



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

INFORME FINAL DEL PROYECTO DE TESIS

"Tamizaje Fitoquímico, Perfil Cromatográfico y Evaluación de la Actividad Antioxidante *in vitro*, de las cortezas de *Erythrina fusca* L., *Campsiandra angustifolia* S. B., y *Swartzia polyphylla* DC".

PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES: Bach. Carlos Andres Ravarocci Quiroz.
Bach. Wilder Carrasco Huamán.

ASESORES : Ing. Víctor Erasmo Sotero Solís, Dr.
Q.F. Ernesto Anselmo Nina Chora.
Q.F. Hugo Miguel Pinto Guerra.

IQUITOS – PERÚ

2010

RESUMEN

“Tamizaje Fitoquímico, Perfil Cromatográfico y Evaluación de la Actividad Antioxidante *in vitro*, de las cortezas de *Erythrina fusca* L., *Campsiandra angustifolia* S. B., y *Swartzia polyphylla* DC”.

*Ravarocci Quiroz, Carlos A.; Carrasco Huamán, Wilder**

Algunas enfermedades se manifiestan por la excesiva oxidación de biomoléculas que dan lugar a daños en el organismo, es así que un exceso de radicales libres está relacionado con una mayor incidencia de enfermedades degenerativas: cáncer, artrosis, etc. Los agentes terapéuticos de las plantas responsables de prevenir, aliviar o curar enfermedades, están comprendidos dentro de los llamados metabolitos secundarios. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de los principales metabolitos secundarios y evaluar la actividad antioxidante de los polifenoles presentes en las cortezas de los extractos de Amasisa (*Erythrina fusca* L.), Huacapurana (*Campsiandra angustifolia* S. B.), y Cumaceba (*Swartzia polyphylla* DC.). Se obtuvieron los extractos etéreo, etanólico y acuoso de cada especie, para el tamizaje fitoquímico; los extractos diclorometánico, metanólico y ácido-básico para el perfil cromatográfico y los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso para la evaluación de la capacidad antioxidante; todas a partir del material obtenido del secado a 60 °C por 24 horas de las cortezas de las especies en estudio. Se realizó el tamizaje fitoquímico y el perfil cromatográfico siguiendo el modelo de la universidad de Budapest y de Wagner & Blatt, respectivamente. Se cuantificaron los Polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. La capacidad antioxidante se midió por el método de DPPH. De acuerdo al tamizaje fitoquímico, se reconoce en cada una de las especies, gran cantidad de Azúcares reductores, la abundante presencia de Glicósidos y la alta presencia de Flavonoides y de cuerpos Fenólicos, que dan a entender la intensa relación sinérgica que pueda existir, entre estas estructuras y las propiedades que a cada una de estas plantas se les atribuye. *C. angustifolia* (Huacapurana) fue la que presentó mayor cantidad de polifenoles totales con 18759.49 ± 0.228 mg de CTQ**/100g seguido de *E. fusca* (Amasisa) con 15859.49 ± 0.086 mg de CTQ/100g y finalmente *S. polyphylla* (Cumaceba) con 9066.16 ± 0.044 mg de CTQ/100g. Fue el extracto Metanólico de las tres especies el que presentó mayor porcentaje de inhibición frente al radical DPPH (94.47 ± 0.275 % para Huacapurana, 93.10 ± 0.264 % para Amasisa y 90.36 ± 0.263 % para Cumaceba). La capacidad antioxidante medida como IC₅₀ (concentración inhibitoria 50) de Cumaceba, Huacapurana y Amasisa fueron de 0.067 ± 0.004 mg/ml, 0.069 ± 0.003 mg/ml y 0.483 ± 0.057 mg/ml, respectivamente. La correlación entre los polifenoles totales y el IC₅₀ de los extractos de Huacapurana y Amasisa fue positiva, sin embargo el extracto de Cumaceba no presentó este comportamiento, lo que sugiere que en este último extracto, existe algún constituyente que contribuye en su más efectiva acción sequestradora de radicales libres.

Palabras claves: *Tamizaje fitoquímico, perfil cromatográfico, actividad antioxidante, metabolitos secundarios, IC₅₀, polifenoles totales, plantas medicinales.*

* Bachilleres en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana – UNAP.

** Catequina

ÍNDICE DE CONTENIDO

	N° de Página
<u>CAPÍTULO I</u>	01
1.- INTRODUCCIÓN	01
2.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	03
3.- OBJETIVOS	03
3.1.- objetivo general	03
3.2.- objetivos específicos	03
<u>CAPÍTULO II</u>	04
1.- MARCO TEÓRICO	04
1.1.- Antecedentes	04
1.2.- Bases Teóricas	07
1.2.1.- Metabolitos Secundarios de las Plantas	07
1.2.2.- La Investigación y el descubrimiento de nuevas propiedades medicinales	12
1.2.3.- Tamizaje Fitoquímico	14
1.2.4.- Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante	15
1.2.5.- Compuestos Fenólicos como Antioxidantes	16
1.2.6.- Modelos <i>in vitro</i> para el estudio de la Actividad Antioxidante	17
A) Método del DPPH	17
B) Método ABTS	18
C) Método DMPD	18
D) Método de barrido de Radicales Superóxido	19
E) Determinación del poder reductor	19
1.2.7.- MUESTRAS EM ESTUDIO	20
A. <i>Erythrina fusca</i> Loureiro, “Amasisa”.	20
B. <i>Campsiandra angustifolia</i> S.B., “Huacapurana”.	22

C. <i>Swartzia polyphylla</i> D.C., “Cumaceba”.	24
2.- DEFINICIONES OPERACIONALES	27
3.- HIPÓTESIS	31
<u>CAPÍTULO III</u>	32
1.- METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	32
1.1.- Obtención de los extractos	32
1.2.- Marcha Fitoquímica Preliminar	34
1.3.- Cromatografía en Capa Fina	41
1.4.- Método del DPPH	41
1.5.- Determinación de Polifenoles Totales	44
2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	44
3.- TÉCNICAS E INSTRUMENTOS	45
4.- PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	49
4.1.- Recolección de las muestras Vegetales	49
4.2.- Recolección de Datos de los Ensayos	49
5.- ANÁLISIS DE DATOS	50
<u>CAPÍTULO IV</u>	51
1.- RESULTADOS	51
1.1.- Tamizaje Fitoquímico	51
1.2.- Perfil Cromatográfico	52
1.3.- Determinación de Polifenoles Totales	54
1.4.- Porcentaje de Inhibición al Radical DPPH	55
1.5.- Valores de IC50 del Extracto Metanólico	57
2.- DISCUSIÓN	63
3.- CONCLUSIONES	66
4.- RECOMENDACIONES	67
5.- BIBLIOGRAFÍA	68
6.- ANEXOS	75

INDICE DE CUADROS

	N° de Página
CUADRO N° 01. - <u>Resumen general de los resultados obtenidos en el Screening Fitoquímico de las Muestras en Estudio</u>	51
CUADRO N° 02. - <u>Perfil Cromatográfico de la Corteza de <i>Campsiandra angustifolia</i></u>	52
CUADRO N° 03. - <u>Perfil Cromatográfico de la Corteza de <i>Erythrina fusca</i></u>	53
CUADRO N° 04. - <u>Perfil Cromatográfico de la Corteza de <i>Swartzia polyphylla</i></u>	54
CUADRO N° 05.- <u>Concentración de Polifenoles en las tres especies de fabáceas en estudio</u>	54
CUADRO N° 06.- <u>Porcentaje de inhibición al radical DPPH de las tres especies de fabáceas en estudio</u>	55
CUADRO N° 07.- <u>Valores de IC₅₀ de los extractos metanólicos de las muestras en Estudio</u>	57
CUADRO N°08.- <u>Prueba “T” y Correlación para Muestras Relacionadas</u>	59
CUADRO N°09.- <u>Anova de un Factor, Homogeneidad de Varianzas y Comparaciones Múltiples entre medias</u>	60
CUADRO N° 10.- <u>Capacidad de Inhibición del radical libre DPPH de la Huacapurana a través del tiempo</u>	91
CUADRO N° 11.- <u>Capacidad de Inhibición del radical libre DPPH de la Cumaceba a través del tiempo.</u>	94
CUADRO N° 12.- <u>Capacidad de Inhibición del radical libre DPPH de la Amasisa a través del tiempo.</u>	97

DEDICATORIA

“Al Perú, que es poseedor de una gran biodiversidad y experiencia en el uso tradicional de las plantas medicinales, que son fuente de recursos naturales terapéuticos en la investigación y desarrollo de drogas en este milenio”

Carlos Ravarocci Q. & Wilder Carrasco H.

“Al recurso máspreciado de la tierra, el recurso humano: las comunidades nativas de la Amazonía poseedoras del valioso conocimiento del uso medicinal de las plantas”

Wilder Carrasco H.

“A la memoria sagrada de mis Abuelos: Germán y Rosa. Que sus almas descansen en paz, sus ilusiones en mí se cumplan y alcance la felicidad sobre el fundamento de la amistad, la base del amor y el reto: la vida”

Carlos A. Ravarocci Q.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a nuestras familias, ellos nos han brindado cariño, comprensión y apoyo incondicional en este periodo tan largo y, en ocasiones, tan difícil; ellos han logrado que siguiéramos avanzando hacia nuestro objetivo.

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) por la oportunidad de desarrollar en su totalidad el presente trabajo de tesis, gracias al Programa de Investigaciones para el aprovechamiento sostenible de la Biodiversidad (PBIO) durante todo el año 2008; al Dr. Víctor Erasmo Sotero Solís, con su gran calidad científica y humana, nos acogió en su grupo de trabajo y nos abrió las puertas a este mundo apasionante. Le agradecemos sinceramente su confianza y todo el apoyo, consejos y ayuda. Agradecer también al Q.F. Ernesto Anselmo Nina Chora que en todo momento ha orientado, aconsejado y aportado sus reflexiones, con total compromiso, a esta tesis. Su generosidad, intuición y apoyo han hecho posible que, por fin, el proyecto sea hoy una realidad.

Queremos extender un sincero agradecimiento a las personas que de una manera u otra, participaron en la ejecución de este trabajo, tanto en la parte experimental como en la redacción.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Los efectos colaterales de las drogas sintéticas y la falta de drogas efectivas contribuyen a que muchas enfermedades no sean resueltas de manera eficaz, siendo aún una característica insalvable de la farmacología moderna. Sin embargo, las plantas usadas en la medicina tradicional se constituyen en una fuente casi inagotable de moléculas, cuyo análisis se está facilitando por la disponibilidad de bioensayos *in vitro*.⁽¹⁾

Algunas enfermedades se manifiestan por la excesiva oxidación de biomoléculas que dan lugar a daños en el organismo, es así que un exceso de radicales libres está relacionado con una mayor incidencia de enfermedades degenerativas⁽²⁾ (cáncer, artrosis,⁽³⁾ etc.). La utilización de antirradicales permite que no se manifiesten especies reactivas oxidantes (de allí su denominación de antioxidantes).^(4,5)

Los agentes terapéuticos de las plantas responsables de prevenir, aliviar o curar enfermedades, están comprendidos dentro de los llamados metabolitos secundarios⁽⁶⁾, derivados biosintéticamente de los metabolitos primarios; pero su distribución es limitada entre las diferentes especies vegetales. Estos compuestos son sintetizados en células especializadas y en distintas etapas del desarrollo, lo que dificulta su extracción y purificación.⁽⁷⁾

Cientos de plantas son utilizadas en la medicina tradicional, pero la ciencia moderna, analizando y estudiando sus efectos terapéuticos, quiere precisar, comparar y clasificar sus diversas propiedades, conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar las enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en la busca de una mayor actividad y finalmente dar a conocer a la humanidad los resultados de estos estudios.^(8,9)

Considerando las informaciones respecto al uso como medicina tradicional de *Erythrina fusca* Loureiro, *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham y *Swartzia polyphylla* DC., y las acciones que se les atribuye en términos generales como antiulcerosos, antiartríticos, antiinflamatorios y antirreumáticos ^(10, 11, 12), resulta imprescindible la validación científica de estas plantas mediante estudios que brinden a la población un mayor rango de seguridad para su empleo tradicional. ⁽¹³⁾

El presente trabajo de investigación, basados en la información bibliográfica etnobotánica, tiene como fin principal evaluar la presencia de los principales metabolitos secundarios, evaluar la actividad antioxidante y determinar la capacidad de secuestro de radicales libres, presentes en los extractos de las cortezas de *Erythrina fusca* Loureiro (Amasisa), *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham (Huacapurana) y *Swartzia polyphylla* DC. (Cumaceba); esto, para tentar la posibilidad de ser utilizados de forma racional como alternativas terapéuticas seguras y con mínimos efectos adversos en el tratamiento de enfermedades y, así mismo, contribuir con datos e información para futuras investigaciones relacionadas con estas especies vegetales.

2. **PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

¿Las cortezas de *Erythrina fusca* Loureiro (Amasisa), *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham (Huacapurana) y *Swartzia polyphylla* DC. (Cumaceba), presentarán metabolitos secundarios con actividad antioxidante?

3. **OBJETIVOS**

3.1. **OBJETIVO GENERAL**

- ◆ Realizar el Tamizaje Fitoquímico y la cromatografía analítica y evaluar la Actividad Antioxidante *in vitro* de extractos de cortezas de *Erythrina fusca* L., *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham y *Swartzia polyphylla* DC.

3.2. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ◆ Obtener los extractos de las cortezas de *Erythrina fusca* L., *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham y *Swartzia polyphylla* DC.
- ◆ Realizar el Tamizaje Fitoquímico en los extractos etéreo, etanólico y acuoso en cortezas de las especies en estudio.
- ◆ Realizar la Cromatografía Analítica en los extractos diclorometánico, metanólico y ácido – básico, de cortezas de las especies en estudio.
- ◆ Determinar la Concentración de Polifenoles Totales en los extractos de cortezas de las especies en estudio.
- ◆ Determinar la Actividad Antioxidante *in vitro* en los extractos de cortezas de las especies en estudio, mediante el método de secuestro de radicales libres DPPH (1,1-difenil-2- picrilhidrazilo).

CAPÍTULO II

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Erythrina fusca L., *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham y *Swartzia polyphylla* DC., son especies reportadas en la medicina tradicional, sea como antiulcerosos, antiartríticos, antirreumáticos, antiinflamatorios, como tónico postparto, para el frío o para la fiebre relacionada con la malaria ^(14, 15, 16, 17); sin embargo existe poca información sobre investigaciones científicas que respalden sus probables efectos, específicamente de las cortezas de estas especies. La búsqueda de información científica ha reportado las siguientes referencias al respecto:

OSAWA, K. *et al*, (1992) ⁽¹⁸⁾ realizaron un estudio en el que determinaron la actividad antibacteriana de los Isoflavonoides presentes en el duramen de *Swartzia polyphylla* DC., frente a bacterias cariogénicas como *Mutans streptococci*. Los extractos metanólicos y la fracción de isoflavononas, mostraron una potente actividad contra estas bacterias. Además purificaron siete flavonoides por cromatografía del extracto metanólico, entre estos flavonoides se encontraron tres isoflavanonas conocidas: dihidrobiocanina A, ferreirina, darbergioidina; además una nueva denominada 5, 2', 4'-trihidroxi-7-metoxiisoflavanona (dihidrocajanina).

ROSARIO ROJAS, A. *et al* (2006) ⁽¹⁹⁾ determinaron la actividad antifúngica, antimicobacteriana y larvicida de la corteza de *Swartzia polyphylla* DC. La fracción de T- cadinol se mostró activa frente a *Mycobacterium tuberculosis* a dosis de 50 µg/ml; el extracto etanólico y la fracción del flavonoide biocanina A, resultaron activas frente a *Trichophyton mentagrophytes* (dosis de 25 mg/ml) y a filamentos de varios hongos (dosis de 1 mg/ml), respectivamente. Extractos etanólicos y una fracción de T-cadinol, tuvieron gran actividad frente a *Culex quinquefasciatus*, llegando hasta el 100% de mortalidad en una hora.

LEUNG *et al.*, (1972) ⁽²⁰⁾, determinaron la composición química de las hojas de *Erythrina fusca* L. del este de Asia, encontrando que contenían 60 calorías, 81.5 g de humedad, 4,6 g de proteínas, 0,8 g de grasa, 11,7 g de carbohidratos, 4,1 g de fibra y 1,4 g de minerales; además 57 mg de calcio, 40 mg de fósforo, 1,8 mg de hierro, 2300 µg de compuestos equivalente a β -caroteno, 0,24 mg de tiamina, 0,17 mg de riboflavina y 4,7 mg de niacina.

DUQUE (1981) ⁽²¹⁾, determinó que las hojas de *Erythrina fusca* L., contienen 325 calorías, 24,9 g de proteína, 4,3 g de grasa y 63,3 g de carbohidratos, 22,2 g de fibra y 7,6 g de minerales; 308 mg de calcio, 222 mg de fósforo, 5,2 mg de hierro, 0,91 mg de tiamina, 0,52 mg de riboflavina, 6,54 mg de niacina y 78 mg de ácido ascórbico. LIST Y HORHAMMER (1979), determinaron que las semillas de *Erythrina fusca* L., contienen los alcaloides eritralina, erisodina, erisopina, erisotiopina, erisotiopyina, crisovina, eritramina, eritratina e hipaforina.

GOMEZ, M.E. *et al.* (1995) ⁽²²⁾ describieron en Cali (Colombia), un conjunto de árboles y arbustos forrajeros utilizados en alimentación animal como fuente proteica, describiendo principalmente a *Erythrina fusca* L.

CALLE A.J., *et al.* (1997) ⁽²³⁾ aislaron los alcaloides isoquinolínicos (+)-epieritratidina y 8-(+)-oxoerisodina, de la corteza y flores de *Erythrina fusca* L., los que fueron identificados en base a sus constantes espectroscópicas. También determinaron la actividad antimicrobiana de extractos crudos y fracciones de éter de petróleo, cloruro de metileno y acetona frente a bacterias y hongos; para la actividad farmacológica realizaron el tamizaje hipocrático de los extractos crudos de *Erythrina fusca* L., en ratas albinas adultas tipo WISTAR.

KHAOMEK *et al.*, (2008) ⁽²⁴⁾, trabajando con extractos de *Erythrina fusca* L., encontraron que posee actividad antimalárica contra una cepa de *Plasmodium falciparum* (K1) altamente resistente a multi-drogas. Además encontraron diferentes flavonoides: citflavanona, eritrisenegalona, loncocarpol A, liquiritigenina, 8-prenilaidzeina y la diprenil flavanona 4, este último demostró una notable actividad antimalárica (IC₅₀ 1.6 µg/mL), aunque los flavonoides

citflavanona y loncocarpol A, no presentaron esta actividad a pesar que también contenían el grupo prenil (isoprenoide).

En la Universidad de Guayaquil (mayo del 2005 ⁽²⁵⁾), se realizaron estudios farmacológicos en ratones. Se estudió el efecto antiinflamatorio de NUTRAMEDIX CUMANDA[®] (producto de extractos de la corteza de *Campsiandra angustifolia* S. ex B.), encontrando inhibición a la inflamación hasta en un 97%. Este efecto fue comparado con FELDENE[®] (piroxicam), droga antiinflamatoria muy tóxica del laboratorio PFIZER, que inhibe la inflamación en un 98%.

1.2. BASES TEÓRICAS

1.2.1 METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS.

Los metabolitos secundarios de las plantas son compuestos químicos sintetizados por las plantas, que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para ellas ya que no intervienen en su metabolismo primario; se diferencian de los metabolitos primarios, en que tienen una distribución limitada en el reino vegetal, a veces a sólo una especie o un grupo de ellas, por lo que muchos de ellos se aplican en Botánica Sistemática. Los metabolitos secundarios de las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

Los metabolitos secundarios muchas veces fueron considerados simplemente como productos finales de procesos metabólicos, sin función específica, o como productos de desecho de las plantas. En general, fueron percibidos como insignificantes por los biólogos, por lo que históricamente han recibido poca atención por parte de los botánicos. Muchas de las funciones de los metabolitos secundarios aún son desconocidas. El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, interesados en estas sustancias por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras y otros materiales utilizados en la industria. De hecho, el estudio de los metabolitos secundarios de las plantas estimuló el desarrollo de las técnicas de separación, la espectroscopía para dilucidar su estructura, y metodologías de síntesis que actualmente constituyen la fundación de la química orgánica contemporánea.

