



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

RELACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES, FLAVONOIDES
Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN BRÀCTEAS DE
BOUGAINVILLEA GLABRA CHOISY

ARMIJOS AGUILAR JUAN CARLOS
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

CEDEÑO SARITAMA RAQUEL ELIZABETH
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Relación del contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad
antioxidante en bràcteadas de *Bougainvillea glabra* Choisy

ARMIJOS AGUILAR JUAN CARLOS
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

CEDEÑO SARITAMA RAQUEL ELIZABETH
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

Relación del contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en
bràctreas de *Bougainvillea glabra* Choisy

ARMIJOS AGUILAR JUAN CARLOS
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

CEDEÑO SARITAMA RAQUEL ELIZABETH
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

JARAMILLO JARAMILLO GLADYS CARMITA

MACHALA, 11 DE FEBRERO DE 2019

MACHALA
2019

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado Relación del contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en brácteas de *Bougainvillea glabra* Choisy, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.

JARAMILLO JARAMILLO GLADYS CARMITA
0701575920
TUTOR - ESPECIALISTA 1

CAMPO FERNANDEZ MERCEDES
0959164625
ESPECIALISTA 2

MARQUEZ HERNANDEZ INGRID
0959479577
ESPECIALISTA 3

Machala, 11 de febrero de 2019

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Relación del contenido de polifenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en brácteas de Bougainvillea glabra Choisy recolectadas en la Provincia de EL Oro. Autores (Armijos y Cedeño).docx (D47081877)

Submitted: 1/21/2019 5:48:00 PM

Submitted By: cjaramillo@utmachala.edu.ec

Significance: 0 %

Sources included in the report:

Instances where selected sources appear:

0

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, ARMIJOS AGUILAR JUAN CARLOS y CEDEÑO SARITAMA RAQUEL ELIZABETH, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado Relación del contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en bràcteadas de *Bougainvillea glabra* Choisy, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

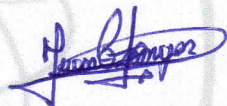
Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

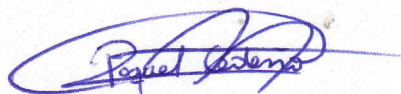
Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 11 de febrero de 2019



ARMIJOS AGUILAR JUAN CARLOS
0706662301



CEDEÑO SARITAMA RAQUEL ELIZABETH
0705520237

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, especialmente a mi madre que ha sido un pilar fundamental a lo largo de mi vida y trayectoria profesional ya que sin sus consejos y su apoyo incondicional no podría terminar este logro tan anhelado.

A mi esposa que ha sido participe en mis estudios y parte fundamental en el trabajo de titulación, siempre a mi lado en mis mejores momentos y también los peores animándome a seguir adelante juntos.

A mi hermanos y familia que han estado apoyándome con sus ánimos para no quedarme a la mitad del camino y poder avanzar hasta el final de mi trayectoria.

A mi tutora Dra. Carmita Jaramillo por formar parte imprescindible aportando sus conocimientos y consejos para poder terminar mis estudios.

A mis mayores mentores y amigas Dra. Mercedes Campos y Dra. Ingrid Márquez que han aportado su conocimiento y consejos de manera primordial incentivando a la investigación científica y poder terminar mi carrera de manera exitosa.

Juan Carlos Armijos Aguilar

DEDICATORIA

La siguiente investigación se la dedico a Dios porque sin él no hubiera podido lograr nada, a mis padres que han sido el pilar fundamental en todo este proceso, pero en especial a mi madre que me ha apoyado incondicionalmente en todos los tropiezos y caídas que he pasado a lo largo de mi carrera universitaria.

A mis hermanos, en especial a mi hermanito porque fue el niño que me motivó a seguir adelante, luchando por ofrecerle un mejor porvenir para su futuro.

A mi esposo que siempre estuvo presente ayudándome e incentivando siempre a luchar por mis metas y no desvanecer en ningún momento a pesar de las adversidades.

A nuestra tutora la Dra. Carmita Jaramillo, Dra. Mercedes Campos y Dra. Ingrid Hernández que estuvieron en este proceso entregándonos sus conocimientos para culminar con éxito nuestra investigación.

A mis familiares, amigos, profesores y todos aquellos que han contribuido a lo largo del camino para mi crecer tanto personal como profesional.

Raquel Elizabeth Cedeño Saritama

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirnos día a día amanecer con salud y sabiduría para tomar las mejores decisiones en la vida cotidiana y profesional.

A mi Madre por ser la mejor mujer del mundo que me ha formado inculcando valores y educación a lo largo de mi vida.

A mi esposa que ha sido imprescindible en mi vida ya que con su cariño y apoyo incondicional hemos podido terminar este proceso tan anhelado para nosotros.

A mi tutora Dra. Carmita Jaramillo por guiarnos día a día con sus consejos y conocimientos para terminar este proceso de titulación.

A la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación como entidad auspiciante de mi Beca para poder terminar mi carrera profesional.

Juan Carlos Armijos Aguilar

AGRADECIMIENTO

A Dios porque siempre forjó mi camino y me llevó por el sendero correcto; también por ser quien me dio las habilidades y destrezas que me permitieron llegar a este momento.

A mis padres por los valores inculcados en el hogar los cuales nos han permitido crecer y ser la persona que hoy somos, además por darnos la oportunidad de formarnos profesionalmente y por todos los logros cumplidos hasta la actualidad incluido este.

A mi esposo porque siempre me apoyó incondicionalmente, ambos sabemos que este proceso no fue fácil, pero si te esfuerzas sabes que al final cosecharas lo que sembraste, y solo toca pedir a Dios que nos siga bendiciendo para poder seguir luchando por un mejor futuro.

A nuestra tutora la Dra. Carmita Jaramillo por brindarnos sus conocimientos para poder culminar la tesis con éxito y sobre todo por la paciencia durante todo este proceso.

Raquel Elizabeth Cedeño Saritama

RESUMEN

La *Bougainvillea glabra* C. es una planta ornamental nativa de Brasil, posee una variedad de colores tales como violeta, naranja, rojo, amarillo, entre otros. Debido a la variedad de colores posee múltiples metabolitos secundarios que ayudan al tratamiento y cura de muchas patologías. Las brácteas, principalmente, poseen una variedad de actividades farmacológicas entre las cuales destacan una alta capacidad de reducir los radicales libres causados por el estrés oxidativo en el ser humano, propiedades antipiréticas, antiinflamatorias, analgésicas, entre otras.

Objetivo: la finalidad de la presente investigación fue establecer la relación que existe entre fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en brácteas de *B. glabra* C. (naranja y morada) recolectadas en la Provincia de El Oro

Metodología: se molinó la droga hasta obtener un polvo fino de aproximadamente 1mm de diámetro, y se procedió a realizar los siguientes parámetros de calidad; humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico y sustancias solubles, tanto para la variedad naranja y morada.

Luego se prepararon extractos acuosos y etanólicos 95° por maceración asistida por ultrasonido, consecutivamente se determinó pH, densidad, e índice de refracción; todos estos ensayos se hicieron por triplicado.

La identificación cualitativa de los metabolitos secundarios se realizó por tamizaje fitoquímico y por cromatografía en capa delgada. Se cuantificó el contenido de fenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteu, flavonoides por el método colorimétrico de tricloruro de aluminio y la capacidad antioxidante por DPPH.

Resultados: los resultados para cenizas totales, la mayoría de las muestras no se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la OMS (2002) (<6%), con

excepción de las muestras 8BM y 13BM con un valor 5,96% y 5,94% respectivamente, demostrando que están dentro del límite permisible. En el tamizaje fitoquímico se evidenció la posible presencia de fenoles, flavonoides, alcaloides, azúcares reductores, saponinas, cumarinas, triterpenos, quinonas antocianinas y aminoácidos. En la cromatografía de capa delgada sugiere la presencia de compuestos fenólicos, terpenos, aminoácidos y la decoloración amarilla del reactivo DPPH, que indica la posible presencia de la actividad antioxidante en las brácteas moradas y naranjas.

El contenido de fenoles totales en las brácteas moradas y naranjas fue de $79,91 \pm 0,01$ mg EAG/g ES y $129,61 \pm 0,00$ mg EAG/g ES respectivamente. Los flavonoides de las brácteas moradas fueron de $9,06 \pm 0,70$ mg EQ/g ES. y naranjas de $40,10 \pm 2,47$ mg EQ/g ES. Finalmente, en la capacidad antioxidante el IC₅₀ fue de 270 ug/ml (moradas) y 37 ug/ml (naranjas). Existiendo una correlación positiva ($r=0,9953$) entre fenoles y flavonoides, al contrario de la correlación entre fenoles vs actividad antioxidante (IC₅₀) y flavonoides vs actividad antioxidante (IC₅₀) que existe una correlación negativa ($r=-0,9995$; $r=-0,9948$).

Se analizaron los datos y el estudio de correlación de Pearson mediante el programa estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI.II.

Conclusión: mediante esta investigación se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo de los metabolitos secundarios presentes en las brácteas morada y naranja. El mayor contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante se obtuvo en las brácteas de color naranja, existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto a las de color morado.

Palabras claves: *Bougainvillea glabra*, capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, flavonoides

ABSTRACT

The *Bougainvillea glabra* C. is an ornamental plant native to Brazil, it has a variety of colors such as violet, orange, red, yellow, among others. Due to the variety of colors it has multiple secondary metabolites that help the treatment and cure of many pathologies. Bracts, mainly, have a variety pharmacological activities, among which are a high capacity to reduce free radicals caused by oxidative stress in humans, antipyretics, anti-inflammatory, analgesic properties, among others.

Objective: the purpose of this research was to establish the relationship between total phenols, flavonoids and antioxidant capacity in *B. glabra* C. bracts collected in the province of El Oro.

Methodology: it grinded the drug until obtaining a fine powder of approximately 1 mm in diameter; proceeded to make the following quality parameters; humidity, total ash, water soluble ashes, insoluble ashes in hydrochloric acid and soluble substances, both for the orange and purple varieties.

Aqueous and ethanolic 95° extracts were then prepared by ultrasonic assisted maceration, consecutively pH, density, and refractive index, were determined; all these tests were carried out in triplicate.

The qualitative identification of the secondary metabolites was carried out by phytochemical screening and by thin layer chromatography. The total content of total phenols was quantified by the Folin Ciocalteu method, flavonoids by colorimetric method of aluminum trichloride and antioxidant capacity by DPPH.

Its analyzed the data and the Pearson correlation study through the statistical program STATGRAPHICS CENTURION XVI.II.

Results: the results for total ash, the majority of the samples are not within the parameters established by the WHO (2002) (<6%), except for the samples 8BM and

13BM with a value 5.96% and 5.94% respectively, showing that they are within the permissible limit. Phytochemical screening revealed the possible presence of phenols, flavonoids, alkaloids, reducing sugars, saponins, coumarins, triterpenes, anthocyanin quinones and amino acids. In thin layer chromatography it suggests the presence of phenolic compounds, terpenes, amino acids and yellow discoloration of DPPH reagent, which indicates the possible presence of antioxidant activity in purple and orange bracts.

The content of total phenols in the purple and orange color bracts was $79,91 \pm 0,01$ mg GAE/g ES and $129,61 \pm 0,00$ mg GAE/g ES respectively. The flavonoids of the purple bracts were $9,06 \pm 0,70$ mg QE/g ES and oranges bracts of $40,10 \pm 2,47$ mg QE/g ES. Finally, in the antioxidant capacity the IC₅₀ was 270 ug/ml (purple) and 370 ug/ml (orange). There is a positive correlation ($r = 0.9953$) between phenols and flavonoids, contrary to the correlation between phenols vs antioxidant activity (IC₅₀) and flavonoids vs antioxidant activity (IC₅₀) that there is a negative correlation ($r = -0.9995$; $r = -0.9948$).

