siempre debe tener una consistencia homogénea y sin rastros de turbidez (Cai, 2014; Stahl, 1969).

2.7.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución o HPLC es una técnica analítica ampliamente usada para la determinación cualitativa y cuantitativa de componentes presentes dentro de una muestra, empleando columnas desde 2 a 5 mm de diámetro y con una longitud aproximada de 3 a 30 cm. Un factor muy importante es el tamaño de partícula de la fase estacionaria que debería estar comprendida de 150 a 200 μm para que la fase móvil se

mueva con mayor fluidez con ayuda de una bomba de presión. (Claure, 2005; Castaños, 2015).

Esta técnica puede trabajar con dos sistemas de elución, una de ellas es la técnica de elución **isocrática** que consiste en la elución por una mezcla de polaridad constante (una sola composición durante la manipulación) y la segunda técnica consiste en la elución en **gradiente**, dentro esta técnica la composición de la mezcla se modifica mientras dura la manipulación (Jaen, 2006).

Las principales ventajas que brinda la aplicación de esta técnica cromatográfica son (Claure, 2005; Jaen, 2006):

- **Alta resolución**, respuesta lineal y poco ruido de fondo.
- **Velocidad**, consta de una bomba generalmente de doble pistón con la que se suministra presión para la rápida elución de la muestra.
- **Sensibilidad**, detectan la mínima concentración de analito con sencillez.
- **Resultados cuantitativos**, proporciona cromatogramas con información de la concentración del analito.

2.8. Técnicas espectroscópicas

2.8.1. Espectroscopia UV-Vis

La mayoría de las técnicas espectroscópicas se basa principalmente en la interacción de la radiación electromagnética con las moléculas. De la misma manera la espectroscopía UV-Vis aprovecha esta propiedad para producir así saltos electrónicos desde un estado basal a un estado excitado y así medir la energía absorbida por las moléculas (Cuesta *et al.*, 2015).

Dentro de esta técnica los rangos aplicados se dividen en dos: una primera región comprende longitudes de onda desde los 200 a 400 nm (rango ultravioleta), mientras que la otra región comprende de 400 a 800 nm (rango visible). Sin embargo si se consideran longitudes de onda menores a 200 nm estas no tienen la energía suficiente para realizar la transición de su estado basal a un estado excitado, por otro lado a longitudes de onda

mayores a 800 nm (rangos de Rayos X) la energía es demasiado alta llegando a expulsar al electrón (fluorescencia de rayos X) (Forster, 2004)

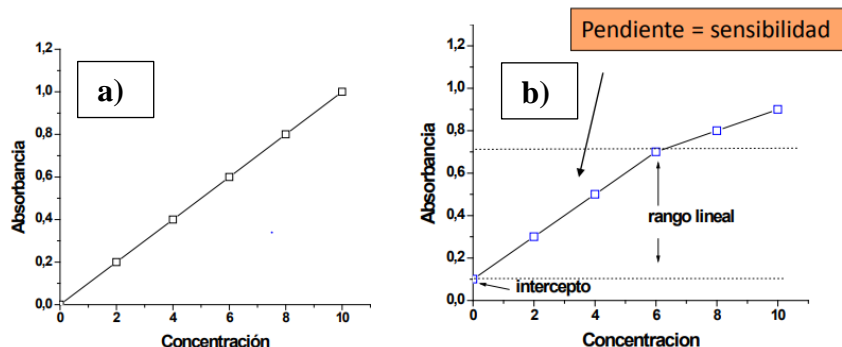


Figura 21: a) Recta de calibración empleada para la cuantificación de analitos, b) Desviación de la linealidad debido al empleo de altas cocentraciones de analitos. **fuentes:**

https://www.upct.es/~minaees/espectro_electromagnetico.pdf

Esta técnica es ampliamente usada para la determinación cuantitativa de analitos mediante la construcción de una recta de calibración, esto es posible debido a que la ley de Lambert-Beer establece una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración (Cuesta *et al*, 2015). Así pues esta técnica también presenta una serie de limitaciones que principalmente se reducen a 3 puntos muy importantes que son: la concentración (en esta técnica deben aplicarse a soluciones no mayores a 10^{-2} M de concentración), la falta de uniformidad dentro la muestra debido a la presencia de impurezas y desviaciones químicas debido a la inestabilidad del analito dentro la solución, pueden llevar a una variación en los valores de absorbancia (Serrano, 2010).

2.8.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear RMN

La resonancia magnética nuclear RMN es una técnica de elucidación estructural utilizada ampliamente en la química orgánica. Se basa en las propiedades magnéticas de algunos núcleos de elementos como el ^1H , ^{13}C , ^{15}N , y otros núcleos que posean un spin diferente de cero.

El movimiento de cualquier partícula cargada tiene un campo magnético asociado. Es decir, que genera un dipolo magnético, que en un campo magnético corresponde a un

momento magnético μ . El μ de un núcleo está íntimamente relacionado a su momento angular. Es decir, que μ es directamente proporcional al spin nuclear. (Ioannis, 2002)

Cada uno de los protones y neutrones de los núcleos atómicos tienen spin $1/2$ (igual que los electrones) y el spin total de un núcleo se encuentra representado por I que es la sumatoria de los spines de las partículas de las que se encuentra compuesta. Dicha sumatoria no es sencilla y se debe tomar en cuenta que el valor de I depende principalmente del estado en el que se encuentra el número atómico (apareado o desapareado) “ Z ” y del número másico “ A ”. en función a estos criterios, los casos podemos clasificarlos de la siguiente manera. (Ioannis, 2002)

- Si el núcleo se encuentra con Z impar y A impar: Estos núcleos tendrán un valor de spin I semientero ($1/2, 3/2, 5/2$, etc) y todos pueden ser analizados por RMN. Por ejemplo ^1H ($1/2$), ^{15}N ($1/2$), ^{19}F ($1/2$) y ^{11}B ($3/2$).
- Si el núcleo se encuentra con Z impar y A par: Estos núcleos tendrán un valor de spin I entero ($1, 2, 3$, etc) y todos pueden ser analizados por RMN. Por ejemplo ^2H (1), ^{14}N (1) y ^{10}B (3).
- Si el núcleo se encuentra con Z par y A impar: Estos núcleos tendrán un valor de spin I semientero ($1/2, 3/2, 5/2$, etc) y todos pueden ser analizados por RMN. Por ejemplo tenemos ^{13}C ($1/2$) y ^{17}O ($5/2$).
- Si el núcleo se encuentra con Z par y A par: Estos núcleos tendrán un valor de spin igual a cero y, por lo tanto, estos no serán afectados por campos magnéticos, de este modo este tipo de átomos serán inactivos a la RMN. Por ejemplo son ^{12}C y ^{16}O . En presencia de un campo magnético, cada spin nuclear puede adoptar diferentes orientaciones.

CAPITULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material vegetal

La corteza y hojas de Colomero (*C. domestica*) fue recolectado en el sector denominado La Brecha B a 10 kilómetros de la carretera Sapecho- Rurrenabaque (S 15°32'31,7" W 67°16'18,7") (**Figura 22**) en el mes de enero de 2020. El material vegetal recolectado se sometió a un proceso de secado a temperatura ambiente por 72 horas. Una vez seco, se procedió a picar la corteza en trozos pequeños, para luego almacenar los trozos de corteza y las hojas en sobres manila separados hasta el momento de su uso.

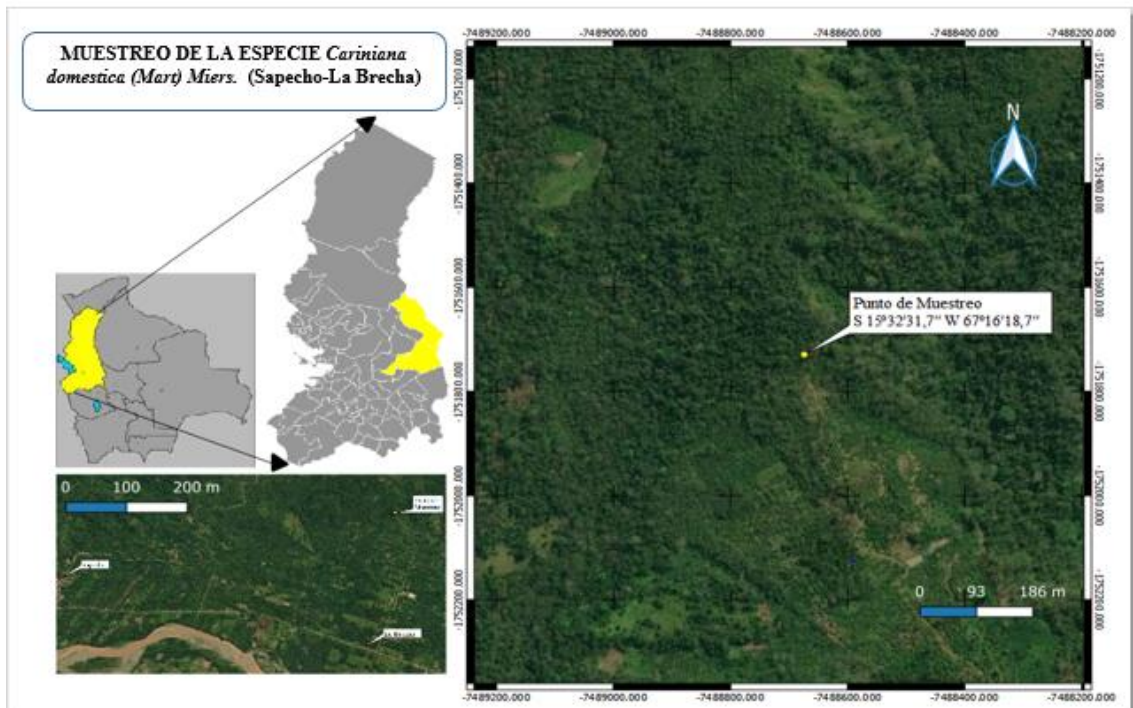


Figura 22: Punto de muestreo de corteza y hojas de Colomero (*C. domestica*).
Fuente: Elaboracion propia.

3.2. Obtención de extractos

Se realizaron cinco extracciones continuas utilizando solventes en orden creciente de polaridad: éter de petróleo, acetato de etilo, etanol, etanol: agua (50:50) y agua. Partiendo de 300 gr de corteza seca y picada con solvente en relación 1:7 (p/v). Por otro lado, los extractos de hojas fueron preparados con 150 gr de material vegetal seco y picado, con una relación de solvente 1:5 (p/v) (**Figura 23**). Posteriormente cada extracto con solvente orgánico fue concentrado a presión reducida en un rotaevaporador IKA RB10 a 100 revoluciones por minuto.

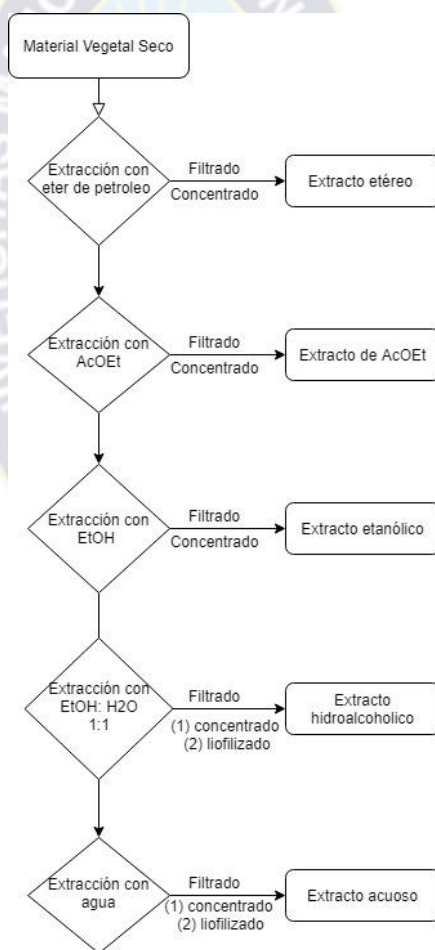


Figura 23: Esquema de preparación de extractos de corteza y hojas de Colomero. **Fuente:** Elaboración propia.

Los extractos hidroalcohólicos fueron concentrados a presión reducida en un rotaevaporador hasta eliminar todo el Etanol. El volumen de extracto restante fue puesto en recipientes de plástico pesados, congelados y llevados al liofilizador por 72 horas. Los extractos acuosos fueron liofilizados. Una vez que los extractos estaban secos, fueron pesados y se calculó el rendimiento de extracción

3.3. Análisis fitoquímico preliminar

Para cada extracto se realizó pruebas cualitativas específicas para la identificación de metabolitos secundarios como: alcaloides, azúcares reductores, saponinas, triterpenos, glucósidos cardiotónicos, fenólicos, taninos, flavonoides y proteínas.

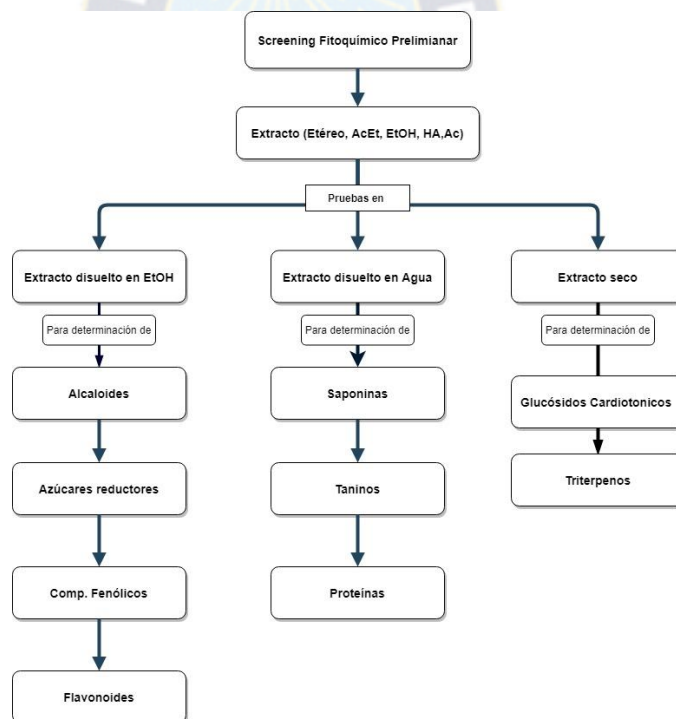


Figura 24: Esquema de preparación de extractos para la identificación de metabolitos secundarios. **Fuente:** Elaboración propia.

Para la determinación de alcaloides, azúcares reductores, fenólicos y flavonoides. En un tubo de ensayo se pesó 0.2g de extracto seco (etéreo, acetato de etilo, etanólico, hidroalcohólico o acuoso), se añadió 15 mL de etanol de 96°GL y se dejó reposar durante 24

horas, el mismo procedimiento se realiza empleando agua en lugar de etanol (**Figura 24**).

Una vez transcurrido el tiempo se colocaron 2ml del líquido sobrenadante en cinco tubos de ensayo limpios seco y numerado, para posteriormente realizar las pruebas específicas como se indica en la (**Tabla 7**).

Tabla 7: Procedimiento experimental para la determinación cualitativa de alcaloides, azúcares reductores, compuestos fenólicos y flavonoides en extracto de corteza y hojas de *C. domestica*.