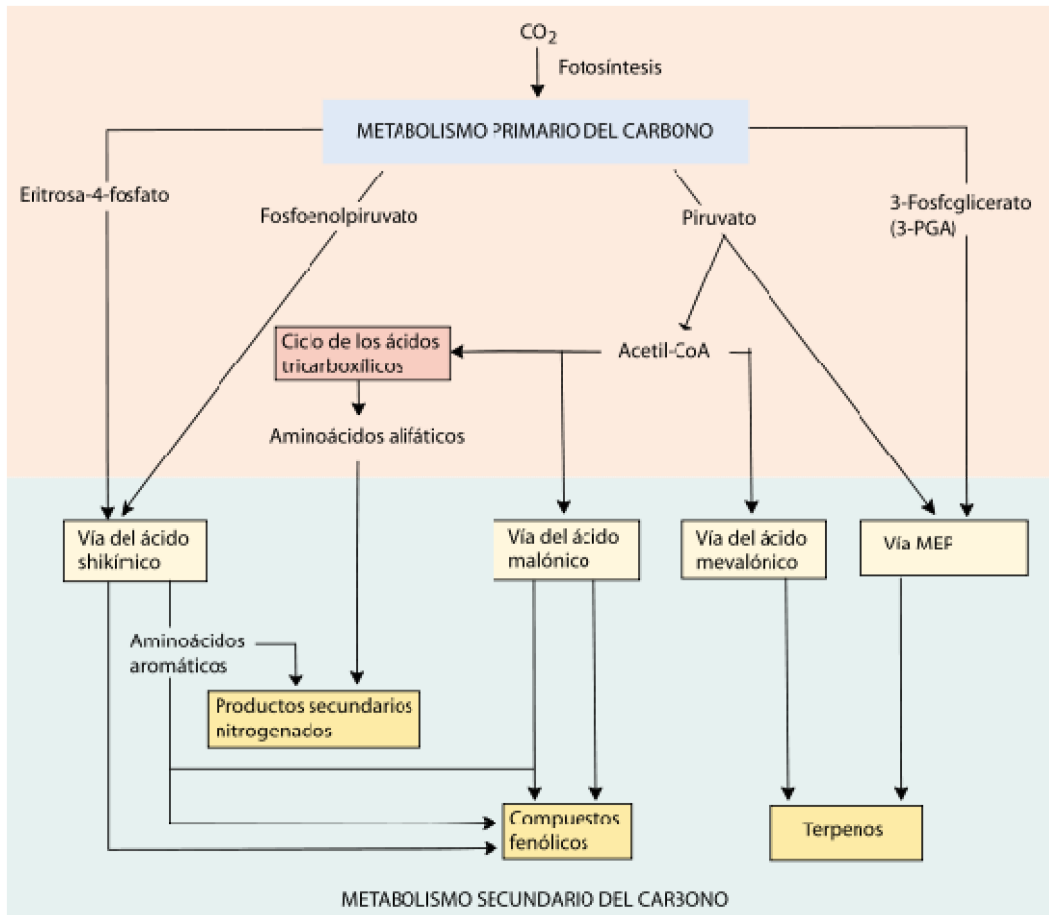
En estudios biológicos más recientes se determinó que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas ^(26, 27,28). El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas.

Además, la creciente apreciación de los diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios, ha llevado a reevaluar los diferentes roles que desarrollan en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas.

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, en base a sus orígenes biosintéticos: ^(29,30)

1. Terpenoides. Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25.000 metabolitos secundarios ⁽²⁹⁾, son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato o "5-carbono isopentenil difosfato") y se forma en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante ⁽³¹⁾. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. La distribución de unos pocos de ellos en las plantas es más limitada, como los que forman los aceites esenciales, entre otros.
2. Compuestos fenólicos como los fenilpropanoides y sus derivados. Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen están formados por la vía del ácido shikímico o por la vía del malonato/acetato.
3. Compuestos nitrogenados o alcaloides. Los alrededor de 12.000 alcaloides que se conocen ⁽²⁹⁾, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas ⁽³²⁾. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina y la estriquina.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios proviene del metabolismo primario de las plantas, del que se desvía acorde con las vías generales que se muestran en el siguiente cuadro:



Vías generales del metabolismo secundario de las plantas, que producen los tres tipos generales de compuestos secundarios: productos nitrogenados, productos fenólicos y terpenoides. También se muestra su relación con el metabolismo primario.

(Dibujado a partir de Taiz, Lincoln y Eduardo Zeiger. "Secondary Metabolites and Plant Defense". En: *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Inc. 2006.

Capítulo 13.)

La diferencia entre metabolitos primarios y metabolitos secundarios es sólo funcional (no pueden ser distinguidos en base a moléculas precursoras, ni estructura química, ni origen biosintético), por lo que la diferencia entre las vías bioquímicas es difusa ya que a veces un compuesto considerado metabolito primario, por la acción de una sola enzima se convierte en lo que se considera un metabolito secundario.

También hay compuestos clasificados como metabolitos secundarios que también cumplen funciones primarias en las plantas.

Los metabolitos secundarios de las plantas también pueden ser divididas en categorías menos abarcativas según JUDD *et al.* ⁽³³⁾, clasificados según su vía biosintética y estructura química, además de los terpenoides y los alcaloides, pueden encontrarse:

- Betalaínas. Son pigmentos rojos y amarillos que están presentes solamente en la familia Caryophyllales excepto en los géneros Caryophyllaceae y Molluginaceae ⁽³⁴⁾; en contraste con la mayoría de las otras plantas cuyos pigmentos son antocianinas (un tipo de flavonoides). Al igual que los demás pigmentos, cumplen funciones de atracción de polinizadores y dispersores, y probablemente tienen funciones adicionales como de absorción de luz ultravioleta y de protección contra el herbivorismo.
- Glucosinolatos ("mustard oil glucosides" en inglés). De ellos se derivan los aceites de mostaza al ser hidrolizados por la enzima myrosinasa ⁽³⁵⁾. Evolutivamente se originaron dos veces, por lo que se encuentran en dos líneas de plantas no emparentadas filogenéticamente: todos los Brassicales por un lado, y en *Drypetes* (familia Putranjivaceae, antes Euforbiaceae) ⁽³⁶⁾.
- Glucósidos cianogénicos. Cumplen funciones de defensa, ya que al ser hidrolizados por algunas enzimas liberan cianuro de hidrógeno ⁽³⁷⁾, proceso llamado cianogénesis. En el transcurso de la evolución, algunos tipos de glucósidos cianogénicos parecen haberse originado muchas veces, mientras que otros parecen haber aparecido una sola vez, y tienen por lo tanto una distribución limitada a sólo algunos taxones emparentados.
- Poliacetilenos. Grupo grande de metabolitos no nitrogenados, formados por la unión de unidades de acetato por la vía de los ácidos grasos. Se encuentran en algunos grupos emparentados de la Familia Astéridas.

- o Antocianinas y otros flavonoides. Son compuestos fenólicos hidrosolubles, presentes en las vacuolas celulares de las plantas, que se sintetizan a partir de fenilalanina y malonil-CoA. Todos los flavonoides comparten la vía biosintética central, pero los productos finales son muy variados entre especies de plantas. Se encuentran en todas las Embriofitas. Tienen funciones de protección contra la luz ultravioleta, defensa ante el herbivorismo, pigmentación, entre otros. Los flavonoides más conocidos son las antocianinas, pigmentos de las flores de muchas plantas. Hay mucha variabilidad de flavonoides entre las especies (se han enumerado cerca de 9.000 flavonoides⁽³⁸⁾), siendo útiles para diferenciar entre especies de plantas.

PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

Las plantas constituyen una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, conocidos y explotados por el hombre desde hace muchos años. Herbolarios y recetas magistrales obtenidas de la «farmacia de la naturaleza» son fruto de la inagotable biodiversidad de nuestro planeta, lo que en la actualidad ha adquirido un enorme protagonismo y divulgación gracias a la concientización causada por grupos ecologistas y bioconservacionistas, y también a las incursiones cinematográficas que se han realizado sobre estos temas, utilizándolos como base argumental.^(6, 11, 14)

Las posibilidades de la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos para la producción de estas sustancias, evitando así los daños ecológicos causados por la sobreexplotación de las especies productoras en la naturaleza y un mejor control de la producción, produjo grandes expectativas en un principio (Yamada y Fujita, 1983; Berlín, 1984), que poco a poco se fueron moderando, tras comprobarse que, en la práctica, determinadas cuestiones y problemas limitaban notablemente los rendimientos y posibilidades de aplicación de estas metodologías.

Las ventajas que *a priori* presentaba la producción de metabolitos secundarios mediante cultivo de tejidos, como por ejemplo la obtención de productos de mayor pureza, la conversión de sustancias precursoras baratas en compuestos de

alto precio (biotransformación) actuando los cultivos celulares como catalizadores de las reacciones implicadas en dicha transformación (Alfermann y Reinhard, 1980; Berlín, 1984), o la obtención de nuevos compuestos, tropezaron con problemas como la baja concentración del metabolito en los cultivos celulares, y problemas de tipo técnico en los sistemas de biorreactores utilizados en el cultivo del material vegetal, como la necesidad de la planta completa para una correcta síntesis de los compuestos, ya que esta síntesis sólo se realiza en estructuras especializadas de la planta y a nivel celular la síntesis es incompleta o muy reducida.

Otras limitaciones de este sistema son puramente técnicas: dificultades en los procesos de manejo y cultivo del material vegetal, en la extracción y purificación de los productos finales obtenidos, la falta de conocimientos sobre los inductores y los mecanismos genéticos y bioquímicos implicados en la regulación y control de este metabolismo secundario. ⁽²⁹⁾

Sólo unos pocos metabolitos secundarios (shikoninas, ácido rosmarínico, etc.) se utilizan de forma industrial, aunque el caudal de conocimientos adquiridos sobre estas metodologías ha alcanzado un elevado nivel, y muchos de los problemas planteados en las primeras épocas de aplicación industrial han sido resueltos con éxito, lo que sin duda permitirá nuevos avances.

1.2.2 INVESTIGACIÓN Y DESCUBRIMIENTO DE NUEVAS PROPIEDADES MEDICINALES.

Existen numerosos enfoques posibles para la investigación de nuevos principios biológicamente activos en las plantas superiores. Uno de los enfoques es que se puede buscar nuevos compuestos químicos y que aparezcan químicos farmacéuticos dispuestos a ensayar cada sustancia con todos y cada uno de los test farmacológicos disponibles, lo que parece ser un enfoque no muy adecuado ⁽³⁹⁾; otra posibilidad es recoger todas las plantas disponibles, preparar los extractos, y ensayar cada uno de los extractos con referencia a uno o varios tipos de actividad farmacológica. Este método, que se conoce como un barrido amplio (“broad

screening”), puede ser un enfoque razonable que ocasionalmente daría lugar al descubrimiento de medicamentos útiles, pero se encuentra condicionado a la disponibilidad de fondos suficientes y de sistemas predecibles de bioensayos adecuados. Haciendo una revisión de las opciones posibles, cuando se plantea la investigación sobre plantas medicinales para obtener nuevos medicamentos, se pueden adoptar diversos criterios, además de los anteriormente mencionados⁽⁴⁰⁾:

1. Selección basada en los usos tradicionales. Generalmente los usos bien establecidos en la medicina popular suelen estar relacionados con la presencia de sustancias químicas dotadas de actividad biológica.
2. Plantas venenosas. En condiciones normales no se suelen utilizar en medicina popular, pero los venenos procedentes de plantas han demostrado una gran eficacia, utilizados en las dosis adecuadas, en el tratamiento de algunos tipos de enfermedades.
3. Selección basada en la composición química. Se trata de trabajos orientados por la existencia de estudios previos sobre la composición química de un buen número de plantas. Por ejemplo búsqueda de ciertas actividades interesantes entre plantas provistas de alcaloides.
4. Revisión exhaustiva de un número elevado de especies para verificar su actividad biológica. Conocidos con el nombre inglés de “screening” estos trabajos constituyen una exploración preliminar para estudios más profundos.
5. Combinación de varios criterios. Se puede seleccionar el material combinando algunos de los anteriores criterios.

1.2.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

El Tamizaje Fitoquímico o “screening” fitoquímico, es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de principios activos de la planta con solventes apropiados y su determinación mediante la aplicación de reacciones de coloración, precipitación y otras. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben ser interpretadas en conjunto con el “screening” farmacológico.

El tamizaje (“screening”) fitoquímico se realiza para identificar las principales familias de metabolitos secundarios presentes en una planta. Las plantas medicinales representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados; en los países en desarrollo el uso de plantas medicinales representa el 80% del arsenal terapéutico. Las plantas medicinales utilizadas como materia prima para la producción de extractos o para aislamiento de sustancias naturales puras, representan un área en franca expansión. Estas sustancias naturales puras y los extractos purificados o estandarizados adquieren una importancia cada vez mayor pues permiten una mejor caracterización analítica permitiendo así que sean cumplidos de una manera más eficaz los requisitos de calidad, efectividad y seguridad, exigidos a cualquier medicamento moderno, sea natural o sintético ⁽⁴¹⁾.

1.2.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE.

Existen muchas evidencias de que la oxidación de moléculas biológicas, membranas y tejidos, inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, se relaciona con un aumento en la incidencia de las principales enfermedades degenerativas de los seres humanos. Por otro lado, también se ha acumulado abundante información sobre la capacidad de algunos componentes de los alimentos para disminuir o prevenir los procesos de oxidación celular.

El metabolismo oxidativo, proceso biológico normal, es capaz de generar radicales libres oxigenados, altamente reactivos. Esas especies con oxígeno activo incluyen el radical superóxido ($O_2\bullet$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical óxido nítrico ($NO\bullet$) y el oxígeno singlete ($1O_2$). Además, el ser humano está permanentemente expuesto a radiaciones electromagnéticas que rompen el agua generando radicales $OH\bullet$ ⁽⁴²⁾

Debido a que los radicales libres se producen constantemente *in vivo*, los humanos han desarrollado diversos mecanismos de defensa antioxidante, como medio de protección. La enzima superóxido dismutasa remueve el ($O_2\bullet$), convirtiéndolo en H_2O_2 , el cual es transformado por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa en agua (H_2O). Nuestro organismo también posee moléculas que remueven los radicales libres por reacción directa (no catalítica), tales como el glutatión reducido, los tocoferoles (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C). ^(42, 43)

Cuando la defensa antioxidante no es totalmente eficiente, se incrementa la formación de radicales libres en el organismo; a esto se denomina estrés oxidativo. Se dice que ha ocurrido un daño oxidativo cuando el exceso de radicales libres causa daño celular. Muchas sustancias tóxicas son capaces de producir radicales libres y de disminuir nuestra defensa antioxidante, aumentando el estrés oxidativo. El herbicida PARAQUAT[®], el solvente tetracloruro de carbono y el paracetamol, son ejemplos de sustancias químicas que inducen estrés oxidativo. Se cree que muchos de los efectos colaterales de los medicamentos se relacionan con un aumento en el daño oxidativo.

Ante el estrés oxidativo, el organismo debe responder con una defensa antioxidante extra, ya que el estrés oxidativo severo puede causar la muerte de la célula. En las frutas y las legumbres se encuentran muchas sustancias capaces de atrapar radicales libres, mejorando nuestra defensa antioxidante. Entre estas sustancias se encuentran los compuestos polifenólicos (presentes en hojas, frutos), el ácido ascórbico (vitamina C) presente en frutos, los tocoferoles (vitamina E) presentes en semillas; los carotenoides y el elemento selenio. ⁽⁴²⁾

1.2.5. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES.

Los compuestos polifenólicos constituyen una clase de metabolitos secundarios biosintetizados por el reino vegetal, encontrados en alimentos derivados de fuentes vegetales. Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos con por lo menos un grupo hidroxilo. Entre ellos podemos mencionar a los flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas y xantonas, a los ácidos fenólicos, fenoles simples, ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, ligninas, entre otros, los cuales actúan generalmente como capturadores y estabilizadores de radicales libres, pudiendo producir quelación de metales aquellos que poseen grupos carboxílicos en su estructura. También han sido reportados trabajos que atribuyen su acción antioxidante a la inhibición de enzimas prooxidantes como la lipooxigenasa.

El mecanismo de protección de los polifenoles (representado por AOH) ocurre en el estado inicial y más efectivamente durante el estado de propagación de la oxidación, por captura de los radicales libres (R•), inhibiendo de esta manera la reacción en cadena.



La transferencia de electrones desde el radical libre (R•) determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa y este radical así formado debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. A su vez el radical formado puede ser recuperado por otras sustancias antioxidantes (reductoras), como el ascorbato. ⁽⁴⁴⁾

1.2.6. MODELOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Los métodos de medición de la actividad antioxidante *in vitro* muestran extrema diversidad. Muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba. Tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno singlete, y fuente de radicales libres.

La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de éstos; por tanto, se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación. ^(45, 46)

Siguiendo este principio, los métodos de ensayo más modernos para medir la actividad antioxidante mediante la capacidad de secuestro de radicales libres, son los ensayos de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2- picrilhidrazilo). ⁽⁴⁷⁾ Debe mencionarse que los principales métodos para la medición de la actividad antioxidante son medidos mediante absorbancia a diferente longitud de onda en el espectrofotómetro Ultravioleta Visible (UV/VIS). Aunque éstos son los métodos más conocidos y utilizados por su relativa facilidad de desarrollo, existen otros métodos importantes para la determinación de la actividad antioxidante, los cuales se describen a continuación:

A) Método de DPPH (1,1-difenil-2- picrilhidrazilo).

En este ensayo desarrollado por Brand-Williams *et al*, se evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de

radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante. ⁽⁴⁸⁾

B) Método ABTS (ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).

Según la metodología desarrollada por RE *et al.* y descrita por KUSKOSKI *et al.*, el radical ABTS^{•+} se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,1$) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 μL de la muestra. A 980 μL de dilución del radical ABTS^{•+} así generado se le determina la absorbancia a 754 nm a 30°C, se añade 20 μL de la muestra (dilución de antocianos) y luego de 1 minuto se mide de nuevo la absorbancia a 754 nm. Se mide la absorbancia de forma continua hasta 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%) se ensaya a una concentración de 0-15 μM (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) y en actividad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC), en este último caso por tratarse de alimentos. ⁽⁴⁹⁾

C) Método DMPD (Dicloridrato de N, N-Dimetil-p-fenilendiamina).

Se determina la actividad antioxidante aplicando el método propuesto por FOGLIANO *et al.*, Este método se basa en añadir 1 ml de la disolución de DMPD 100 mM a 100 ml de disolución tamponada con ácido acético/ acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 ml de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados (DMPD^{•+}). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90 ($\pm 0,1$), a 506 nm. Se añade 50 μL de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez

minutos (a 25°C) se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. Los resultados se expresan en actividad antioxidante equivalente a TROLOX (TEAC) en mM o μ M, o bien en actividad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC) en mg/L o mg/100g ⁽⁴⁹⁾

D) Método de barrido de Radicales Superóxido.

El método se basa en la capacidad de la muestra para inhibir la formación de complejo azul mediante el barrido de los radicales superóxido generados en el sistema riboflavina - luz - azul de nitrotetrazolio (NBT). Que consiste en que el medio de reacción contiene 2.5 ml de tampón fosfato (pH 7.6), 100 μ l de riboflavina (20 μ g), 200 μ l de Etilendiamino tetraacético (EDTA), (12 mM), 100 μ l de NBT (0.1 mg) y distintas concentraciones de una muestra en 100 μ l de metanol. Para iniciar la reacción, se ilumina la mezcla de reacción durante 5 minutos. La absorbancia se mide a 590 nm. El blanco se realiza de la misma manera, pero con 100 ml. de metanol en lugar de la sustancia de análisis. La capacidad de inhibición (IC_{50}) se calcula como una reducción del 50% en la absorbancia ocasionada por la muestra en comparación con el blanco. Como estándar se utiliza ácido ascórbico en concentraciones acorde a la sustancia de análisis. ⁽⁴⁶⁾

E) Determinación del poder reductor.

El poder reductor se determina por el método de OYAIZU. Se mezclan las muestras con 5 ml de tampón fosfato (pH 6.6) y 5 ml de ferrocianuro potásico 1%; a continuación, se incuba la mezcla a 50 °C durante 20 minutos, se añaden 5 ml de ácido tricloroacético 10% y se centrifuga la mezcla a 4000 r.p.m. Seguidamente, se mezclan 5 ml de solución sobrenadante de lo centrifugado, con 5 ml de agua destilada y 1 ml de cloruro férrico 0.1%. La absorbancia se mide a 700 nm. El aumento de absorbancia de la mezcla de reacción indica un aumento de poder reductor. Como estándar se utilizan 0.3 mg de ácido ascórbico. ⁽⁴⁶⁾

1.2.7. MUESTRAS EN ESTUDIO

A. *Erythrina fusca* Loureiro “Amasisa”.

Clasificación Taxonómica

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Fabales
Familia	:	Fabaceae
Subfamilia	:	Faboideae
Tribu	:	Phaseoleae
Género	:	<i>Erythrina</i>
Especie	:	<i>E. fusca</i>

Sistema: Clasificación Adolph Eugler (1954-1964).⁽⁵⁰⁾

Descripción botánica.

Árbol de hasta 25 m de alto, tronco espinoso. Hojas folioladas; foliolos ovoides hasta elípticos, obtusos en la base y el ápice, de 13 cm de largo por 8 cm de ancho, de color verde pálido, suavemente pubérulas o escamosas en el envés. Inflorescencia terminal racimosa, poco florecida. Flores con cáliz ampliamente campanulado, hasta 1,5 cm de ancho, corola anaranjada. Fruto moniliforme, hasta 20 cm de largo por 1,5 cm de ancho. Semillas marrones o pardas.⁽¹⁴⁾

Información Etnomédica.

La *Corteza* de amasisa rallada y aplicada directamente, es utilizada en la medicina folclórica para combatir las úlceras; el líquido obtenido de un

cocimiento de la corteza se emplea en baños de asiento para atacar las hemorroides; como antiséptico y antimicótico se usa el cocimiento en lavados sobre la zona afectada.