Conclusion: through this research, qualitative and quantitative analysis of the secondary metabolites present in the purple and orange bracts was carried out. The highest content of phenols, flavonoids and antioxidant activity was obtained in the orange bracts, there being statistically significant differences with respect to the purple color.

Keywords: *Bougainvillea glabra*, antioxidant capacity, phenolic compounds, flavonoids

ÍNDICE

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTO	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
CAPÍTULO I	14
1.1 Introducción	14
1.2 Formulación del problema	15
1.3 Planteamiento del problema	16
1.4.1 Objetivo general	17
1.4.2 Objetivos específicos	17
1.5 Hipótesis	17
CAPÍTULO II MARCO REFERENCIAL	18
2.1 Descripción general de la planta	18
2.2 Historia	18
2.3 Morfología de la planta	19
2.3.1 Tallos	19
2.3.2 Hojas	19
2.3.3 Flores	19
2.3.4 Brácteas	20
2.4 Composición química	20
2.4.1 Compuestos fenólicos	20
2.4.1.1 Fenoles simples	21
2.4.1.2 Flavonoides	21
2.4.1.3 Taninos	22

2.4.2 Alcaloides	23
2.4.3 Saponinas	23
2.4.4 Betalaínas	24
2.5 Cromatografía	25
2.6 Etnofarmacología de la planta	26
2.7 Propiedades farmacológicas	27
2.8 Toxicidad	27
CAPÍTULO III METODOLOGÍA	28
3.1 Materiales y métodos	28
3.1.1 Materiales	28
3.1.2 Equipos	29
3.1.3 Reactivos	29
3.1.4 Material de estudio	30
3.2 Diseño metodológico	30
3.2.1 Lugar de experimentación	30
3.2.2 Obtención de la muestra	31
3.2.3 Preparación de la droga	31
3.2.4 Control de calidad de droga seca	31
3.2.4.1 Determinación de humedad residual	31
3.2.4.2 Determinación de cenizas totales	32
3.2.4.3 Determinación de cenizas solubles en agua	33
3.2.4.4 Determinación de cenizas insolubles en HCl	33
3.2.4.5 Determinación de sustancias solubles	34
3.2.5 Preparación de extractos	35
3.2.6 Parámetros de control de calidad de los extractos	35
3.2.7 Identificación de metabolitos secundarios por ensayos cualitativos	35
3.2.7.1 Tamizaje fitoquímico	35
3.2.7.2 Cromatografía en capa delgada (CCD)	36

3.2.8 Cuantificación de metabolitos secundarios de la droga	37
3.2.8.1 Preparación de extractos secos	37
3.2.8.2 Cuantificación del contenido de fenoles totales (CFT) por el método de Folin-Ciocalteu	37
3.2.8.3 Cuantificación de flavonoides por el método colorimétrico de tricloruro de aluminio	38
3.2.8.4 Evaluación de la actividad antioxidante por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	38
3.2.9 Análisis estadístico	39
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 Parámetros farmacognósticos	40
4.2 Control de calidad de los extractos	43
4.3 Tamizaje fitoquímico	45
4.4 Cromatografía en capa delgada (CCD)	48
4.4.1 Revelado físico	48
4.4.2 Revelado químico	50
4.4.2.1 Revelado con cloruro férrico (FeCl ₃)	50
4.4.2.2 Revelado con ácido sulfúrico 50% en metanol + vainillina + calor	50
4.4.2.3 Revelado con DPPH (2,2-difenil, 1-pic5rilhidrazil)	51
4.4.2.4 Revelado con ninhidrina	52
4.5 Cuantificación de metabolitos secundarios	53
4.5.1 Cuantificación de fenoles por el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu	53
4.5.2 Cuantificación de flavonoides totales por el método colorimétrico de cloruro de aluminio	56
4.5.3 Evaluación de la actividad antioxidante por DPPH	59

4.5.4 Correlación del contenido de fenoles totales, flavonoides y la actividad antioxidante	61
CAPÍTULO V CONCLUSIONES	65
CAPÍTULO VI RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>B. glabra</i> C.....	19
Tabla 2. Coordenadas de los lugares de recolección.....	32
Tabla 3. Análisis farmacognóstico de la droga cruda.....	41
Tabla 4. Resultados de sustancias solubles de la droga cruda.....	43
Tabla 5. Control de calidad.....	44
Tabla 6. Tamizaje fitoquímico.....	46
Tabla 7. Contenido de Fenoles totales en brácteas de <i>B. glabra</i> C.....	55
Tabla 8. Contenido de flavonoides en brácteas de <i>B. glabra</i> C.....	58
Tabla 9. IC ₅₀ de las brácteas de <i>B. glabra</i> C.....	60
Tabla 10. Correlación estadística entre fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante.....	62

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Brácteas de color morado y naranja de <i>B. glabra</i> C.....	19
Ilustración 2. Estructura química de un fenol (catecol)	22
Ilustración 3. Estructura básica de un flavonoide.....	23
Ilustración 4. Estructura de un tanino hidrolizable.....	23
Ilustración 5. Estructura de un tanino condensado proantocianidina.....	24
Ilustración 6. Estructura de un núcleo de alcaloide.....	24
Ilustración 7. Estructura de una saponina.....	25
Ilustración 8. Estructura de las betaxantinas.....	26
Ilustración 9. Estructura de las betacianinas.....	26
Ilustración 10. Cámara para cromatografía de capa delgada.....	27
Ilustración 11. Tamizaje fitoquímico.....	37
Ilustración 12. Revelado físico con luz ultravioleta 254 y 365 nm.....	50
Ilustración 13. Revelado con cloruro férrico.....	51
Ilustración 14. Revelado con ácido sulfúrico al 50% en metanol + vainillina + calor....	52
Ilustración 15. Revelado químico con disolución metanólica al 0,2% de DPPH.....	53
Ilustración 16. Revelado con ninhidrina.....	54
Ilustración 17. Curva de calibración del ácido gálico.....	55
Ilustración 18. Curva de calibración de quercetina.....	58
Ilustración 19. Análisis de correlación fenoles vs flavonoides.....	63
Ilustración 20. Análisis de correlación de fenoles vs actividad antioxidante (IC ₅₀).....	64
Ilustración 21. Análisis de correlación de flavonoides vs actividad antioxidante (IC ₅₀).....	64

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas siempre han sido parte de la ciencia medicinal desde el comienzo de la civilización humana hasta en la actualidad moderna ¹. Esta medicina herbaria se ha utilizado ancestralmente para aliviar o curar enfermedades, dando lugar a los fitofármacos que son muy apreciados, no solamente debido a su bajo costo, sino también por los niveles de toxicidad y efectos secundarios reducidos en comparación con los productos sintéticos ².

La estrategia de la Organización mundial de la Salud para el año 2014-2023, tiene como objetivo principal “promover la utilización segura y eficaz de la medicina tradicional”. Mediante la implementación de reglamentos y como base la investigación científica, para la incorporación de productos naturales en los sistemas de Salud, que cumplan con los estándares de calidad establecidos ³.

El valor de estas plantas medicinales radica en un grupo de sustancias químicas, que producen un efecto fisiológico definido sobre el cuerpo humano, denominados metabolitos secundarios. Entre los componentes bioactivos existentes, los más importantes son los alcaloides, los flavonoides y los compuestos fenólicos. Estos últimos ayudan a reducir los niveles de radicales libres que se generan en el cuerpo humano como parte del proceso metabólico normal, ya que funcionan como potentes antioxidantes, para reducir el daño oxidativo celular ¹.

La *Bougainvillea glabra* Choisy pertenece a la familia Nyctaginaceae existiendo 14 especies diferentes, pero entre las más importantes horticultamente: *B. spectabilis*, *B.*

glabra C., y *B. peruviana*. Se han reportado una diversidad de metabolitos secundarios tales como flavonoides, taninos, alcaloides, betaxantinas entre otros. En medicina tradicional están indicadas para el tratamiento de la tos y tos ferina, especialmente, la especie *B. glabra* se recomienda para el asma, la bronquitis y la disentería ⁴. En algunos casos está indicada para reducir los síntomas de la fiebre, la acidez, la diarrea, y se le ha atribuido una alta capacidad antiinflamatoria y antioxidante ⁵.

A partir de esto, la presente investigación está centrada en establecer la relación que existe entre el contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en brácteas de *B. glabra* C. (naranja y morada).

La metodología utilizada en la presente investigación para la cuantificación de polifenoles totales, está descrita por Kuppusamy et al., (2018) ⁶. Para la cuantificación de flavonoides, por Lin & Tang, (2007) ⁷ ; y la actividad antioxidante descrita por Barrón-Yáñez, (2011) ⁸.

Esto contribuirá a aportar información que fortalezca y justifique el uso de la medicina tradicional para tratar las diferentes enfermedades inflamatorias y otras patologías causadas por el estrés oxidativo con la finalidad de mejorar la calidad de vida de la población ².

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Existe una relación entre el contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en brácteas de *B. glabra* C. (naranja y morada) recolectadas en la Provincia de El Oro?

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día, hay un compromiso creciente en cuanto a la investigación, el desarrollo, la innovación, la producción y comercialización de fitofármacos, debido que en los últimos años hay una gran tendencia a consumir productos de origen natural. Estos son considerados beneficiosos para la salud (ayudan a prevenir múltiples patologías), se ha venido registrando un aumento significativo en la demanda de estos productos y, como consecuencia, la oferta de estos. La Organización Mundial de la Salud no sólo reconoce la importancia de las terapias usando plantas medicinales y su alcance en el ámbito mundial, sino que incluso ha creado una estrategia para la aplicación de la medicina tradicionales. Ha destacado que éstas siguen estando muy poco reglamentadas, en términos generales, en todos los países ³.

Los antioxidantes son un grupo de moléculas reconocidas, entre otras, por su capacidad para neutralizar los radicales libres. Estas sustancias han surgido como una alternativa para combatir deficiencias asociadas al estrés oxidativo, tales como las enfermedades cardiovasculares, reumáticas y a eventos tan comunes en los seres humanos como el envejecimiento.

En los últimos años la atención se ha dirigido hacia la química de alimentos, ya que hay una necesidad de aislar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en las plantas comestibles, los cuales tienen propiedades farmacológicas o nutritivas mientras que otros son tóxicos.

La siguiente investigación analiza y relaciona la composición de fenoles totales, flavonoides y la actividad antioxidante que está presente en las brácteas de dos variedades de *B. glabra* C. color naranja y morada. En la actualidad no se ha hecho un estudio de relación de estas variedades de *B. glabra* C. por lo que aporta información relevante sobre cuál es la variedad con más alto contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante para futuros estudios y formulaciones farmacéuticas.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la relación que existe entre fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en brácteas de *B. glabra* C. (naranja y morada) recolectadas en la Provincia de El Oro.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las brácteas de *B. glabra* C. a través de tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa delgada.
- Evaluar el contenido de fenoles totales presentes en las brácteas de *B. glabra* C. por el método de Folin-Ciocalteu.
- Determinar el contenido de flavonoides presentes en las brácteas de *B. glabra* C. por el método colorimétrico de cloruro de aluminio.
- Evaluar la capacidad antioxidante en las brácteas de *B. glabra* C. por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).
- Analizar estadísticamente la relación que existe entre el contenido de fenoles, flavonoides y la capacidad antioxidante en brácteas de *B. glabra* C.

1.5 HIPÓTESIS

¿Existe una relación y diferencia significativa en el contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en las brácteas de *B. glabra* C. de acuerdo a la variedad de color?