Metabolito	Test	Procedimiento
Alcaloides	Mayer	Al tubo número 1 se añadió cinco gotas del reactivo de Mayer por la pared del tubo de ensayo y se dejó en reposo por unos minutos. La formación de un precipitado blanco o crema indicó la presencia de alcaloides
	Dragendorf	Al tubo número 2 se añadió 1 ml de reactivo de Dragendorf, la formación de un precipitado amarillo indicó prueba positiva de alcaloides
Azúcares reductores	Fehling	Al tubo número 3 se añadió 1 ml de reactivo de Fehling A y 1 ml de Fehling B, se calentó por unos minutos. La formación de un precipitado rojo ladrillo indico la presencia de azúcares reductores.
Fenólicos	Cloruro férrico	Al tubo número 4 se le añadió 5 gotas de solución de cloruro férrico al 5%. La formación de un precipitado de color verde oscuro o azul oscuro indico prueba positiva a compuestos fenólicos.
Flavonoides	Shinoda	Al tubo número 5 se añadió un pequeño trozo de magnesio metálico, posteriormente se añadieron por las paredes del tubo 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado. se dejó reposar por unos minutos, un cambio de coloración a rosa pálido, naranja o violeta indico la presencia de flavonoides

Fuente: Laboratory Handbook for the fraction of Natural Extracts.

Como siguiente paso se determinaron: saponinas, taninos y proteínas. Para realizar estas pruebas en un tubo de ensayo se pesó 0,2g de extracto (etéreo, acetato de etilo, etanólico, etanol-agua o acuoso), se añadió agua destilada y se dejó reposar por 24 horas. Pasado el tiempo se procedió a colocar pequeñas porciones del líquido sobrenadante en cuatro tubos de ensayos limpios, secos y numerados. Y se realizaron las pruebas específicas como se describen en la (**Tabla 8**).

Tabla 8: Procedimiento experimental para la determinación cualitativa de taninos, saponinas y proteínas en extractos de corteza y hojas de *C. domestica*.

Metabolito	Test	Procedimiento
Taninos	Acetato de plomo	Al tubo número 1 se añadió por las paredes del tubo 1 ml de una solución de acetato de plomo al 10% y se dejó en reposo por unos minutos. La formación de un precipitado blanco voluminoso indicó la presencia de taninos
	Gelatina-sal	Al tubo número 2 se añadió 1 ml de solución caliente de gelatina al 1% conteniendo cloruro de sodio al 10%, la formación de un precipitado blanco indicó prueba positiva para taninos.
Saponinas	Espuma	El tubo número 3 fue agitado por 10 minutos para la formación de espuma, se midió la altura de espuma y se dejó reposar por 15 minutos. Una espuma persistente en el tiempo de reposo indica presencia de saponinas.
Proteínas	Biuret	Al tubo número 4 se le añadió 1ml de solución de reactivo de Biuret. Un cambio de coloración a azul oscuro o violeta indica prueba positiva para proteínas.

Fuente: Laboratory Handbook for the fraction of Natural Extracts.

Finalmente se analizaron la presencia de triterpenos y glucósidos cardiotónicos. Para ello se realizaron pruebas directas al extracto seco, para cada extracto se tomaron 10mg y fueron repartidos en 4 tubos de ensayo limpios, secos y numerados. Y se realizaron las pruebas específicas como se describe en la (Tabla 9):

Tabla 9: Procedimiento experimental para la determinación de glucósidos cardiotónicos y triterpenos en extractos secos de *C. domestica*

Metabolito	Test	Procedimiento
Glucósidos cardiotónicos	Kedde	A la porción de extracto que se encuentra en el tubo número 1 se añadió 1 ml de metanol y se agito por unos minutos, se decanta la solución a otro tubo de ensayo donde se añaden reactivo de Kedde I (Acido 3,5-dinitrobenzoico en metanol) y reactivo de Kedde II (hidróxido de potasio). Un cambio de coloración (azul) de la solución indico prueba positiva a glucósidos cardiotónicos.
	Baljet	En un tubo de ensayo se prepara una mezcla 1:1 de solución 1 (ácido pícrico al 1% en etanol) y solución 2 (hidróxido de sodio al 10%). Se añadió 5 gotas de la mezcla anterior al tubo 2 con una porción de extracto, un cambio de coloración a rojo intenso indico prueba

		positiva para glucósido cardiotónicos
	Keller- Killani	Al tubo número 3 se añadió 1 ml de ácido acético glacial, posteriormente se añadió 2 gotas de una solución de cloruro férrico al 5%. Cuidadosamente y por las paredes del tubo de ensayo fueron añadidos 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Si la capa superior muestra una coloración azul indica presencia de glucósidos cardiotónicos
Triterpenos	Liebermann-Bouchard	Al tubo número 4 se añaden 1 ml de anhídrido acético y lentamente por las paredes del tubo se añaden cuidadosamente 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Un cambio de coloración indica presencia de triterpenos.

Fuente: Laboratory Handbook for the fraction of Natural Extracts.

3.4. Perfil cromatográfico

El perfil cromatográfico se realizó para una mejor visualización de la cantidad de metabolitos presentes en los extractos, para esto se empleó la técnica de cromatografía de capa fina (CCF) de fase normal, empleando como reveladores al ácido sulfúrico al 5% (revelador universal) y el cloruro férrico al 5% (revelador para compuestos fenólicos).

Cada extracto y muestra fueron sembrados mediante capilar en una placa de Silica gel 60 F₂₅₄ de 5cm y se esperó hasta que la muestra sembrada se encuentre completamente seca. Posteriormente se preparó el eluyente adecuado para cada extracto y se lo vertió dentro de un vaso de precipitado dejando reposar por 2 min.

Finalmente, se introdujo la placa con la muestra sembrada dentro del vaso de precipitado y se esperó hasta que el eluyente haya recorrido hasta el borde superior, se secaron las placas y se revelaron con ácido sulfúrico al 5% y cloruro férrico al 5%

3.5. Separación, aislamiento e identificación de metabolitos

El aislamiento de metabolitos secundarios se realizó de cada extracto como se describe a continuación:

3.5.1. Aislamiento de metabolitos en extracto de Acetato de Etilo de hojas

Para el aislamiento de metabolitos secundarios del extracto de acetato de etilo, en primer lugar se realizó un fraccionamiento al extracto crudo con una mezcla 1:1 de éter de petróleo (20-40) y acetato de etilo dejando en reposo por 24 horas. Pasado el tiempo de fraccionamiento se filtró el sobrenadante y se realizó un control mediante placas TLC del residuo y el sobrenadante con un sistema de elución de éter de petróleo (20-40): AcOEt en una proporción de 3:7 (**Figura 25**). Posteriormente se concentró el sobrenadante en un rotaevaporador a presión reducida.



Figura 25: Placa TLC de 1) Extracto crudo de AcOEt y 2) Fracción éter de petróleo (20-40): AcOEt 1:1. **Fuente:** Elaboración propia

Con la fracción obtenida se realizó una columna VLC (Columna A) empaquetada con éter de petróleo 20-40, fueron sembrados 0.53 g de la fracción obtenida del extracto crudo y como fase móvil se empleó mezclas de éter de petróleo 20-40: acetato de etilo en orden creciente de polaridad y se realizó el control por placas TLC con un sistema de elución éter de petróleo (40-60): AcOEt 3:7 (**Figura 26 y 27**).

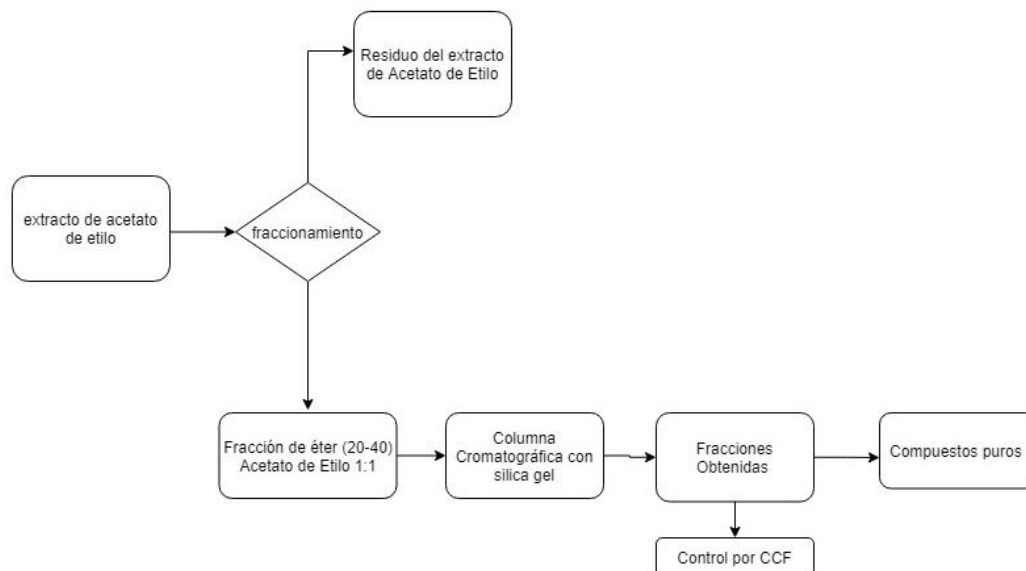


Figura 26: Esquema del tratamiento y fraccionamiento (Columna A) del extracto de AcOEt de corteza. **Fuente:** Elaboración propia.

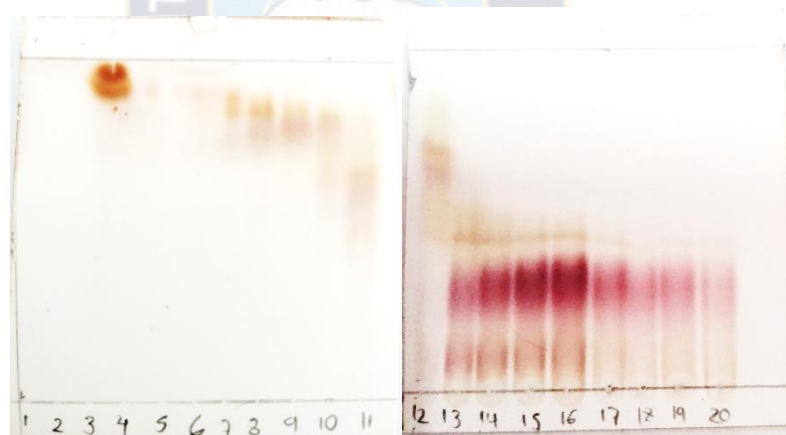


Figura 27: Placas TLC realizadas a fracciones obtenidas de la Columna A. **Fuente:** Elaboración propia.

Posteriormente se realizó una columna abierta de flujo continuo (Columna B) con Sílica gel como fase estacionaria, empacada con éter de petróleo 40-60: acetato de etilo en relación (95:5), donde fueron sembrados 120.5 mg de extracto de las uniones obtenidas (13-16) en la columna A. Las fracciones fueron colectadas en tubos de ensayo y controlados mediante cromatografía de capa fina, las fracciones que contenían metabolitos con mismo Rf fueron unidas, concentradas hasta la cuarta parte de su volumen inicial y se

esperó para que la molécula pueda cristalizar (**Figura 28**). Los cristales obtenidos (**COMPUESTO 1**), correspondientes probablemente a un compuesto puro, fueron analizados por TLC, pesados y llevados a análisis por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) para determinar su estructura.

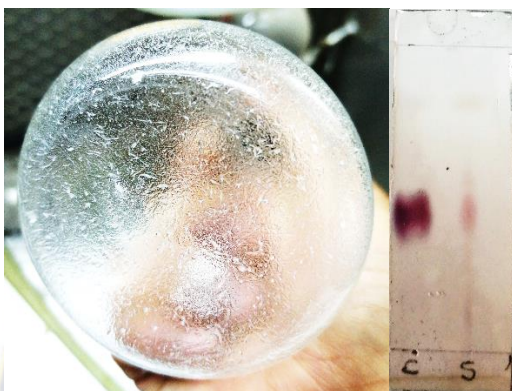


Figura 28: Compuesto cristalizado y placa TLC de cristales (C) y sobrenadante (S). **Fuente;** Elaboración propia.

Compuesto 1 RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) δ 185.9 (C-28), 142.3 (C-13), 125.9 (C-12), 81.0 (C-3), 77.2 (C-24), 70.6 (C-2), 49.7 (C-5), 47.4 (C-1), 46.9 (C-9), 44.5 (C-4), 40.9 (C-14; C-18), 39.7 (C-8; C-10), 37.8 (C-19), 34.8 (C-21), 32.7 (C-7), 32.1 (C-20), 29.7 (C-22), 28.3 (C-15), 28.1 (C-29), 27.4 (C-30), 25.4 (C-27), 24.2 (C-16), 23.6 (C-11), 19.8 (C-6; C-26), 17.0 (C-25), 14.2 (C-23).

3.5.2 Separación de fracciones ricas en compuestos fenólicos y saponinas del extracto etanólico de hojas

Para la obtención de una fracción rica en saponinas se realizaron 3 extracciones del extracto etanólico de hojas, para eso fueron disueltos 6,2 g de extracto seco en una mezcla etanol: agua en una relación 50:50. Una primera extracción se realizó con éter de petróleo (40-60) para separar principalmente clorofilas. Para la segunda extracción se eliminó el etanol de la mezcla en un rota-evaporador y se adiciono acetato de etilo. Finalmente, para la tercera extracción se añadió al residuo acuoso de la anterior separación n-butanol (**Figura 29**). Todas las fracciones fueron monitoreadas mediante placas TLC.

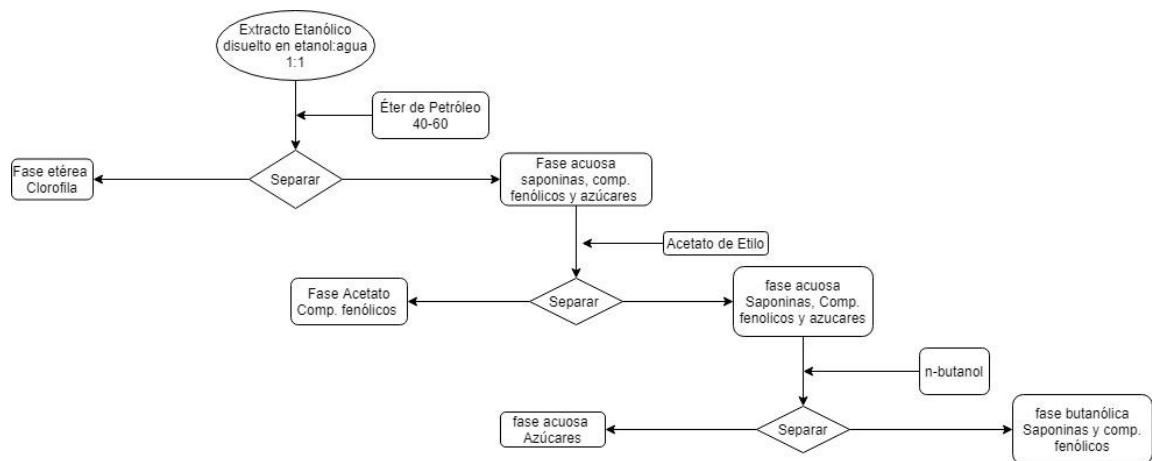


Figura 29: Esquema de tratamientos realizados al extracto etanólico de hojas. Fuente: elaboración propia.



Figura 30: Fracciones obtenidas en el proceso de separación realizado al extracto etanólico con éter de petróleo, AcOEt y n-BuOH. Fuente: Elaboración propia.

La Fase de n-butanol fue sometida a una separación por cromatografía de exclusión molecular, mediante tres columnas Sephadex LH-20, utilizando etanol como fase móvil, donde fueron sembrados 100.1, 303,3 y 302,1 mg de extracto seco respectivamente. Se recolectaron 29 fracciones de la columna que al ser monitoreadas mediante placas TLC con un sistema de eluyentes de AcOEt:EtOH:H₂O:AcOH (85:15:5:5) (**Figura 32**) dieron dos fracciones: F1 (5-9, fracción rica en saponinas) 160.6mg y F2 (10-22, fracción rica en compuestos fenólicos) 34.5 mg (**Figura 31**).