El cocimiento de 250 g de hojas combate las infecciones urinarias; la trituración hasta obtener una masa y aplicada directamente en la parte afectada desinflama la próstata. ^(11, 14)

Estudios Fitoquímicos, Biológicos y Farmacológicos.

De la corteza y flores de amasisa se aislaron los alcaloides isoquinolínicos (+)-epieritratidina y 8-(+)-oxoerisodina, que fueron identificados en base a sus constantes espectroscópicas ⁽²³⁾; otros estudios revelaron la presencia de alcaloides, saponinas, esteroides y triterpenos ⁽¹⁴⁾. Determinaron también la actividad antimicrobiana de extractos crudos y fracciones de éter de petróleo, cloruro de metileno y acetona frente a bacterias y hongos; para la actividad farmacológica realizaron las pruebas de los extractos crudos en ratas albinas adultas, WISTAR. ⁽²³⁾

B. *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham “Huacapurana”.

Clasificación Taxonómica.

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Sub-Clase	:	Rosidae
Orden	:	Fabales
Familia	:	Fabaceae
Subfamilia	:	Caesalpinioideae
Tribu	:	Caesalpinieae
Género	:	<i>Campsiandra</i>
Especie	:	<i>C. angustifolia</i>

Sistema: Clasificación Adolph Eugler (1954-1964).⁽⁵⁰⁾

Descripción botánica.

Huacapurana es un árbol mediano que crece al costado de ríos y corrientes en la cuenca del Amazonas. El nombre común peruano, huacapurana, puede aplicarse a tres especies diferentes de árboles amazónicos estrechamente relacionadas, que son utilizados intercambiamente por habitantes locales: *Campsiandra Angustifolia*, *C. comosa*, y *C. laurifolia*. Cuando en medicina tradicional se usa "huacapurana auténtico" es considerado *Campsiandra angustifolia*.⁽²²⁾ Las tres son árboles de hasta 25 m de alto. Presentan hojas alternas, imparipinnadas, 9 foliolos, estrecho-oblongos de 12 x 6.5 cm, ápice acuminado, haz glabro, envés opaco. Inflorescencia en corimbos terminales. Fruto legumbre coriácea marginada en la sutura dorsal de 20 x 5 cm.⁽¹⁴⁾

Información Etnomédica.

Huacapurana es un remedio común para la fiebre malarial en la Amazonía peruana. En la región de Iquitos, herbalistas y curanderos locales recomiendan que una decocción o un colorante de la corteza, sean tomados dos veces al día para reducir la fiebre relacionada con la malaria. Huacapurana también es recomendada para la artritis y el reumatismo, la diarrea, como tónico, y para otras condiciones febriles. Los nativos witotos utilizan la corteza pulverizada de *C. laurifolia* para tratar heridas. En la región de Loreto – Perú, se ha utilizado un té de corteza de *C. comosa* como tónico postnatal. En Brasil, el árbol tiene el nombre común de cumandá o acapurana y los herbalistas recomiendan la corteza de *C. comosa* como tónico, para la fiebre malarial y para limpiar llagas y úlceras. ^(11, 14, 22)

Estudios Fitoquímicos.

Las sustancias químicas de la corteza de huacapurana no han sido estudiadas completamente ni han sido informadas. No ha habido sustancia química analizada publicada en ningún Journal para fechar. ⁽²²⁾

Estudios Biológicos y Pre – Clínicos.

No hay estudios de laboratorio ni investigación clínica publicada de la corteza de huacapurana, en ningún diario ni publicaciones revisadas. En EE.UU. fabricaron un extracto de huacapurana para venderlo y una universidad en Ecuador fue pagada para realizar varios estudios. Este producto está disponible en el mercado de EE.UU., es recomendado extensamente para la enfermedad de Lyme (enfermedad infecciosa bacteriana causada por *Borrelia burgdorferi*) transmitida al hombre por garrapatas de los ciervos o venados; así como para otras enfermedades microbianas.

Ninguno de estos estudios ha podido ser justificado con documentación independiente de terceros o investigaciones publicadas, ni aún por su uso tradicional. ⁽²²⁾

C. *Swartzia polyphylla* D.C. “Cumaceba”

Clasificación Taxonómica.

Reino : Plantae
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Orden : Fabales
Familia : Fabaceae
Género : *Swartzia*
Especie : *S. polyphylla*

Sistema: Clasificación Adolph Eugler (1954-1964) ⁽⁵⁰⁾

Descripción botánica.

Árbol de hasta 40 m de alto. Hojas alternas, imparipinnadas; pecíolos teretes de 2, 6 cm. de largo, raquis terete, peciólulo de 4 a 5 cm de largo; folíolos de 5 a 15cm, cartilagosos, elípticos o lanceolados, de 4.5 a 15.5 x 1a7 cm, ápice acuminado, base obtusa. Inflorescencias axilares en racimos simples. Flores con el cáliz fusionado, corola reducida a un solo pétalo de color blanco, estambres libres. Fruto legumbre cilíndrico u ovoide, de 6.5 a 12 x 4 a 5 cm marrón claro con lenticelas blancas. ⁽¹⁴⁾

Información Etnomédica.

En el Amazonas, la corteza y la madera del árbol de cumaceba son empleadas como tónico postnatal, para el reumatismo, y para apresurar la curación de fracturas de hueso y dislocaciones. Los nativos Tirios en Surinam preparan la corteza en una decocción para la malaria. Los nativos Shipibo-Conibos utilizan la corteza como antiséptico, y la resina de árbol la utilizan dejándola caer en los ojos contra infecciones, deficiencia de la visión y para lesiones del nervio óptico. Otras tribus en el Amazonas creen que la corteza del árbol da fuerza y previene la pereza. También es utilizado para fortalecer el cuerpo durante la enfermedad y para apresurar la curación. (25)

Dentro de sus principales propiedades, documentadas a través de estudios de investigación que se realizaron en la corteza de cumaceba, es antibacteriana, antimicótica, citotóxica, larvicida e inhibidora de la proteinquinasa C (PKC) En medicina tradicional la corteza de cumaceba es considerada como afrodisíaco y tónico; es recomendado contra *Candida albicans*, infecciones por levadura e infecciones micóticas, para el frío y la gripe, reumatismo, desórdenes hormonales femeninas y como tónico postnatal. (14)

Estudios Fitoquímicos.

Cumaceba es rica en flavonoides e isoflavonas. (18) Contiene una cantidad significativa de una sustancia química de isoflavona llamada biocanina A que ha sido bien estudiada y documentada (más de 150 estudios publicados para fecha). Biocanina A es una sustancia química que se refirió como un "Fitoestrógeno", es encontrada en otras plantas como el trébol rojo (la fuente más rica de biocanina A). Los fitoestrógenos son moléculas que se parecen a las hormonas humanas (estrógeno y/o progesterona) y por lo que pueden ejercer algún tipo de actividad estrogénica, interactuando con receptores de estrógeno en el cuerpo humano llamados Moduladores Selectivos de Receptor de Estrógeno o SERM's. Mientras existan investigaciones que opinen lo contrario, generalmente biocanina A ha sido documentada con

acciones de los SERM's, la capacidad de disminuir los niveles del Antígeno Específico Prostático (PSA en ingles) en células de cáncer de próstata, las acciones cáncer-preventivos, y dirigir las acciones antitumorales y citotóxicas contra dos puntos: el cáncer de mama y cáncer de próstata. ⁽²⁵⁾

La corteza de cumaceba ha sido documentada por contener biocanina A dalbergioidina, dihidrocajanina, dihidrolicoisoflavona, dihidrobiocanina A, ferreirina, ferreirinol, formononetina, naringenina y T-cadinol.

Actividades Biológicas e Investigación Clínica.

Los científicos han confirmado *in vitro* que cumaceba es un buen antibacteriano. ⁽¹⁸⁾ Ha sido reportado como letal para el *Mycobacterium tuberculosis*, varios antibiótico-resistentes, bacterias del estómago ligadas al cáncer de úlceras y estómago (*H. pylori*), bacterias en las cavidades de la boca que causan la gingivitis y otras bacterias Gram-positivas. Cumaceba también ha sido documentada por tener acciones contra hongos y *Candida*. ^(18, 19) La mayor parte de estos investigadores han atribuido las acciones antibacterianas de cumaceba a sus sustancias químicas como la isoflavona. ⁽²⁵⁾

Otro grupo de investigación que identificó una nueva isoflavona en la cumaceba, informó que un extracto de etanol del duramen (así como la nueva sustancia química que ellos descubrieron) pudo inhibir la Proteínquinasa C (PKC). Inhibidores de PKC han tenido mucho interés de la ciencia mundial, existiendo la evidencia que demasiada concentración de enzima de PKC es implicada en una gran variedad de procesos de enfermedades, inclusive artritis, asma, tumores cerebrales, cáncer y enfermedades cardiovasculares.

2. DEFINICIONES OPERACIONALES

Variable Independiente.

- 1.- Extractos de las cortezas de *Erythrina fusca* Loureiro, *Swartzia polyphylla* DC., y *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham.

Indicador:

- Pesos de las cortezas de *Erythrina fusca* Loureiro, *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham y *Swartzia polyphylla* DC.

Variable Dependiente.

- 1.- Metabolitos secundarios presentes en los extractos de las cortezas de *Erythrina fusca* Loureiro, *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham y *Swartzia polyphylla* DC.

Indicadores:

- Reacción ante los reactivos identificación fitoquímica (coloración y precipitación).
- Valores de Rf de las manchas reveladas en las placas cromatográficas.

- 2.- Actividad antioxidante de los extractos de las cortezas de *Erythrina fusca* Loureiro, *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham y *Swartzia polyphylla* DC.

Indicadores:

- Determinación del Tiempo de Secuestro de los radicales libres.
- Determinación del valor de la absorbancia, medido en el espectrofotómetro U.V. y Visible.
- Determinación de la capacidad de secuestro y/o inhibición de los radicales libres.

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
<p>Extractos de cortezas de <i>Erythrina fusca</i> Loureiro “AMASISA”, <i>Campsiandra angustifolia</i> Spruce ex Bentham “HUACAPURANA” y <i>Swartzia polyphylla</i> DC. “CUMACEBA”</p>	<p>Productos de la extracción de metabolitos secundarios presentes en las partes vegetales, que se realizan con solventes orgánicos.</p>	<p>Los extractos fueron obtenidos por maceración con éter dietílico, etanol 95% y agua, indistintamente de partes vegetales, durante 24 - 48 horas. Los extractos metanólico y diclorometánico se obtuvieron por baño maría a 60 °C por 5 – 15 minutos. Posteriormente fué filtrado y concentrado en rotavapor. El extracto ácido – básico fué obtenido por ebullición de ácido sulfúrico 2% por 30 minutos, llevado a pH 11 con amoniaco y extraído con diclorometano.</p>	<p>Pesos de las cortezas de <i>Erythrina fusca</i> Loureiro, <i>Campsiandra angustifolia</i> Spruce ex Bentham y <i>Swartzia polyphylla</i> DC.</p>	<p>Intervalar -Tipo: Cuantitativo</p>

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
1. Actividad antioxidante de los Extractos de cortezas de <i>Erythrina fusca</i> Loureiro, <i>Campsiandra angustifolia</i> Spruce ex Bentham y <i>Swartzia polyphylla</i> DC.	Capacidad de inhibición o secuestro de radicales libres.	Actividad antioxidante de las moléculas responsables contenidas en los extractos de <i>Erythrina fusca</i> Loureiro, <i>Campsiandra angustifolia</i> Spruce ex Bentham y <i>Swartzia polyphylla</i> DC.	Se prepararon las soluciones stock, y a partir de éstas, se tomaron alícuotas que fueron colocadas en cubetas de poliestireno, las cuales fueron medidas por espectrofotometría a 517 nm. A medida que hubo un mayor secuestro de los radicales libres por un antioxidante, la absorbancia disminuía.	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de secuestro y/o inhibición de radicales libres. • Tiempo de secuestro de radicales libres. • Valor de la absorbancia medida en el espectrofotómetro UV/VIS. 	<ul style="list-style-type: none"> • Intervalar -Tipo: Cuantitativo • Intervalar - Tipo: Cuantitativo • Intervalar - Tipo: Cuantitativo

<p>2. Metabolitos Secundarios presentes en los extractos de las cortezas de <i>Erythrina fusca</i> Loureiro, <i>Campsiandra angustifolia</i> Spruce ex Bentham y <i>Swartzia polyphylla</i> DC.</p>	<p>Compuestos químicos sintetizados por las plantas y que cumplen funciones secundarias en ellas.</p>	<p>Metabolitos secundarios contenidos en cada muestra de extracto.</p>	<p>Se prepararon los extractos y a partir de éstos se tomaron alícuotas que fueron colocadas en tubos de ensayos, se agregaron en ellas reactivos específicos para que reaccionen según el tipo de metabolito que se estuvo evaluando.</p> <p>Se tomaron alícuotas más pequeñas, entre 10 y 30 ul, y se colocaron en placas cromatográficas de Silicagel, sometidas a una fase móvil, observándose las manchas que se produjeron.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia o ausencia de coloración, precipitación o ambas. • Valores de Rf de las manchas reveladas en las placas cromatográficas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Nominal - Tipo: Cualitativo • Intervalar - Tipo: Cuantitativo
---	---	--	---	---	--

3. HIPÓTESIS

- 3.1. Los extractos etéreos, etanólicos y acuosos de las cortezas de *Erythrina fusca* Loureiro (Amasisa), *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham (Huacapurana) y *Swartzia polyphylla* DC. (Cumaceba), presentan grupos importantes de metabolitos secundarios.

- 3.2. Los extractos metanólicos de las cortezas de *Erythrina fusca* Loureiro (Amasisa), *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham (Huacapurana) y *Swartzia polyphylla* DC. (Cumaceba), presentan actividad antioxidante.

CAPÍTULO III

1. MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

- Tipo de estudio

Descriptivo-correlacional

Prospectivo: en el registro de la información se consideraron los hechos a partir de la fecha de estudio.

Transversal: se estudiaron las variables en un momento dado del período de investigación.

- Diseño de investigación

Ensayo pre-clínico *in vitro*, con grupos elegidos al azar, bajo condiciones controladas.

La distribución de los grupos de estudio se realizó según el siguiente esquema de tratamiento:

1.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

- **Selección de la materia prima:** se seleccionaron las cortezas en buen estado de conservación.
- **Secado de la materia prima:** las cortezas se secaron en una estufa a 60°C durante 24 horas.

1.1.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

- **Obtención del extracto etéreo:** se pesan 50 gramos de cada una de las cortezas previamente molidas y se agregan 500 ml de éter dietílico q.p.; dejándolo en maceración durante 24 a 48 horas y luego se filtra.
- **Obtención del extracto etanólico:** se pesan 50 gramos de cada una de las cortezas previamente molidas y se agregan 500 ml de Etanol al 95%; dejándolo en maceración durante 24 a 48 horas y se filtra.
- **Obtención del extracto acuoso:** se pesan 50 gramos de cada una de las cortezas previamente molidas y se agregan 500 ml de agua destilada a temperatura ambiente; se deja en maceración durante 24 a 48 horas y se filtra.

1.1.2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

- **Obtención del extracto metanólico:** se pesan de 1 a 2 gramos de cada una de las cortezas molidas y se agregan de 10 a 15 ml de metanol en baño maría a 60 °C durante 5 minutos; luego se filtra.
- **Obtención del extracto Diclorometánico:** se pesan de 1 a 2 gramos de cada una de las cortezas molidas y se agregan 10 a 15 ml de Diclorometano por 15 minutos en reflujo; se filtra, se concentra a sequedad y se redissuelve con tolueno.
- **Obtención del Extracto Ácido – Base:** de 1 a 2 g de cada una de las cortezas molidas, se le agregan 30 ml de ácido sulfúrico al 2 % a ebullición por 30 minutos, se filtra, se enjuaga el residuo con mililitros necesarios de H₂SO₄ 2% caliente; el filtrado se lleva a pH 11 con amoníaco y se extrae con diclorometano (10 ml x 5 veces).

1.2 MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR

El método que se utilizó para el tamizaje de las muestras fue el descrito por el Departamento de Farmacognosia de la Universidad Médica de Budapest (Hungría) y por el Departamento de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, adoptado por el Departamento de Fitoquímica del IMET-EsSALUD, con el protocolo de estudio respectivo.

Técnica Operatoria: Se macera al medio ambiente 5 gramos de droga cruda en 50 ml de éter dietílico durante 24 a 48 horas, luego se filtra el extracto etéreo y se distribuyen alícuotas de 5 ml en 6 tubos de ensayo, concentrando los tubos a sequedad en baño maría, para identificar: alcaloides, triterpenos-esteroides, quinonas, cumarinas, carotenos, aceites esenciales y grasas.

El residuo libre de éter dietílico de la etapa anterior, se seca y se macera 50 ml de etanol al 95% durante 24 a 48 horas, luego se filtra el extracto etanólico y el filtrado se distribuye en alícuotas de 5 ml en 5 tubos de ensayos para identificar: azúcares reductores, saponinas, aminoácidos y aminas, cumarinas, fenoles y taninos. El resto de este extracto metanólico es llevado a sequedad, redissuelto luego con 10 ml de HCl al 10%, se calienta y se filtra por dos veces. Con 1 ml del filtrado se realizan la prueba para alcaloides y el resto se ajusta a pH 9 con amoníaco, se añaden 0.9 gramos de sulfato de sodio, se filtra y se extrae 2 veces con 15 ml de cloroformo. Con 2 ml de la fase acuosa se identifican flavonoides. La fase clorofórmica se distribuye en alícuotas de 5ml en 3 tubos de ensayo y se concentra a sequedad para identificar glicósidos cardiotónicos, flavonoides y quinonas.

El residuo libre de etanol se macera con 50 ml de agua destilada durante 24 a 48 horas, luego se filtra y distribuye en alícuotas de 5 ml en 8 tubos de ensayo, para identificar alcaloides, azúcares reductores, fenoles y taninos, saponinas, flavonoides, mucílagos, principios amargos y principios astringentes y glicósidos.

En el **esquema N° 01 (Ver Anexos)** se muestra el flujo completo del proceso de recolección y análisis de datos seguido en el presente trabajo, donde se puede observar el orden secuencial de los procedimientos descritos.

La identificación de la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios, estuvo sujeta a la aplicación de los siguientes ensayos:

1. **Identificación de Alcaloides**

◆ *Ensayo de Dragendorff*

La fracción disuelta en 1 ml de solución de ácido clorhídrico al 1%, con ausencia de solvente orgánico se mezcla con una gota del reactivo; si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++) de color rojo ladrillo. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade I gota de ácido clorhídrico concentrado y se procede de la misma forma.

◆ *Ensayo de Mayer*

Proceder de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añadir una pizca de cloruro de sodio en polvo, agitar y filtrar. Añadir II o III gotas del reactivo; si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) o precipitado coposo (+++) de color crema, indica reacción positiva.

◆ *Ensayo de Wagner*

Al igual que en los casos anteriores, se parte de la solución ácida, añadiendo II o III gotas de reactivo, clasificando los resultados de la misma forma. Un resultado positivo se indica por un precipitado carmelita.

2. **Identificación de Triterpenos y Esteroides**

◆ *Ensayo de Salkowski*

En un tubo de ensayo colocar 1 ml de fracción disuelta en cloroformo con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Un ensayo positivo se indica por una coloración amarillo rojiza.

3. **Identificación de Quinonas**

◆ *Ensayo de Borntrager*

La fracción disuelta en 1 ml de cloroformo se agita con 1 ml de solución de Hidróxido de sodio, de potasio o de amonio al 5 % en agua. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo (naftaquinona y antraquinona)

El ensayo no excluye presencia de quinonas, ya que pueden encontrarse en forma de Glicósidos, siendo necesaria la hidrólisis previa de los mismos para su posterior detección.

4. **Identificación de Cumarinas**

◆ *Ensayo de Baljet*

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamientos lactónicos en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo, como: las lactosas sesquiterpénicas, cardiotónicos, etc.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño maría y disolverse en la menor cantidad de alcohol (1 ml). En estas condiciones se adiciona 1 ml del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de precipitado rojo o coloración roja.

5. **Identificación de Carotenos**

◆ *Ensayo de Carr – Price*

A una alícuota del extracto etéreo (éter de petróleo) se le adiciona 1 ml del reactivo. La aparición de una coloración verde azulada indica la presencia de carotenos.

6. **Identificación de Aceites esenciales y Sustancias Grasas**

◆ *Ensayo de Sudán*

A una alícuota de la fracción en el solvente de extracción se le añade 1 ml de una solución diluida en agua del colorante Sudán III. Se calienta en baño de agua hasta la evaporación del solvente. La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro indica la presencia de lípidos y/o aceites esenciales.

Para el ensayo del papel blanco con aceites esenciales sin reactivos, se coloca la gota y se deja secar al aire. En caso positivo, la mancha muestra transparencia vista a trasluz. Se calienta el papel a 110 °C. Si al calentar la mancha se hace más transparente, es signo de positividad para aceites y grasas.

7. **Identificación de Azúcares Reductores**

◆ *Ensayo de Fehling*

El residuo se divide en 1 a 2 ml de agua en caso que la fracción no sea acuosa, se adicionan 2 ml de reactivo, se calienta la mezcla en baño de agua durante 10 a 30 minutos. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

8. **Identificación de Saponinas**

◆ *Ensayo de la Espuma*

Permite reconocer la presencia de saponinas tanto del tipo esferoidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la muestra fuertemente durante 2 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma de 2 mm de altura en la superficie del líquido y persiste por más de 2 minutos.