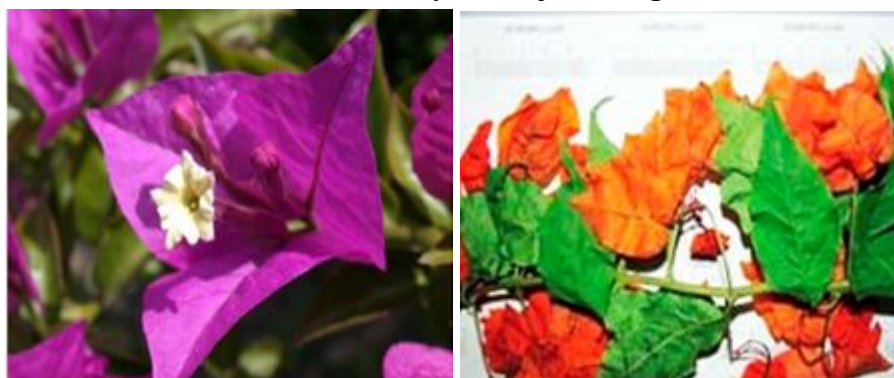
CAPÍTULO II MARCO REFERENCIAL

2.1 Descripción general de la planta

Es una planta leñosa y espinosa que posee una diversidad de colores tales como rosado, rojo, lila, naranja, amarillo, blanco, púrpura, escarlata, lavanda entre otros. (Ilustración 1.)

A pesar de ser una planta ornamental posee diversas propiedades farmacológicas debido a la presencia de los metabolitos secundarios que pueden ayudar en el tratamiento y en la cura de diferentes enfermedades; además se la conoce también como veranera, buganvilla, Santa Rita, carmelina entre otros ¹.

Ilustración 1. Brácteas de color morado y naranja de *B. glabra* C.



Fuente: Sahu y Saxena (2012) ⁵; Robles, Jaramillo y Rojas (2017) ⁹.

2.2 Historia

B. glabra C. es nativa de Brasil y al pasar de los años se ha ido distribuyendo por Oriente Medio, Bangladesh, India, Pakistán, América del Norte, América del Sur y otras áreas con zonas cálidas ¹. Esta planta lleva el nombre de *Bougainvillea* debido al navegador francés Louis de Bougainvillea que descubrió por primera vez estas plantas. Tiene una vida caducifolia de hoja caduca es decir que pierde sus hojas cada año. Sus pequeñas flores blancas generalmente aparecen en racimos rodeados de coloridas brácteas de papel, de ahí el nombre de flor de papel ¹⁰. En la tabla 1, se presenta la clasificación taxonómica.

Tabla 1. Taxonomía de *B. glabra* C.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Subdivisión	Spermatophyta
Clase	Magnoliopsida - Dicotyledons
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Nyctaginaceae
Género	<i>Bougainvillea</i>
Especie	<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy

Fuente: Sahu y Saxena (2012) ⁵; Espinoza y Espinosa (2008) ¹¹

2.3 Morfología de la planta

2.3.1 Tallos

Es un arbusto que puede medir hasta 12 metros de altura, tiene un tronco leñoso que se enreda fácilmente, además posee ramas puberulentas con espinas ^{11,12,13}.

2.3.2 Hojas

Las hojas son alternas pecioladas, ovaladas, lanceoladas de 4 a 10 cm de largo, agudas o acuminadas y verdes intensos brillantes, dependiendo de la edad de la planta y del lugar donde se encuentre ^{11,12}.

2.3.3 Flores

Las flores miden 14 mm de largo, son hermafroditas, poseen de 3 a 4 flores que se encuentran protegidas por las brácteas ^{11,12}.

2.3.4 Brácteas

Las brácteas están compuestas de 3 – 5 lóbulos y dependen intrínsecamente del color. Existen diferentes colores de brácteas tales como amarillo, naranja, lila, rosado, blanca, roja, entre otras. De acuerdo al color varía el contenido de fenoles de las plantas, algunas de ellas puedan tener más de 2 variedades de brácteas en la misma planta ^{11,12}.

2.4 Composición química

De acuerdo a los diversos estudios realizados, los metabolitos presentes en la *B. glabra* C. son los compuestos fenólicos. En este grupo se encuentran intrínsecos, mayoritariamente los flavonoides. Entre otros metabolitos secundarios tenemos el pinitol, los alcaloides indólicos, las saponinas, betalainas, terpenos, taninos y glicósidos cardiotónicos, según lo reportado en la bibliografía ^{5,13-18}.

2.4.1 Compuestos fenólicos

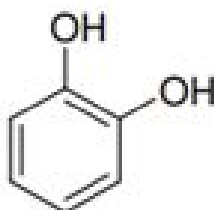
El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenólicos no son polifenoles, sino monofenoles. Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas ¹⁹.

Los fenoles son sintetizados por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (p. ej. los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas) ¹⁹.

2.4.1.1 Fenoles simples

Son compuestos que tienen en su estructura el grupo fenol, como se puede apreciar en la ilustración 2. Estos metabolitos secundarios son difíciles de encontrar en la naturaleza, se hallan en las plantas en forma de heterósido, entre estos destacan el arbutósido (antiséptico procedente de la hoja de la guayaba), vainilla, entre otros. Poseen actividades farmacológicas como antiinflamatorio, analgésico, antioxidante, antipirético en las diferentes especies vegetales ²⁰.

Ilustración 2. Estructura química de un fenol (catecol)

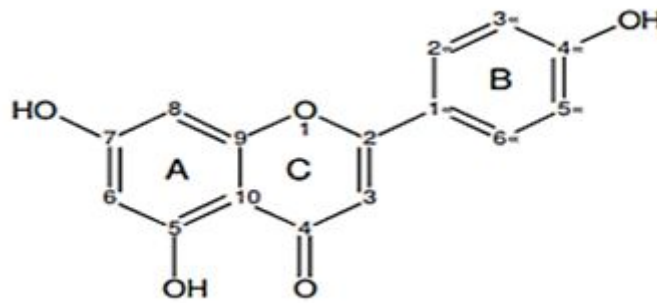


Fuente: Peñarrieta et al. (2014) ²¹.

2.4.1.2 Flavonoides

Son compuestos polifenólicos que se encuentran formados por 3 anillos: benzopirano 2-fenil, como se aprecia en la ilustración 3. Se hallan ampliamente distribuidos estos compuestos en las plantas superiores principalmente en las partes aéreas como las hojas, flores, y frutos. Son de diversas estructuras y de acuerdo a las variaciones en la estructura se pueden encontrar; flavonas, flavanonas, isoflavonoides, chalcona entre otros. Los seres humanos necesitan de estas sustancias químicas para protegerse del estrés oxidativo, que si no es tratado a tiempo puede ocasionar la muerte del individuo. Según estudios realizados, estos metabolitos poseen actividad antiinflamatoria, antiviral, antialérgica, antimicrobiana. Ellos, además, protegen al organismo frente a enfermedades cardiovasculares, es decir actúan sobre la pared vascular de los vasos sanguíneos y capilares, inhiben la agregación plaquetaria e incluso contrarrestan el cáncer ^{20, 22, 23}.

Ilustración 3. Estructura básica de un flavonoide

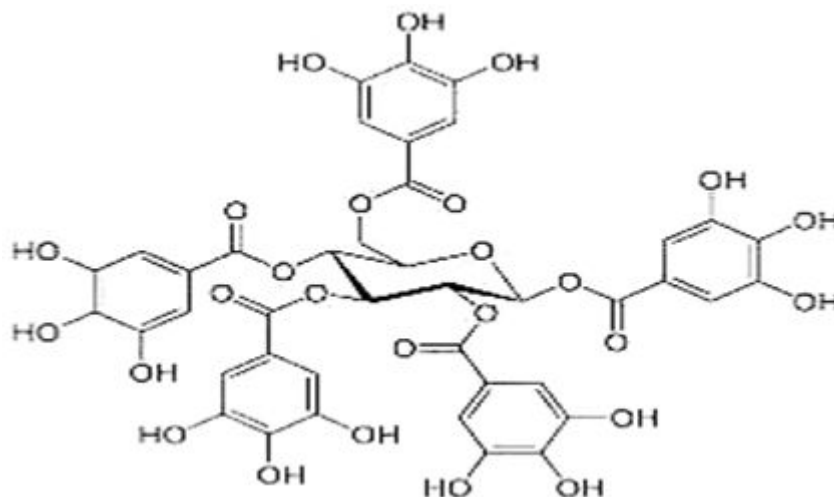


Fuente: Peñarrieta et al. (2014) ²¹.

2.4.1.3 Taninos

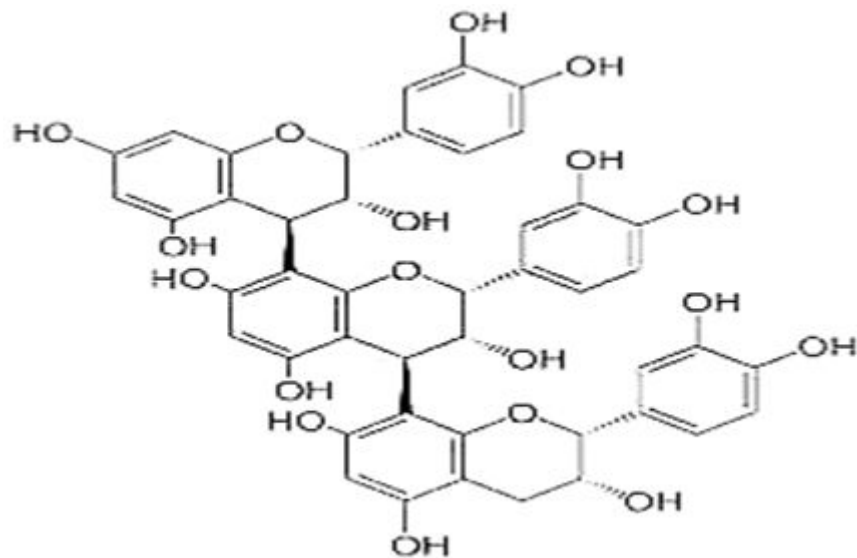
Estos compuestos fenólicos son solubles en agua y capaces de precipitar las proteínas y formar sales con los alcaloides. De acuerdo a ello, tienen la capacidad de curtir la piel y de ser astringentes. Se dividen en dos grupos los taninos hidrolizables o pirogálicos y los taninos no hidrolizables o condensados (ilustración 4 y 5), ambos estudiados por su actividad antioxidante. Aunque tienen otras propiedades farmacológicas que se reportan, entre las que se encuentran: antidiarreica, antibacteriana, anticarcinogénica, cicatrizante y hemostática ^{20,24,25}.

Ilustración 4. Estructura de un tanino hidrolizable



Fuente: Olivas et al (2015) ²⁵.

Ilustración 5. Estructura de un tanino condensado proantocianidina

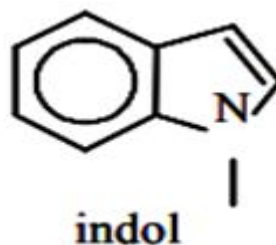


Fuente: Olivas et al (2015) ²⁵.

2.4.2 Alcaloides

Son las sustancias más estudiadas y de mayor interés. Poseen en su estructura el nitrógeno (ilustración 6), y son de carácter básico. Presentan estructuras muy complejas, así como propiedades farmacológicas muy diversas ^{20,26}.

Ilustración 6. Estructura de un núcleo de alcaloide



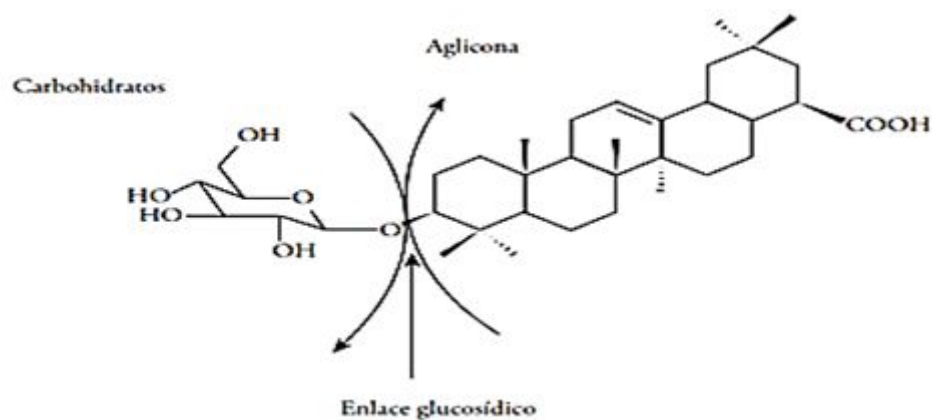
Fuente: Arango (2008) ²⁶.