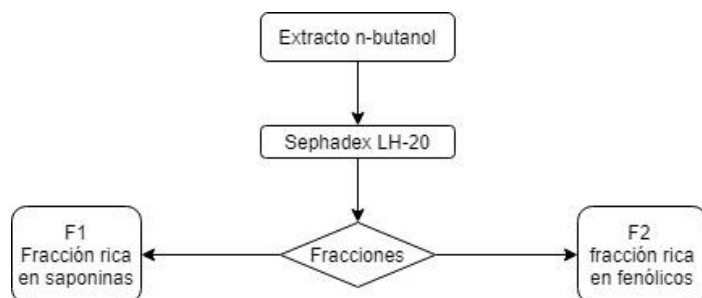


Figura 31: Fraccionamiento de la fase n-butanolico mediante Sephadex LH-20. Fuente: Elaboración propia

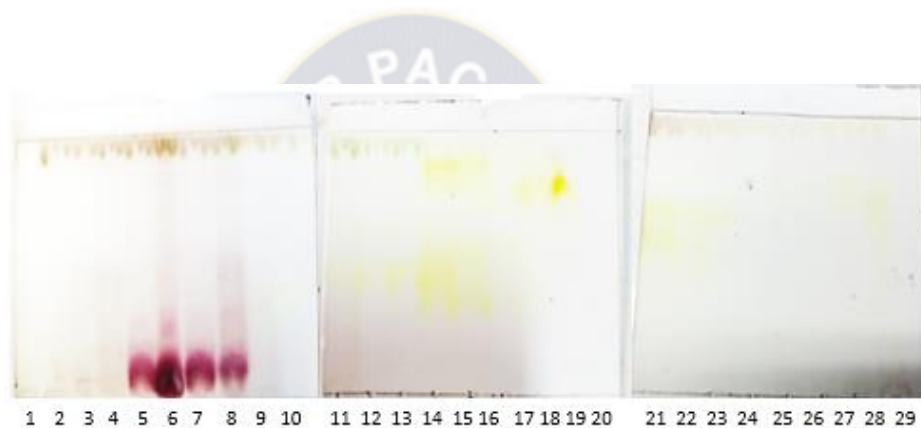


Figura 32: Placas TLC de control a fracciones obtenidas por Sephadex LH-20 del extracto n-butanolico. Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, la Fase de Acetato de Etilo fue también sometida a un fraccionamiento para la obtención de una fracción rica en compuestos fenólicos. Así, se realizó un fraccionamiento mediante columna con sílica gel donde fueron sembrados 304,3 mg de la fase de acetato de etilo empleando AcOEt y AcOEt: MeOH hasta un 3% de MeOH como fase móvil (**Figura 33**), colectándose 31 tubos que al ser monitoreados mediante placas TLC con un sistema de eluyentes AcOEt:EtOH:H₂O:AcOH (90:10:2:3) dio las fracciones F3 (fenólicos) y F4 (clorofila) (**Figura 34**)

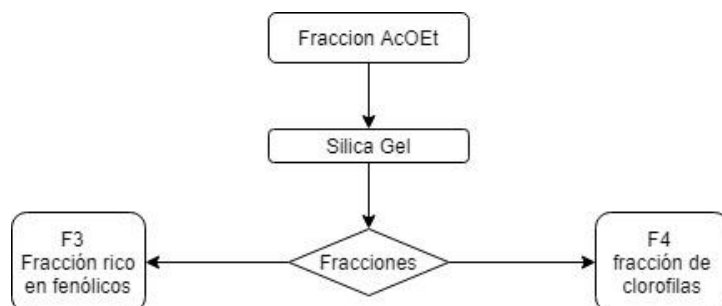


Figura 33: Esquema de fraccionamiento de la fase de AcOEt obtenido a partir del Extracto Etanólico de Hojas. Fuente elaboración propia



Figura 34: Placas TLC de fracción rica en compuestos fenólicos F3 y fracción rica en clorofila F4. **Fuente:** Elaboración propia.

3.5.2. Cuantificación de saponinas mayoritarias por HPLC

Para la cuantificación de saponinas mayoritarias se emplearon las técnicas cromatográficas de HPLC preparativa y analítica. Se trabajó con la fracción rica en saponinas (F1), obtenida como se detalla en el apartado 3.5.2, desarrollando inicialmente un método para la separación de saponinas en el HPLC analítico, basado en uno previamente establecido en el Laboratorio de Bioorgánica del IIQ para saponinas de quinua. El método HPLC utilizado tiene las siguientes características:

Tabla 10: Parámetros utilizados en el HPLC analítico.

Inyección de muestra	25 µL
Tiempo de corrida	45 min.
Columna	
Tipo	C18
Diámetro	4.6 mm
Longitud	250 mm
Tamaño de partícula	5 µm
Elución	
Mezcla	Acetonitrilo:Agua (67:33)
Tipo de elución	Isocrático
Presión	83 bar

Fuente: Elaboración propia.

Con el método desarrollado en el HPLC analítico, se trabajó en el HPLC preparativo para la obtención de saponinas separadas. Así, se obtuvo una fracción más pura (4.6 mg) compuesta por dos saponinas mayoritarias, con una pureza del 97%, con la que después se realizó la construcción de una curva de calibración, en el HPLC analítico, que nos brindaría una concentración aproximada de las dos saponinas mayoritarias dentro de extractos y fracciones obtenidas de hojas de Colomero en función al área que presentan los picos. Para la construcción de la curva de calibración se preparó una solución madre de 9200 ppm de la cual fueron preparadas cinco soluciones patrón de 100µL, de concentraciones 1420, 2840, 4260, 5680 y 7100 ppm. Cada una de las soluciones patrón fueron inyectadas por triplicado y se calculó el área de los picos (**Figura 35**), obteniendo una curva de calibración con un valor de $R^2=0.9905$ (**Figura 36**)

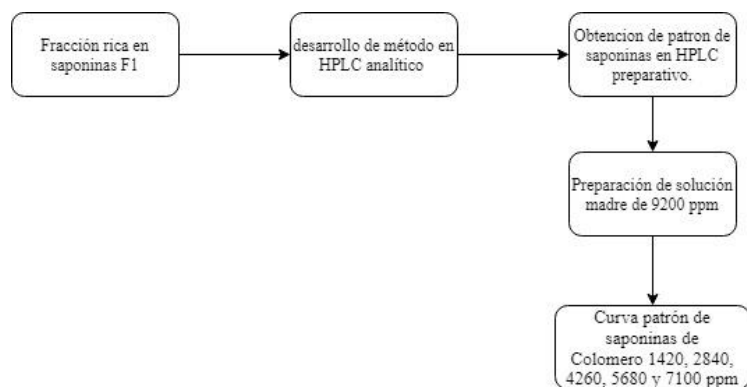


Figura 35: Proceso experimental realizado para la obtención de patrón de saponinas de Colomero y construcción de curva patrón. **Fuente:** Elaboración propia.

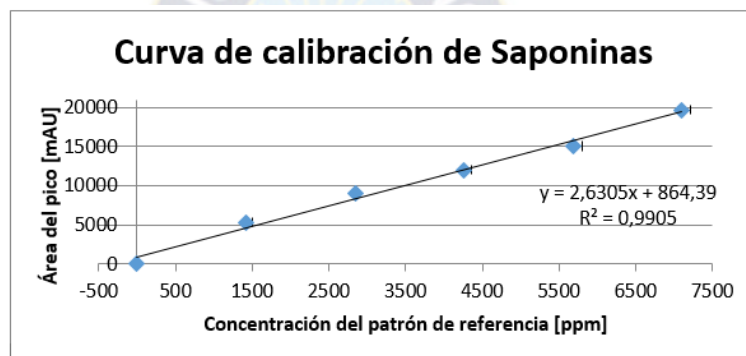


Figura 36: Curva de calibración obtenida para la cuantificación de saponinas por HPLC. **Fuente:** Elaboración propia.

La mayoría de las muestras fueron preparadas con una mezcla de acetonitrilo: agua (60:40) pasando luego por un filtrado con filtros de 35 μm de porosidad para la eliminación de partículas, sólo en el caso de los extractos crudos hidroalcohólico y acuoso se pasó antes por una columna Sephadex LH-20 para la eliminación de taninos. Las muestras fueron inyectadas por duplicado con un tiempo de corrida de 20 min para finalmente medir el área de los picos.

3.5.4. Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó en los extractos crudos de AcOEt, EtOH y EtOH:H₂O, en las fases de ButOH y AcOEt obtenidas del extracto EtOH de hojas y en las fracciones ricas en fenólicos (F2 y F3), es decir en todos los extractos y fracciones donde anteriormente se determinó posibles flavonoides por TLC. Para la

cuantificación se utilizó el método por quelación con AlCl_3 descrito por (Mammen, 2012), realizando una curva de calibración empleando soluciones etanólicas de Quercetina como estándar. Así, se preparó una solución madre de Quercetina a 500 ppm a partir de la cual se obtuvieron por dilución 8 soluciones de distintas concentraciones (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 ppm).

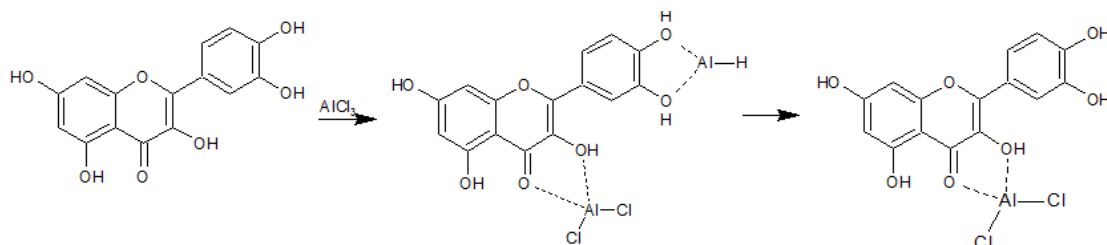


Figura 37: Reacción de quelación de flavonoides con cloruro de Aluminio. **Fuente:** Mammen, 2012

Para la reacción de quelación de la Quercetina en un tubo de ensayo fueron introducidos 30 μL de la solución estándar (Quercetina), 1970 μL de etanol destilado, 100 μL de AlCl_3 al 10%, 100 μL de AcOK 1M y 2800 μL de agua destilada **Figura 38**.

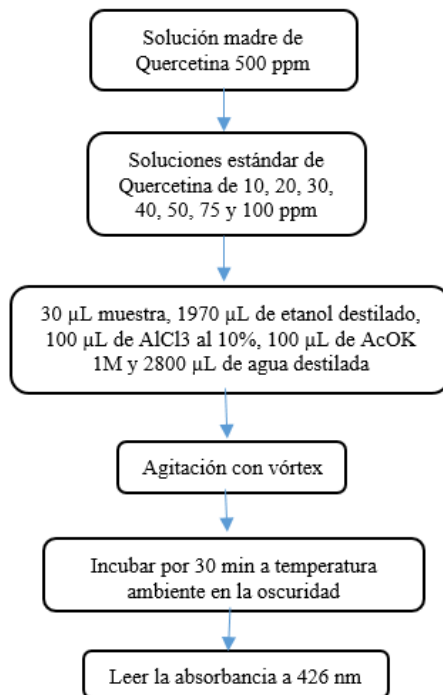


Figura 38: Esquema para la obtención de la curva de calibración con Quercetina. **Fuente:** Elaboración propia

La mezcla rápidamente se llevó a agitación mediante un vórtex y se dejó en reposo por un intervalo de 30 minutos, posteriormente se midió las absorbancias a una longitud de onda fija de 426nm en celdas de 10 mm de distancia. Obteniendo así una curva de calibración con un valor de $R^2=0.9978$ **Figura 39**

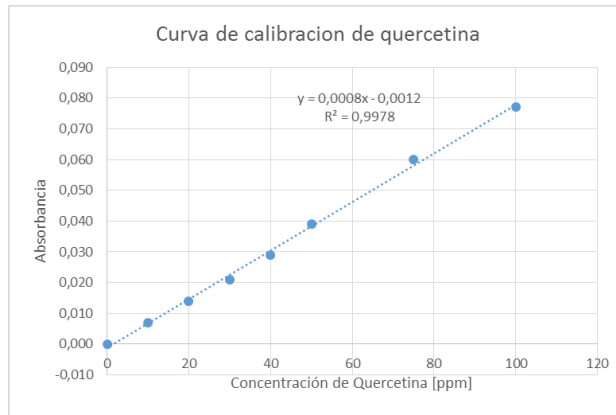


Figura 39: Curva de calibración de Quercetina para la cuantificación de flavonoides totales. **Fuente:** Elaboración propia

Los extractos (AcOEt, EtOH, HA EtOH:H₂O) y las fases de ButOH y AcOEt fueron preparadas a una concentración de 1000 ppm, mientras que las fracciones ricas en compuestos fenólicos fueron preparadas a una concentración de 500 ppm. Todas las muestras fueron preparadas en etanol destilado a un volumen de 25ml. La quelación de las muestras se realizó mediante el mismo método descrito en la **Figura 40**



Figura 40: Extractos y fracciones preparadas para la determinación de flavonoides totales. **Fuente:** Elaboración propia.

3.5.5. Cuantificación de fenoles totales por Folin- Ciocalteu

Para la determinación de fenoles totales se siguió el procedimiento reportado por Ikumawoyi *et al*, 2017 (**Figura 41**), para ello se realizó la construcción de una curva de calibración empleando ácido gálico de 98% de pureza, como estándar, dentro un medio básico regulado con carbonato de sodio al 7.5% p/v y con el reactivo Folin-Ciocalteu (F-C).

Para la construcción de la curva de calibración se preparó una solución madre de ácido gálico a una concentración de 1000 ppm, de la cual fueron preparadas 9 soluciones patrón de 5-80 ppm de concentración. En un tubo de ensayo se añadió 0.5 mL de la solución estándar, 2,5 mL del reactivo F-C y 2 ml de solución de carbonato de sodio. Las muestras fueron encubadas por 30 min en una estufa a 40°C, pasado el tiempo de incubación las muestras fueron medidas por triplicado una longitud de onda de 765nm (**Figuras 41**), obteniendo así una curva de calibración de buena linealidad con un valor de $R^2=0.9998$ (**Figura 42**)

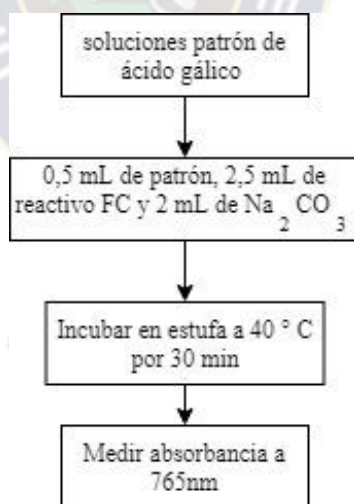


Figura 41: Esquema de preparación de muestras patrón para la determinación de fenoles totales. **Fuente:** Elaboración propia.

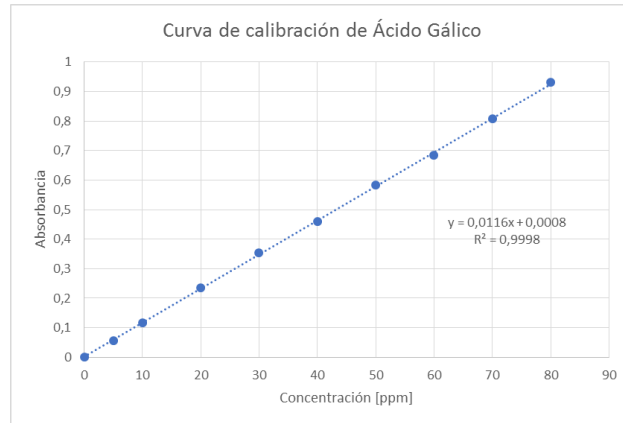


Figura 42: Muestras patrón de ácido gálico después de la incubación. **Fuente:** Elaboración propia.