9. **Identificación de Fenoles y Taninos**

◆ *Ensayo de Cloruro Férrico*

A la fracción disuelta en 1 ml de etanol, se añade 0.5 ml de una solución de cloruro férrico al 5% en solución salina. La aparición de un color o precipitado verde oscuro indica la presencia de fenoles y/o taninos. En el extracto acuoso se adiciona acetato de sodio previo al ensayo.

10. Identificación de Aminoácidos y Aminas

◆ *Ensayo de Ninhidrina*

Se toma una alícuota de extracto en alcohol, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, evaporar a sequedad; en ambos casos se mezclan con 2 ml de solución al 0,2% de ninhidrina en alcohol. La mezcla se calienta de 5 a 10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.

11. Identificación de Glicósidos Cardiotónicos

◆ *Ensayo de Kedde*

La fracción se disuelve en 1 ml de alcohol etílico, se mezcla con 1 ml del reactivo y se deja reposar durante 5 – 10 minutos. Un ensayo positivo es cuando se desarrolla una coloración violácea persistente durante 1 a 2 horas.

12. Identificación de Flavonoides

◆ *Ensayo de Shinoda*

A 2 ml de fracción acuosa o el residuo disuelto en 2 ml de agua, se le adiciona 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de magnesio metálico o zinc metálico. Cuando la reacción termina, se añade 1 ml de alcohol amílico y se agita.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, anaranjado o rojo, intenso en todos los casos.

13. **Identificación de Mucílagos**

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estructuras tipo polisacáridos, que forman un coloide hidrófilo que aumenta la densidad del agua cuando se extrae.

Para ello una alícuota del extracto se enfría de 0 a 5 °C y si la solución toma una consistencia gomosa al tacto, el ensayo es positivo.

14. **Identificación de Principios Amargos**

El ensayo se realiza tomándole el sabor a 1 gota del extracto acuoso del vegetal.

15. **Identificación de Glicósidos**

◆ *Ensayo de Molish*

En un tubo de ensayo colocar 2 ml del extracto acuoso y añadir unas gotas de solución alfa-naftol al 5 % en etanol. Se mezcla y por la pared del tubo se adiciona 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un anillo violáceo en la interfase indica una reacción positiva.

1.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Los métodos de extracción y los procedimientos que se desarrollaron en esta parte, se realizaron guiándose por el atlas de cromatografía en capa fina, descrito por Hildebert Wagner y Sabine Bladt. ⁽⁵¹⁾

Como Fase Estacionaria se utilizaron Placas cromatográficas TLC (Thin Layer Chromatography) en base de aluminio, de Silicagel60 F₂₅₄, (Merck, Darmstadt, Germany).

Como Fase Móvil, se utilizaron a una serie de solventes polares y no polares:

- Acetato de Etilo: Acido Fórmico: Acido Acético Glacial: Agua (100: 11: 11: 26).
- Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100 : 13.5 : 10).
- Butanol: Ácido acético glacial: Agua (4 : 1 : 5)
- Tolueno: Acetato de Etilo (7 : 3)
- Cloroformo: Metanol (10 : 1)

La detección de los metabolitos secundarios, después de cada corrida cromatográfica, se realizaron mediante exposición de las placas a la luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm, y por reactivos específicos para cada metabolito.

1.4 MÉTODO DE DPPH

Para evaluar la actividad antioxidante se utilizó el método de LEBEU *et al.*, (2000), por reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), con absorbancia de 515 nm.

Técnica operatoria: Se prepararon las siguientes soluciones stock:

- a) 10 ml de solución 1 mM DPPH en Metanol.
- b) 10 ml de solución 1 mM Ácido Ascórbico.

A partir de la solución stock (a) se prepararon 30 ml de 100 μ M DPPH en metanol. Simultáneamente se prepararon concentraciones crecientes de 30 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 3 μ M y 1 μ M de ácido ascórbico a partir de la solución stock (b). Vale decir que esta etapa de la investigación, tiene como propósito evaluar el estado de oxidación del radical DPPH; una vez establecido que el producto a utilizar se encuentra en condiciones óptimas, se procedió a evaluar las muestras en estudio.

Se prepararon los extractos clorofórmicos, metanólicos y acuosos de las muestras, se evaporaron los solventes y se redisolviaron en metanol, como parte del método, pues el radical DPPH es soluble solo en metanol; todas las muestras tuvieron como concentración final 2.5 mg/ml al momento de la evaluación (inicialmente 1g en 10 ml de solvente)

En una cubeta de poliestireno se agregaron 25 μ L de muestra de las concentraciones de las cortezas a 975 μ L de la solución de 100 μ M DPPH. Esto con la finalidad de explorar el porcentaje de inhibición de los extractos, siendo la fracción metanólica el que presentó porcentajes por encima del 50 %; se decidió entonces evaluar la actividad antioxidante de este extracto, determinando su IC₅₀.

La inhibición de los radicales libres DPPH[•] fue determinada por la variación del color de la solución que vira del color violeta al amarillo, que es medido por espectrofotometría a 515 nm. A medida que hubo un mayor secuestro de los radicales libres por un antioxidante, la absorbancia disminuyó.

Para calcular la capacidad de secuestro de radicales DPPH• para cada muestra, se utilizó la siguiente expresión:

$$PI = [(A_{DPPH} - A_{muestra(t)}) / A_{DPPH}] \times 100$$

Donde:

PI = Porcentaje de Inhibición.

A_{DPPH} = Absorbancia del radical DPPH sin muestra de ensayo.

A_{muestra(t)} = Absorbancia del radical DPPH con la muestra de ensayo en tiempo t.

Para calcular el IC₅₀, valor que representa la concentración a la que las muestras llegan a obtener el 50 % de inhibición de radicales libres en el ensayo *in vitro*, se utiliza la siguiente expresión:

$$IC_{50} = C_1 - [(C_1 - C_2) \times (PI_1 - 50)] / (PI_1 - PI_2)$$

Donde:

IC₅₀ = Capacidad Inhibitoria al 50%

C₁ y **C₂** corresponden a las concentraciones en las que se producen **PI₁** y **PI₂**, respectivamente.

PI₁ y **PI₂** corresponden a los valores de porcentajes de inhibición inmediatamente superiores e inferiores al 50% de inhibición.

1.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Técnica operatoria: A 2 g de muestra, previamente secada y molida, se le añaden 20 ml de Metanol, se calienta en baño maría por 10 minutos a 60° C y se filtra en caliente, obteniéndose así la fracción total a una concentración de 100 mg/ml.

Se prepara una solución stock de 50 mM de Catequina y a partir de ella disoluciones de 3 mg/ml, 1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml y 0 mg/ml para construir la curva estándar. Posteriormente se agrega 1.58 ml de agua milipore a 20 ul de los estándares, a las muestras (por triplicado) y al control (agua milipore) respectivamente; luego vortéar.

Se agrega 100ul de la solución de Folin Ciocalteu, se incuba por 1 minuto a temperatura ambiente; se neutraliza la reacción agregando 300 ul de una solución de Carbonato de Sodio al 20%, dejando reposar por 2 horas, tiempo en el que hay una reacción completa. De cada uno de los tubos se Coloca 1 ml, en la cubeta de poliestireno para leer la absorbancia por espectrofotometría a 700 nm.

2. POBLACIÓN Y MUESTRA

Población vegetal: Conjunto de arbustos de *Erythrina fusca* Loureiro, *Swartzia polyphylla* DC., y *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham, que se encuentran en el Jardín Botánico del Instituto de Medicina Tradicional (IMET) de ESSALUD, sito en Pasaje San Lorenzo # 205, Iquitos-Perú.

Muestra vegetal: Se emplearon aproximadamente 1 kilo de cortezas de cada especie en estudio, que fueron recolectadas del Jardín Botánico del IMET-ESSALUD con sede en la ciudad de Iquitos, en los meses de marzo a abril del 2008. Almacenadas luego en el laboratorio de biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), donde las cortezas fueron triturados con un molino manual.

Criterios de inclusión.

- Cortezas en buen estado de *Erythrina fusca* Loureiro, *Swartzia polyphylla* DC., y *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham

3. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

Reactivos

- 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).
- Ácido ascórbico Q.P.
- Agua destilada desionizada (ddH₂O)
- Folin-ciocalteu.
- Ácido metafosfórico
- Agua nanopura.
- Cloruro de Hierro hexahidratado p.a.
- Acido clorhídrico fumante 37% p.a.
- Alcohol amílico p.a.
- Acido acético glacial 100% p.a.
- Anhídrido acético p.a.
- Etanol absoluto p.a.
- Hidróxido de potasio p.a.
- Cloruro de mercurio (II) p.a.
- Ácido sulfúrico 95 – 97% p.a.
- Yoduro de potasio p.a.
- Yodo puro resublimado p.a.
- Ácido nítrico 65% p.a.
- Ácido pícrico p.a.
- Cloroformo p.a.
- Sulfato de cobre pentahidratado p.a.
- 1- Naftol p.a.
- Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado p.a.
- Citrato de sodio dihidratado p.a.
- Carbonato de sodio anhidro p.a.
- Glicerina 87% p.a.
- Benceno p.a.

- Ácido oxálico dihidratado p.a.
- Isobutanol p.a.
- Diclorometano p.a.
- Tolueno p.a.
- Acetato de etilo p.a.
- Bencina de petróleo p.a.
- Nitrato de plata 99.8% p.a.
- n-Hexano p.a.
- Ácido fórmico 98 – 100% p.a.
- Éter dietílico p.a.
- Amoníaco en solución al 25% p.a.
- 2-propanol.
- Sulfato de sodio anhidro p.a.
- Etanol 95 %.
- Cloruro férrico p.a.
- Ninhidrina p.a.
- Limaduras de magnesio.
- Ácido 3,5–dinitrobenzoico p.a.
- Subnitrato de bismuto pentahidratado p.a.
- Cloruro de antimonio p.a.
- Vainillina.
- Agua destilada.

Materiales de Laboratorio

- Matraz de Erlenmayer 500 ml.
- Fiolas (10 a 250 ml).
- Balones de 250 a 500 ml de fondo plano esmerilado con tapa color ámbar.
- Pera de decantación de 500 a 1000 ml color ámbar.
- Balones en forma de pera de 250 ml esmerilado con aforado color ámbar.
- Probetas de 50, 100, 250 ml.

- Cronómetro digital.
- Guantes quirúrgicos N° 7 ½.
- Micropipetas de 0.5 a 1000uL.
- Tips descartables.
- Espátula mediana.
- Marcador de vidrio.
- Placas cromatográficas Sílicagel 20 x 20 cm., base de vidrio y aluminio.
- Mascarillas descartables.
- Papel toalla.
- Papel filtro.
- Tijeras.
- Cubetas de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4.5 cm).
- Pipetas 1 a 10 ml.
- Embudos de vidrio.
- Buretas 50 ml.

Material Vegetal

- 1) Cortezas de *Erythrina fusca* Loureiro, “AMASISA”.
- 2) Cortezas de *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham, “HUACAPURANA”.
- 3) Cortezas de *Swartzia polyphylla* DC. “CUMACEBA”.

Equipos

- Espectrofotómetro U.V./VIS THERMO ELECTRON CORPORATION Génesis 6.
- Rotavapor BUCHI.
- Estufa THERMOLYNE Modelo 9000.
- Baño maría equipado con agitador magnético – SCORPION SCIENTIFIC.
- Aparato de extracción - SCORPION SCIENTIFIC.
- Centrífuga refrigerada - BECKMAN, AVANTI j-25.
- Campana de Seguridad – TERRA UNIVERSAL.
- Vorteador - SCORPION SCIENTIFIC.
- Balanza analítica - METTLER TOLEDO AG 204.
- Cámara fotográfica LUMIX– PANASONIC.
- Cámaras Cromatográficas 20 x 20 cm. MERCK.

4. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

4.1. Recolección de las muestras vegetales.

Fueron recolectados del Jardín Botánico del IMET - EsSALUD, que está ubicado en la ciudad de Iquitos, capital del Departamento de Loreto, a orillas del Río Amazonas en la Selva Baja, a una altura de 116 msnm, Latitud Sur de 03° 45' 18'' y Longitud Oeste de 73° 14' 00'' aproximadamente, en una zona de vida considerada Bosque Tropical Húmedo, de terreno arenoso, ligeramente ácido y con buen contenido de materia orgánica; con una temperatura media anual de 26° C y una precipitación pluvial de 2,727 mm al año.

Para la identificación de la muestra vegetal, se utilizó como patrones de comparación las plantas herborizadas del Herbarium de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP).

Además, en la recolección de las muestras vegetales se tuvo en consideración los siguientes factores:

- Edad de la planta.
- Estado vegetativo.
- Temporada de recolección.

4.2.- Recopilación de datos de los ensayos.

Se utilizó la observación directa, medición y registro de: las reacciones de coloración en la identificación de los metabolitos secundarios; el Rf y otras características que se observaron de la cromatografía en capa fina; la absorbancia para identificar la capacidad de secuestro de los radicales libres que fueron expresados como IC₅₀. Previamente se identificó la concentración total de polifenoles mediante la medición de la absorbancia.

5. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos en los ensayos, se expresaron en términos de valores resultantes y se expresaron de la siguiente manera:

- ❖ Porcentaje de inhibición (IC₅₀) obtenidos mediante los valores de absorbancia de las muestras en estudio.

- ❖ Se calculó la media y la desviación estándar como medidas de tendencia central, que fueron presentadas mediante tablas y gráficos.

- ❖ Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

- ❖ Todo el procedimiento se realizó con el programa SPSS versión 18.0

CAPÍTULO IV

1. RESULTADOS

1.1 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

En el cuadro N° 01 se presenta el tamizaje fitoquímico de la corteza molida de las tres especies en estudio, *Swartzia polyphylla* D.C. (Cumaceba), *Erythrina fusca* Loureiro (Amasisa) *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham (Huacapurana). Las figuras del 4 al 14, muestran las reacciones producidas en el ensayo (ver Anexos).

CUADRO N° 01.- Resumen general de los resultados obtenidos en el Tamizaje Fitoquímico de las Muestras en Estudio

METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBAS	REACCIONES								
		<i>Swartzia polyphylla</i>			<i>Erythrina fusca</i>			<i>Campsiandra angustifolia</i>		
		Éter	EtOH	H2O	Éter	EtOH	H2O	Éter	EtOH	H2O
Alcaloides	<i>Dragendorff</i>	0	0	0	0	0	0	0	+	0
	<i>Mayer</i>	0	0	0	0	0	+	0	+	+
	<i>Wagner</i>	0	0	0	0	0	+	0	+	+
Triterpenos y Esteroides	<i>Salkowski</i>	++	-	-	++	-	-	+	-	-
Quinonas	<i>Bornträger</i>	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Cumarinas	<i>Baljet</i>	0	0	-	0	0	-	++	++	-
Carotenos	<i>Carr – Price</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Aceites Esenciales-Grasas	<i>Reactivo Sudán</i>	++	-	-	++	-	-	++	-	-
Azúcares reductores	<i>Reactivo Fehling</i>	-	++	+++	-	+	++	-	+++	+++
Saponinas	<i>Espuma</i>	-	+	+++	-	+	+++	-	+++	+++
Fenoles y Taninos	<i>Cloruro Férrico</i>	-	0	+++	-	0	++	-	++	++
Aminoácidos	<i>Ninhidrina</i>	-	0	-	-	+++	-	-	0	-
Glicósidos Cardiotónicos	<i>Reactivo Kedde</i>	-	0	-	-	0	-	-	0	-
Flavonoides	<i>Shinoda</i>	-	+	++	-	++	++	-	++	++
Mucílagos	<i>Tacto</i>	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Princ. Amargos y Astring.	<i>Sabor</i>	-	-	+	-	-	++	-	-	+
Glicósidos	<i>Molish</i>	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++

(+++) Abundante; (++) Moderado; (+) Leve; (0) Ausente; (-) No se realizó

1.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO

En los cuadros N° 02, 03 y 04, se presentan los perfiles cromatográficos realizados a las cortezas molidas de huacapurana, amasisa y cumaceba, respectivamente; con sus sistemas de trabajo y reveladores apropiados. Las figuras 15, 16 y 17 ayudan a visualizar dichas manchas (*ver Anexos*).

CUADRO N° 02. - Perfil Cromatográfico de la Corteza molida de *Campsiandra angustifolia*

SISTEMA	Rf	Revelador	Observaciones	Metabolitos
AcOEt: MeOH: H ₂ O (100:13.5:10) (Figura 15, 15a)	0.75 – 0.81	UV – 254 nm	Mancha de color pardo oscuro	Cuerpos Fenólicos y Flavonoides.
	0.83	UV – 366 nm	Color amarillo fluorescente	Flavonas, Isoflavonas, Alcaloides.
	0.90	UV – 366 nm	Color celeste fluorescente	Flavonas y Flavononas; Flavonoles sin 5-OH libre, isoflavonas.
	0.96	UV – 366 nm	Color amarillo fluorescente	Auronas o algunas Chalconas
SISTEMA	Rf	Revelador	Observaciones	Metabolitos
BAW (4:1:5) (Figura 15b)	0.18	UV – 254 nm	Manchas disconformes	Restos de Compuestos cerca de la salida
	0.44	UV – 254 nm	Fluorescencia celeste	Rutina, Ácido clorogénico
	0.6	UV – 254 nm	Fluorescencia Azul	Luteolinglucósidos, Apigeninas e Hiperósidos
	0.68	UV – 254 nm	Fluorescencia amarilla	Isoquercetrinas
	0.8	UV – 254 nm	Fluorescencia celeste	Ácido cafeíco y ácido ferúlico

CUADRO N° 03. - Perfil Cromatográfico de la Corteza molida de *Erythrina fusca*

SISTEMA	Rf	Revelador	Observaciones	Metabolitos
AcOEt: MeOH: H ₂ O (100:13.5:10) (Figuras 16 y 16a)	0.19	UV – 254 nm	Mancha de color pardo oscuro	Compuestos fenólicos
	0.33	UV – 254nm	Color amarillo fosforescente	Fenoles, Flavonoides, Glicósidos.
	0.4	UV – 254 nm	Color celeste fosforescente	Flavonas, Flavononas, ciertas Cumarinas
	0.45	UV – 254 nm	Color amarillo fosforescente	Flavonoles
	0.04	UV – 366 nm	Color amarillo fosforescente	Auronas o algunas Chalconas.
	0.13	UV – 366 nm	Color anaranjado oscuro	Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre.
	0.44	UV – 366 nm	Color amarillo fosforescente	Flavonas, Isoflavonas, Alcaloides.
	0.96	UV – 366 nm	Color anaranjado oscuro	Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre.
SISTEMA	Rf	Revelador	Observaciones	Metabolitos
AcOEt: ác. form: AAg: H ₂ O (100: 11: 11: 26) (Figura 16b)	0.3	UV – 366 nm	Color amarillo fosforescente	-
	0.4	UV – 366 nm	Color amarillo verdoso	Fenoles, Flavonoides
	0.48	UV – 366 nm	Color anaranjado	Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre.
	0.38	UV – 366 nm	Color amarillo fosforescente	Auronas
	0.44	UV – 366 nm	Color celeste fosforescente	Flavonas, Flavononas
	0.98	UV – 366 nm	Color anaranjado oscuro	Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre.
	0.31	UV – 254 nm	Color amarillo oscuro	Auronas y Chalconas
	0.49	UV – 254 nm	Color pardo	Fenoles y Flavonoides.
	0.4	UV – 254 nm	Color pardo	Fenoles y Flavonoides.
	0.98	UV – 254 nm	Color pardo	Fenoles y Flavonoides.