2.4.3 Saponinas

Estos compuestos glicósidos están constituidos por un anillo terpenoide o esteroidal conocidos como aglicón o genina (ilustración 7). Tienen propiedades tensoactivas, es

decir son anfífilos. Poseen una amplia actividad biológica y farmacológica destacando sus propiedades como antiinflamatorio, antifúngico, antiagregante plaquetario, antihipercolesterolemico, antioxidante entre otras actividades ^{27,28}.

Ilustración 7. Estructura de una saponina



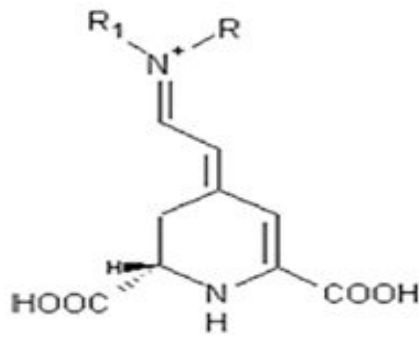
Fuente: Ahumada et al (2016) ²⁸.

2.4.4 Betaínas

Las betaínas son pigmentos vacuolares N-heterocíclicos solubles en agua, cuyo precursor es el ácido betalámico. Este condensa en un aminoácido o amina para las betaxantinas (ilustración 8); mientras que para las betacianinas condensa con el ciclo DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) (ilustración 9). Hasta la actualidad se han identificado 78 betaínas en aproximadamente 17 familias del orden Caryophyllales. Se han clasificado en dos grandes grupos que son, las betacianinas que dan el color violeta, y las betaxantinas que dan el color amarillo y naranja a las flores ²⁹.

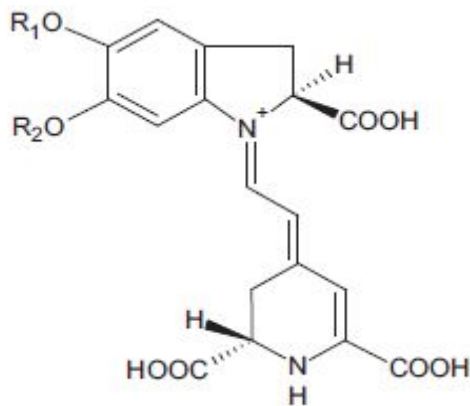
Las betalainas son estables a pH de 3 y 7, pero hay diferentes factores que pueden variar la estabilidad tales como la luz, temperatura, metales ^{9,29-32}. Posee diversas propiedades farmacológicas entre las que tenemos antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, antidiabética y hepatoprotectora ³².

Ilustración 8. Estructura de las betaxantinas



Fuente: Slimen et al (2017) ²⁹.

Ilustración 9. Estructura de las betacianinas



Fuente: Khan (2016) ³⁰.

2.5 Cromatografía

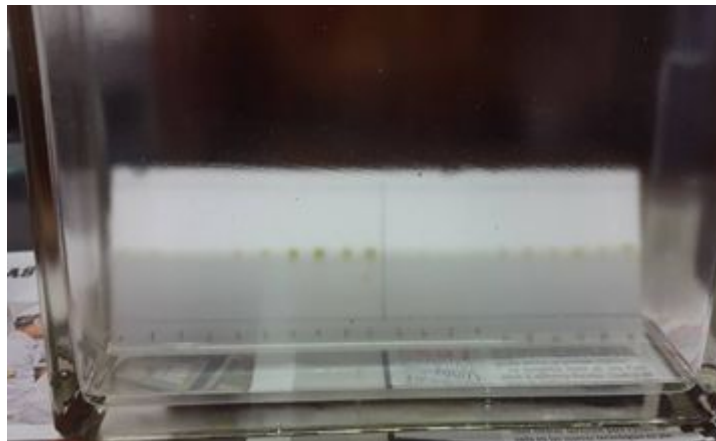
La cromatografía es un método físico que se basa en la separación de mezclas en sus componentes. Hay diferentes tipos de cromatografía tales como: la cromatografía en columna, cromatografía en papel, cromatografía de capa delgada, todas basadas en el mismo principio. Consta de dos fases, la fase estacionaria, que puede ser un sólido o gel, líquido que se encuentre adherido en un sólido y la fase móvil, que puede ser un gas o un líquido e incluso un fluido supercrítico ^{33,34}.

Los requisitos básicos son placas de vidrio, papel o metal, recubiertas de un adsorbente sólido (por ejemplo silica gel). La placa se coloca dentro de la cámara cromatográfica;

donde se encuentra el disolvente, que asciende lentamente a la placa por acción capilar³³. (Ilustración 10.)

En la cromatografía de capa delgada se utiliza una placa de vidrio recubierta con sílice gel u óxido de aluminio como fases estacionarias más comunes y la fase móvil va a depender de los componentes de la mezcla a separarse. Esta es una técnica cuya detección es simple, ya que depende si los componentes de interés son fluorescentes o si se absorben en luz ultravioleta, aunque en ocasiones se necesita el uso de sustancias reveladoras. Es una técnica fácil de realizar, rápida, sensible, de bajo costo y solo se necesita pocos miligramos para tener un buen análisis^{34,35}.

Ilustración 10. Cámara para cromatografía de capa delgada



2.6 Etnofarmacología de la planta

Se han reportado usos como antiinflamatorio y como repelente para insectos. Las hojas tienen gran actividad contra la diarrea, dolor de estómago, dolor de garganta y afecciones respiratorias. Las flores secas se las usa para tonificar los vasos sanguíneos, la leucorrea y como expectorante. El tallo de esta planta lo utilizan para curar síntomas de la hepatitis y las raíces se usan para tratar el aumento de la temperatura corporal (fiebre) y la decocción de estos tienen efecto laxante^{1,13,36}.

2.7 Propiedades farmacológicas

La *B. glabra* C. es una planta que tiene diversos usos tales como hipoglucemiante, antioxidante, antidiarreico, antiinflamatorio y analgésico, debido a la presencia de alcaloides, antipirético, antimicrobiano, antitusivo o antitusígeno. Otros estudios reportan que sirve para curar el cáncer debido al gran contenido de flavonoides y taninos ^{5,16,37,38}.

2.8 Toxicidad

Según Alcívar (2014) ³⁹, estudios de toxicidad realizados en extractos acuosos y etanólicos de sus flores y hojas, presentan toxicidad aguda a dosis de 500 mg/ml en peces *Mollinesia*. En ratones, la dosis letal 50 (DL₅₀) de extractos etanólicos por vía intraperitoneal es de 1000 mg/kg ³⁹.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Materiales

- Tubos de ensayo de capacidad 5 ml y 10 ml
- Cápsulas de porcelana
- Crisoles
- Mechero de alcohol
- Embudos caña larga
- Porta embudos
- Erlenmeyer
- Gradillas
- Espátulas
- Agitadores de vidrio
- Pipetas automáticas de 1000 uL, 100 uL, 10 ml
- Pipetas graduadas de 10 ml
- Pipetas volumétricas de 5 ml
- Puntas estériles desechables para pipeta de 100 uL, 1000 uL, y 10 ml
- Vasos de precipitación de 10 ml, 25 ml, 100 ml, 250 ml, y 500 ml
- Probetas de 50 ml y 100 ml
- Balones aforados de 10 ml, 25 ml, 50 ml y 100 ml
- Balones con tapa esmerilada 250 ml y 500 ml
- Fundas selladas herméticamente
- Mascarillas
- Papel aluminio
- Guantes
- Cofias
- Zapatones

3.1.2 Equipos

- Estufa marca MEMMERT; modelo INB 500
- Balanza analítica marca OHAUS; modelo PA224
- Cocineta marca Scientific
- Mufla marca Thermo Scientific
- Desecador
- Roto evaporador marca Heidolph
- Motor universal marca Erweka
- Agitador planetario marca Erweka
- Vortex mixer
- Refractómetro marca Antón Para Abbemat 200
- pH-metro marca Oakton
- Molino eléctrico marca Black & Decker
- Espectrofotómetro Thermo Scientific
- Baño ultrasónico Fisher Scientific
- Campana de gases

3.1.3 Reactivos

- Agua destilada
- Etanol 95%
- Metanol grado analítico
- Ácido nítrico concentrado
- Ácido clorhídrico al 10%
- Ácido clorhídrico al 1%
- Reactivo de Sudan III
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Reactivo Dragendorff
- Disolución tricloruro férrico al 5 %
- Reactivo de ninhidrina al 2 %
- Hidróxido de sodio

- Reactivo de Kedde
- Ácido clorhídrico concentrado
- Cinta de magnesio metálico
- Reactivo de Baljet “A” y “B”
- Reactivo de Fehling “A” y “B”
- Alcohol amílico
- Cloroformo (Sigma Aldrich)
- Reactivo DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Sigma Aldrich)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma Aldrich)
- Carbonato de sodio
- Ácido gálico (Sigma Aldrich)
- Tricloruro de aluminio 10%
- Acetato de potasio 1M
- Patrón de quercetina (Sigma Aldrich)

3.1.4 Material de estudio

La parte de la planta que se estudió fueron las brácteas de *B. glabra* C. de color naranja y morado, libre de impurezas según las normas de recolección de la Organización mundial de la Salud ⁴⁰.

3.2 Diseño metodológico

3.2.1 Lugar de experimentación

El trabajo de investigación se realizó en la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud en el laboratorio Tecnología Farmacéutica y de Investigación que pertenece a la Universidad Técnica de Machala ubicada en la Av. Panamericana Km 5½ Vía Pasaje. De acuerdo a su ubicación geográfica tiene una latitud de 3° 17' 46,003" S y una longitud de 79° 54' 48,539" W.

3.2.2 Obtención de la muestra

Se recolectaron muestras representativas en diferentes lugares de la zona alta y baja de la provincia de El Oro (tabla 2), presentando las siguientes coordenadas:

Tabla 2. Coordenadas de los lugares de recolección

Lugares de recolección	Latitud	Longitud
Machala	3° 28' 60,64" S	79° 89' 87,20" W
Pasaje	3° 33' 89,07" S	79° 81' 45,99" W
Piñas	3° 68' 73,03" S	79° 61' 09,05" W

3.2.3 Preparación de la droga

Se seleccionaron brácteas de *B. glabra* C. de color naranja y morado y se sometieron al proceso de lavado con abundante agua potable por 2 enjuagues y el último enjuague se lo realizó con agua desionizada tipo II, para evitar contaminación por carbonatos presentes del agua potable (no dejar en remojo por mucho tiempo, ya que habría despigmentación de las brácteas, debido a la hidrosolubilidad de los pigmentos). Luego de esto se realizó el proceso de secado al ambiente por 48 horas y luego en estufa por 48 horas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Finalmente, se procedió al proceso de molinado en un molino eléctrico hasta obtener un polvo fino de, aproximadamente, un tamaño de partícula homogéneo de 1 mm ⁴¹.