Los mismos extractos crudos y fracciones utilizados en la cuantificación de flavonoides totales fueron utilizados para la cuantificación de Fenoles Totales por esta técnica. Estos fueron preparados a una concentración de 2000 ppm (**Figura 43**), y posteriormente preparados e incubados en las mismas condiciones que las muestras patrón de ácido gálico (**Figura 44**).



Figura 43: Muestras de extractos crudos y fracciones obtenidas de hojas de *C. domestica*. **Fuente:** Elaboración propia.



Figura 44: Muestras preparadas para la medición a 765nm. **Fuente:** Elaboración propia

3.5.6. Determinación de la actividad antioxidante mediante la técnica ABTS

La determinación de la actividad antioxidante se realizó mediante la técnica de ABTS con un método basado en el descrito por Demoliner *et al* (2018), para ello se preparó 10 ml de una solución acuosa 7 mM de ABTS que posteriormente fue mezclada con 10 ml de una solución de persulfato de potasio 2.45 mM, la mezcla se agito en un vortex y se dejó reposar por 12 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Como una etapa final de la preparación del reactivo de ABTS se diluyo la mezcla con etanol hasta que al medir su absorbancia a 734 nm de un valor igual a 0.700.

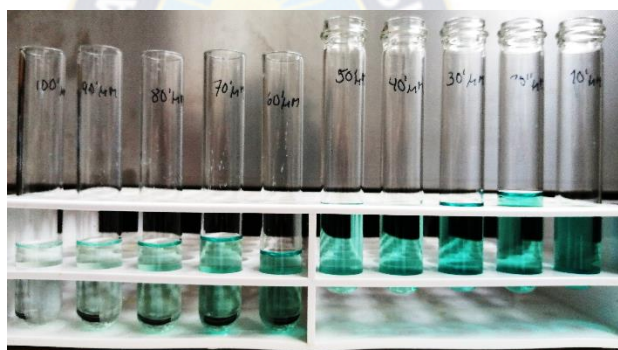


Figura 45: Muestras estándar de Trolox para la construcción de la curva de calibración. **Fuente:** Elaboración propia.

Para la determinación se empleó como estándar Trolox, con el cual se realizó una curva de calibración con soluciones de concentraciones entre 10 y 100 μM , posteriormente las muestras estándar fueron preparadas tomando 20 μL del estándar, 813 μL de etanol destilado y 4167 μL de reactivo $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (**Figura 46**), obteniendo así una curva de calibración de alta linealidad $R^2=0.9994$ (**Figura 47**). Se siguió el mismo procedimiento para las muestras de extractos y fracciones, utilizando nuevamente las mismas muestras utilizadas para la determinación de flavonoides totales.

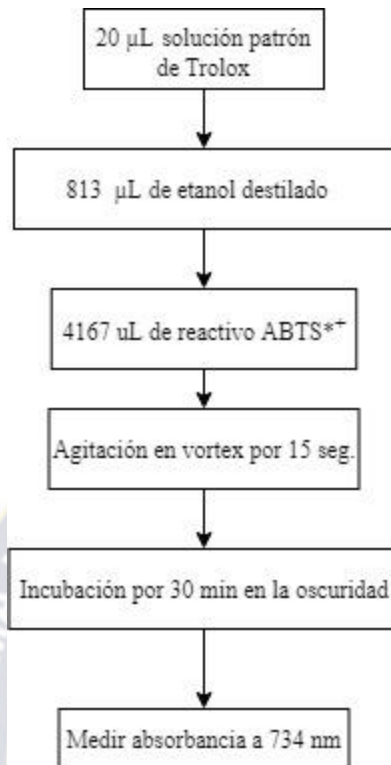


Figura 46: Esquema de preparación de muestras para la elaboración de la curva de calibración. **Fuente:** elaboración propia.

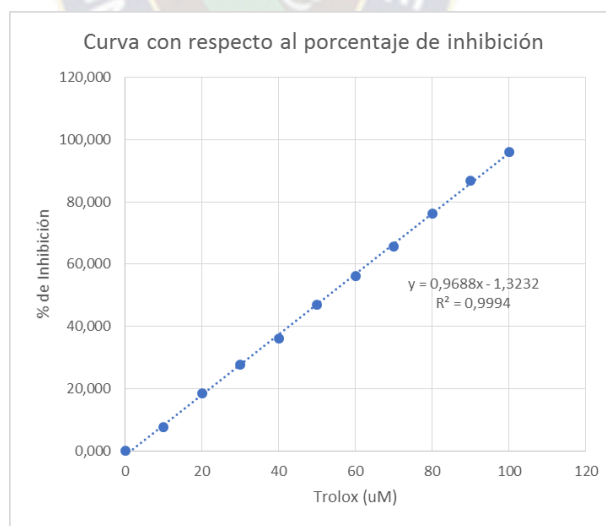


Figura 47: Curva de calibración en porcentaje de inhibición respecto al Trolox. **Fuente:** Elaboración propia.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La especie *Cariniana domestica*, es un árbol del Norte del departamento de La Paz conocido comúnmente con el nombre de “Colomero”, que según residentes del lugar posee propiedades biopesticidas y en Brasil es utilizada tradicionalmente como remedio antiinflamatorio y antifúngico. Esto motivo estudios científicos de un grupo de Brasil (Janovik *et al.*, 2012) que determinó, en extractos de corteza y hojas, la presencia de triterpenos (lupeol y β -amirina), fitoesteroles (β -sitosterol y estigmasterol) y compuestos fenólicos (Ac. caféico, Ac. clorogénico, Ac. gálico, campferol, rutina y quercetina); además de actividad antioxidante en los compuestos fenólicos.

Sabemos que los metabolitos secundarios varían de acuerdo al medio ambiente en que se desarrolla la planta, por lo que mediante este estudio quisimos determinar el tipo de metabolitos presentes en una especie colectada en Sapecho (Norte de La Paz), además de cuantificar los metabolitos mayoritarios presentes, así como determinar las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos.

Para esto, empezamos con un proceso de extracción de amplio espectro, de hojas y corteza de *C. domestica*, empleando solventes en orden creciente de polaridad (éter de petróleo, acetato de etilo, etanol, etanol: agua (50:50) y agua) de acuerdo al método de extracción descrito en la sección 3.2.

4.2.Determinación de rendimiento de extracción

Los extractos obtenidos, fueron secados y pesados, determinándose los rendimientos obtenidos para corteza y hojas (**Ver Tabla 11**). Respecto a la corteza, se obtuvieron altos rendimientos dentro de los extractos etanólico, hidroalcohólico y acuoso (4.37, 14.21 y 6.20% respectivamente) y bajos rendimientos para los extractos de éter de petróleo y acetato de etilo (0.44 y 0.26% respectivamente).

Por otro lado dentro de los extractos de hojas se obtuvieron los mayores rendimientos dentro de los extractos etanólico y hidroalcohólico, con 6.10 y 19.16% respectivamente, y bajos rendimientos para los extractos etéreo, acetato de etilo y acuoso, con 1.11, 1.32 y 2.61%, respectivamente. Lo que nos indica que dentro de la planta existen principalmente metabolitos secundarios de mediana y alta polaridad.

Tabla 11: rendimientos de extracción de corteza y hojas de Colomero (*C. domestica*).

Órgano de la planta	Fracción	Rendimiento [%]
Corteza	Etéreo	0.44%
	Acetato de etilo	0.26%
	Etanólico	4.37%
	Hidroalcohólico	14.21%
	acuoso	6.20%
Hojas	Etéreo	1.11%
	Acetato de etilo	1.32%
	Etanólico	6.10%
	Hidroalcohólico	19.16%
	acuoso	2.61%

Fuente: Elaboración propia.

4.2. Análisis fitoquímico preliminar

Luego, los extractos crudos fueron sometidos a un estudio fitoquímico preliminar, realizado según la metodología descrita en la sección 3.3, para la identificación de tipos de metabolitos secundarios presentes en cada extracto (**Tabla 11**), observándose varias diferencias en la composición de metabolitos secundarios en hojas y cortezas, como por ejemplo la presencia de triterpenos y saponinas en el extracto EtOH de hojas que no se observan en el extracto EtOH de corteza. De hecho, las saponinas se encuentran en las hojas y no en la corteza. En cuanto a los flavonoides, también se observa mayor cantidad en los extractos de hojas (AcOEt y EtOH), mientras que los fenólicos hay tanto en hojas como en corteza, sin embargo no debemos olvidar que los taninos también son fenólicos y que normalmente están presentes en la corteza, pero que no son de nuestro interés.

Por otra parte, en este estudio preliminar se ven diferencias con el estudio desarrollado en Brasil, ya que nuestro estudio fitoquímico preliminar nos permitió determinar la presencia de alcaloides, terpenos, azúcares reductores, flavonoides, compuestos fenólicos y taninos; mientras que los estudios en Brasil (Janovik *et al*, 2012) determinaron dentro la corteza triterpenos, compuestos fenólicos y saponinas.

La composición determinada dentro de los extractos de hojas, con presencia de alcaloides, triterpenos, saponinas, azúcares reductores, glucósidos cardiotónicos flavonoides, compuestos fenólicos y taninos, hace más interesante el estudio dentro de los extractos de hojas. Los resultados se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Resultados obtenidos en el estudio fitoquímico preliminar realizados a extractos de

Metabolito	Prueba	HOJAS					CORTEZA				
		Ext. Éter	Ext. AcOEt	Ext. EtOH	Extr. EtOH:H ₂ O	Ext. Ac.	Ext. éter	Ext. AcOEt	Ext. EtOH	Extr. EtOH:H ₂ O	Ext. Ac.
alcaloides	Dragendorf	++	++	+	-	-	++	+	-	-	-
	Mayer	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
triterpenos	Lieberman	+++	+++	++	+	-	+++	++	-	-	-
	Bouchard										
Saponinas	Espuma	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-
Azúcares reductores	Fehling	-	+	++	+	+		-	++	++	+
G. cardiotónicos	Kedde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Baljet	-	+++	++	+	+	-	+	+	+	+
	Keller-Killani	++	+++	+	+	+	-	+	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	++	++	+	-	-	-	+	-	-
Fenólicos	Cloruro férrico	-	+	+++*	+++*	+++*	-	-	++	+++	++
Taninos	Ac. de plomo	-	+	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++
	Gelatina	-	+	++	+++	+	-	-	++	+++	+++
Proteínas	Ninhidrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

hojas y corteza de Colomero (*C. domestica*)


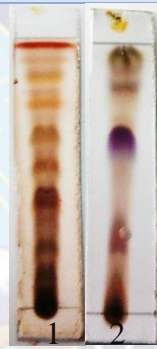


(+++)=presencia alta, (++)=presencia moderada, (+)=presencia baja, (-)=ausencia, (*)=presencia excesiva

Fuente: Elaboración propia

4.3. Perfil cromatográfico

Finalmente, para un mejor análisis de la composición cualitativa de los extractos, se analizó su perfil cromatográfico mediante placas TLC eluidas con solventes de diferente polaridad y reveladas con ácido sulfúrico, un revelador de amplio espectro. Así se observó los perfiles cromatográficos de los extractos mostrados en la **Tabla 13**:

Tabla 13: Placas TLC realizadas a extractos obtenidos de hojas y corteza.

Extracto	Placa		Fase móvil	Revelador
	Hojas	Corteza		
(1) Extracto etéreo (2) Extracto acetato			Hojas Éter de petróleo (20-40): acetato de etilo, 20:80. Corteza Éter de petróleo (20-40): acetato de etilo, 95:5.	Ácido sulfúrico al 5%.
Extractos (1) Etanólico (2) Hidroalcohólico (3) Acuoso			Acetato de etilo: etanol: agua: ácido acético, 70:30:5:5.	Ácido sulfúrico al 5%.

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en las placas TLC de extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas se observa la probable presencia de saponinas (color rosado) y compuestos fenólicos (amarillo), en baja concentración, mientras que en el extracto acuoso no se identifica la presencia de saponinas, dato que correlaciona con el análisis fitoquímico preliminar realizado a estos extractos (**Ver Tabla 11**). Por otra parte, analizando la placa realizada a los extractos etanólico, hidroalcohólico y acuoso de corteza,

se observa que no poseen la misma composición que los extractos de hojas, no determinándose la presencia de saponinas y observándose sólo una presencia de compuestos fenólicos (amarillo) y azúcares reductores (marrón). Finalmente, realizando un análisis de los extractos etéreo y de AcOEt, vemos que tanto los extractos de hojas como de corteza se ven con una interesante composición de metabolitos secundarios, particularmente se evidenció la presencia de terpenos que fueron determinados por la coloración característica que presentan al revelarse en placas TLC (rosa, café y azul) (Krebs *et al*, 1969), en especial se observa un terpeno claramente mayoritario en el extracto de AcOEt de corteza.

Por lo que, considerando el perfil cromatográfico por TLC, y el estudio fitoquímico preliminar, se decidió trabajar con el extracto de AcOEt de corteza, con el objetivo de separar el terpenoide mayoritario y con el extracto etanólico de hojas para el análisis de saponinas y compuestos fenólicos.

4.4. Aislamiento e identificación de metabolitos

4.4.1. Extracto de acetato de etilo de corteza

Para la separación del terpenoide mayoritario se seleccionó el extracto de AcOEt de corteza, del cual se realizó inicialmente una separación con una mezcla 1:1 de éter de petróleo (20-40) y acetato de etilo, la fracción soluble se concentró y se realizó una columna abierta en Silicagel G60, utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt:EP (5:95) obteniéndose en una fracción el compuesto mayoritario **1**, el cual fue sometido a cristalización y luego a análisis por espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C determinándose que se trataba de un triterpeno tipo oleanano, cuya estructura probable es un isómero del ácido arjulónico (Figura 48), gracias a la comparación de datos de RMN ^{13}C con datos bibliográficos (Lima *et al*, 2002), sin embargo todavía se observaba impurezas y por problemas en el equipo de RMN del IIQ, no se pudo realizar experimentos de RMN 2D. Por lo que la estructura todavía debe ser confirmada.