CUADRO N° 04. - Perfil Cromatográfico de la Corteza molida de *Swartzia polyphylla*

SISTEMA	Rf	Revelador	Observaciones	Metabolitos
AcOEt: Ac. For: AAG: H ₂ O (100: 11: 11: 26) (Figura 17)	0.6	UV – 254 nm	Fluorescencia celeste	Orientina, Vitexinas e Hiperósidos
	0.77	UV – 254 nm	Fluorescencia celeste	Ácido clorogénico o Isoclorogénicos
	0.88	UV – 254 nm	Fluorescencia celeste	Quercetina, Kaempferol

1.3 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de polifenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu, que fueron expresados como equivalentes a Catequina (CTQ) por cada 100g de extracto bruto, son representados en el Cuadro 05; la cual indica una alta concentración de estos compuestos, destacando la Huacapurana con 18759.49 mg de CTQ/100g, seguido de Amasisa con 15859.49 mg de CTQ/100g y Cumaceba con 9066.16 mg de CTQ/100g. (Ver Gráfico N° 01 en el Anexo)

CUADRO N° 05.- Concentración de Polifenoles en las tres especies de fabáceas en estudio

Muestra	Polifenoles Totales (mg de CTQ/100g) ± DESVEST
Huacapurana	18 759.49 ± 0.228
Amasisa	15 859.49 ± 0.086
Cumaceba	9 066.16 ± 0.044

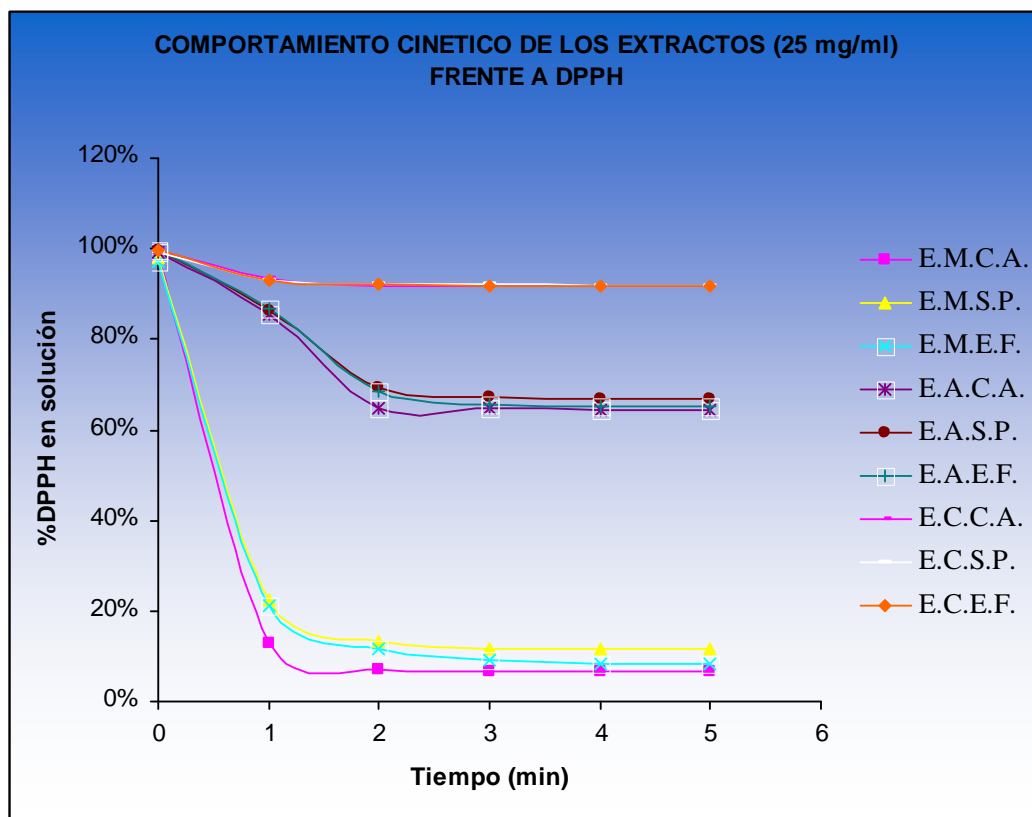
1.4 PORCENTAJE DE INHIBICION AL RADICAL DPPH

De acuerdo al cuadro N° 06, donde se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos por las tres especies en estudio, se observa que tanto el extracto clorofórmico y acuoso, al ser evaluados a una concentración de 2.5 mg/ml (1g/10 ml de solvente), no superan ni el 50% de Inhibición, caso contrario al extracto metanólico, en donde se aprecia un alto porcentaje de inhibición a los radicales libres producidos por el reactivo DPPH, siendo la más alta la de Huacapurana con 94.47%, seguido de Amasisa con 93.10% y finalmente Cumaceba con 90.40%. Las Figuras 18, 19 y 20 (*ver Anexos*), muestran la capacidad de inhibición en 2.5 mg/ml a una longitud de onda de 515 nm, confirmando lo dado en el cuadro 06. La Figura 21, resalta el comportamiento cinético de los extractos frente al radical DPPH.

CUADRO N° 06.- Porcentaje de inhibición al radical DPPH de las tres especies de fabáceas en estudio

MUESTRAS	% INHIBICION ± DESVEST		
	Extracto Clorofórmico	Extracto Metanólico	Extracto Acuoso
HUACAPURANA	23.19 ± 0.027	94.47 ± 0.275	45.94 ± 0.129
AMASISA	23.08 ± 0.027	93.10 ± 0.264	45.30 ± 0.126
CUMACEBA	23.00 ± 0.025	90.36 ± 0.263	43.98 ± 0.118

**Figura N° 21. COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LOS EXTRACTOS
FRENTE AL DPPH**



E.M.C.A.: *Extracto Metanólico de Campsiandra angustifolia*

E.M.S.P. : *Extracto Metanólico de Swartzia polyphylla*

E.M.E.F. : *Extracto Metanólico de Erythrina fusca*

E.A.C.A. : *Extracto Acuoso de Campsiandra angustifolia*

E.A.S.P. : *Extracto Acuoso de Swartzia polyphylla*

E.A.E.F. : *Extracto Acuoso de Erythrina fusca*

E.C.C.A. : *Extracto Clorofórmico de Campsiandra angustifolia*

E.C.S.P. : *Extracto Clorofórmico de Swartzia polyphylla*

E.C.E.F. : *Extracto Clorofórmico de Erythrina fusca.*

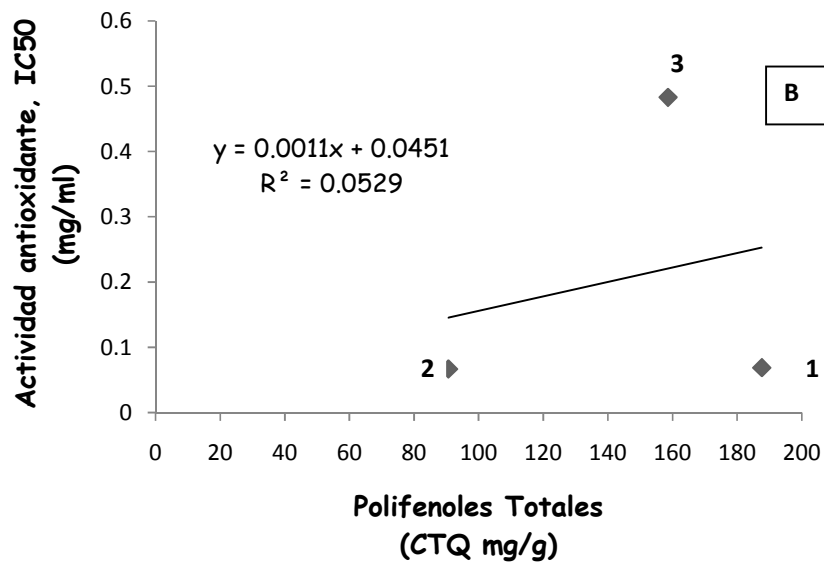
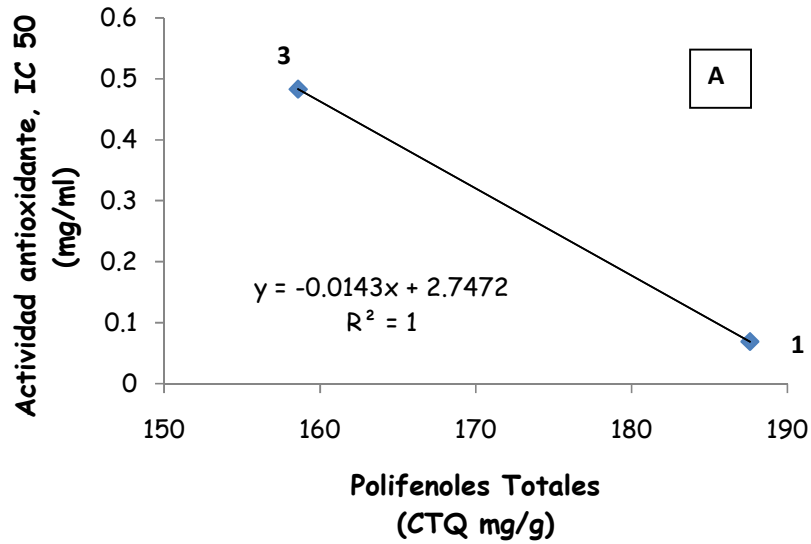
1.5 VALORES DE IC₅₀ DEL EXTRACTO METANÓLICO

En el Cuadro N° 07, se muestran los valores de IC₅₀ que representan la concentración a la que los extractos metanólicos de las especies en estudio, llegaron a obtener el 50 % de inhibición de radicales libres en el ensayo *in Vitro*.
(Ver Anexos páginas 85 al 92)

CUADRO N° 07.- Valores de IC₅₀ de los extractos metanólicos de las muestras en Estudio

Muestras	IC 50
	mg/ml ± DESVEST
HUACAPURANA	0.069 ± 0.003
CUMACEBA	0.067 ± 0.004
AMASISA	0.483 ± 0.057

Figura N° 22. CORRELACIÓN ENTRE LOS POLIFENOLES TOTALES EXPRESADOS EN EQUIVALENTES DE CATEQUINA (CTQ) Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, EXPRESADA COMO CONCENTRACIÓN INHIBITORIA EFICIENTE (IC₅₀) DEL EXTRACTO METANÓLICO.



(1) *Campsiandra angustifolia* (cortezas molidas). (2) *Swartzia polyphylla* (cortezas molidas). (3) *Erythrina fusca* (cortezas molidas).

CUADRO N°08.- Prueba “T” y Correlación para Muestras Relacionadas

Estadísticos de muestras relacionadas

	Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1 Concentración de Polifenoles	145,61733	3	49,752553	28,724650
Capacidad de Inhibición al 50%	,20633	3	0,239602	0,138335

Correlaciones de muestras relacionadas

	N	Correlación	Sig.
Par 1 Concentración de Polifenoles y Capacidad de Inhibición al 50%	3	0,230	0,852

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 Concentración de Polifenoles - Capacidad de Inhibición al 50%	145,411000	49,698000	28,693154	21,954323	268,867677	5,068	2	0,037

Puesto que el nivel crítico vale $p=0.037$ se rechaza la hipótesis nula ($H_0: \mu = \mu_0$ con $\alpha = 0.05$) con un nivel de confianza de 0.95 y se concluye que la media de la población de diferencia es significativamente diferente de cero, es decir, existen diferencias significativas entre el promedio de la concentración de Polifenoles totales y la capacidad de inhibición al 50 %.

CUADRO N°09.- Anova de un Factor, Homogeneidad de Varianzas y Comparaciones Múltiples entre medias

Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
Concentración de Polifenoles	Campsiandra angustifolia	3	187,60000	22,838345	13,185725	130,86641	244,33359	161,400	203,300
	Erythrina fusca	3	158,60000	8,510582	4,913587	137,45854	179,74146	149,300	166,000
	Swartzia polyphylla	3	90,66667	4,368447	2,522124	79,81484	101,51849	87,000	95,500
Capacidad de Inhibición al 50%	Campsiandra angustifolia	3	0,06867	0,003512	0,002028	0,05994	0,07739	0,065	0,072
	Erythrina fusca	3	0,48300	0,057559	0,033232	0,34002	0,62598	0,424	0,539
	Swartzia polyphylla	3	0,06733	0,004619	0,002667	0,05586	0,07881	0,062	0,070

Prueba de homogeneidad de varianzas

(H₀: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2$ con $\alpha = 0.05$)

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Concentración de Polifenoles	6,178	2	6	0,035
Capacidad de Inhibición al 50%	3,971	2	6	0,080

Dentro de la capacidad de inhibición al 50%, el nivel crítico es superior a 0.05, se mantiene la hipótesis nula que dentro de este grupo existe una igualdad de varianzas, existiendo una ligera diferencia solo en el grupo de la concentración de Polifenoles.

ANOVA

(H₀: $\mu_1 = \mu_2$ con $\alpha = 0.05$)

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Concentración de Polifenoles	Inter-grupos	14852,009	2	7426,004	36,336	0,000
	Intra-grupos	1226,207	6	204,368		
	Total	16078,216	8			
Capacidad de Inhibición al 50%	Inter-grupos	0,344	2	0,172	154,386	0,000
	Intra-grupos	0,007	6	0,001		
	Total	0,351	8			

El nivel crítico (0.000) es menor que 0.05, se rechaza entonces la hipótesis nula de ANOVA, concluyéndose que si existen diferencias significativas dentro de la concentración de polifenoles y la capacidad de inhibición al 50% entre las muestras.

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) Muestras en Estudio	(J) Muestras en Estudio	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Concentración de Polifenoles	Campsiandra angustifolia	Erythrina fusca	29,000000	11,672411	0,104	-6,81416	64,81416
		Swartzia polyphylla	96,933333*	11,672411	0,000	61,11917	132,74750
	Erythrina fusca	Campsiandra angustifolia	-29,000000	11,672411	0,104	-64,81416	6,81416
		Swartzia polyphylla	67,933333*	11,672411	0,003	32,11917	103,74750
	Swartzia polyphylla	Campsiandra angustifolia	-96,933333*	11,672411	0,000	-132,74750	-61,11917
		Erythrina fusca	-67,933333*	11,672411	0,003	-103,74750	-32,11917
Capacidad de Inhibición al 50%	Campsiandra angustifolia	Erythrina fusca	-0,414333*	0,027271	0,000	-0,49801	-0,33066
		Swartzia polyphylla	0,001333	0,027271	0,999	-0,08234	0,08501
	Erythrina fusca	Campsiandra angustifolia	0,414333*	0,027271	0,000	0,33066	0,49801
		Swartzia polyphylla	0,415667*	0,027271	0,000	0,33199	0,49934
	Swartzia polyphylla	Campsiandra angustifolia	-0,001333	0,027271	0,999	-0,08501	0,08234
		Erythrina fusca	-0,415667*	0,027271	0,000	-0,49934	-0,33199

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

2. DISCUSIÓN

Realizado el tamizaje fitoquímico, se observa:

Alcaloides, presencia leve en el extracto acuoso de amasisa y en los extractos etanólicos y acuosos de huacapurana. Según la literatura (List y Horhamme, 1979), en la semilla de cumaceba se encuentran los alcaloides eritralinas denominados así por este género.

Triterpenos, presencia moderada en cumaceba y amasisa.

Cumarinas, solo en los extractos etéreos y alcohólicos de huacapurana. Según Domínguez (1973), las cumarinas conocidas (son más de 115), se los encuentra libres en las plantas y comúnmente en las leguminosas, lo cual coincide con el estudio actual. Pese a su abundancia en la naturaleza y a su diversidad estructural, su papel fisiológico solo se conoce parcialmente. Se ha encontrado que pueden ser anticoagulantes como el dicumarol y la cumarina, espasmolítica e hipercolesterémicas o inhibidoras del crecimiento vegetal. Cabe indicar que Lock (1988) los considera como parte de los compuestos fenólicos.

Azúcares reductores, se encuentran prácticamente en las tres especies pero solo en los extractos alcohólicos y acuosos de las mismas.

Aceites esenciales, se presentan en forma moderada pero solo en los extractos etéreos de las tres especies. Según Sharapin (2000), los aceites esenciales son constituyentes volátiles presentes en diversas plantas y se caracterizan por estar constituidas por mezclas de terpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados y a veces por compuestos aromáticos, que se volatilizan a temperatura ambiente y tienen consistencia aceitosa. Los aceites esenciales generalmente contienen sustancias farmacológicamente activas.

Saponinas, los extractos acuosos y alcohólicos también reportan buena concentración de estos metabolitos, confirmando lo registrado por la organización Rain Tree (2008), que indican la posible presencia de saponinas para huacapurana.

Fenólicos y taninos, también se presentan en buena cantidad en los extractos acuosos de las tres especies, siendo más abundante en cumaceba. Según Lock (1988), los compuestos fenólicos son sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, en este grupo los más característicos son los flavonoides, los cuales se utilizaron durante mucho tiempo como colorantes de lana y actualmente se usan en la conservación de la grasa o jugos de frutas debido a sus propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas. La acción farmacológica es también extensa y variada, bien conocidas son sus actividades contra la fragilidad capilar, dilatadores coronarios, espasmolítica, antihepatotóxica, colerética, estrógena y diurética. Destaca también la actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y la acción fungitóxica de isoflavonas. Coincide con lo indicado por la organización Rain tree (2008), quienes indican la posible presencia de antocianinas y taninos para la huacapurana.

Aminoácidos, se presenta tan solo en el extracto alcohólico de amasisa. LEUNG *et al* (1972) y DUKE (1981) encontraron proteínas en las hojas de amasisa en cantidades de 4.6 y 4.3 mg respectivamente, lo cual indica la presencia de estos compuestos.

Carotenos, su presencia es baja en los tres extractos etéreos de las especies en estudio; aún así, es importante lo encontrado por LEUNG *et al* (1972) quienes reportan 2 300 ug de carotenos en la hoja de cumaceba.

Glicósidos, en los extractos acuosos de las tres especies se observa la presencia abundante de glicósidos. También confirma la presencia de éstos según lo manifestado por la organización Rain –tree (2008). Pero los glicósidos cardiotónicos no se observan en ninguno, así como la alta presencia de flavonoides.

El perfil cromatográfico realizado a las cortezas molidas de huacapurana, amasisa y cumaceba, con sus sistemas de trabajo y reveladores apropiados, mostró manchas que indican la presencia de metabolitos secundarios importantes ya descritos por la organización Rain –tree (2008), para cada uno de las muestras.

Los valores de Rf de las manchas reveladas en el extracto metanólico, fueron las más resaltantes, pues ellas en su conjunto, sugieren en gran medida, la existencia de sustancias con actividad antioxidante.

La cuantificación de Fenoles Totales, abarca en gran medida a los Flavonoides, metabolitos presentes en cada uno de las muestras en estudio, algo que se corroboró en el tamizaje fitoquímico y en el perfil cromatográfico realizados en estas cortezas. GULICIN, I. (2003) sugirió que estos compuestos fenólicos tienen una importante acción en la estabilización de la oxidación lipídica, han sido asociados con la actividad antioxidante y tienen efecto inhibitorio sobre la mutagénesis y carcinogénesis en humanos. Ya KHAOMEK (2006), encontró en los extractos de amasisa: citflavona, eritrisenegalona, loncocarpol A, liquitirigenina y 8 – prenildaidzeina, presentando incluso algunos de ellos actividad antimalárica. La alta concentración de estos metabolitos en las cortezas de huacapurana, sugieren la intensa relación que existe entre estas estructuras y las propiedades que a esta planta se le atribuye. OSAWA (1992), purificó 7 flavonoides del duramen de Cumaceba, esto respalda también la medianamente alta presencia de estos metabolitos, dentro del conjunto de Polifenoles Totales.

En la Figura 21, se muestra el comportamiento cinético de la reacción del DPPH con los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso a concentración de 2.5 mg/ml, a través de una curva de dosis – respuesta relativa al decrecimiento del porcentaje de DPPH en la solución en función del tiempo. Observándose que todos las muestras del extracto metanólico presentaron cinética rápida, aprovechando prácticamente al máximo el consumo de DPPH en el primer minuto, con un porcentaje de DPPH en la solución menor que 50%. Caso contrario a lo que se observa en las muestras de los extractos clorofórmico y acuoso, que no mostraron aumento significativo del consumo de DPPH en el mismo tiempo total de la observación. Debido a este comportamiento es que se decidió evaluar los valores de IC_{50} en el extracto metanólico, obteniéndose de esa manera un valor de 0.069 ± 0.003 mg/ml para huacapurana, 0.067 ± 0.004 mg/ml para cumaceba y 0.483 ± 0.057 mg/ml para amasisa. (*Ver Anexos*).

En la Figura 22, se observa una correlación positiva entre los polifenoles totales y el IC₅₀ de los extractos de *Campsiandra angustifolia* (Huacapurana) y *Erythrina fusca* (Amasisa); sin embargo el extracto de *Swartzia polyphylla* (Cumaceba) no presenta este comportamiento, pues aún al contar con cantidades menores de polifenoles Totales, su inhibición al radical libre es mejor que los otros extractos. Este análisis, sugiere que en este último extracto, existe algún constituyente que contribuye, particular y más efectivamente, en la acción secuestradora de radicales libres. En los cuadros 08 y 09, se muestra los análisis estadísticos a ambos grupos (Concentración de polifenoles y capacidad de inhibición al 50% de DPPH) y se concluye que existen diferencias significativas entre el promedio de la concentración de Polifenoles totales y la capacidad de inhibición al 50 %.

3. CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis realizados se puede concluir que:

- De acuerdo al tamizaje fitoquímico realizado en cada una de las especies en estudio, se reconoce la gran cantidad de Azúcares reductores, la abundante presencia de Glicósidos y la alta presencia de Flavonoides y de cuerpos Fenólicos, que dan a entender la intensa relación sinérgica que pueda existir entre estas estructuras y las propiedades que se les atribuye a cada una de estas plantas.
- *C. angustifolia* (Huacapurana) fue el que presentó mayor cantidad de polifenoles totales, seguido de *E. fusca* (Amasisa) y finalmente *S. polyphylla* (Cumaceba).
- De las tres especies, el extracto metanólico presentó mayor capacidad de secuestro del radical libre *in vitro*; siendo *S. polyphylla* (Cumaceba) el de mayor capacidad de secuestro, seguido de *C. angustifolia* (Huacapurana) y finalmente *E. fusca* (Amasisa).