3.2.4 Control de calidad de droga seca

3.2.4.1 Determinación de humedad residual

Se siguió la metodología propuesta por Miranda y Cuellar, (2001)⁴². Para ello se pesó 2 g del material vegetal seco y molinado en una cápsula de porcelana tarada y se lo llevó a estufa a una temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 4 horas, hasta obtener un peso constante. Luego de enfriarlo en una desecadora para poder tenerlo a una temperatura

ambiente se procedió a pesar y realizar los respectivos cálculos con la siguiente fórmula que se detalla a continuación ⁴².

$$\%HR = ((X2 - X1) / (X2 - Xc)) \times 100$$

%HR= Porcentaje del contenido de humedad residual en la muestra

X2= Masa de la cápsula de porcelana con la droga (g)

X1= Masa de la cápsula de porcelana con la droga deshidratada (g)

Xc= Masa de la cápsula de porcelana vacía (g)

100= Constante para realizar los cálculos respectivos

3.2.4.2 Determinación de cenizas totales

Se procedió la metodología propuesta por la Organización Mundial de la Salud, (2011) ⁴³. Se pesó con precisión de 2 – 4 g del material vegetal seco esparcido de manera uniforme en un crisol de porcelana anteriormente tarado. Posteriormente, se llevó a la mufla a una temperatura entre 500 – 600 °C, por un lapso de 4 horas, hasta que tome un color blanco, lo que indica la ausencia de carbono. Se dejó enfriar en el desecador para luego pesar y obtener un peso constante, para los cálculos respectivos se utilizó la siguiente fórmula ⁴³:

$$\%CT = (C2 - C1) / (C2 - Cv) \times 100$$

%CT= Porcentaje de cenizas totales

C2= Masa del crisol con cenizas (g)

C1= Masa del crisol con droga (g)

Cv= Masa del crisol vacío (g)

100= Constante para realizar los cálculos respectivos

3.2.4.3 Determinación de cenizas solubles en agua

Se procedió con lo descrito por Miranda y Cuellar, (2001)⁴². Al crisol que contenía las cenizas totales, se le adicionaron 15 ml de agua destilada, se cubrió y se dejó hervir durante 5 minutos en un mechero bunsen. La disolución obtenida se filtró mediante un papel filtro libre de cenizas. Se traspasó el residuo obtenido al crisol, para luego llevarlo a incineración en una mufla a una temperatura de 750 ± 2 °C, durante el lapso de 4 horas, hasta obtener un peso constante. Se dejó enfriar en el desecador, se pesó, y procedió a realizar los cálculos respectivos con la siguiente fórmula ⁴²:

$$\%C_{sw} = (Cct - Cci) / (Cd - Cv) \times 100$$

$\%C_{sw}$ = Porcentaje de cenizas solubles en agua

Cct = Masa del crisol con cenizas totales (g)

Cci = Masa del crisol con cenizas insolubles en agua (g)

Cd = Masa con crisol con droga (g)

Cv = Masa del crisol vacío (g)

100 = Constante para realizar los cálculos respectivos

3.2.4.4 Determinación de cenizas insolubles en HCl

Se siguió la metodología propuesta por Miranda y Cuellar, (2001) ⁴². A las cenizas totales obtenidas, se le agregó 2 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 10%(v/v). Con una luna de reloj se cubrió el crisol y calentó en baño maría durante 10 minutos. Se retiró y enjuagó la luna de reloj con 5 ml de agua destilada caliente y se añadió al contenido del crisol. Luego se procedió a filtrar con papel filtro libre de cenizas, se enjuagó el vestigio con disolución acidulada de ácido nítrico (HNO₃), se agregó una cierta cantidad de nitrato de plata (AgNO₃) 0.1% para eliminar los cloruros presentes. Se eliminó el exceso de agua del filtrado en una estufa a una temperatura entre 100 - 105°C, para luego traspasar al crisol inicial y posteriormente llevar a la mufla, a una temperatura entre 700 - 750 °C durante 2 horas, hasta obtener un peso constante. Por último se llevaron los crisoles con las cenizas insolubles en ácido al desecador para enfriar y poder pesar en la balanza analítica para hacer los respectivos cálculos ⁴².

$$\%CI=(X_{ct} - X_{cl})/(X_1-X_v) \times 100$$

%CI= Porcentaje de cenizas insolubles en HCl

X_{ct}= Masa del crisol con cenizas totales

X_{cl}= Masa del crisol con las cenizas insolubles en HCl (g)

X₁= Masa del crisol con muestra (g)

X_v= Masa del crisol vacío (g)

100= Constante para realizar los cálculos respectivos

3.2.4.5 Determinación de sustancias solubles

Se utilizó la metodología propuesta por Miranda y Cuellar, (2001) ⁴². Se pesó en la balanza analítica 5 g de la droga en un Erlenmeyer de capacidad de 250 ml. Se le agregaron 100 ml de los diferentes disolventes por separado (agua, etanol y etanol/agua (50:50)), se cubrió y agitó de manera mecánica en una zaranda durante 6 horas. Pasado el tiempo descrito se dejó reposar durante 30 min y se filtró para recoger el sobrenadante, aproximadamente 20 ml, y luego se transfirió a una cápsula de porcelana previamente tarada. Se evaporó en baño de agua maría y se procedió a secar en la estufa a temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$. Seguidamente, se colocó en el desecador y finalmente se pesó en la balanza analítica. Se procedió a realizar los cálculos respectivos con la fórmula que se describe a continuación ⁴²:

$$\%S_s=(R*500*100)/(M(100-H)) \times 100$$

%S_s= Porcentaje de sustancias solubles (%)

H= Porcentaje de humedad residual (%)

R= Vestigio de la muestra (g)

M= Masa de la droga(g)

500 y 100= Factores para realizar los cálculos respectivos

3.2.5 Preparación de extractos

Se prepararon extractos acuosos y etanólicos a partir de la droga almacenada, de acuerdo a las especificaciones de la OMS (2003) ⁴⁰. Se utilizó como menstruo agua desionizada tipo II y etanol al 95° en proporción 1:10 (1 g de droga y 10 ml del disolvente). La maceración se realizó en un baño ultrasónico ^{42,44}.

3.2.6 Parámetros de control de calidad de los extractos

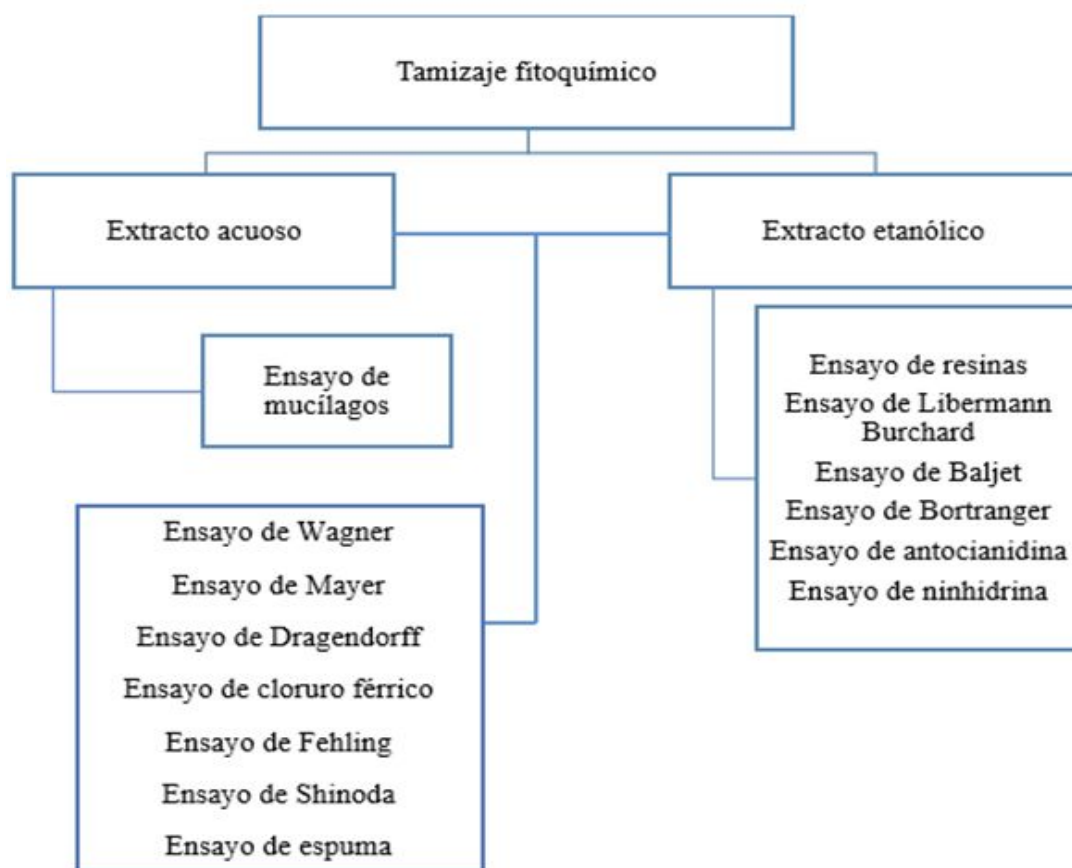
A los extractos obtenidos se les realizó el control de calidad de acuerdo a los procedimientos establecidos por la OMS (2003) ⁴⁰. Dentro de los parámetros analizados fueron: pH, densidad e índice de refracción. Estos ensayos se midieron por triplicado en el refractómetro y en el pH - metro ⁴².

3.2.7 Identificación de metabolitos secundarios por ensayos cualitativos

3.2.7.1 Tamizaje fitoquímico

Para realizar el tamizaje fitoquímico se realizaron dos extractos acuosos y etanólicos, para ello se pesaron 10g de la droga seca con 150 ml del disolvente (agua y etanol 95°) por separado. Se llevó al baño ultrasónico durante 30 min y se dejó macerar por 24 horas. Posteriormente, se filtraron y realizaron las respectivas reacciones de identificación, siguiendo la metodología propuesta por Miranda y Cuellar, (2001) ⁴². En la ilustración 11 se pueden divisar las reacciones utilizadas para identificar la presencia de los posibles metabolitos secundarios.

Ilustración 11. Tamizaje fitoquímico



Fuente: Miranda y Cuellar (2001) ⁴².

3.2.7.2 Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se utilizó como fase estacionaria placas de sílica gel GF₂₅₄ (0,20 mm; Macherey-Nagel) sobre un soporte de vidrio. Se trazó una línea horizontal con un lápiz, a 1 cm de la parte inferior de la placa, y se realizó la aplicación con la ayuda de un capilar de vidrio a dos concentraciones diferentes. Las distancias entre las aplicaciones fueron de 1 cm y finalmente esperamos a que seque la placa a temperatura ambiente ⁴⁵.

La fase móvil utilizada fue BAW (butanol, ácido acético y agua) en proporción 65:25:10. Para la corrida de la placa se utilizó una cámara de vidrio con tapa, dejando un tiempo de saturación de la fase móvil por 10 minutos. Una vez desarrollada la cromatografía, el secado de la placa se realizó a temperatura ambiente bajo una campana extractora de gases y por acción de la corriente de aire de la misma ^{34,45}.

Las placas se revelaron por dos métodos físicos y químicos. El revelado físico se hizo al someter la placa a una lámpara UV con longitudes de onda de 254 y 365 nm. Se utilizaron como reveladores químicos; ácido sulfúrico + vainillina, cloruro férrico, DPPH y ninhidrina.

3.2.8 Cuantificación de metabolitos secundarios de la droga

3.2.8.1 Preparación de extractos secos

Se utilizó como menstroo etanol al 70%, pesando exactamente 10 g de droga seca en 100 ml del disolvente, para luego llevarlo al ultrasonido durante 30 min. Se filtró y se concentró en el rotaevaporador a 40 °C, adaptado a una bomba a vacío Vacuubrand CVC 3000 y un criostato Lauda Alpha RA8, hasta obtener un extracto blando para poder verter en cajas petri y llevarlo a sequedad con la ayuda de la estufa con recirculación de aire a 40 ± 2 °C. Finalmente, se almacenó el extracto en seco a 4 °C y se lo cubrió para evitar la degradación de los metabolitos secundarios hasta su posterior análisis.