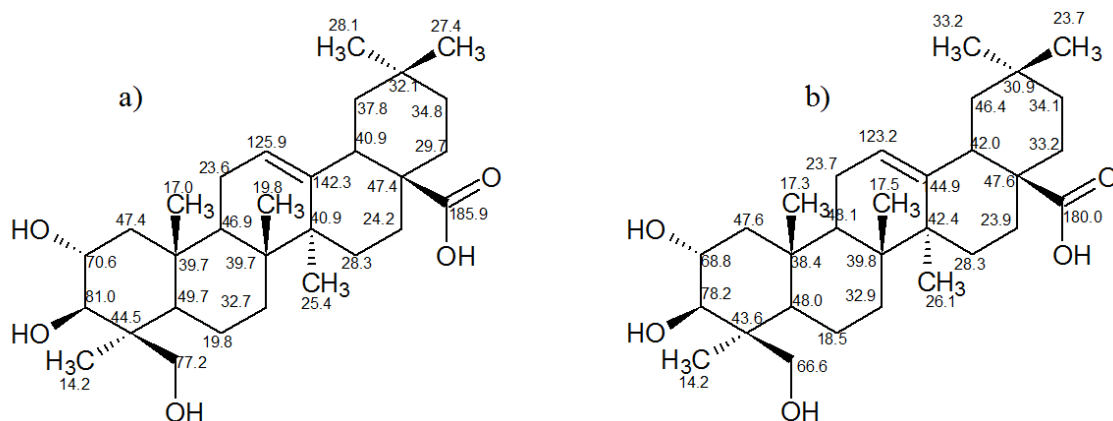


Figura 48: Comparación de datos de RMN¹³C a) Experimental **Compuesto 1** y b) Teórico Ac. Arjulónico (Lima *et al*, 2002). **Fuente:** Elaboración propia

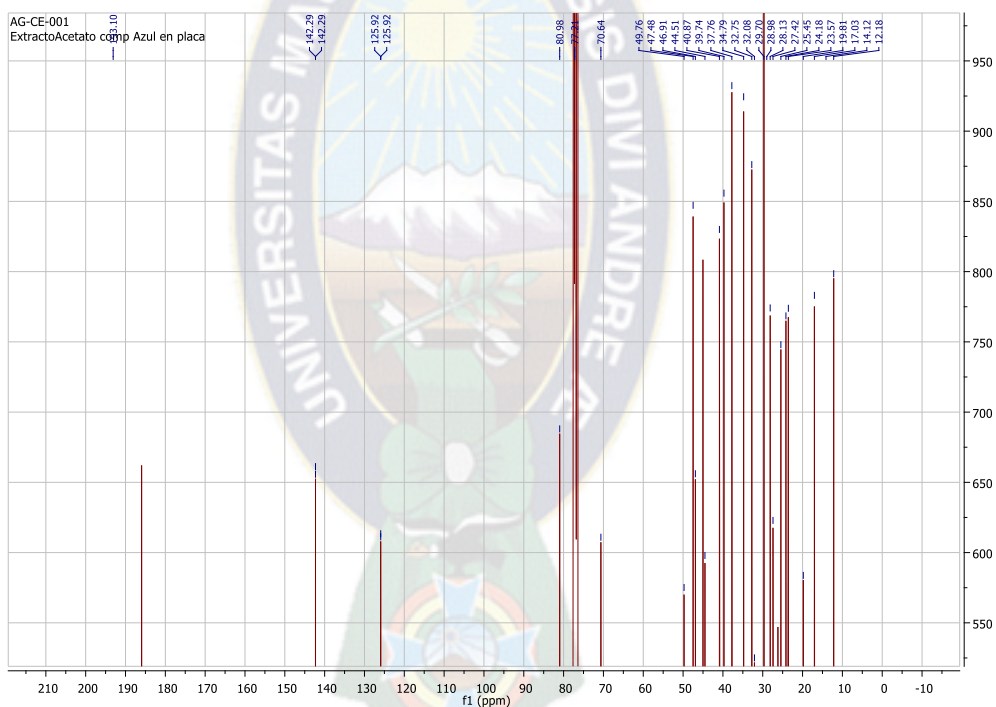


Figura 49: Espectro de carbono 13 del compuesto 1. **Fuente:** Elaboración propia.

-.

En la Figura 48 se puede observar una gran coincidencia de datos excepto en el C-24, por lo que propusimos un cambio en la estereoquímica del C-4 que afectaría los desplazamientos de C-23 y C-24. Sin embargo, como dijimos anteriormente, la estructura se debe confirmar por experimentos de RMN 2D, porque el cambio de estereoquímica también puede ser en el C-2. Pero, la presencia de este tipo de compuestos en la especie

además se encuentra respaldada porque ya fueron reportados en otras especies del género, como en *Cariniana rubra* (Lima et al, 2002).

El ácido arjunólico, dentro del campo de la farmacología, es denominado como la nueva promesa de la medicina terapéutica, debido a sus diversas actividades biológicas, que incluyen actividades: antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas, anticolinesterasas, antitumorales, antiasmáticas, de cicatrización de heridas e inhibidoras del crecimiento de insectos (Jyotirmoy & Parames C., 2013).

Este metabolito, ha sido ampliamente estudiado y se le atribuye una buena actividad antimicrobiana, actuando principalmente a nivel gastrointestinal evitando dolores estomacales y diarrea (JD et al, 2005). Además, se realizaron pruebas *in vitro* frente a distintos agentes patógenos, demostrando una alta inhibición contra: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum canis* y *Sporothrix schenckii* y baja capacidad de inhibición para el *Aspergillus fumigatus*. (Masoko et al, 2008). Por otro lado, se informó que la citotoxicidad en hepatocitos inducidos por NaF del ácido Arjulongico es comparable frente a de la vitamina C, protejiendo a los hepatocitos y previniendo su muerte necrótica (Jyotirmoy et al, 2008).

4.4.2. Separación de fracciones ricas en compuestos fenólicos y saponinas del extracto etanólico de hojas.

Para la obtención de las fracciones ricas en saponinas y compuestos fenólicos se empleó el extracto etanólico de hojas de *C. domestica*, el cual inicialmente se disolvió (6.20 g) en una mezcla de etanol: agua (1:1), para posteriormente realizar extracciones líquido-líquido con solventes en orden creciente de polaridad obteniendo cuatro fracciones. La primera extracción se realizó con éter de petróleo 40-60, para la eliminación de clorofilas que contiene el extracto, obteniendo un residuo verdoso con un rendimiento de 3.78%.

Antes de realizar la segunda extracción con acetato de etilo, se llevó la solución hidroalcohólica resultante a un rotaevaporador para la eliminación de etanol y de esta manera evitar la formación de una sola fase por la miscibilidad del etanol y acetato de etilo; así con la fase acuosa obtenida se realizó la extracción con acetato de etilo obteniendo una solución amarillenta que al ser analizada por placas TLC mostró la presencia de compuestos fenólicos y clorofila, en menor cantidad, con un rendimiento de 7.79%.

La tercera extracción de la fase acuosa resultante se realizó con n-butanol, esto con el fin de obtener una fracción rica en saponinas, ya que las saponinas son solubles en este tipo de solventes por su mediana polaridad, obteniendo una solución de color naranja, que al realizar una placa cromatográfica mostró la presencia de saponinas y compuestos fenólicos, con un rendimiento de 28.07%. Finalmente, la fase acuosa final se analizó mediante placas TLC mostrando la presencia de azúcares de una coloración marrón, por lo que no fue tomada en cuenta.

Para la obtención de una fracción rica en saponinas, libre de compuestos fenólicos, se realizó una columna cromatográfica de exclusión molecular (Sephadex LH-20) al extracto butanólico, con etanol como fase móvil, obteniendo así una fracción rica en saponinas (F1) y otra fracción rica en compuestos fenólicos (F2).

Por otra parte, la fracción de acetato de etilo correspondiente a la segunda extracción, que mostró la presencia de compuestos fenólicos y clorofila, fue sometida a una cromatografía en columna abierta de Sílica gel G60, con un sistema de elución AcOEt: MeOH 95:5, donde se obtuvo dos fracciones, una fracción rica en compuestos fenólicos (F3) y otra fracción rica en clorofilas que no se tomó en cuenta para posteriores estudios.

4.5. Cuantificación de Saponinas mayoritarias

El desarrollo de la metodología para el análisis de saponinas por el método de HPLC analítico, fue basado inicialmente en métodos ya desarrollados anteriormente para saponinas de quinua por el laboratorio de Bio-orgánica del IIQ, parámetros que después fueron modificados como se indica en el apartado 3.5.3 en función a las saponinas de Co-

lomero (*C. domestica*) (**Figura 50**). Con el método desarrollado, se obtuvo una fracción más pura de saponina (pureza del 97%) que fue utilizada como referencia (**Figura 51**) para la construcción de una curva de calibración ($y=2,6305+864.39x$; $R^2=0.9904$) para la cuantificación aproximada de saponinas mayoritarias dentro extractos crudos EtOH, EtOH; H₂O y fracciones ricas en saponinas F. BuOH y F1.

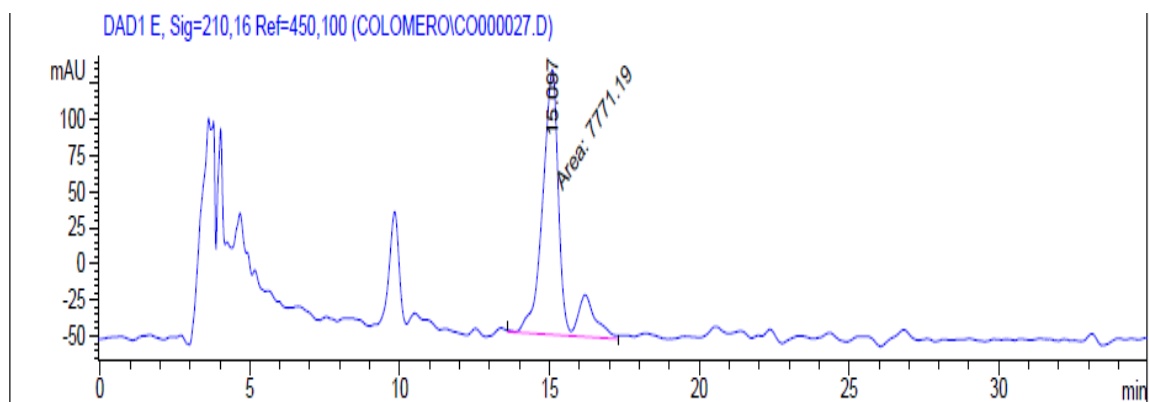


Figura 50: Cromatograma HPLC de la Fracción rica en saponinas. **Fuente:** Elaboración propia.

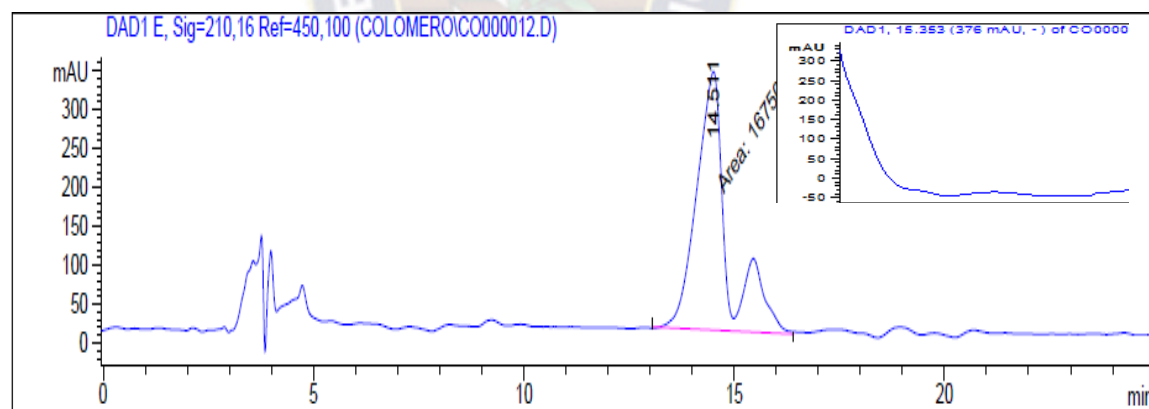


Figura 51: Cromatograma de la fracción de saponinas obtenida por la técnica de HPLC preparativo, utilizada posteriormente como referencia. **Fuente:** Elaboración propia.

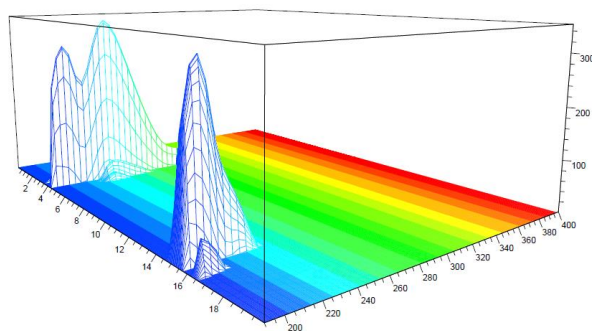


Figura 52: Proyección de Cromatograma de la fracción de saponinas de referencia en 3D. **Fuente:** Elaboración propia.

Posteriormente, se prepararon las muestras de extractos crudos y fracciones donde se vio por TLC la presencia de saponinas. Para la preparación de extractos crudos, en primer lugar se realizó un tratamiento para la eliminación de taninos mediante cromatografía de exclusión molecular Sephadex LH-20, la fracción obtenida de este tratamiento fue concentrada, pesada y disuelta nuevamente en una mezcla de agua: acetonitrilo 40:60 para finalmente pasar la solución por filtros de 35 μ m de malla para la eliminación de partículas que podrían dañar a la columna del equipo. Por otra parte, las fracciones ricas en saponinas no requirieron la eliminación de taninos y fueron preparadas directamente en la mezcla de agua: acetonitrilo y filtradas.

Tabla 14: Concentración aproximada de saponinas en extractos y fracciones.

extracto	Conc. [mg/g ES]
Etanólico	7,06 \pm 0.08
Butanólico	120,94 \pm 0.37
F. rica en saponinas	477,70 \pm 5.26
Hidroalcohólico	6,55 \pm 0.21

Fuente: Elaboracion propia

Así, con la ecuación de la curva de calibración, se determinó la concentración aproximada de saponinas mayoritarias, expresada en mg de saponinas/g de extracto seco (**Tabla 14**), determinando dentro del extracto crudo etanólico 7.06 \pm 0.008 mg/g ES y en el extracto hidroalcohólico de hojas 6.55 \pm 0.21 mg/gr ES. En la fracción butanólica, obtenida del fraccionamiento realizado al extracto etanólico, se determinó 120.94 \pm 0.37 mg/g ES y

dentro la fracción rica de saponinas (F2), obtenidas mediante cromatografía con Sephadex LH-20, se determinó 477.70 ± 5.26 mg/g ES **Figura 53**.

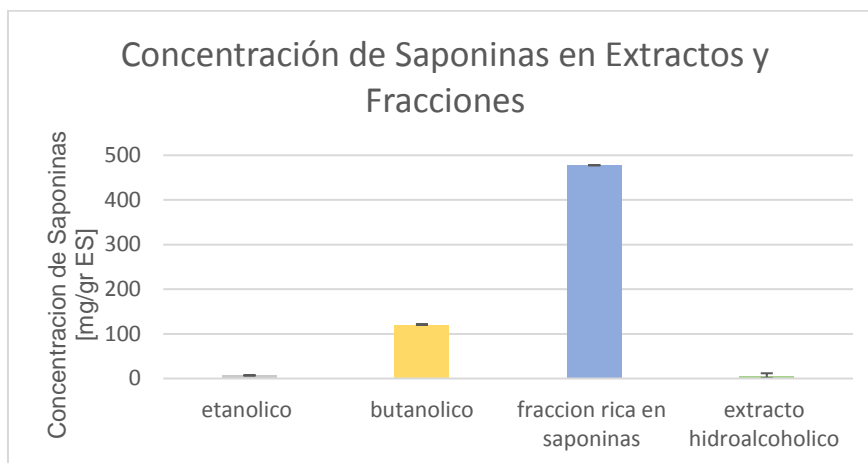


Figura 53: Concentración aproximada de saponinas mayoritarias en extractos y fracciones en mg de saponinas/g de extracto seco. **Fuente:** elaboración propia.

Finalmente, dentro el extracto acuoso no se llegó a determinar la presencia de estas saponinas, dato que correlaciona con placas TLC realizadas a extractos y pruebas fitoquímicas preliminares. Este resultado que indica que las saponinas son de mediana polaridad siendo mayormente solubles en etanol y mezclas hidroalcoholicas, lo que nos llevaría a pensar que se trata de saponinas con pocos azúcares, probablemente monodesmosídicas como las reportadas dentro la especie *Cariniana rubra* (Lima *et al*, 2002).