4. **RECOMENDACIONES**

Considerando que las sustancias naturales pueden ser responsables del efecto de protección contra riesgos de muchos procesos patológicos, los resultados descritos en este trabajo estimulan a continuar los estudios de sustancias aisladas de las especies *C. angustifolia* (Huacapurana), *E. fusca* (Amasisa) y *S. polyphylla* (Cumaceba), para así avalar la acción antioxidante.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. ABELSON PHILIP H. (1990). Medicine from plants. *Science* .247:513.
2. PRATICO D., DELANTY N. (2000). Oxidative injury, in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am J. Med.* 577-585.
3. FINKEL T., HOLBROOK N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. Pág. 239-247.
4. VISIOLI F. *et al.* (2000). Diet prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc. Res.* 419-425.
5. ETERTHON K. *et al.* (2002). Bioactive compounds foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer.
6. ANGULO HERRERA, P. (1996). La Etnofarmacología y los medicamentos del siglo XXI. Segundo Symposium sobre "*Plantas Medicinales y Medicamento Vegetal en el Perú*". 27/31 Oct. Lima-Perú.
7. MANN J. (1978) *Secondary Metabolism*. Oxford Univ. Press, Oxford.
8. SIMMONDS M. (2003). Novel drugs from botanical sources. *Drug Discov. Today*. 721-722.
9. MONGE A. *et al.* (2000). Medicinal chemistry in the development of societies. Biodiversity and natural products. *Eur. J. Med. Chem.* 1121-1125.
10. JARAMILLO S. (1989). *Naturismo como sistema sanitario social*. Barcelona: Léima.

11. BRACK A. (1999). Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Cuzco: Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas.
12. DUKE A, VÁSQUEZ R. (1994). Amazonian Ethnobotanical Dictionary. Boca Ratón. Florida: CRC; pág. 215.
13. BRANCH L, DA SILVA M. (1983). Fol. Medicene of Alter do Chao, Brazil. *Acta Amazónica*. Manaus; 13 (5/6): 737-797.
14. MEJÍA, KEMBER; RENGIFO, ELSA. (2000). Plantas Medicinales de Uso popular en la Amazonía Peruana; Agencia Española de Cooperación Internacional. 2º Edición. Lima.
15. BERG, M.E., RAMALHO, M.E., VASQUEZ, R. (1991). Principales Plantas Reportadas como Medicinales en la Amazonía. Programa de Medicina Tradicional, Organización Mundial de la Salud.
16. TEODORO AGAPITO F. & ISABEL SUNG. (2003). *Fitomedicina, 1100 Plantas Medicinales*; Editorial Isabel; Lima. Perú
17. JOVEL, E. M; CABANILLAS, J; TOWERS, G. H. N. (1996). *An Ethnobotanical Study of the Traditonal Medicine of the Mestizo People of Suni Mirano, Loreto, Peru.* J. Ethnopharmacol. (53) pp. 149-156 Univ. British Columbia Dept. Botany Vancouver V6T 1Z4 Canada.
18. OSAWA, K; YASUDA, H; MARUYAMA, T; MORITA, H; TAKEYA, K; ITOKAWA, H. (1992); *Isoflavanones from the heartwood of Swartzia polyphylla and their antibacterial activity against cariogenic bacteria.* Chem Pharm Bull 40 (11) pp. 2970-2974. Lotte Cent Lab. Co. Ltd. Dept Basic Res Saitama 336 Japan.

19. ROJAS A., ROSARIO; BETTY BUSTAMANTE, B.; PALMIRA VENTOSILLA, B.; IRMA FERNÁNDEZ, A.; LUZ CAVIEDES, C.; ROBERT HENRY GILMAN, C., D OLGA LOCK; E AND GERALD BRUCE HAMMOND, F. (2006) *Larvicidal, Antimycobacterial and Antifungal Compounds from the Bark of the Peruvian Plant Swartzia polyphylla DC*. Chem. Pharm. Bull. 54(2) 278—279 vol. 54, N° 2 Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú.
20. LEUNG W., WOOT-TSUEN, BUTRUM, R.R., AND CHANG, F.H. (1972). Part I. Proximate composition mineral and vitamin contents of east Asian foods. In: Food composition table for use in east Asia. FAO & U.S. Dept. HEW.
21. DUKE, J.A. (1981). The gene revolution. Paper 1. p. 89–150. In: Office of Technology Assessment, Background papers for innovative biological technologies for lesser developed countries. USGPO. Washington.
22. GÓMEZ, M.E.; MURGUELITO, E.; MOLINA, C.H.; MOLINA, E.; RODRÍGUEZ, L; RÍOS, C.I.; MOLINA, C.H.; MOLINA, J.P. (1995); *Árboles y arbustos forrajeros utilizados en alimentación animal como fuente proteica: Matarratón (Gliricidia sepium), Nacedero (Trichanthera gigantea), Pízamo (Erythrina fusca) y Botón de Oro (Tithonia diversifolia)*. Cali, Valle (Colombia). CIPAV. 1era Edición. 129 p.
23. JAIRO CALLE A., ROBERTO PINZÓN S., LUIS F. OSPINA, NUBIA C. MEDINA, ANA CARRIÓN Y EDGAR BAUTISTA. (1997); *Alcaloides Isoquinolínicos de la Corteza y Flores de Erythrina fusca Loureiro*; Universidad Nacional de Colombia, Santa Fé de Bogota.
24. KHAOMEK P, ICHINO C, ISHIYAMA A, SEKIGUCHI H, NAMATAME M, RUANGRUNGSI N, SAIFAH E, KIYOHARA H, OTOGURO K, OMURA S, YAMADA H. (2008). *In vitro antimalarial activity of prenylated flavonoids from Erythrina fusca*. Nat. Med. (Tokyo). Apr;62(2):217-20.

25. 2005 Mayo. Disponible en : <http://www.rain-tree.com/>
26. SWAIN, T (1973). *Chemistry in evolution and systematics*. Butterworth, Londres.
27. LEVIN, DA. (1976). "The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores". *Ann Rev. Ecol. Syst.* 7: 121-159.
28. CRONQUIST A. (1977). "On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms". *Plant Syst Evol.*, suppl 1: 179-189.
29. R. CROTEAU, T. M. KUTCHAN, N. G. LEWIS. (2000). "Natural Products (Secondary Metabolites)". En: Buchanan, Grissem, Jones (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24.
30. TAIZ, LINCOLN Y EDUARDO ZEIGER. (2006). "Secondary Metabolites and Plant Defense". En: *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.
31. GOODWIN TW. (1971). *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry*. Academic Press, Londres.
32. ROBINSON T. (1981). *The biochemistry of alkaloids*. 2ª ed. Springer, Nueva York.
33. JUDD, W. S. CAMPBELL, C. S. KELLOGG, E. A. STEVENS, P.F. DONOGHUE, M. J. (2002). "Secondary Plant Compounds". *Plant systematics: a phylogenetic approach, Second Edition*. Sinauer Axxoc, USA. Capítulo 4; "Structural and Biochemical Characters".

34. CLEMENT J.S., T.J. MABRY, H. WYLER Y A.S. DREIDING. (1994). "Chemical review and evolutionary significance of the betalains". En: *Caryophyllales*, H-D Behnke y TJ Mabry (eds.) 247-261. Springer, Berlin.
35. RODMAN J.E. (1981). "*Divergence, convergence, and parallelism in phytochemical characters: The glucosinolate-myrosinase system.*" En: *Phytochemistry and angiosperm phylogeny*. DA Young y DS Seigler (editores). 43-79. Praeger, Nueva York.
36. RODMAN J.E., P.S. SOLTIS, D.E. SOLTIS, K.J. SYTSMA Y K.G. KAROL. (1998). "*Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies.*" *Am. J. Bot.* 85: 997-1006.
37. HEGNAUER R. (1977). "Cyanogenic compounds as systematic markers in Tracheophyta". *Plant Syst. Evol. Suppl.* 1: 191-209.
38. WILLIAMS C.A, GRAYER R.J. (2004). "Anthocyanins and other flavonoids". *Nat. Prod. Rep.* 21: 539-573.
39. FLEURENTIN, J. Y J.M. PELT. (1990). Las plantas medicinales. *Mundo Científico*, 105: 927-933.
40. HENRY, J. (1991). *Guide to Medicines & Drugs*. Covent Graden Books. London. 432 pp.
41. SHARAPIN, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Santa Fé. Colombia: Quebecor-Impresiones, 247p.
42. MURILLO, E., *Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas*. [artículo en internet]. Disponible en: <http://www.alfa-editores.com/bebidas/Junio-Julio%2006/Actividad.pdf>.

43. GONZÁLEZ M. *ET AL.*, *Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo*. [artículo en internet] Disponible en :
http://www.cervezaysalud.com/estudio_8.pdf
44. Universidad nacional del nordeste – Facultad de Agroindustrias. [resumen en internet] Argentina. 2003. Disponible en:
<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/08-Exactas/E-054.pdf>
45. MOSQUERA O. *et al.*, (2005). *Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales*. [artículo en internet]. Disponible en:
<http://www.utp.edu.co/php/revistas/ScientiaEtTechnica/docsFTP/82044231-234.pdf>
46. BAFNA A., MISHRA S. *Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de Curculigo orchioides Gaertn.* [artículo en internet] Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1310955>
47. BUTTERFIELD D. *et al.*, (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nut Biochem*, 444-61.
48. RIVERO A., BETANCORT J. (2006). *Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas*. [artículo en internet]. Disponible en:
http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-3.pdf
49. KUSKOSKI E. *et al.*, *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpas de frutos*. [artículo en internet] Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27642.pdf>

50. CYTED-RIVAPLAMED. (2001). Métodos farmacológicos para la validación de plantas medicinales. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; pág. 65-69.
51. WAGNER H., BLADT S. (1996). *Plant Drug Análisis. AThin Layer Chromatography Atlas*. 2da edición; Alemania.

ANEXOS

GRÁFICOS, ESQUEMAS Y FIGURAS

Figuras N° 01: Muestras de Estúdio



Swartzia polyphylla

“CUMACEBA”



Campsiandra angustifolia

“HUACAPURANA”



Erythrina fusca
“AMASISA”

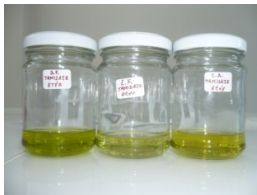


Fig. 02 Extractos Etéreos

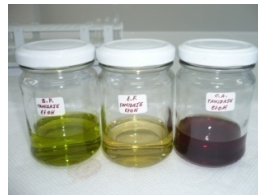


Fig. 03 Extractos Etanólicos

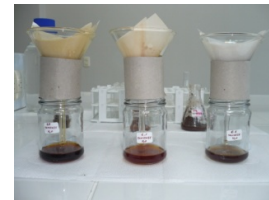


Fig. 04 Extractos Acuosos



Fig. 04 Reacción Positiva a la presencia de Azúcares Reductores en *Swartzia polyphylla* D.C.

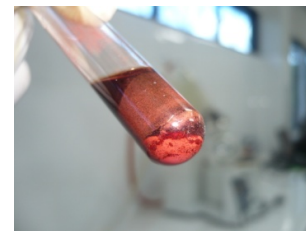


Fig. 06 Reacción Positiva a la de Azúcares Reductores en *Erythrina fusca* L.

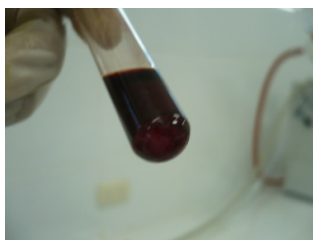


Fig.07 Reacción Positiva a la presencia de Azúcares Reductores en *Campsiandra angustifolia* S.B

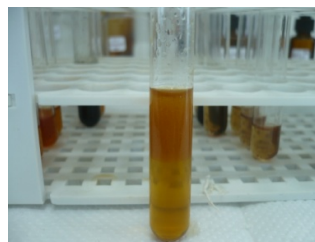


Fig.08 Reacción positiva a la presencia de Flavonoides en *Swartzia polyphylla* D.C.

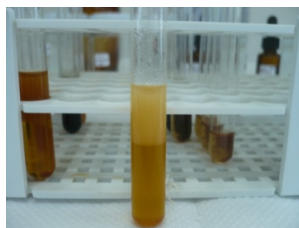


Fig.09 Reacción Positiva a la presencia de Flavonoides en *Erythrina fusca* L

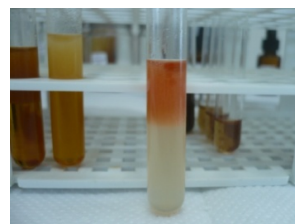


Fig.10 Reacción Positiva a la presencia de Flavonoides en *Campsiandra angustifolia* S.B.

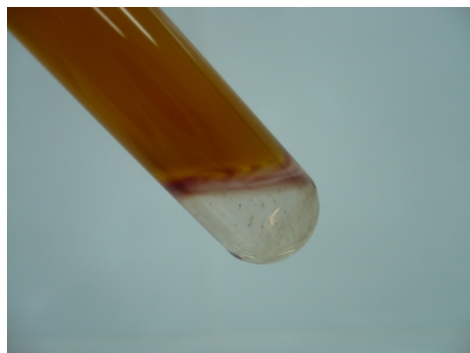


Fig. 11 Reacción Positiva a la presencia de Glicósidos en *Swartzia polyphylla* D.C



Fig. 12 Reacción Positiva a la presencia de Glicósidos en *Erythrina fusca* L.

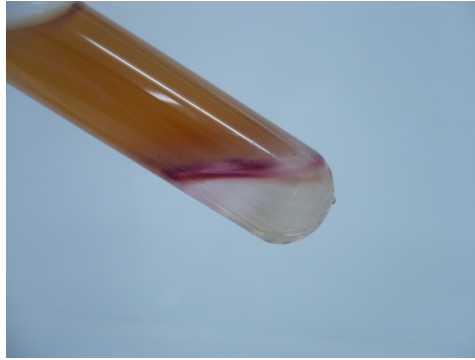


Fig. 13 Reacción Positiva a la presencia de Glicósidos en *Campsiandra angustifolia* S.B.

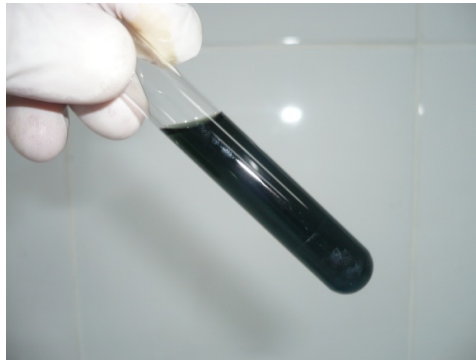


Fig. 14 Reacción Positiva de los Extractos Acuósos frente a los Fenoles y Taninos, semejante en las tres especies

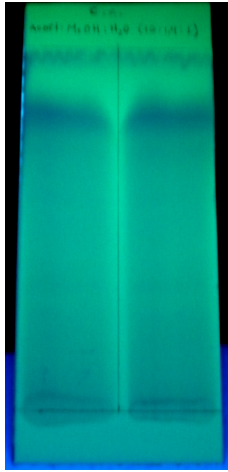


Fig. 15: *Campsiandra angustifolia*
vista en UV-254 nm

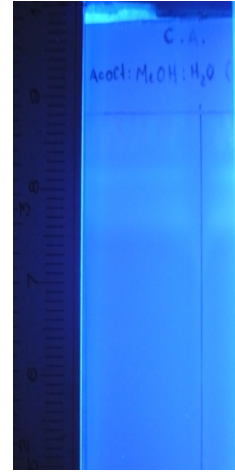


Fig.15a: *Campsiandra angustifolia*
vista en UV-366 nm

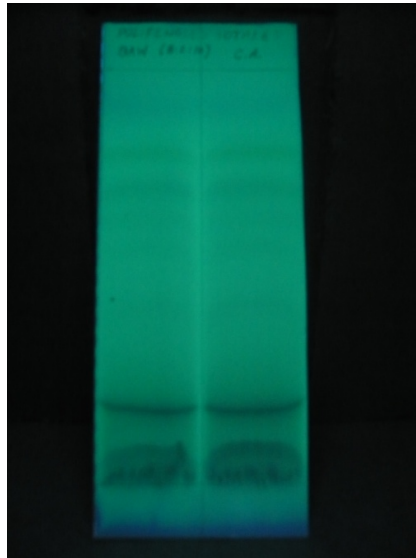


Fig.15b: *Campsiandra angustifolia*
vista en UV-254 nm



Fig. 16: *Erythrina fusca*
Vista en UV-254 nm.

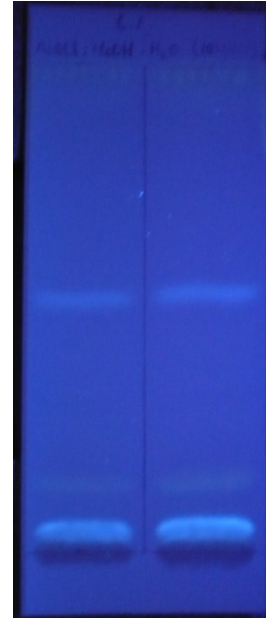


Fig. 16a: *Erythrina fusca*
vista en UV-366 nm.



Fig. 16b: Corteza molida de *Erythrina fusca*
vista en UV-366 nm

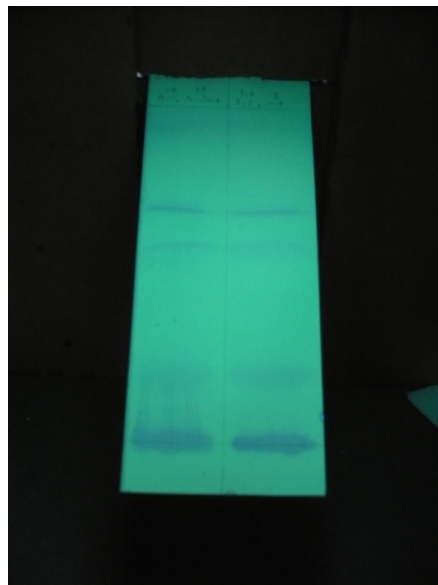
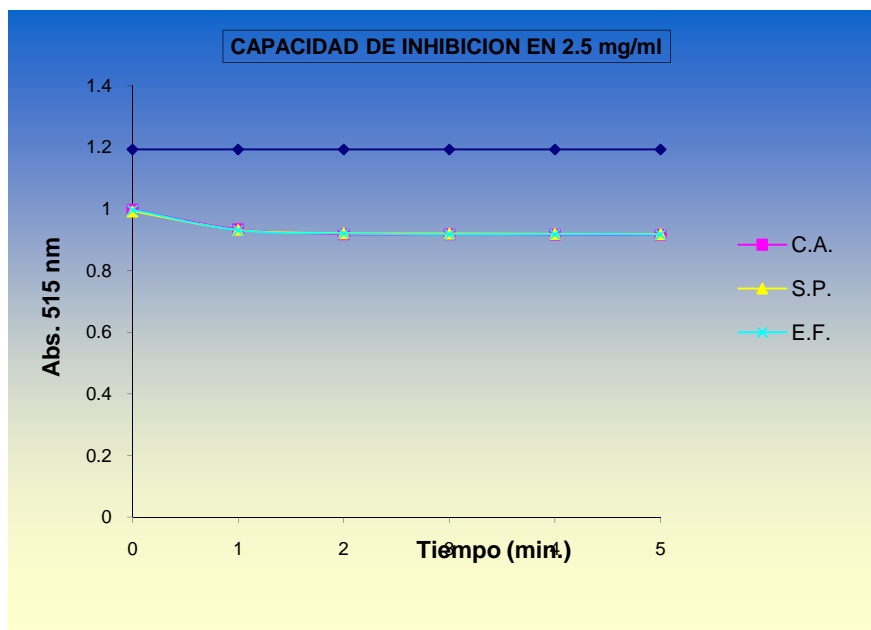


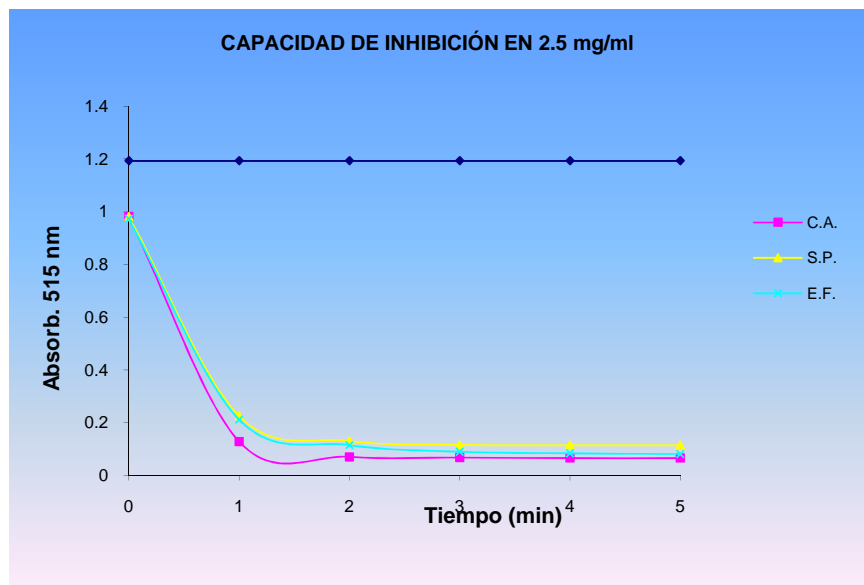
Fig. 17: Corteza molida de *Swartzia polyphylla*
Vista en UV-254 nm