3.2.8.2 Cuantificación del contenido de fenoles totales (CFT) por el método de Folin-Ciocalteu

La cuantificación de fenoles se realizó siguiendo la metodología propuesta por Kuppusamy et al., (2018)⁶ con algunas modificaciones. Para ello se construyó una curva de calibración utilizando como sustancia patrón ácido gálico, partiendo de una disolución stock de ácido gálico a una concentración de 10 mg/ml. Se realizaron las respectivas diluciones, hasta tener concentraciones entre 0,1 – 0,5 mg/ml. De cada dilución de ácido gálico se tomaron 20 uL a los cuales se le añadió 1 ml de disolución diluida de Folin-Ciocalteu (1:10) (v/v) y 180 uL de agua destilada. Se agitó y se esperó 5 minutos para dar lugar a la reacción. Se adicionaron, por último, 800 uL de carbonato de sodio al 7,5% (p/v), se agitó y, posteriormente, se dejó reposar por 2 horas. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 765 nm. Se utilizó un blanco que se preparó en

las mismas condiciones, a excepción del ácido gálico. El ensayo se realizó por triplicado⁴⁶. Para la cuantificación de fenoles totales en los extractos secos de *B. glabra* C. (morada y naranja), se transfirieron 20 uL de una disolución metanólica al 1% del extracto seco, y se procedió de la misma manera antes descrita en la curva de calibración.

3.2.8.3 Cuantificación de flavonoides por el método colorimétrico de tricloruro de aluminio

Para la cuantificación de flavonoides se siguió la metodología propuesta por Lin & Tang, (2007)⁷, con algunas modificaciones. Para ello se realizó la respectiva curva de calibración por triplicado, utilizando como sustancia patrón quercetina. Se preparó una disolución stock a una concentración de 1 mg/ml en etanol absoluto y se prepararon diluciones a concentraciones entre 25 – 125 ug/ml con el mismo disolvente. Se transfirieron 0,5 ml de cada dilución de la disolución patrón y se mezcló con 1,5 ml de etanol absoluto a un tubo de ensayo de capacidad de 5 ml. Se añadió 0,1 ml de disolución de cloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 10% m/v en agua destilada, 0,1 ml de acetato de potasio 1M (CH_3COOK), y 2,8 ml de agua destilada. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 40 min, para proceder a la lectura en el espectrofotómetro, estableciendo una longitud de onda de 415 nm, frente al blanco que se preparó en las mismas condiciones que el ensayo. Para cuantificar la cantidad de flavonoides en los extractos secos de *B. glabra* C., se transfirieron 0,5 ml de cada disolución acuosa, de concentraciones diferentes, 0,2% m/v de las brácteas naranjas y 0,6% m/v de las brácteas moradas, y se procedió de la misma manera antes descrita en la curva de calibración.

3.2.8.4 Evaluación de la actividad antioxidante por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Se siguió la metodología propuesta por Barrón-Yáñez et al., (2011)⁸ con algunas modificaciones, para ello se preparó una disolución de DPPH en metanol 0,1 mM protegido de la luz. Se prepararon extractos acuosos al 1% y se diluyó a varias

concentraciones (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5) mg/ml. Se transfirieron 0,5 ml de cada dilución del extracto por separado en un tubo de ensayo, luego se agregaron 1,5 ml de la solución metanólica de DPPH, se agitó y almacenó en la oscuridad por 30 min. Se consideró un grupo control por cada réplica, utilizando la disolución de DPPH, para proceder a la lectura en un espectrofotómetro estableciendo una longitud de onda 516 nm, este ensayo se lo realizó por triplicado y el porcentaje de DPPH se lo determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%DPPH = \frac{\text{Absorbancia}(\text{control}) - \text{Absorbancia}(\text{muestra})}{\text{Absorbancia}(\text{control})} \times 100$$

Con el porcentaje de captura del radical libre, se determinó la capacidad mínima inhibitoria (IC_{50}), mediante la ecuación de la recta obtenida en el análisis de regresión lineal.

3.2.9 Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados en el programa estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI.II y se realizó el test ANOVA ($p < 0,05$) para muestras independientes. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para correlacionar el contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante de las brácteas de *B. glabra* C.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Parámetros farmacognósticos

Todos los parámetros farmacognósticos realizados a la droga fueron: la determinación de humedad residual, cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico como se pueden apreciar los resultados en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis farmacognóstico de la droga cruda

Muestras	%Humedad	%Cenizas totales	%Cenizas solubles en H ₂ O	%Cenizas insolubles en HCl
	X/SD			
1BM	7,95/0,28	7,37/0,09	3,62/0,08	0,88/0,01
4BM	9,18/0,06	7,78/0,04	3,70/0,09	0,54/0,10
5BN	10,34/0,10	6,98/0,02	3,10/0,18	0,43/0,29
8BM	9,48/0,47	5,96/0,05	3,60/0,04	0,45/0,02
10BM	7,88/0,37	8,13/0,26	3,81/0,08	0,80/0,29
11BN	8,26/0,13	7,43/0,08	3,31/0,02	0,95/0,03
13BM	7,24/0,21	5,94/0,06	3,94/0,01	0,44/0,05

BM= Brácteas morada; BN= Brácteas naranjas; X=Media; SD= Desviación estándar

1= El Cambio-Machala; 4 y 5= Av. Buenavista y Los Almendros-Machala; 8= Hospital Esperanza-Machala; 10= Y Corralitos-Machala; 11= Vía Pasaje La Peaña; 13= San Roque-Piñas

El porcentaje de humedad residual permite evaluar la efectividad del proceso de secado⁴⁵, además sirve como un estándar de calidad de la droga cruda que se debe tener en cuenta. Si los valores son altos, puede existir susceptibilidad de la droga a posible contaminación microbiana por hongos o bacterias e interferiría en el correcto

almacenamiento. Por el contrario un proceso de desecación prolongado y excesivo puede desnaturalizar algunas enzimas y compuestos que afectan la calidad de los principios activos ⁴⁷. Es por ello que la OMS (2002)⁴⁸ establece un valor de humedad <10%. Los resultados obtenidos para las brácteas moradas de *B. glabra* C. varían de 7,24 – 9,48 % y para las brácteas naranjas 8,26-10,34% por lo que la mayoría de las muestras se encuentran dentro de los rangos permisibles. La excepción fue la muestra 5BN, con un valor de humedad de 10,34%, que excede el rango permisible. No es recomendable conservarla en un prolongado tiempo, debido a que puede descomponerse por contaminación microbiana y por ende causar degradación de los principios activos.

La determinación de cenizas totales es un parámetro muy importante, indica la calidad y pureza de la droga cruda ¹. La OMS (2002)⁴⁸ establece que no se debe exceder el 6%. Como se puede observar en la tabla 3, el porcentaje de cenizas totales para las brácteas moradas de *B. glabra* C. varían entre 7,37 – 8,13% y para las brácteas naranjas se obtuvieron resultados de 6,98 y 7,93%. La mayoría de muestras exceden el valor normal, a excepción de la muestra 8BM con un valor 5,96% y la muestra 13BM con un valor 5,94%, que se encuentran dentro del rango establecido. Estos resultados están acorde a lo reportado por Islam et al., (2016)¹ y Rakam y Raja, (2017)⁴⁹ que obtuvieron valores de cenizas totales de 6,67% y 6,26% respectivamente para la misma especie de estudio *B. glabra* C.

Cabe recalcar que las cenizas totales determinan la cantidad de materia inorgánica que queda luego de la incineración. Estos valores están por encima de lo normal, puede ser debido a la abundancia de minerales que existe en la planta de estudio. Al comparar estos resultados con un estudio realizado por Shalini et al., (2018)⁵⁰, que determinaron la concentración de metales pesados en la especie *B. glabra* C. confirmaron que la planta se encuentra libre de contaminación por metales pesados. Juson, Martinez, y Ching, (2016)⁵¹ corroboraron la información, al determinar la cantidad de metales en otra especie de estudio del mismo género, *B. spectabilis*. Ellos determinaron altas concentraciones de minerales esenciales tales como Zn y Cu. En principio se podría asumir que la planta no contiene metales pesados tóxicos y en su mayoría contiene altas concentraciones de minerales esenciales que sirven para el crecimiento y buen

desarrollo de la misma ⁵². No obstante, este hecho debe confirmarse adecuadamente para la especie de estudio.

Las cenizas insolubles en HCl permiten determinar el contenido metales pesados tóxicos, sílice o tierra presentes en la droga ⁵³. El contenido de cenizas insolubles en HCl para las brácteas moradas de *B. glabra* C. varían entre 0,44 – 0,88 % y para las brácteas naranjas 0,43 y 0,95%. Todas las muestras cumplen con el rango permisible dispuesto por la OMS (2002)⁴⁸, que establece que no deben exceder el 1%. Se asume que se realizó un óptimo proceso de lavado y desinfección de la droga, a diferencia de lo reportado por Rakam & Raja, (2017)⁴⁹ que obtuvieron 1,35 % de cenizas insolubles en HCl. Evidenciándose que los valores que ellos obtuvieron no están acorde a lo establecido por la OMS (2002)⁴⁸. Estas diferencias pueden deberse al procedimiento de cultivo, condiciones geográficas y ambientales.

En la tabla 4, se pueden observar los resultados de sustancias solubles en diferentes menstros:

Tabla 4. Resultados de sustancias solubles de la droga cruda

Muestras	Menstruos		
	Agua	Etanol	EtOH/H ₂ O (50:50)
	X/SD		
1BM	34,26/0,03	20,47/0,04	31,86/0,03
4BM	25,43/0,04	19,75/0,04	35,81/0,03
5BN	17,72/0,26	11,19/0,12	47,70/0,12
8BM	16,50/0,06	9,77/0,07	32,63/0,17
10BM	18,41/0,02	12,26/0,06	38,47/0,05
11BN	18,10/0,02	5,91/0,07	50,65/0,03
13BM	21,62/0,04	18,62/0,05	43,31/0,04

BM= Brácteas morada; BN= Brácteas naranjas; =Media; SD= Desviación estándar
 1= El Cambio-Machala; 4 y 5= Av. Buenavista y Los Almendros-Machala; 8= Hospital Esperanza-Machala; 10= Y Corralitos-Machala; 11= Vía Pasaje La Peaña; 13= San Roque-Piñas

Los valores obtenidos para sustancias solubles varían entre 16,50–34,26%; 5,91–20,47%; y 31,86–50,65% respectivamente (H₂O, EtOH y EtOH/H₂O 50:50). Se evidencia una mayor extracción de metabolitos en el menstuo hidroalcohólico EtOH/H₂O. Según Abarca, Peña Malacara, & Petricevich, (2016)⁵⁴ en su estudio de caracterización de los componentes químicos de la *B. x buttiana*, establece que la mayoría de los componentes químicos aislados son solubles en agua y metanol. Cabe recalcar que esto no es indicativo para establecer el disolvente apropiado pero permite orientar la capacidad extractiva del disolvente, siendo importante tomar en cuenta la relación entre el metabolito de interés y la naturaleza del disolvente ⁵⁵.

4.2 Control de calidad de los extractos

El control de calidad de las drogas vegetales garantiza la seguridad, eficacia, identidad y pureza. Estas exigencias de calidad se recogen en las diferentes farmacopeas tanto a nivel nacional como internacional ⁵⁶.

En la tabla 5 se pueden apreciar los diferentes resultados del control de calidad al extracto acuoso y etanólico de *B. glabra* C.

Tabla 5. Control de calidad

EXTRACTO ACUOSO			
Muestras	pH	IR	Densidad g/ml
X/DS			
1BM	5,40/0,04	1,33/0,00	1,017/0,00
4BM	6,27/0,08	1,34/0,00	1,020/0,01

Tabla 5. Continuación

EXTRACTO ACUOSO			
Muestras	pH	IR	Densidad g/ml
		X/DS	
5BN	6,27/0,02	1,33/0,00	1,012/0,00
8BM	6,28/0,02	1,34/0,00	1,007/0,00
10BM	6,26/0,03	1,34/0,00	1,011/0,00
11BN	5,66/0,04	1,34/0,00	1,013/0,00
13BM	5,61/0,03	1,34/0,00	1,008/0,00
EXTRACTO ETANÓLICO			
1BM	5,41/0,01	1,36/0,00	1,06/0,00
4BM	5,49/0,04	1,37/0,00	1,05/0,00
5BN	5,72/0,07	1,36/0,00	1,06/0,00
8BM	5,87/0,05	1,37/0,00	1,07/0,00
10BM	5,41/0,14	1,37/0,00	1,06/0,00
11BN	5,54/0,01	1,37/0,00	1,06/0,00
13BM	5,69/0,01	1,37/0,00	1,06/0,00

BM= Brácteas morada; BN= Brácteas naranjas; = Media; DS=Desviación estándar
 1= El Cambio-Machala; 4 y 5= Av. Buenavista y Los Almendros-Machala; 8= Hospital Esperanza-Machala; 10= Y Corralitos-Machala; 11= Vía Pasaje La Peaña; 13= San Roque-Piñas

En el análisis de pH para las brácteas moradas los resultados oscilan entre 5,40 – 6,28 y para las brácteas naranjas 5,66 y 6,27. En el análisis del índice de refracción y densidad no se evidencian diferencias apreciables, obteniendo resultados alrededor de 1,34 y 1,01 respectivamente. Estos resultados se reportan por primera vez para este tipo de extracto y especie en particular que crece aquí en Ecuador.