4.7. Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides totales, se realizó la construcción de la curva de calibración, descrita en la **sección 3.5.4**, utilizando Quercetina como patrón, para esto se prepararon soluciones de quercetina a 7 concentraciones, de las cuales se determinó la absorbancia por triplicado. A este conjunto de datos se realizó un análisis estadístico para la exclusión de datos empleando la prueba de Grubbs y el criterio de Chauvenet al 95% de confianza.

De esta manera se obtuvo la curva patrón de Quercetina ($y = 0,008x - 0,0012$) con un R^2 de 0.9978 **Ver anexo 5**

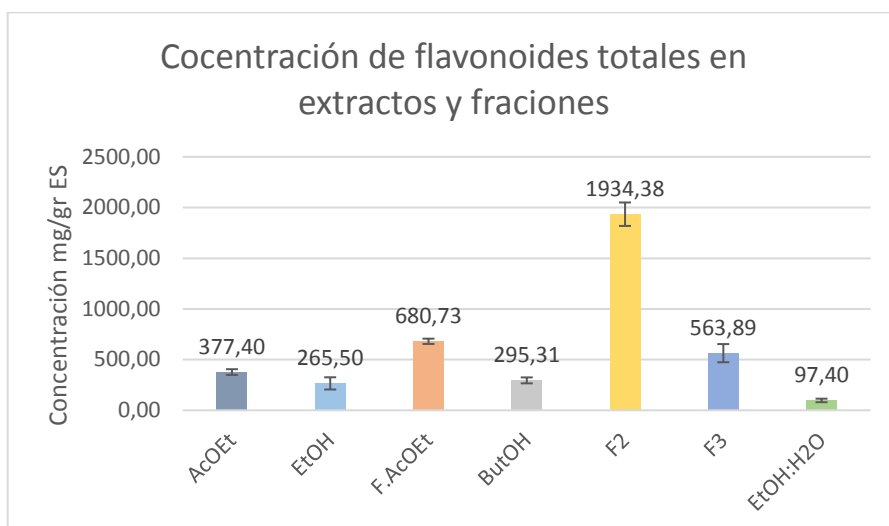


Figura 54: Concentración de flavonoides totales en [mg/g extracto seco] presentes en extractos y fracciones de hojas de Colomero. **Fuente** Elaboración propia

En función a la curva de calibración obtenida se logró determinar los miligramos de flavonoides presentes por gramo de extracto seco (**Figura 54**). Así, los resultados obtenidos nos indican el extracto de acetato de etilo (2.717 ± 0.203 mg/g ES) muestra mayor contenido de flavonoides totales que el extracto etanólico (2.005 ± 0.494 mg/gr ES) y el extracto hidroalcohólico (0.737 ± 0.158 mg/gr ES) (**Tabla 15**).

Tabla 15: Contenido de flavonoides totales en extractos crudos y fracciones obtenidas.

Extracto	Cons. [mg/g ES]
AcOEt	377,40±28.25
EtOH	265,50±60.3
F.AcOEt	680,73±25.97
ButOH	295,31±29.33
F2	1934,38±115.59
F3	563,89±89.63
EtOH: H2O	97,40±17.39

Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, también se observa que el proceso para obtener una fracción rica en flavonoides fue correcto, ya que al realizar la extracción líquido-líquido al extracto etanólico con AcOEt se obtuvo una fracción con mayor concentración de flavonoides, fracción de acetato de etilo (F. AcOEt) con una concentración de 4.937 ± 0.205 mg/g ES. Por otra parte en la fracción de n-butanol se obtuvo una concentración de flavonoides totales de 2.170 ± 0.237 mg/g ES y en la F2 (rica en compuestos fenólicos), derivada de la fracción de n-BuOH, se obtuvo la mayor concentración de flavonoides totales.

Analizando las concentraciones obtenidas de extractos crudos y fracciones se observa una afinidad de los flavonoides con los solventes de menor polaridad como el acetato de etilo, este tipo de comportamiento ya ha sido estudiado y reportado por Turkmen *et al*, 2006.

4.8. Cuantificación de Fenoles Totales (F-C)

Para la determinación de fenoles totales se empleó la técnica de Folin-Ciocalteu, lográndose cuantificar la concentración de estos en Eq. mg ácido gálico/g ES, en extractos y fracciones donde se observó fenoles por cromatografía TLC.

Tabla 16: Fenoles totales en extractos y fracciones de Colomero (*C. domestica*).

Fenoles totales	
Muestra	EAG (mg/g de extracto)
AcOEt	$33,642 \pm 0.373$
EtOH	$290,922 \pm 0.452$
H ₂ O:EtOH	$381,048 \pm 0.452$
F ButOH	$244,998 \pm 0.412$
F AcOEt	$373,032 \pm 0.249$
F2	$302,773 \pm 0.249$

Fuente: Elaboración propia

Así pues en la **Tabla 16** se observa que el contenido de fenoles totales dentro los extractos crudos va en orden decreciente H₂O:EtOH>EtOH>AcOEt con valores de

381.048±0.452, 290.922±0.452 y 33.642±0.373 mg/g ES, respectivamente. Por otro lado, la fracción de AcOEt, obtenida partiendo del extracto etanólico de hojas, exhibió una mayor concentración de fenoles totales (373.032±0.249 Eq mg AG/g ES) comparada con la fracción purificada (F2) y la fracción butanólica (302.773±0.249 y 244.998±0.412 mg/gr ES, respectivamente) (**Figura 55**).

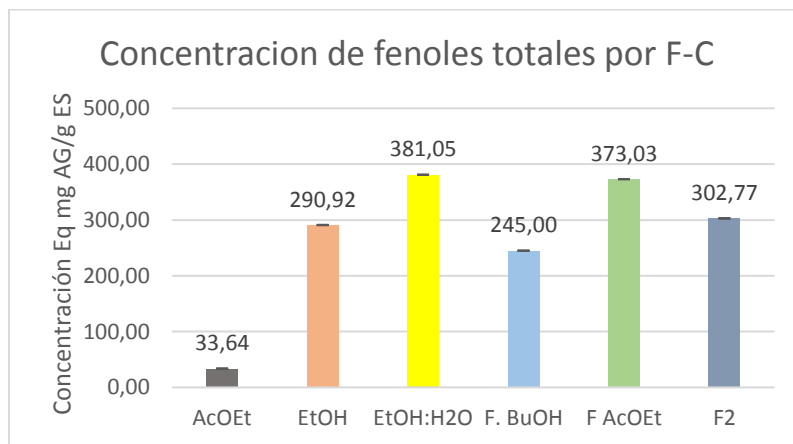


Figura 55: Concentración de fenoles totales en extractos crudos y fracciones de hojas de Colomero. **Fuente:** Elaboración propia.

El contenido de fenoles totales obtenido dentro del extracto hidroalcohólico es mayor al reportado por Janovik *et al*, 2009 (268±3.266 mg/g ES), sin embargo estos valores no son comparables ya que el tratamiento para la obtención de extractos realizado a la muestra de hojas seca no fue igual. Por otra parte, si analizamos estos datos con los de flavonoides podemos decir que una buena parte de los fenólicos determinados en el extracto EtOH son flavonoides, lo mismo que en la fracción de AcOEt; mientras que los fenoles determinados en el extracto hidroalcohólico claramente no son flavonoides.

4.9. Determinación de la actividad antioxidante

Aplicando el método $ABTS^{+}$ se determinó la capacidad antioxidante de las soluciones de extractos crudos (AcOEt, EtOH y EtOH:H₂O) y fracciones (AcOEt, BuOH y F2) preparadas también para la cuantificación de fenoles totales, observándose una correlación directa entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC)

Tabla 17: Resultados obtenidos de la capacidad antioxidante equivalente al trolox.

Muestra	Masa de muestra en mg	ET ($\mu\text{M/g}$ de extracto)
AcOEt	1	37,219 \pm 0.209
EtOH	1,1	339,051 \pm 0.272
EtOH:H ₂ O	1,1	516,338 \pm 0.395
F. BuOH	1	264,975 \pm 0.299
F. AcOEt	1	475,175 \pm 0.194
F2	1	367,109 \pm 0.352

Fuente: Elaboración propia

Así, dentro los extractos crudos, se observó un comportamiento similar al observado en la determinación de fenoles totales (**Tabla 17**), estableciendo una menor actividad para los extractos de menor polaridad, siendo el extracto de acetato de etilo (37.22 \pm 0.21 $\mu\text{M/g}$ de extracto) el que presentó menor actividad, una actividad media se observó dentro extracto etanólico (339.05 \pm 0.27 $\mu\text{M/g}$ de extracto) y una alta actividad para el extracto hidroalcohólico (516.34 \pm 0.39 $\mu\text{M/g}$ de extracto). Igualmente, entre las fracciones la que presentó mayor actividad inhibitoria de radicales libres ABTS⁺ fue la fracción de AcOEt.

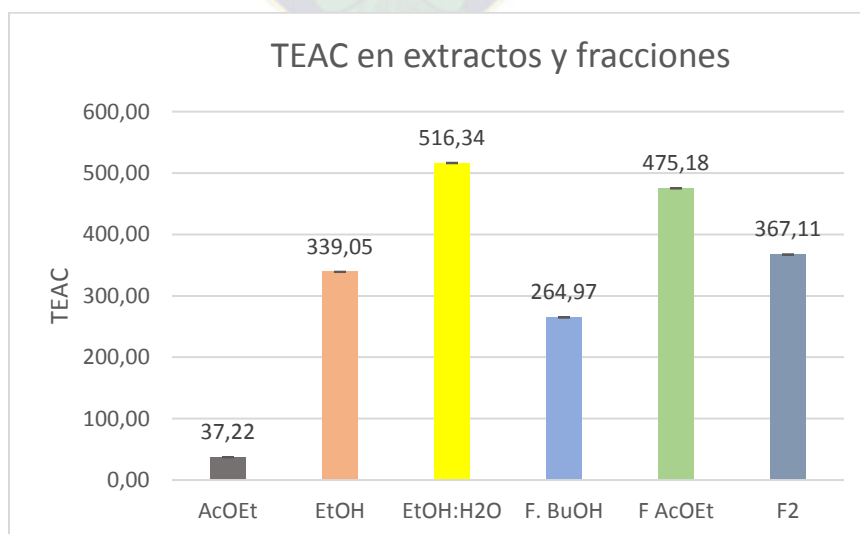


Figura 56: Resultados de la actividad antioxidante ABTS en extractos crudos y fracciones de hojas de colomero. **Fuente:** Elaboración propia.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES

- Se obtuvo extractos de un amplio gradiente de polaridad de corteza y hojas de *Cariniana domestica*, determinándose altos rendimientos en los extractos etanólico, hidroalcohólico y acuoso de ambas partes de la planta, con un rendimiento de 4.37, 14.21 y 5.20%, respectivamente, para la corteza y 6.31, 19.11 y 2.61%, respectivamente, para las hojas.
- Se realizó una determinación cualitativa de familias de metabolitos secundarios presentes en extractos obtenidos a partir de corteza y hojas, mediante un estudio fitoquímico preliminar, determinándose en la corteza la presencia minoritaria de alcaloides, azúcares reductores, saponinas, triterpenos, flavonoides y glucósidos cardiotónicos, además de la presencia mayoritaria de compuestos fenólicos y taninos. Mientras que en los extractos de hojas, se determinó la presencia mayoritaria de compuestos fenólicos, saponinas, triterpenos, alcaloides y glucósidos cardiotónicos.
- Se analizó el perfil cromatográfico de los extractos mediante placas TLC en conjunto con los resultados del estudio fitoquímico preliminar determinándose en los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas la presencia de saponinas (color rosado) y compuestos fenólicos (amarillo), considerando la menor complejidad del extracto de etanólico, este fue seleccionado para la obtención de fracciones ricas en saponinas y fenólicos.
- Por otra parte, el extracto de AcOEt de corteza mostró en su cromatografía TLC la presencia clara de un terpenoide mayoritario, por lo que fue sometido a sucesivas separaciones, lográndose aislar el **compuesto 1**, que fue analizado por espectroscopía de RMN 1D estableciéndose la estructura, por comparación con datos bibliográficos RMN¹³C, del Ácido Arjulónico, la cual debe ser confirmada

posteriormente mediante espectros bi-dimensionales (COSY, HSQC y HMBC), además de espectros DEPT.

- Empleando la técnica de cromatografía HPLC se determinó la concentración aproximada de saponinas mayoritarias dentro de extractos crudos, expresada en mg de saponinas por g de Extracto Seco (ES): EtOH 7.06 ± 0.08 mg/g ES, H₂O:EtOH 6.55 ± 0.21 mg/g ES, fracción rica en saponinas 477.7 ± 5.26 mg/g ES y fracción ButOH 120.94 ± 0.37 mg/g ES. Observándose claramente que con el proceso realizado si se logró obtener una fracción rica en saponinas. Sin embargo se recomienda realizar la cuantificación de saponinas en base a un compuesto identificado de referencia (patrón), para la obtención de un valor de concentración de mayor exactitud.
- La cuantificación de flavonoides totales, se realizó por un método UV-Vis, obteniendo resultados expresados como mg de quercetina/g de ES. Así, se determinó una alta concentración de flavonoides dentro el extracto de acetato de etilo (2.717 ± 0.203 mg/g ES), seguida por el extracto etanólico (2.005 ± 0.494 mg/g ES) y por último el extracto hidroalcohólico (0.737 ± 0.158 mg/g ES). Además, se determinó una buena concentración de flavonoides totales en la fase de acetato de etilo obtenida del Ex. Etanólico de hojas (4.937 ± 0.205 mg/gr ES) y dentro la fase de n-butanol también obtenida a partir del Ex EtOH (2.170 ± 0.237 mg/gr ES), así como en las fracciones obtenidas de la fase n-BuOH, F2 y F3, determinándose claramente que la fracción F2 es la más rica en flavonoides, de acuerdo con lo esperado durante el fraccionamiento. Es recomendable realizar la identificación de los flavonoides presentes dentro de extractos y fracciones ricas en estos metabolitos.
- Se determinó el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de extractos crudos y fracciones de hojas de Colomero donde previamente se determinaron fenólicos por TLC. El método utilizado para la determinación de fenólicos fue el de Folin-Ciocalteu y el de actividad antioxidante fue el inhibición de radi-

cales libres ABTS. En ambas determinaciones hubo una correlación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante, obteniendo altos porcentajes de inhibición dentro los extractos hidroalcohólico, fase de AcOEt y fracción rica en compuestos fenólicos (F2). Es recomendable complementar el estudio de la actividad antioxidante mediante otras pruebas como el DPPH, además de la identificación de los compuestos fenólicos que participan en dicha actividad.



BIBLIOGRAFÍA

- Acero M, N., & Mingarro M., D. M. (2016). Principios activos de las drogas vegetales. Metabolitos secundarios. Propiedades. In Manual de Fitoterapia *Libro ISBN: 978-84-9022-829-6* (Segunda Ed, pp. 68–70). Editorial ELSIEVER.
- Alconchel G., F., Santamaría, A., & Túnez, I. (2014). Efecto antioxidante del ácido oleico e hidroxitirosol en un modelo experimental similar a la enfermedad de Huntington. *Actualidad Médica*, 99(792), 60–64.
- Almanza, G.R., & Salcedo, L. (2012) “De la Planta al Medicamento; Parte I Investigaciones de *Baccharis latifolia* (Chilca)” Libro-ISBN: 978-3-8473-6519-8, Editorial Académica Española, Saarbrücken, 1-293
- Avalos G., A., & Perez U., DE. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología): *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3).
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494(2), 161-172.
- Bonola G., I. F., Irigoyen C., M. E., Vera R., L. I., Campero C., A., & Hamdan P., A. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Revista de Ciencias Clínicas*, 15(1), 2-8.
- Brum M., G., Camponogara, C., Piana, M., Silva, C. R., & Marchesan O., S. (2019). *Cariniana domestica* fruit peels present topical anti-inflammatory efficacy in a mouse model of skin inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(5), 513-528.
- Bruneton, J. (1993). Farmacognosia: Fitoquímica, plantas medicinales. Libro ISBN: 978-84-200-0956-8 (Segunda ed). Acribia S.A.
- Cai, L. (2014). Thin Layer Chromatography. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, *Division of Mathematics and Science, University of South Carolina Salkehatchie, Waltherboro*. 1, 6.3.1-6.3.18.
- Calle, A., Yupanqui, J., Flores, Y., & Almanza, G. (2012). FLAVONOIDES DE *Baccharis boliviensis*. *Revista Boliviana de Química*, 29(2), 155-160.