Figura N° 18. Capacidad de Inhibición en 2.5 mg/ml del extracto clorofórmico



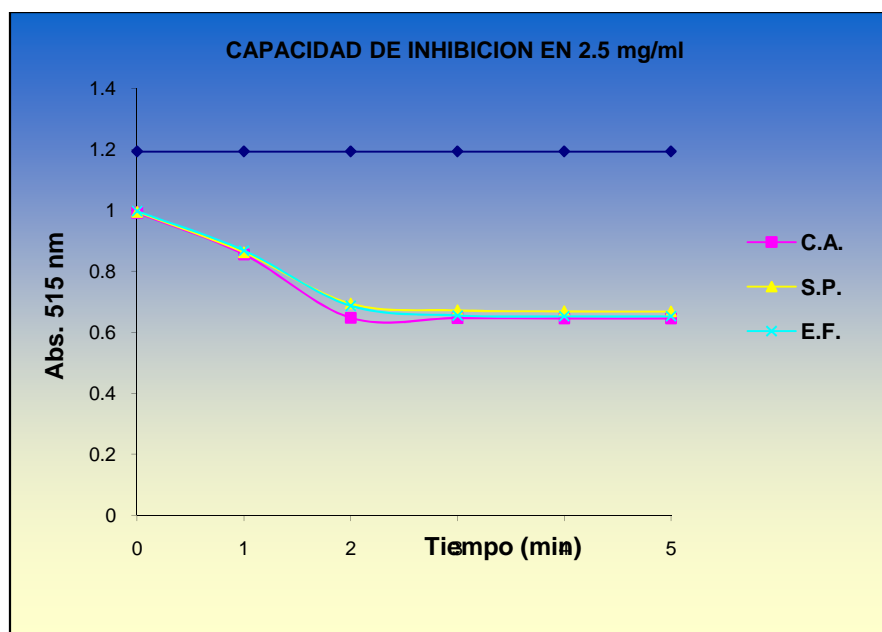
(C.A.: Huacapurana, S.P.: Cumaceba, E.F.: Amasisa)

Figura N° 19. Capacidad de Inhibición en 2.5 mg/ml del extracto metanólico



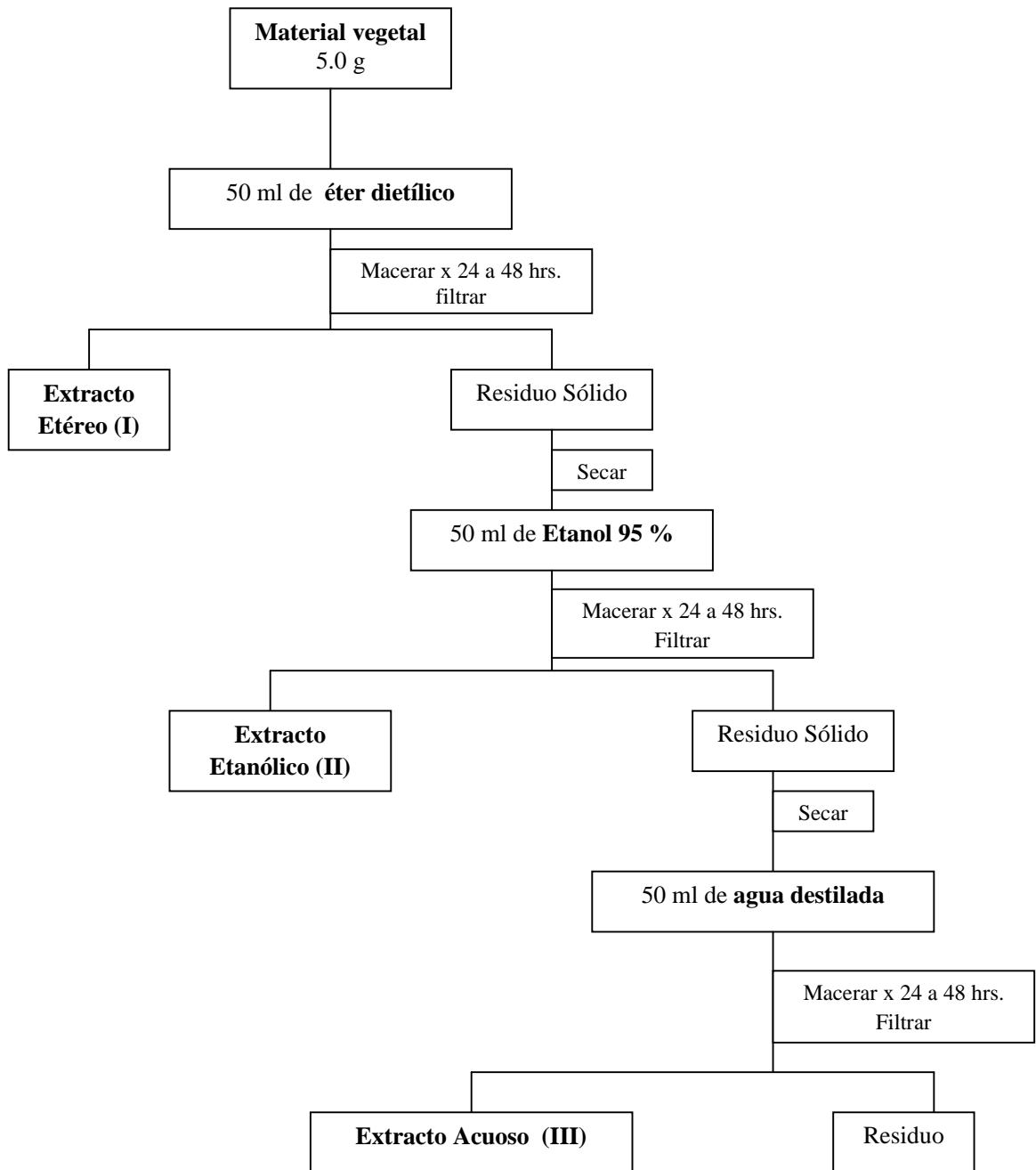
(C.A.: Huacapurana, S.P.: Cumaceba, E.F.: Amasisa)

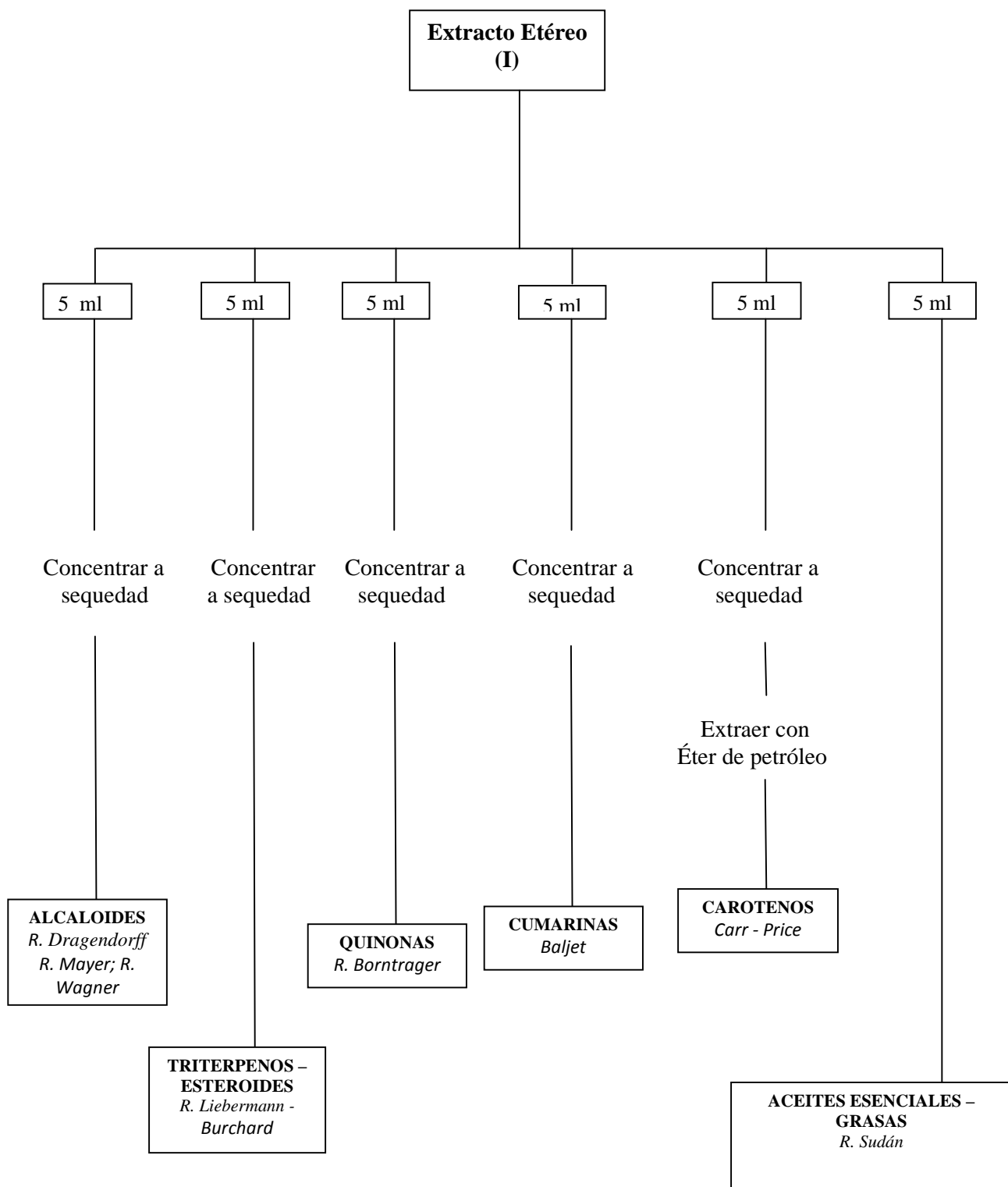
Figura N° 20. Capacidad de Inhibición en 2.5 mg/ml del extracto acuoso

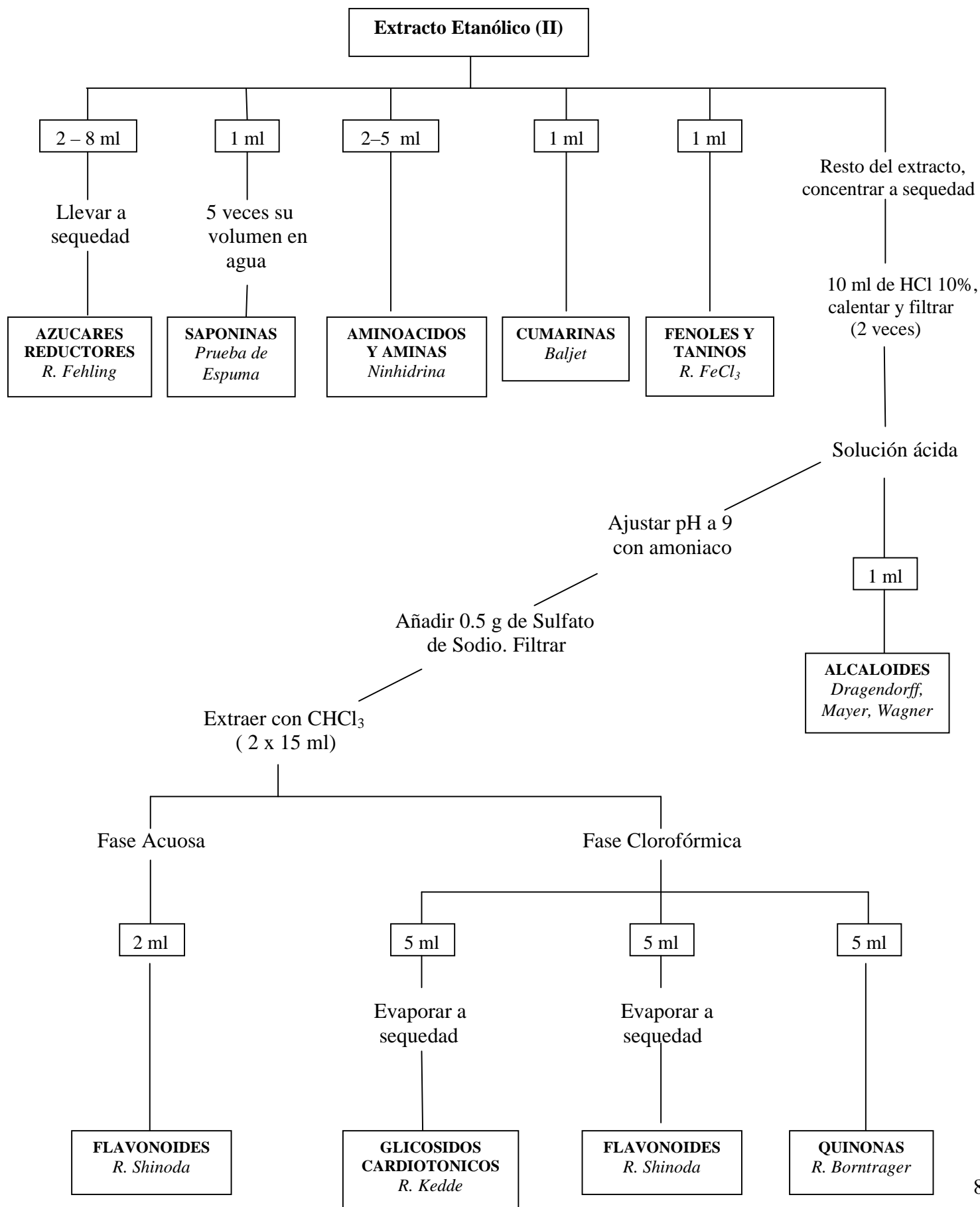


(C.A.: Huacapurana, S.P.: Cumaceba, E.F.: Amasisa)

ESQUEMA 01. OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS EXTRACTOS.







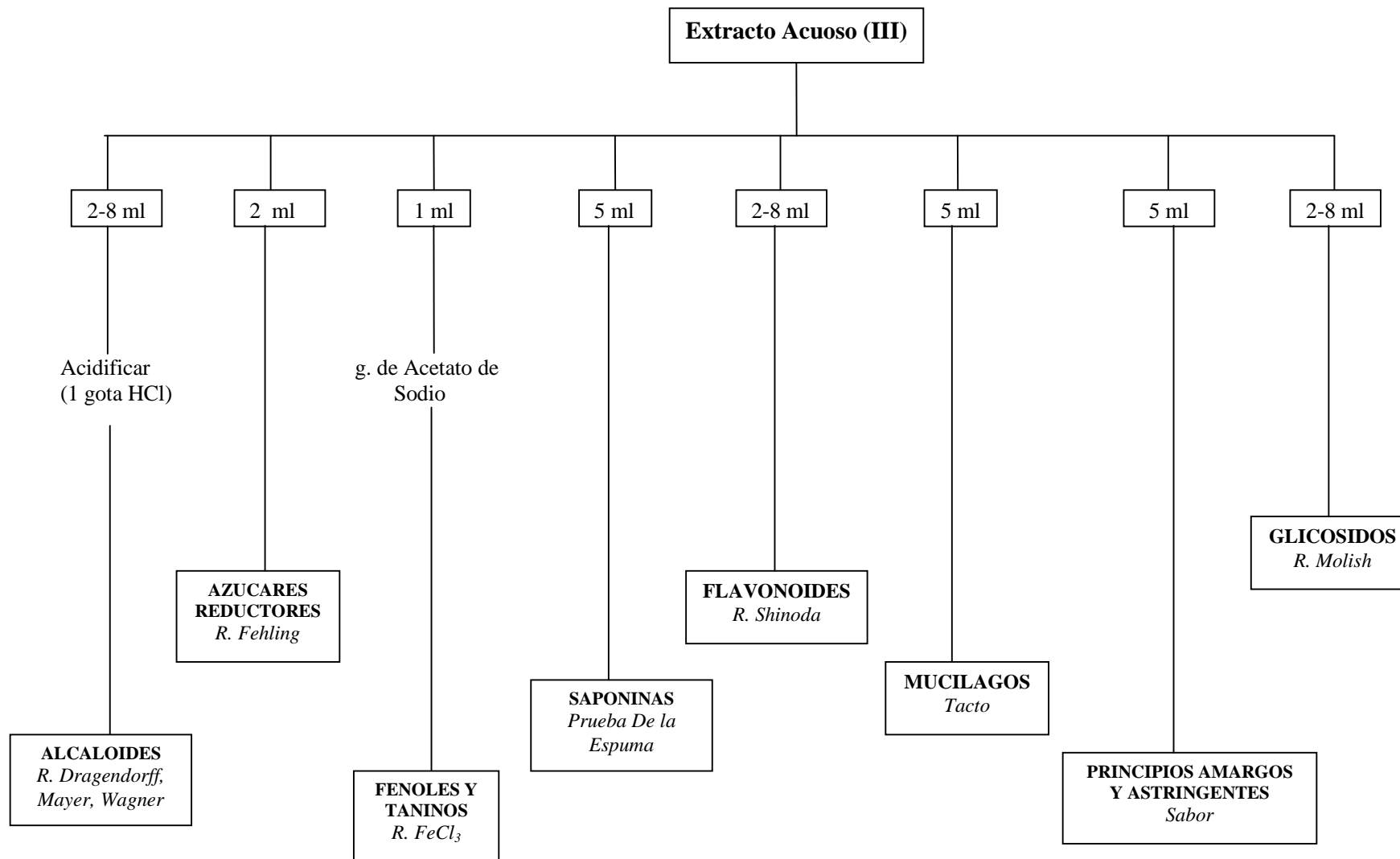
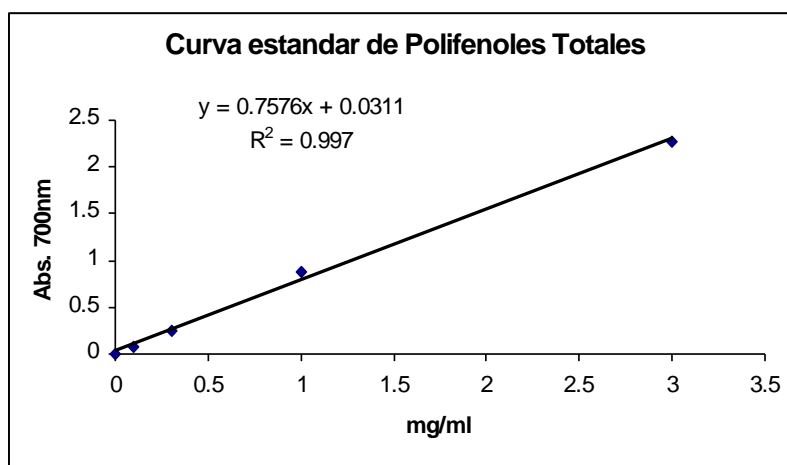


GRÁFICO N° 01.- Concentración de Polifenoles totales

mg/ml	Abs. 700 nm
Control	0
Estándares	
0 mg/ml	0.004
0.1 mg/ml	0.074
0.3 mg/ml	0.257
1 mg/ml	0.879
3 mg/ml	2.275



El gráfico indica la concentración de Polifenoles expresadas por los estándares en esa determinada longitud de onda; dando lugar a la ecuación de la línea de tendencia o regresión, en la que “y” representa a cualquier otro punto de absorbancia a 700 nm, y “x” a la Concentración de Polifenoles que expresa el punto “y”.

Muestra: *Campsiandra angustifolia* Spruce ex Bentham
 Extractos Metanólicos de las Cortezas:

Muestra	Lecturas	Conc.	Promedio	FD	Cantidad	Des. Est.	Error est.	Cant. De Polif.
	Abs. 700 nm	mg/ml	mg/ml		mg/ml			CTQmg/100g
Huacapurana	1.655	1.614	1.876	100.00	187.595	0.22838345	0.13185725	18759.49314
	2.022	1.981						
	2.074	2.033						

Muestra: *Erythrina fusca* L.
 Extractos Metanólicos de las Cortezas:

Muestra	Lecturas	Conc. mg/ml	Promedio	FD	Cantidad	des est	Error est.	Cant. De Polif.
	Abs. 700 nm		mg/ml		mg/ml			mg/100g
Amasisa	1.534	1.493	1.586	100.00	158.595	0.08510582	0.04913587	15859.49314
	1.646	1.605						
	1.701	1.660						

Muestra: *Swartzia polyphylla* D.C.
 Extractos Metanólicos de las Cortezas:

Muestra	Lecturas	Conc. mg/ml	Promedio	FD	Cantidad	des est	Error est.	Cant. De Polif.
	Abs. 700 nm		mg/ml		mg/ml			mg/100g
Cumaceba	0.911	0.870	0.907	100.00	90.662	0.04368447	0.02522124	9066.159803
	0.936	0.895						
	0.996	0.955						

Método de DPPH

Muestra: Extractos metanólicos de la Corteza de Huacapurana de (100 mg/mL) a concentraciones crecientes 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 y 1 mg/mL en 1 ml como volumen final.