Los resultados del control de calidad para el extracto etanólico se pueden observar en la tabla 5. En el análisis de pH, los resultados para las brácteas moradas oscilan entre 5,41 – 5,87 y para las brácteas naranjas 5,54 – 5,72. En cambio, al analizar los resultados del índice de refracción y densidad no existen diferencias cuantitativas apreciables, ya que se encuentran alrededor de 1,37 y 1,06, respectivamente, para ambas variedades de colores. Al comparar estos resultados, podemos corroborar que se encuentran acorde a lo reportado por Zambrano, Ramón, & Jaramillo (2017) ⁵⁷.

4.3 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o también conocido como screening fitoquímico, constituye una de las técnicas más útiles en la etapa inicial de la investigación de productos vegetales, debido a su aplicación rápida y de bajo costo. Consiste en predecir cualitativamente la presencia de los principales metabolitos secundarios, mediante la aplicación de reactivos específicos que dan lugar a reacciones de coloración y precipitación ⁵⁸.

En la tabla 6, se presentan los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso y etanólico.

Tabla 6. Tamizaje fitoquímico

EXTRACTO ACUOSO								
ENSAYOS	METABOLITOS	MUESTRAS						
		1BM	4BM	5BN	8BM	10BM	11BN	13BM
Dragendorff		++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Mayer	Alcaloides	—	++	+	—	—	+	+
Wagner		++	++	+	+++	++	++	++
Cl ₃ Fe	Fenoles	+	+	+	+	+	+	+
Shinoda	Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+
Fehling	Azúcares reductores	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 6. Continuación

EXTRACTO ACUOSO								
ENSAYOS	METABOLITOS	MUESTRAS						
		1BM	4BM	5BN	8BM	10BM	11BN	13BM
Espuma	Saponinas	+	+	+	+	+	+	+
Mucílago	Polisacáridos	-	-	-	-	-	-	-
EXTRACTO ETANÓLICO								
Dragendorff		+++	+++	+	+	+++	++	+++
Mayer	Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Wagner		+	+	+++	-	+	-	-
Resinas	Resinas	-	-	-	-	-	-	-
Fehling	Azúcares reductores	+	+	+	+	+	+	+
Baljet	Coumarinas	+	+++	+	++	+	+++	++
Liebermann Buchar	Triterpenos y/o esteroides	+	+	+	+	+	+	+
Espuma	Saponinas	-	-	-	-	-	-	-
Cl ₃ Fe	Fenoles	+	+	+	+	+	+	+
Shinoda	Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+
Borntrager	Quinonas	++	+++	+++	+++	++	++	++
Antocianidina	Antocianidina	+	+	+	+	-	+	+
Ninhidrina	Aminoácidos	+	+	+	+	+	+	+

Presencia abundante (+++); Moderado (++); Leve (+); Ausencia (-)

El extracto acuoso sugiere la presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, azúcares reductores y saponinas, en ambas brácteas, de color naranja y morado. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Islam et al., (2016)¹. Ellos reportaron la posible

presencia de fenoles, alcaloides, azúcares reductores y saponinas, pero no se reportan flavonoides para un extracto acuoso.

Al comparar estos resultados, con lo obtenido en el análisis de pH (tabla 5) del extracto acuoso. Podemos observar un pH ácido, esto debido a la posible presencia de algunos compuestos fenólicos, identificados mediante el tamizaje fitoquímico y las betalainas reportadas para el género *Bougainvillea*.

En el extracto etanólico, se pueden apreciar la posible presencia de alcaloides, azúcares reductores, cumarinas, triterpenos y/o esteroides, fenoles, flavonoides, quinonas, antocianidinas y aminoácidos para el extracto etanólico (tabla 6). Entre los metabolitos secundarios antes descritos, Echavarría et al., (2016)⁵⁹ reporta la posible presencia de fenoles, flavonoides, triterpenos, y saponinas para ambas variedades de brácteas en la especie *spectabilis* del género *Bougainvillea*. En otro estudio realizado por Zambrano et al., (2017)⁵⁷ reporta positivo alcaloides, antocianidinas y cumarinas, pero solo para la variedad naranja. No se han reportado la presencia azúcares reductores ni quinonas para el extracto etanólico.

Al analizar los resultados del pH (tabla 5) del extracto etanólico. Podemos observar un pH ácido, esto puede ser debido a los posibles aminoácidos y compuestos fenólicos identificados mediante el tamizaje fitoquímico para el extracto etanólico.

Al comparar los resultados del extracto acuoso y etanólico del tamizaje fitoquímico. Podemos observar, resultados positivos para saponinas solo en el extracto acuoso, en principio se puede asumir que las saponinas pueden estar en forma de heterósidos. Por tanto, son solubles mayormente en agua y mezclas hidroalcohólicas de alcoholes de bajo peso molecular (metanol o etanol)⁶⁰. Un estudio propuesto por Amal, (2009)⁶¹ reporta 3 saponinas triterpenoidales en la especie *B. spectabilis*. No obstante, este hecho hay que confirmar adecuadamente para la especie de estudio.

Cabe recalcar que el tamizaje fitoquímico es una prueba preliminar, que carece de sensibilidad y especificidad. Con esto no podemos afirmar la existencia de los

componentes químicos descritos anteriormente, por lo que los reactivos utilizados dan falsos positivos a similares grupos funcionales ⁶².

Las betalainas, son derivados de la tirosina, un precursor químico de los alcaloides. Por esto han sido considerados como alcaloides coloreados o “cromoalcaloides” ^{63,64}. Debido a esto, las reacciones para identificar alcaloides pueden dar falso positivo, provocado por estos metabolitos.

Existen estudios que mencionan, que en las plantas productoras de betalainas del orden Caryophyllales nunca se han detectado antocianinas ⁶⁵. Esto sugiere que las antocianinas y betalainas son pigmentos mutuamente excluyentes. Por ende, la reacción positiva para antocianinas, puede ser un falso positivo causado por las betalainas presentes en las brácteas de *B. glabra* C.

Luego de procesar todos los datos se procedió a seleccionar dos muestras representativas para las brácteas moradas fue la BM4 y para las naranjas la BN11. Para ello se tomó en cuenta el estado fenológico de la planta, los resultados de sustancias solubles y los resultados del tamizaje fitoquímico. Con estas muestras se realizó la identificación por cromatografía en capa delgada (CCD) y la respectiva cuantificación de metabolitos secundarios.

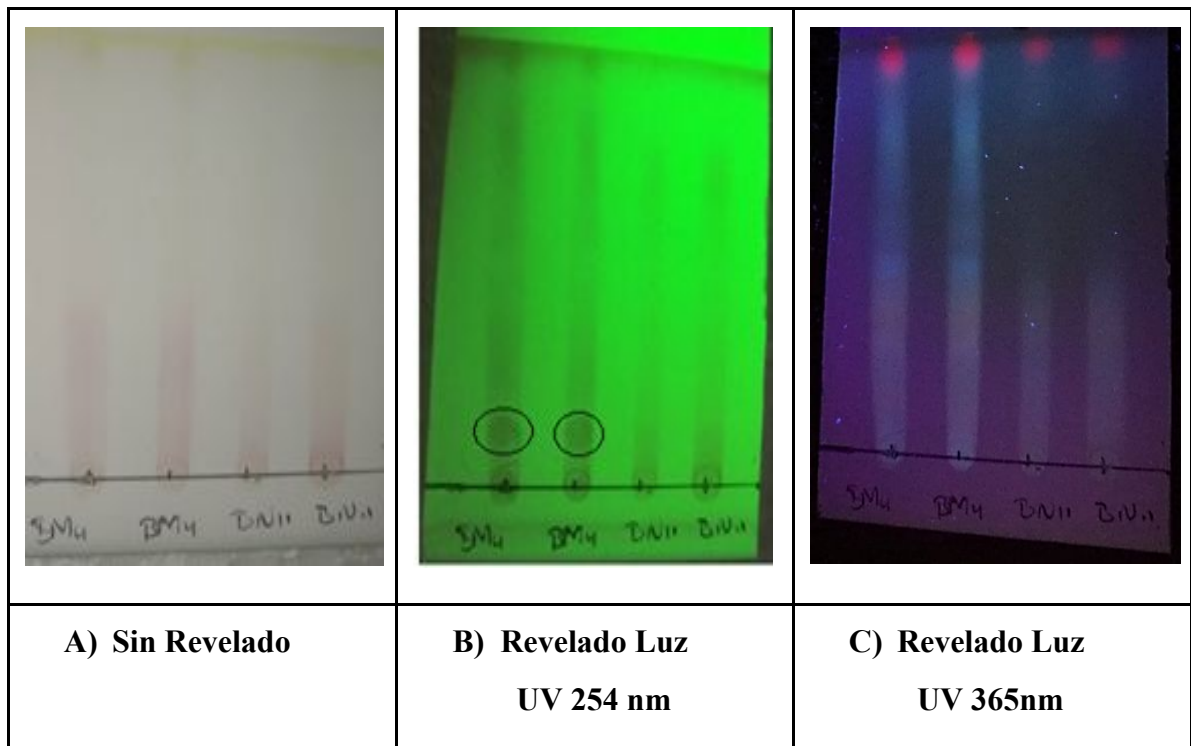
4.4 Cromatografía en capa delgada (CCD)

4.4.1 Revelado físico

Se utilizó como revelador físico luz ultravioleta a longitudes de onda 254 y 365 nm, como se puede observar en la ilustración 12.

Al revelar con una longitud de onda 254 nm, podemos denotar la presencia de dos bandas de color marrón en el cromatograma (Imagen B), que en comparación sin utilizar ningún revelado (Imagen A) no se logró observar.

Ilustración 12. Revelado físico con luz ultravioleta 254 y 365 nm



Esto sugiere que existen componentes químicos, que en su estructura poseen grupos cromóforos conjugados, capaces de absorber la luz a esta longitud de onda. Estos resultados están acorde a lo reportado por Zambrano et al., (2017) ⁵⁷.

En cambio, al revelar con una longitud de onda 365nm, podemos divisar en el cromatograma (Imagen C) manchas rojas fluorescentes, que es característico de clorofilas, con mayor intensidad en los extractos de las brácteas moradas de *B. glabra* C. Estos resultados están acorde a lo reportado por Kalirajan et al., (2012) ⁶⁶.

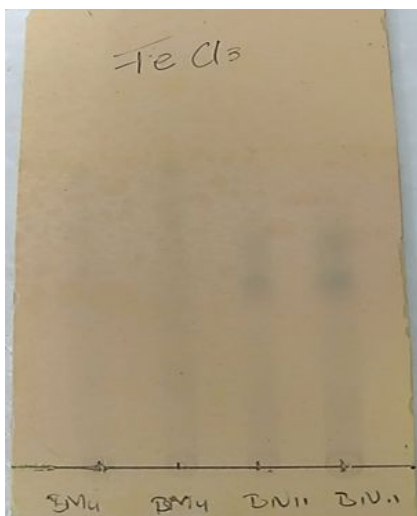
También podemos denotar en el punto de aplicación, mayor afinidad de la mezcla de componentes químicos a la fase estacionaria. Esto sugiere que existen componentes químicos altamente polares.