- Callisaya, J. C., & Alvarado K., J. A. (2016). TOTAL PHENOL CONTENTS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF *Bertholletia excelsa*, AMAZONIAN ALMONDS FROM BOLIVIA. *Revista Boliviana de Química*, 33(1), 34-42.
- Capasso, F. (2011). *Farmacognosia: Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali*. Libro ISBN 978-88-470-1651-4.
- Carvajal C., C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medica Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
- Castaños, E. (3 de agosto de 2015). Introducción a las Técnicas Cromatográficas. Obtenido de CIENCIAONTHCREST: http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema6.pdf
- Cavalcante, R. (2019). Indicacoes de plantas medicinais na odontologia: Jequitiba. En R. Cavalcante, *As plantas na odontologia: um guia práctico* (págs. 363-366). Rio Branco: Ac: [s.n.].
- Claure, C. (2005). Métodos Cromatográficos. En C. Claire, *Análisis Cuantitativo* (Primera ed., págs. 275-291). La Paz.
- Coy Barrera, C. A., Parra, J., & Cuca Suarez, L. E. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Elementos*, 4(0), 31-39.
- Cuesta R., O., Márquez H., I., & Campos F., M. (2015). Espectroscopia UV-Vis. En O. Cuesta Rubio, I. Márquez H., & M. Campos F., *Introducción a la caracterización estructural de flavonoides* (págs. 23-36). Machala, Ecuador: UTMACH.
- D, D., E. Abou, M., R., T., A. L., T., H., B., & D., L. (2005). Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *Journal of ETHNO-PHARMACOLOGY*, 101, 283-286.
- Demoliner, F., de Brito P., P., Lopes V., L. F., Vitali, L., Amadeu M., G., & Mara Block, J. (2018). *Sapucaia nut* (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part II: Phenolic compounds profile. *Food Research International*, 112, 434-442.
- Dewik, P. M. (2001). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach* Libro-ISBN: 0-471-49641-3 (Segunda Ed). John Wiley & Sons, LTD.

- Fernández L., I. M. (2014). Bioquímica del olivo: triterpenos pentacíclicos [Universidad de Jaén]. <https://hdl.handle.net/10953.1/561>
- Forster, H. (2004). Espectroscopia UV/VIS. En H. Karge, & J. Weitkamp, Tamices moleculares- Ciencia y tecnología (Vol. 4, págs. 337-427). Berlin, Heidelberg: Springer.
- GE Healthcare. (2018). Size Exclusion Chromatography: Principles and methods. Chicago: GE Healthcare. Obtenido de <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11639>
- Ghosh, S. (2016). Biosynthesis of Structurally Diverse Triterpenes in Plants: the Role of Oxidosqualene Cyclases. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 82(4), 1189–1210.
- Giménez, Alberto, Ávila, J. Antonio, Ruiz, Grace, Paz, Magali, Udaeta, Enrique, Ticona, J. Carlos, Salamanca, Efraín, Paredes, Crispín, Rodríguez, Norka, Quints, Katia, Ferraudy, Carolina, Gutiérrez, Iván, Chuqui, Rogelio, Quenevo, Celin, Dalence, Maria Fanny, & Bascope, Marcelo. (2005). ESTUDIOS QUÍMICOS, BIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS DE *Galipea longiflora*, KRAUSE. *Revista Boliviana de Química*, 22(1), 94-107
- Hernández, A., & Hermosilla, V. (2014). Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala [Universidad de San Carlos de Guatemala].
- Hiley, D., & Vidal, G. (2015). Desert King. Obtenido de Aplicaciones Farmacéuticas: <http://desertking.com/aplicaciones-farmaceuticas/?lang=es>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*, 53(6), 1841-1856.
- Huet B., C. (2017). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. Trabajo fin de grado, Universidad Complutense, Facultad de Farmacia, Madrid.
- Jaén, U. d. (2006). Técnicas cromatográficas. Jaén, Andalucía, España: Universidad de Jaén.
- Janovik, V. (2011). CHEMICAL EVALUATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE BARK AND TRITERPENOIDS OBTAINED FROM *Cariniana domestica* (Mart) Miers. Brazil: Federal University of Santa Maria.

- Janovik, V., Augusti B., A., Kieling F., J., Guilherme S., T., Venturini P., T., Hartz A., S., & Linde A., M. (2012). Isolation and chromatographic analysis of bioactive triterpenoids from the bark extracts of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 26(1), 66-71.
- Janovik, V., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2012). Antioxidant activities and HPLC/DAD Analysis of Phenolics and Carotenoids from the Barks of *Cariniana domestica* (Mart.) Miers. *Research Journal of Phytochemistry*, 6(4).
- Janovik, V., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2012). Antioxidant activities and HPLC/DAD Anlalysis of Phenolics and Carotenoids from the Barks of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Research Journal of Phytochemistry*, 6(4), 105-112.
- Janovik, V., Boligon, A., Bandeira, R., & Athayde, M. (2011). HPLAC/DAD ANALYSIS, DETERIMATION OF TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM THE LEAVES OF *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Research Journal of Phytochemistry*, 5, 209-215.
- Janovik, V., Boligon, A. A., Kieling F., J., Guilherme S., T., Venturini P., T., Hartz A., S., & Athayde, M. L. (2012). Isolation and chromatographic analysis of bioactive triterpenoids from the bark extract of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Natural Product Research*, 26(1), 66–71.
- Janovik, V.. (2011). Avaliação química e atividade antioxidante das cascas e triterpenóides obtidos de *Cariniana domestica* (Mart) Miers (Tesis de Maestria). Universidade Federal de Santa Maria.
- Jocélia P. C. Oliveira, É. L.-L. (2012). CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Lecythis pisonis* AND CYTOTOXIC ACTIVITY. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(5), 1140-1144.
- Jyotirmoy, G., & Parames C., S. (2013). Arjunolic acid: A new multifunctional therapeutic promise of alternative medicine. *Biochimie*, 95(6), 1098-1109.
- Jyotirmoy, G., Joydeep, D., Prasenjit, M., & Parames C., S. (2008). Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway. *Toxicology in Vitro*, 22(8), 1918-1926.

- Kuklinski, C. (1999). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Libro-ESBN: 978-8428211918 (Primera ed). Editorial Omega.
- Kuskoski, M. E., Asuero, A. G., & Troncoso, A. M. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia de Tecnología de Alimentos*, 25(4), 726-732.
- Lew, P. C., Bin, Y., & Yun, J. (2014). Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research*, 2, 1-13.
- Limachi V., I., Farfán, O., Sterner, O., & Giménez T., A. (2009). ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE FRUTOS DE *Bertholletia excelsa* POR CROMATOGRAFÍA DE GASES. *BIOFARBO*, 17(1), 47-53.
- Lock Sing de Ugaz, O. (1998). Avances en el estudio del genero *Werneria* y sus metabolitos secundarios. *Revista de Química*, 12(1), 69-85.
- Ludwing, I. A., Bravo, J., de Peña, M. P., & Cid, C. (2013). Effect of sugar addition (torrefacto) during roasting process on antioxidant capacity and phenolics of coffee. *Food Science and Technology*, 51, 553-559.
- Luna, S. G., Albanesi, A., & Lopez, C. R. (2002). Caracterización de la variabilidad de cepas de *Paenibacillus larvae subsp. larvae* (White) Heyndrickx *et al.* en la Argentina. *AGRISCIENTIA*, 19(0), 31-36.
- Macbride, V. c. (s.f.). www.itto.int. Obtenido de www.itto.int: [http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2448/Technical/S-PD-150-91-R1-I-Manual %20de%20Identificaci%C3%B3n-6.pdf](http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2448/Technical/S-PD-150-91-R1-I-Manual%20de%20Identificaci%C3%B3n-6.pdf)
- Macías V., V. E., Á. Caballero, J. M., & Suárez G., H. (2010). Terpenos con Actividad Biológica Anti-VIH. *Revista de La Facultad de Ciencias de La Salud*, 7(2), 257-273.
- Maestro D., R., & Borja P., R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Revista csic*, 44(2), 101-106.
- Mammen, D., & Mammen, D. (2012). A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chemistry*, 135(1), 1365-1368.

- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2018). Productos Naturales: Una Visión General. In *Fitoquímica Orgánica* Libro-ISBN: 980-00-2066-7 (Tercera ed, pp. 29–87). Universidad Central de Venezuela: Consejo de Desarrollo Científica y Humanístico.
- Marco, J. A. (2006). Consideraciones generales. In *Química de los productos naturales* Libro-ISBN: 84-9756-403-0 (Primera Ed, pp. 14–16). Editorial Síntesis.
- Martinez, S., Terrazas, E., Alvarez, T., Mamani, O., Vila, J., & Mollinedo, P. (2010). ACTIVIDAD ANTIFUNGICA *in Vitro* DE EXTRACTOS POLARES DE PLANTAS DEL GENERO BACCHARIS SOBRE FITOPATOGENOS. *Revista Boliviana de Química*, 27(1), 13-18.
- Mori, G. T. (2003). Lecythidaceae. En *The Families and Genera of Vascular Plants* (pag. 221-222). Hamburgo: Springer.
- Mostacedo, B., & Rumiz, D. (2010). ESTIMACION DEL ESTADO DE CONSERVACION DE LAS ESPECIES MADERALES DE LA CHIQUITANIA EN BOLIVIA. *Revista Boliviana de Ecología y Consolidación Ambiental*, 23(00), 43-52.
- Mostacedo, B., & Rumiz, D. I. (2010). Estimacion del Estado de Conservacion de las Especies Maderables de la Chiquitanía en Boliva. *Revista Boliviana de Ecología y Conservacion Ambiental*, 28(0), 43–52.
<http://www.cesip.org.bo/rebeca/index.php/rebeca/article/view/19>
- Muñoz Bernal, O. A., Torrez Aguirre, G. A., Nuñez Gastelum, J. A., de la Rosa, L. A., Garcia, J. R., Ayala Zavala, J. F., & Alvarez Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interaccion del reactivos de Folin-Ciocalteu con azucares durante la cuantificacion de polifenoles totales. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23-28.
- Nelson, Z. (30 de Agosto de 2006). LECYTHIDACEAE. Flora digital de la selva.
- Oliveira, M., Rodríguez, A., Belem, M., & Rocha, J. (2010). CHEMICAL CONSTITUENTS AND LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE). *Química Nova*, 34(7), 1183-1187.
- OPS. (2020). Perfiles de país sobre cancer, 2020.
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.

- Pérez A., F., León A., G., Rodríguez A., F., & Vazquez N., L. (2016). Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del Perú. *Pueblo Continente*, 22(2).
- Piana, M., de Brum, T. F., Boligon, A. A., S. Alves, C., de Freitas, R. B., Nunes, L. T., Athayde, M. L. (2015). In vitro growth-inhibitory effect of Brazilian plants extracts against *Paenibacillus larvae* and toxicity in bees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(2), 1041-1047.
- Porras L., A. P., & Lopez M., A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121-134.
- Ramos-Hryb, A. B., Pazini, F., Kaster, M., & S. Rodriguez, A. L. (2017). Potencial terapéutico del ácido ursólico para el manejo de enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas. *Medicamentos Para El SNC*, 31(1), 1029–1041.
- Reyes Z., J. F. (2007). Caracterización del efecto anticancerígeno del Ácido Maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural. Universidad de Granada, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Editorial de la Universidad de Granada.
- Rivas Perez, B. N., Leal Granadillo, I. A., Loaiza Cuaro, L. F., Morillo, Y. E., & Colina Chirinos, J. C. (2021). Phenolic Compounds and antioxidant activity in extracts of four Oregano species. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 40(3), 134-142.
- S.G., L., Albanesi, A., & Lopez, C. R. (2012). Caracterización de la variabilidad de cepas de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (White) Heyndrickx et al. en la Argentina. *AGRISCIENTIA*, 19(0), 31–36.
- Santos, A. L., Jimenez, H., & Cano, A. (2005). Efecto in vitro de extractos ricos en saponinas de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* sobre el crecimiento de dos bacterias calulolíticas ruminales. *Corpoica*, 6(1), 20–25.
- Santos, Edson N., Lima, Joaquim CS, Noldin, Vânia F., Cechinel-Filho, Valdir, Rao, Vietla SN, Lima, Evangelista F., Schmeda H., Guillermo, Sousa Jr., Paulo T. y Martins Domingos TO. (2011) Efectos antiinflamatorios, antinociceptivos y antipiréticos del extracto de metanol de la corteza del tallo de *Cariniana rubra* en modelos animales. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83 (2), 557-566
- Scalbert, A., Jhonson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Journal Clinical and Nutrition*, 81(1), 215-217.

- Serrano M., J. L. (s.f.). El espectro electromagnético, absorción visible-ultravioleta. Postgrado en ingeniería del agua y del terreno.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Estadísticas del cáncer, 2016. *Una Revista Sobre El Cáncer Para Médicos*, 66(1), 7–30.
- Stahl, E. (1969). *Thin-Layer Chromatography* Libro ISBN 978-642-88490-0 (segunda ed). *Springer*.
- Tarqui, S., Flores, Y., & Almanza, G. (2012). Polyoxygenated flavonoids from *Baccharis pentlandii*. *Revista Boliviana de Química*, 29(1), 10-14.
- Thimmappa, R., Geiser, K., Louveau, T., O'Maille, P., & Osbourn, A. (2014). Biosíntesis de triterpenos en plantas. *Revisión Anual de Biología Vegetal*, 65, 225–257. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120229>
- Turkmen, N., Sari, F., & Sedat V., Y. (2006). Efectos de los disolventes de extracción sobre la concentración y la actividad antioxidante de los polifenoles del té negro y negro mate determinados por el tartrato ferroso y los métodos de Folin-Ciocalteu. *Food Chemistry*, 99(4), 835-841.
- Universidad Nacional del Nordeste. (2010). Lecythidaceae. En F. d. Agrimensura, Diversidad vegetal biotaxonomía de espermatofitos. Argentina.
- Valencia A., E., Figueroa, I. I., Sosa M., E., Bartolome C., M. C., Martínez F., H. E., & García P., M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 1(16), 15-29.
- Weston, L., & Mathesius, U. (2013). Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal Chemical Ecology*, 39(1), 283–297.
- Zaragoza García, F., Tofiño Gonzales, I., & Oliveira Santamaria, L. (2002). Flavonoides y fitoterapia. *Revista de Fitoterapia*, 2(1), 21–32.

Anexos



Anexo 1: Carta de solicitud de identificación taxonómica dirigida al Herbario Nacional de Bolivia LPB. Fuente: Elaboración propia.



La Paz 02 de marzo del 2020

Doctora:

PhD Carla Maldonado
Directora del Herbario Nacional de Bolivia (LPB)
Presente.