Muestra	Tiempo (min.)	DPPH	Extracto Metanólico de la Corteza de <i>Campsiandra angustifolia</i>											
			0.03 mg/ml			Promedio	0.1 mg/ml			Promedio	0.3 mg/ml			Promedio
			1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Huacapurana	0'	0.83	0.797	0.764	0.766	0.776	0.73	0.759	0.794	0.761	0.743	0.751	0.752	0.749
	30"	0.83	0.742	0.714	0.72	0.725	0.616	0.607	0.632	0.618	0.538	0.535	0.509	0.527
	1'	0.83	0.699	0.668	0.708	0.692	0.43	0.432	0.455	0.439	0.307	0.442	0.305	0.351
	1' 30"	0.83	0.686	0.647	0.683	0.672	0.348	0.356	0.395	0.366	0.206	0.276	0.257	0.246
	2'	0.83	0.678	0.628	0.677	0.661	0.261	0.338	0.348	0.316	0.154	0.2	0.213	0.189
	2' 30"	0.83	0.676	0.617	0.677	0.657	0.232	0.329	0.34	0.300	0.14	0.161	0.173	0.158
	3'	0.83	0.671	0.613	0.676	0.653	0.228	0.325	0.297	0.283	0.132	0.154	0.149	0.145
	3' 30"	0.83	0.669	0.613	0.675	0.652	0.201	0.321	0.278	0.267	0.131	0.15	0.146	0.142
	4'	0.83	0.668	0.613	0.674	0.652	0.188	0.277	0.261	0.242	0.13	0.15	0.145	0.142
	4' 30"	0.83	0.664	0.612	0.669	0.648	0.168	0.256	0.243	0.222	0.13	0.149	0.145	0.141
Promedio			0.662	0.612	0.668		0.174	0.258	0.249		0.130	0.149	0.145	
% Inhibición			20.201	26.225	19.518		79.076	68.916	70.000		84.378	82.008	82.570	
Promedio				21.981				72.664				82.985		
Desv Est (SD)				3.690921099				5.579632028				1.238051282		
Error Est (SE)				2.13095429				3.221402053				0.714789241		

$$IC_{50} = (0.1 - (((0.1 - 0.03) * (79.076 - 50)) / (79.076 - 20.201))) = 0.065 \text{ mg/ml}$$

$$IC_{50} = (0.1 - (((0.1 - 0.03) * (68.916 - 50)) / (68.916 - 26.225))) = 0.069 \text{ mg/ml}$$

$$IC_{50} = (0.1 - (((0.1 - 0.03) * (70 - 50)) / (70 - 19.518))) = 0.072 \text{ mg/ml}$$

$$C = [(C_1 - C_2) \times (PI_1 - 50)] / (PI_1 - PI_2)$$

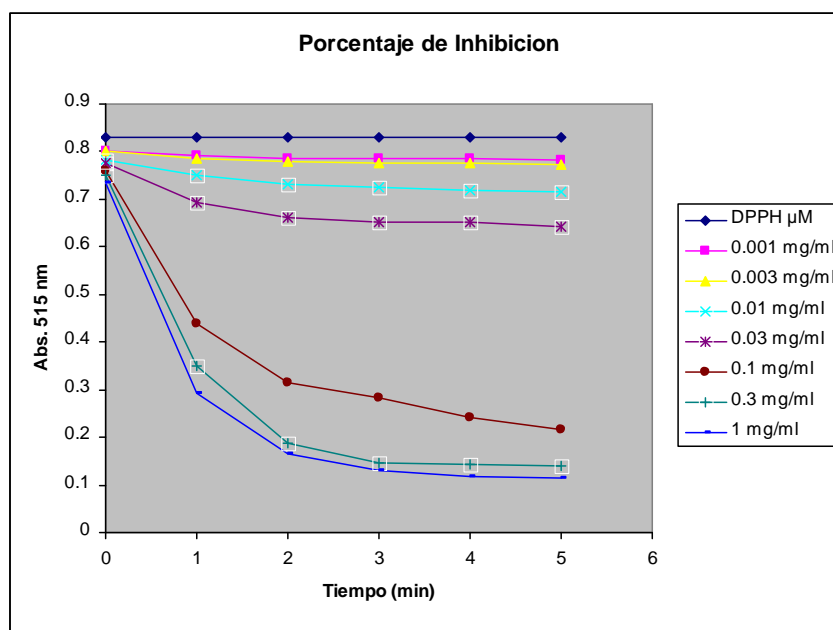
PI₁ y PI₂: Valores de porcentajes de inhibición superiores e inferiores al 50% de inhibición.
C₁ y C₂: Concentraciones en las que se producen PI₁ y PI₂.

$$X IC_{50} = 0.069 \pm 0.003 \text{ mg/ml}$$

Muestra	Tiempo (min.)	Extracto Metanólico de la Corteza de <i>Campsiandra angustifolia</i>				
		DPPH	1 mg/ml			Promedio
			1	2	3	
Huacapurana	0'	0.83	0.723	0.755	0.728	0.735
	30"	0.83	0.387	0.532	0.423	0.447
	1'	0.83	0.204	0.426	0.246	0.292
	1' 30"	0.83	0.19	0.265	0.202	0.219
	2'	0.83	0.148	0.193	0.155	0.165
	2' 30"	0.83	0.143	0.135	0.137	0.138
	3'	0.83	0.132	0.129	0.13	0.130
	3' 30"	0.83	0.125	0.123	0.122	0.123
	4'	0.83	0.121	0.118	0.119	0.119
	4' 30"	0.83	0.118	0.115	0.116	0.116
5'	0.83	0.114	0.113	0.114	0.114	
Promedio			0.118	0.115	0.116	
% Inhibición			85.823	86.104	85.984	
Promedio				85.971		
Desv Est (SD)				0.141039542		
Error Est (SE)				0.081429217		

CUADRO N° 10. Capacidad de Inhibición del radical libre DPPH de la Huacapurana a través del tiempo

Tiempo (min.)	DPPH μ M	0.001 mg/ml	0.003 mg/ml	0.01 mg/ml	0.03 mg/ml	0.1 mg/ml	0.3 mg/ml	1 mg/ml
0	0.83	0.801	0.801	0.781	0.776	0.761	0.749	0.735
1	0.83	0.793	0.785	0.751	0.692	0.439	0.351	0.292
2	0.83	0.787	0.78	0.732	0.661	0.316	0.189	0.165
3	0.83	0.786	0.776	0.724	0.653	0.283	0.145	0.13
4	0.83	0.785	0.775	0.718	0.652	0.242	0.142	0.119
5	0.83	0.783	0.773	0.714	0.643	0.216	0.141	0.114



Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología - IIAP

Método de DPPH

Muestra: Extractos metanólicos de la Corteza de Cumaceba de (100 mg/ml) a concentraciones crecientes 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml en 1 ml como volumen final.

Muestra	Tiempo (min.)	DPPH	Extracto Metanólico de la Corteza de <i>Swartzia polyphylla</i>											
			0.001 mg/ml			Promedio	0.003 mg/ml			Promedio	0.01 mg/ml			Promedio
			1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Cumaceba	0'	1.34	1.323	1.309	1.288	1.307	1.258	1.262	1.253	1.258	1.239	1.233	1.23	1.234
	30"	1.34	1.271	1.305	1.283	1.286	1.249	1.245	1.24	1.245	1.204	1.2	1.211	1.205
	1'	1.34	1.298	1.303	1.28	1.294	1.245	1.24	1.237	1.241	1.193	1.189	1.196	1.193
	1' 30"	1.34	1.295	1.3	1.278	1.291	1.243	1.235	1.234	1.237	1.188	1.183	1.19	1.187
	2'	1.34	1.294	1.298	1.277	1.290	1.24	1.231	1.233	1.235	1.178	1.178	1.182	1.179
	2' 30"	1.34	1.293	1.297	1.275	1.288	1.238	1.226	1.231	1.232	1.176	1.174	1.179	1.176
	3'	1.34	1.292	1.295	1.275	1.287	1.237	1.225	1.229	1.230	1.171	1.171	1.177	1.173
	3' 30"	1.34	1.292	1.295	1.275	1.287	1.236	1.222	1.228	1.229	1.17	1.168	1.174	1.171
	4'	1.34	1.292	1.294	1.273	1.286	1.236	1.22	1.228	1.228	1.169	1.166	1.173	1.169
	4' 30"	1.34	1.29	1.294	1.273	1.286	1.233	1.219	1.226	1.226	1.167	1.164	1.171	1.167
	5'	1.34	1.29	1.293	1.273	1.285	1.232	1.217	1.226	1.225	1.166	1.163	1.17	1.166
Promedio			1.291	1.294	1.273		1.234	1.219	1.227		1.167	1.164	1.171	
% Inhibición			3.682	3.458	5.000		7.935	9.055	8.458		12.886	13.109	12.587	
Promedio				4.046				8.483				12.861		
Desv Est (SD)				0.833364273				0.560115933				0.262080939		
Error Est (SE)				0.481143087				0.323383085				0.151312501		

Muestra	Tiempo (min.)	DPPH	Extracto Metanólico de la Corteza de <i>Swartzia polyphylla</i>							
			0.03 mg/ml			Promedio	0.1 mg/ml			Promedio
			1	2	3		1	2	3	
Cumaceba	0'	1.34	1.189	1.171	1.184	1.181	1.152	1.149	1.082	1.128
	30"	1.34	1.084	1.036	1.085	1.068	0.896	0.875	0.638	0.803
	1'	1.34	1.046	1.011	1.043	1.033	0.766	0.754	0.544	0.688
	1' 30"	1.34	1.018	0.98	1.015	1.004	0.678	0.677	0.485	0.613
	2'	1.34	0.994	0.97	0.998	0.987	0.616	0.61	0.441	0.556
	2' 30"	1.34	0.984	0.962	0.989	0.978	0.568	0.567	0.412	0.516
	3'	1.34	0.977	0.955	0.978	0.970	0.533	0.533	0.388	0.485
	3' 30"	1.34	0.968	0.949	0.969	0.962	0.5	0.494	0.361	0.452
	4'	1.34	0.959	0.943	0.965	0.956	0.472	0.479	0.343	0.431
	4' 30"	1.34	0.957	0.94	0.961	0.953	0.451	0.462	0.331	0.415
5'	1.34	0.953	0.935	0.957	0.948	0.435	0.447	0.322	0.401	
Promedio			0.956	0.939	0.961		0.453	0.463	0.332	
% Inhibición			28.632	29.900	28.284		66.219	65.473	75.224	
Promedio				28.939				68.972		
Desv Est (SD)				0.850998382				5.427295968		
Error Est (SE)				0.491324145				3.133450788		

$$IC_{50} = (0.1 - (((0.1 - 0.03) * (66.219 - 50)) / (66.219 - 28.632))) = 0.070 \text{ mg/ml}$$

$$IC_{50} = (0.1 - (((0.1 - 0.03) * (65.473 - 50)) / (65.473 - 29.900))) = 0.070 \text{ mg/ml}$$

$$IC_{50} = (0.1 - (((0.1 - 0.03) * (75.224 - 50)) / (75.224 - 28.284))) = 0.062 \text{ mg/ml}$$

$$C = [(C_1 - C_2) \times (PI_1 - 50)] / (PI_1 - PI_2)$$

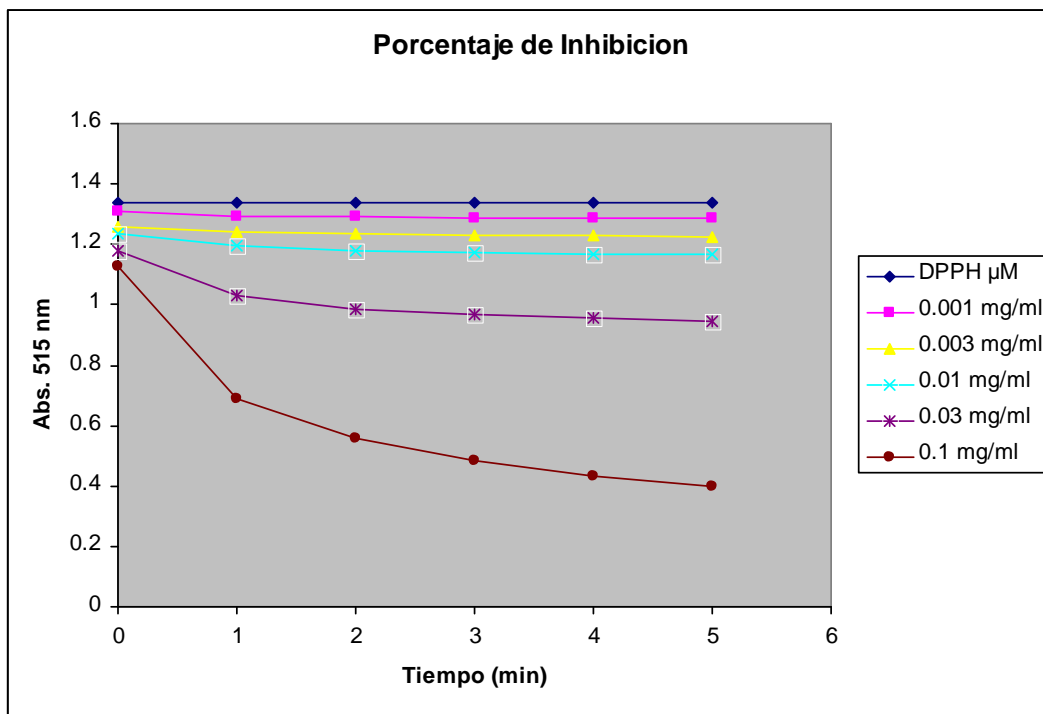
$$\bar{X} IC_{50} = 0.067 \pm 0.004 \text{ mg/ml}$$

PI₁ y PI₂: Valores de porcentajes de inhibición superiores e inferiores al 50% de inhibición.

C₁ y C₂: Concentraciones en las que se producen PI₁ y PI₂.

CUADRO Nº 11. Capacidad de Inhibición del radical libre DPPH de la Cumaceba a través del tiempo.

tiempo (min)	DPPH μ M	0.001 mg/ml	0.003 mg/ml	0.01 mg/ml	0.03 mg/ml	0.1 mg/ml
0	1.34	1.307	1.258	1.234	1.181	1.128
1	1.34	1.294	1.241	1.193	1.033	0.688
2	1.34	1.29	1.235	1.179	0.987	0.556
3	1.34	1.287	1.23	1.173	0.97	0.485
4	1.34	1.286	1.228	1.169	0.956	0.431
5	1.34	1.285	1.225	1.166	0.948	0.401



Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología - IIAP

Método de DPPH

Muestra: Extractos metanólicos de la Corteza de Amasisa de (100 mg/ml) a concentraciones crecientes 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 y 1 mg/ml en 1 ml como volumen final.

Muestra	Tiempo (min.)	DPPH	Extracto Metanólico de la Corteza de <i>Erythrina fusca</i>											
			0.001 mg/ml			Promedio	0.003 mg/ml			Promedio	0.01 mg/ml			Promedio
			1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Amasisa	0'	1.19	1.158	1.13	1.104	1.131	1.113	1.115	1.104	1.111	1.087	1.118	1.064	1.090
	30"	1.19	1.155	1.105	1.099	1.120	1.094	1.1	1.104	1.099	1.082	1.112	1.053	1.082
	1'	1.19	1.145	1.101	1.095	1.114	1.074	1.099	1.098	1.090	1.076	1.099	1.044	1.073
	1' 30"	1.19	1.143	1.095	1.093	1.110	1.069	1.098	1.095	1.087	1.075	1.099	1.042	1.072
	2'	1.19	1.143	1.088	1.092	1.108	1.064	1.096	1.093	1.084	1.073	1.097	1.035	1.068
	2' 30"	1.19	1.142	1.086	1.092	1.107	1.054	1.094	1.09	1.079	1.072	1.097	1.032	1.067
	3'	1.19	1.142	1.084	1.092	1.106	1.051	1.092	1.089	1.077	1.071	1.097	1.031	1.066
	3' 30"	1.19	1.14	1.083	1.09	1.104	1.047	1.091	1.089	1.076	1.07	1.095	1.029	1.065
	4'	1.19	1.139	1.081	1.088	1.103	1.046	1.09	1.089	1.075	1.07	1.093	1.028	1.064
	4' 30"	1.19	1.139	1.081	1.089	1.103	1.042	1.089	1.089	1.073	1.07	1.093	1.027	1.063
5'	1.19	1.138	1.08	1.087	1.102	1.044	1.089	1.088	1.074	1.069	1.092	1.026	1.062	
Promedio			1.139	1.081	1.088		1.044	1.089	1.089		1.070	1.093	1.027	
% Inhibición			4.314	9.188	8.571		12.269	8.459	8.515		10.112	8.179	13.697	
Promedio				7.358				9.748				10.663		
Desv Est (SD)				2.65402775				2.183437005				2.800046479		
Error Est (SE)				1.532303636				1.260607943				1.616607589		

Muestra	Tiempo (min.)	DPPH	Extracto Metanólico de la Corteza de <i>Erythrina fusca</i>											
			0.03 mg/ml			Promedio	0.1 mg/ml			Promedio	0.3 mg/ml			Promedio
			1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Amasisa	0'	1.19	1.064	1.06	1.045	1.056	1.065	1.037	1.013	1.038	1.005	1.001	1.001	1.002
	30"	1.19	1.045	1.014	1.008	1.022	1.029	0.983	0.99	1.001	0.919	0.821	0.893	0.878
	1'	1.19	1.041	1.008	0.996	1.015	0.959	0.938	0.947	0.948	0.844	0.781	0.881	0.835
	1' 30"	1.19	1.032	1.002	0.986	1.007	0.955	0.918	0.928	0.934	0.785	0.741	0.766	0.764
	2'	1.19	1.032	1.002	0.974	1.003	0.932	0.915	0.895	0.914	0.773	0.733	0.761	0.756
	2' 30"	1.19	1.029	0.999	0.952	0.993	0.944	0.915	0.892	0.917	0.73	0.664	0.707	0.700
	3'	1.19	1.028	0.994	0.945	0.989	0.944	0.907	0.886	0.912	0.712	0.656	0.699	0.689
	3' 30"	1.19	1.027	0.989	0.939	0.985	0.94	0.906	0.885	0.910	0.69	0.621	0.674	0.662
	4'	1.19	1.027	0.986	0.935	0.983	0.928	0.899	0.872	0.900	0.669	0.602	0.649	0.640
	4' 30"	1.19	1.025	0.981	0.932	0.979	0.921	0.889	0.87	0.893	0.651	0.586	0.633	0.623
5'	1.19	1.022	0.979	0.926	0.976	0.916	0.887	0.869	0.891	0.637	0.572	0.613	0.607	
Promedio			1.025	0.982	0.931		0.922	0.892	0.870		0.652	0.587	0.632	
% Inhibición			13.894	17.479	21.765		22.549	25.070	26.863		45.182	50.700	46.919	
Promedio				17.712				24.827				47.600		
Desv Est (SD)				3.940762685				2.167085044				2.821540879		
Error Est (SE)				2.275200397				1.251167134				1.629017386		

$$IC_{50} = (1 - (((1 - 0.3) * (59.300 - 50)) / (59.300 - 45.182))) = 0.539 \text{ mg/ml}$$

$$IC_{50} = (1 - (((1 - 0.3) * (46.751 - 50)) / (46.751 - 50.700))) = 0.424 \text{ mg/ml}$$

$$IC_{50} = (1 - (((1 - 0.3) * (58.515 - 50)) / (58.515 - 46.919))) = 0.486 \text{ mg/ml}$$

$$C = [(C_1 - C_2) \times (PI_1 - 50)] / (PI_1 - PI_2)$$

$$\bar{X} IC_{50} = 0.483 \pm 0.057 \text{ mg/ml}$$

PI₁ y PI₂: Valores de porcentajes de inhibición superiores e inferiores al 50% de inhibición.
C₁ y C₂: Concentraciones en las que se producen PI₁ y PI₂.

Muestra	Tiempo (min.)	DPPH	Extracto Metanólico de la Corteza de <i>Erythrina fusca</i>			
			1 mg/ml			Promedio
			1	2	3	
Amasisa	0'	1.19	0.963	0.997	0.95	0.970
	30"	1.19	0.791	0.902	0.711	0.801
	1'	1.19	0.694	0.842	0.601	0.712
	1' 30"	1.19	0.672	0.821	0.596	0.696
	2'	1.19	0.644	0.812	0.593	0.683
	2' 30"	1.19	0.619	0.764	0.574	0.652
	3'	1.19	0.614	0.756	0.552	0.641
	3' 30"	1.19	0.557	0.689	0.538	0.595
	4'	1.19	0.515	0.685	0.5	0.567
	4' 30"	1.19	0.485	0.623	0.498	0.535
5'	1.19	0.453	0.593	0.483	0.510	
Promedio			0.484	0.634	0.494	
% Inhibición			59.300	46.751	58.515	
Promedio				54.855		
Desv Est (SD)				7.02971485		
Error Est (SE)				4.05860776		

CUADRO N° 12. Capacidad de Inhibición del radical libre DPPH de la Amasisa a través del tiempo.

Tiempo (min.)	DPPH μ M	0.001 mg/ml	0.003 mg/ml	0.01 mg/ml	0.03 mg/ml	0.1 mg/ml	0.3 mg/ml	1 mg/ml
0	1.19	1.131	1.111	1.09	1.056	1.038	1.002	0.97
1	1.19	1.114	1.09	1.073	1.015	0.948	0.835	0.712
2	1.19	1.108	1.084	1.068	1.003	0.914	0.756	0.683
3	1.19	1.106	1.077	1.066	0.989	0.912	0.689	0.641
4	1.19	1.103	1.075	1.064	0.983	0.9	0.64	0.567
5	1.19	1.102	1.074	1.062	0.976	0.891	0.607	0.51