Ref.: DETERMINACION TAXONOMICA

Tengo a bien saludarle, el trabajo de investigación que estoy realizando para mi tesis requiere la información de la planta conocida como **Colomero** (*Cariniana estrellencis*) también conocido como Yesquero Negro, por lo que solicito su colaboración en la determinación taxonómica de la planta colectada en Sapecho-Departamento de La Paz dejando así mismo dejando toda la información de la colecta con 1 ejemplar adjunto para su respectiva identificación.

ABEL FRANZ GUTIERREZ ESCALERA CI. 8483488 L.P. RU. 1701140 soy estudiante de la Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Carrera de Ciencias Químicas.

Sin más que decir me despido con las atenciones más anteladas

Atentamente:


ABEL FRANZ GUTIERREZ ESCALERA
CI. 8483488 LP
RU. 1701140

Anexo 2: Carta de confirmación de clasificación taxonómica. Fuente: Herbario Nacional de Bolivia (LPB)



HERBARIO NACIONAL DE BOLIVIA
Casilla 10077 Correo Central, La Paz - Bolivia / Campus Universitario, Calle 27 Cota Cota
Teléfonos (591 -2) 2121751 - 2792582 - 2792416 • Fax (591-2) 2770962
e-mail: direccion.herbariobolivia@gmail.com

PLANTAS COLECTADAS POR: ABEL FRANZ GUTIERREZ ESCALERA

Determinado por: Rossy de Michel (LPB)

Fecha : 2 de marzo de 2020

1 Lecythidaceae *Cariniana domestica* (C.Mart.) Miers



Anexo 3: Pesos obtenidos en el proceso de extracción en Corteza y Hojas de la especie *Cariniana domestica*. Fuente: Elaboración propia.

Extractos de Corteza				
Extracto	Solvente	m matraz	m matraz+extracto	m extracto
		vacío [g]	[g]	[g]
Etéreo	Éter de petróleo 60-80	38.7851	40.0978	1.3127
Acetato	acetato de etilo	44.5349	45.3131	0.7782
Etanólico	etanol 96°GL	34.0520	47.1797	13.1277
Hidroalcoholico	Etanol: agua, 50:50	37.9637	80.6061	42.6424
acuoso	Agua destilada	96.2856	111.8885	15.6029

Extractos de Hojas				
Extracto	Solvente	m matraz	m matraz+extracto	m extracto
		vacío [g]	[g]	[g]
Etéreo	Éter de petróleo 40-60	44.5348	46.1952	1.6604
Acetato	acetato de etilo	34.0527	35.9935	1.9408
Etanólico	etanol 96°GL	39.3037	48.7689	9.4652
Hidroalcoholico	Etanol: agua, 50:50	22.7610	51.5078	28.7468
acuoso	Agua destilada	40.8629	48.6842	7.8213

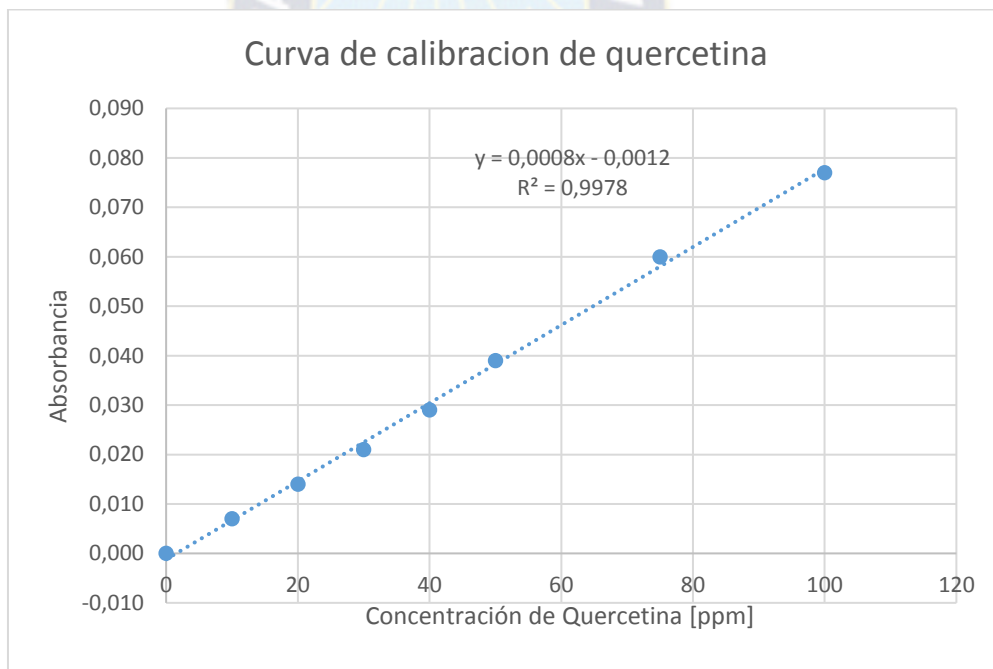
Anexo 4: Rendimientos obtenidos en el proceso de extracción de la especie *Cariniana domestica*. Fuente: Elaboración propia.

Extractos de Corteza				
Extracto	Solvente	Tiempo [Hrs]	Extracto seco [g]	Rendimiento [%]
Etéreo	Éter de petróleo 60-80	24	1.3127	0.44%
Acetato	acetato de etilo	24	0.7782	0.26%
Etanólico	etanol 96°GL	24	13.1277	4.37%
Hidroalcoholico	Etanol: agua, 50:50	48	42.6424	14.21%
Acuoso	Agua destilada	48	15.6029	6.20%

Extractos de Hojas				
extracto	Solvente	Tiempo [Hrs]	Extracto seco [g]	Rendimiento [%]
Etéreo	Éter de petróleo 60-80	24	1.6604	1.11
Acetato	acetato de etilo	24	1.9408	1.32
Etanólico	etanol 96°GL	24	9.4652	6.10
Hidroalcoholico	Etanol: agua, 50:50	48	28.7468	19.16
		48	3.3284	2.22
Acuoso	Agua destilada	48	7.8213	2.61

Anexo 5: Exclusión de datos para la curva de calibración mediante la Prueba de Grubbs
Fuente: Elaboración propia.

Rechazo de datos								
G al 95%	2,11	si $n < G_{\text{tabulado}}$ = Se acepta ; $n > G_{\text{tabulado}}$ = Se rechaza						
n	Blanco	10 ppm	20 ppm	30 ppm	40 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm
1	0,000	1,479	1,886	1,438	1,182	1,356	0,838	1,033
2	0,000	1,479	0,471	1,438	1,182	1,171	0,838	1,033
3	0,000	0,185	0,471	1,046	0,698	1,171	0,838	1,033
4	0,000	0,185	0,471	0,523	0,215	0,123	0,479	0,516
5	0,000	0,185	0,471	0,523	0,215	0,123	0,479	0,000
6	0,000	0,185	0,943	0,523	0,215	0,308	0,479	0,000
7	0,000	0,185	0,943	0,523	1,236	1,048	1,317	1,033
8	0,000	0,185	0,943	0,915	1,236	1,048	1,317	1,033
9	0,000	1,849	0,943	0,915	1,236	1,048	1,317	1,549



Anexo 6: Exclusión de datos de muestras según la prueba de Grubbs. **Fuente:** Elaboración propia.

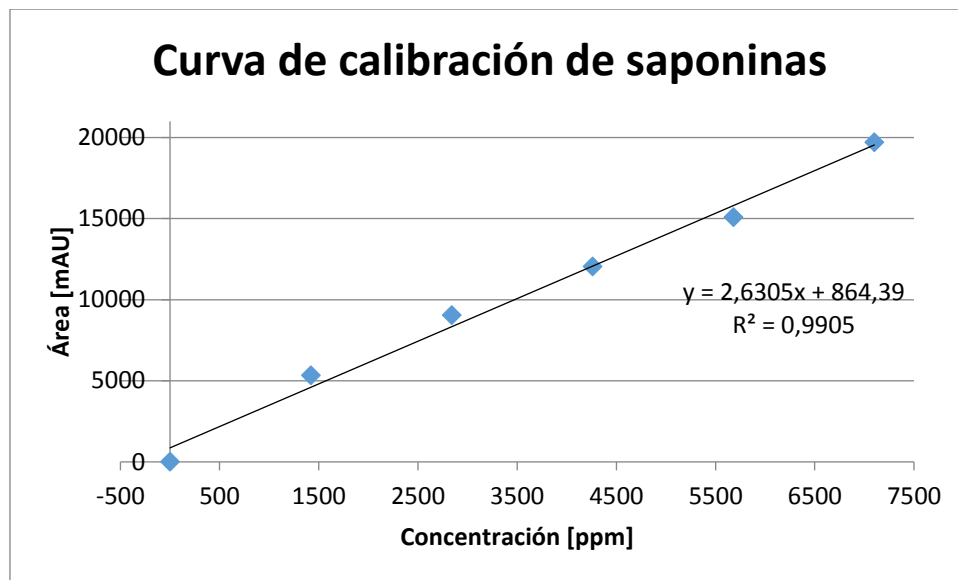
Datos de absorbancia obtenidos en la medición de							
n	AcOEt	EtOH	HA	F AcOEt	F ButOH	F1	F2
1	0,019	0,012	0,005	0,033	0,014	0,044	0,013
2	0,019	0,012	0,005	0,033	0,014	0,044	0,013
3	0,019	0,013	0,005	0,033	0,015	0,045	0,013
4	0,019	0,013	0,006	0,033	0,015	0,049	0,014
5	0,019	0,013	0,006	0,033	0,015	0,049	0,014
6	0,019	0,013	0,006	0,035	0,015	0,050	0,014
7	0,022	0,019	0,007	0,035	0,017	0,050	0,018
8	0,022	0,019	0,007	0,036	0,018	0,050	0,018
9	0,025	0,020	0,008	0,036	0,018	0,050	0,019
Promedio	0,020	0,015	0,006	0,034	0,016	0,048	0,015
SD	0,002	0,003	0,001	0,001	0,002	0,003	0,002

● Se desprecia el dato.

Concentración de flavonoides totales en extractos y fracciones							
	AcOEt	EtOH	HA	F AcOEt	F ButOH	F1	F2
	22,25	13,50	4,75	39,75	16,00	53,50	14,75
	22,25	13,50	4,75	39,75	16,00	53,50	14,75
	22,25	14,75	4,75	39,75	17,25	54,75	14,75
	22,25	14,75	6,00	39,75	17,25	59,75	16,00
	22,25	14,75	6,00	39,75	17,25	59,75	16,00
	22,25	14,75	6,00	42,25	17,25	61,00	16,00
	26,00	22,25	7,25	42,25	19,75	61,00	21,00
	26,00	22,25	7,25	43,50	21,00	61,00	21,00
	-	23,50	8,50	43,50	21,00	61,00	22,25
Promedio	23,19	16,31	5,84	40,84	17,72	58,03	16,78
SD	1,74	3,71	1,04	1,56	1,76	3,47	2,67

Anexo 7: Curva de calibración y datos de áreas en extractos crudos y fracciones ricas en saponinas. **Fuente:** Elaboración propia.

CURVA PATRON					
Conc. ppm	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	SD
1420	5320,7	5267,3	5435,9	5341,3	86,2
2840	9088,6	9036,1	9013,4	9046,0	38,6
4260	12124,7	11933,4	12059,2	12039,1	97,2
5680	15037,5	15234,2	14999,4	15090,4	126,0
7100	19575,8	19815,3	19706,0	19699,0	119,9



Extracto	Área 1	Área 2	Promedio	SD
BuOH	121,21	120,68	120,94	0,37
EtOH	7,06	7,06	7,06	0,08
HA	6,69	6,40	6,55	0,21
Ext. Rico	87,52	86,03	86,78	1,05

Anexo 8: Datos obtenidos para la construcción de la curva de calibración de Ácido Gálico.

Fuente: Elaboración propia

Conc. mg/L	Abs 1	Abs 2	Prom. 1	N°	Abs 1	Abs 2	Prom 2	N°	Abs 1	Abs 2	Prom 3	Prom de Abs	SD
	0,006	0,008	0,007	B1	0,006	0,008	0,007	B1	0,005	0,006	0,0055		
	0,005	0,005	0,005	B2	0,005	0,005	0,005	B2	0,004	0,004	0,004		
				B3				B3	0,005	0,005	0,005		
	0,007	0,008	0,0075	B4	0,007	0,008	0,0075	B4	0,004	0,005	0,0045		
	0,006	0,006	0,006	B5	0,006	0,006	0,006	B5	0	0	0		
0			0,000				0,000				0,0038	0	0
5	0,064	0,064	0,064	1	0,064	0,064	0,064	1	0,06	0,061	0,0605	0,057	0,001
10	0,121	0,122	0,1215	2	0,121	0,122	0,1215	2	0,12	0,121	0,1205	0,116	0,001
20	0,241	0,241	0,241	3	0,24	0,241	0,2405	3	0,236	0,238	0,237	0,234	0,001
30	0,359	0,36	0,3595	4	0,361	0,359	0,36	4	0,357	0,36	0,3585	0,354	0,001
40	0,467	0,467	0,467	5	0,465	0,467	0,466	5	0,464	0,462	0,463	0,460	0,001
50	0,59	0,591	0,5905	6	0,59	0,591	0,5905	6	0,587	0,586	0,5865	0,584	0,001
60	0,69	0,69	0,69	7	0,69	0,69	0,69	7	0,689	0,688	0,6885	0,684	0,001
70	0,814	0,815	0,8145	8	0,815	0,815	0,815	8	0,814	0,813	0,8135	0,809	0,001
80	0,936	0,936	0,936	9	0,937	0,936	0,9365	9	0,936	0,934	0,935	0,930	0,001

Anexo 9: Datos obtenidos para la construcción de la curva de calibración con ABTS. **Fuente:** Elaboración propia

N°	C1 Um	Abs 1	Abs 1	Prom. 1	Abs 5	Abs 5	Prom 4	Abs 3	Abs 3	Prom 3	Abs promedio	% Inhibicion
Blanco	B1				0,560	0,559	0,560	0,559	0,56	0,5595		
Blanco	B2	0,559	0,560	0,5595	0,559	0,558	0,559					
Blanco	B3	0,557	0,557	0,557	0,558	0,558	0,558	0,561	0,56	0,5605		
Blanco	B4							0,559	0,558	0,5585		
Blanco	B5	0,56	0,559	0,560	0,559	0,558	0,559	0,56	0,559	0,5595		
	0			0,559			0,559			0,560	0,559	0,000
1	10	0,515	0,516	0,516	0,517	0,516	0,517	0,515	0,517	0,516	0,516	7,681
2	20	0,455	0,454	0,455	0,454	0,455	0,455	0,456	0,455	0,456	0,455	18,624
3	30	0,403	0,404	0,404	0,404	0,404	0,404	0,403	0,403	0,403	0,404	27,809
4	40	0,356	0,356	0,356	0,357	0,358	0,358	0,357	0,357	0,357	0,357	36,158
5	50	0,296	0,297	0,297	0,298	0,297	0,298	0,296	0,297	0,297	0,297	46,893
6	60	0,244	0,244	0,244	0,245	0,247	0,246	0,244	0,244	0,244	0,245	56,226
7	70	0,191	0,192	0,192	0,191	0,191	0,191	0,191	0,192	0,192	0,191	65,768
8	80	0,132	0,133	0,133	0,132	0,132	0,132	0,132	0,133	0,133	0,132	76,324
9	90	0,074	0,075	0,075	0,074	0,074	0,074	0,073	0,074	0,074	0,074	86,760
10	100	0,022	0,022	0,022	0,023	0,022	0,023	0,022	0,021	0,022	0,022	96,064