4.4.2 Revelado químico

4.4.2.1 Revelado con cloruro férrico (FeCl_3)

En la ilustración 13 se puede observar el cromatograma correspondiente al revelar con una disolución de cloruro férrico.

Ilustración 13. Revelado con cloruro férrico



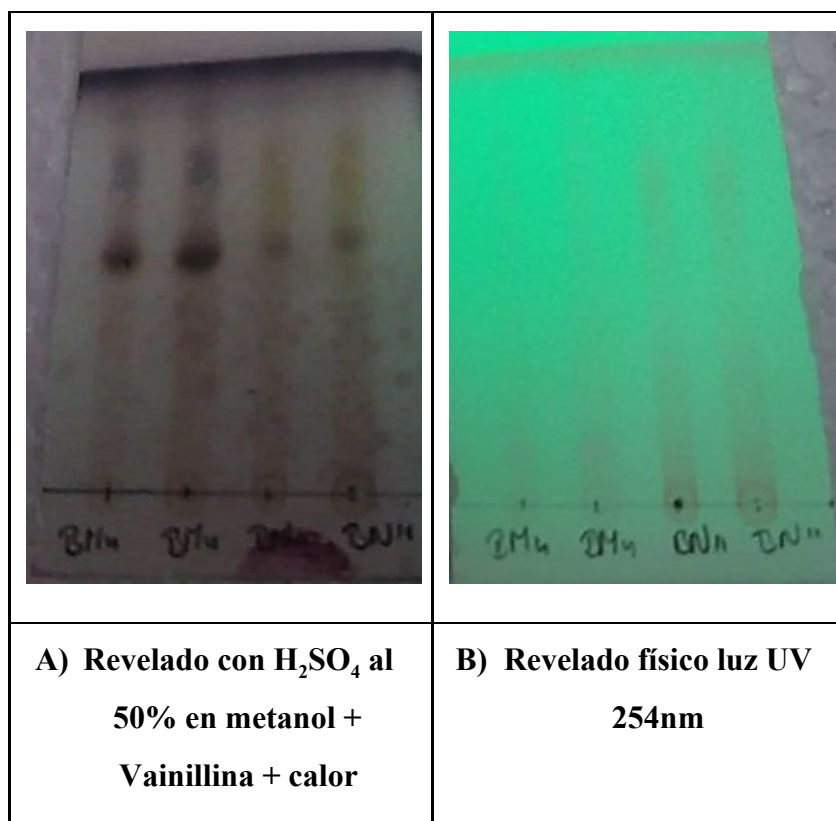
Se logran divisar manchas oscuras en la placa, posiblemente debido a la presencia de compuestos fenólicos, con mayor intensidad en el extracto de brácteas naranjas de *B. glabra* C. Estos resultados están en relación con los resultados del tamizaje y a lo propuesto por Zambrano et al., (2017)⁵⁷.

4.4.2.2 Revelado con ácido sulfúrico 50% en metanol + vainillina + calor

En la ilustración 14 se pueden observar los cromatogramas al hacer un revelado con ácido sulfúrico y luz UV 254 nm.

En la imagen A podemos apreciar el revelado con ácido sulfúrico en disolución metanólica al 50% + vainillina y calor. Con esto podemos denotar bandas de color morado y naranja que con un revelado físico (Imagen B) no se pueden apreciar.

Ilustración 14. Revelado con ácido sulfúrico al 50% en metanol + vainillina + calor

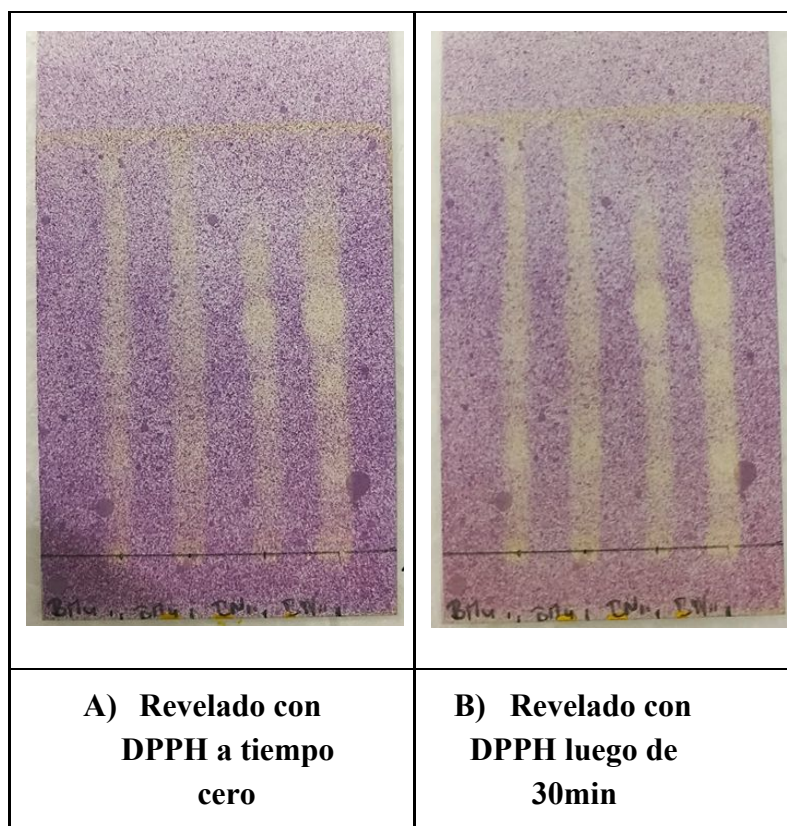


Esto quiere decir que existen componentes que no tienen en su estructura grupos cromóforos conjugados capaz de absorber la luz a dicha longitud de onda, pero con un agente oxidante fuerte como es el ácido sulfúrico se pueden revelar. Las bandas moradas pueden ser atribuibles a saponinas de naturaleza triterpénica, de mayor intensidad en las brácteas moradas, en comparación con las brácteas naranjas. Las bandas amarillas sugieren la presencia de flavonoides, de mayor intensidad en las brácteas naranjas, en comparación con las brácteas moradas. Estos resultados están en relación a lo descrito anteriormente en el tamizaje fitoquímico, que dio positivo para saponinas, triterpenos y/o esteroides y flavonoides.

4.4.2.3 Revelado con DPPH (2,2-difenil, 1-pic5rilhidrazil)

Se utilizó como revelador químico DPPH al 0,2% en metanol para demostrar la capacidad secuestradora del radical libre producido por los componentes químicos de los extractos de *B. glabra* C., como se puede observar en la ilustración 15.

Ilustración 15. Revelado químico con solución metanólica al 0,2% de DPPH



Existe una coloración amarilla verdosa de mayor intensidad en los extractos de brácteas naranjas de *B. glabra C*, al nivel de la misma zona donde se apreció el revelado de compuestos fenólicos. Esta coloración en la placa es indicativa de la actividad captadora del radical libre. Se puede apreciar, además, (Imagen a) que existe una rápida decoloración del DPPH a tiempo cero. Además, se logró observar que al dejar pasar 30 minutos (Imagen b) hubo una mayor intensidad en el color, evidenciándose el aumento de la actividad secuestradora del radical libre con el tiempo, esto puede ser atribuible a la presencia de compuestos fenólicos que dieron positivo en el tamizaje fitoquímico y contenido de betalainas que existe en la *B. glabra C*.

4.4.2.4 Revelado con ninhidrina

En la ilustración 16 se puede apreciar el cromatograma con el revelado de ninhidrina y podemos divisar bandas de color café oscuras en el extracto de las brácteas naranjas de *B. glabra C*. que sugiere la presencia de componentes químicos que tienen en su

estructura grupos aminos libres capaz de producir dicha coloración con la ninhidrina. Lo que concuerda con lo obtenido en el tamizaje fitoquímico, que sugiere la presencia de aminoácidos.

Ilustración 16. Revelado con ninhidrina



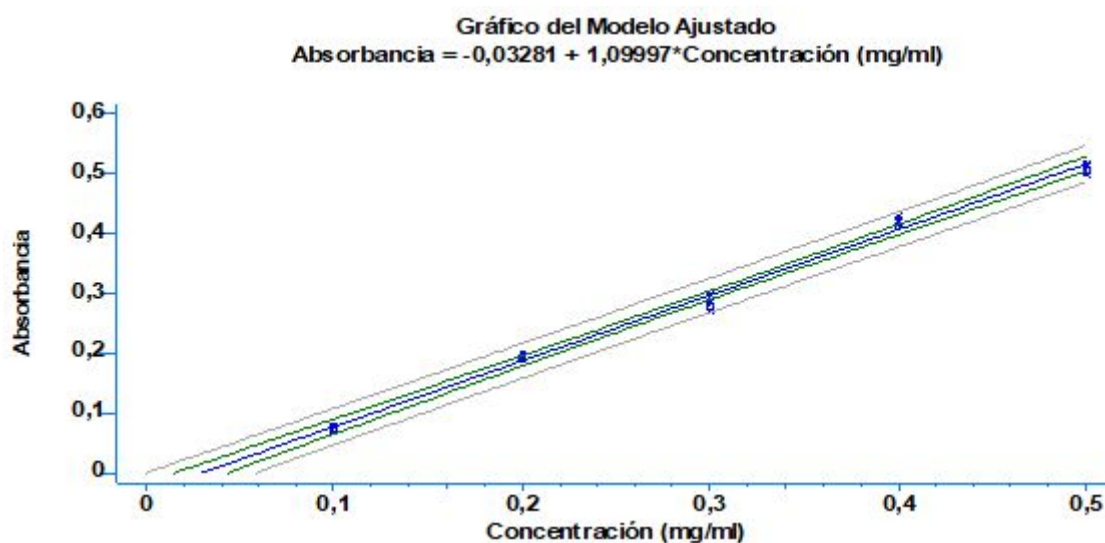
4.5 Cuantificación de metabolitos secundarios

Se decidió trabajar con un extracto hidroalcohólico al 70%, tomando en cuenta, las características químicas de los flavonoides ya que son un grupo limitado para la cuantificación y extracción. Debido a lo reportado por Abarca & Petricevich, (2018)⁴ y Sahu & Saxena, (2014)¹⁷, para esta especie en particular existen flavonoides que en su mayoría se encuentran en forma glicosilada, por ende, se extraen mejor en mezclas hidroalcohólicas del 60-80%.

4.5.1 Cuantificación de fenoles por el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu

Para cuantificar el contenido de fenoles totales en los extractos hidroalcohólicos de las brácteas de *B. glabra* C. se utilizó el método de Folin Ciocalteu previamente descrito. Para ello se construyó la curva de calibración utilizando como sustancia patrón el ácido gálico. (Ilustración 17.)

Ilustración 17. Curva de calibración del ácido gálico



Obteniendo un $R^2= 0,994$ y mediante la ecuación de la recta, calcular a través de la absorbancia la concentración de fenoles en las brácteas de *B. glabra* C. Los resultados fueron expresados en mg equivalente de ácido gálico por cada gramo de extracto seco (EAG/g); como se puede observar en la tabla 7.

Tabla 7. Contenido de fenoles totales en brácteas de *B. glabra* C.

Muestras	Concentración en mg EAG/g E.S. X/DS
BN11	129,61/0,00
BM4	79,91/0,01

BM= Brácteas morada; BN= Brácteas naranjas; X= Media; DS=Desviación estándar
 4= Av. Buenavista-Machala; 11= Vía Pasaje La Peaña

La concentración de fenoles en las brácteas naranjas fueron $129,61 \pm 0,00$ mg EAG/g E.S. y en las brácteas moradas $79,91 \pm 0,01$ mg EAG/g E.S., obteniendo un Valor-P de

0,000 ($p < 0,05$). Se constataron diferencias estadísticamente significativas, existiendo mayor contenido de fenoles totales en las brácteas naranjas, en comparación con las brácteas moradas.

Hay pocos estudios realizados en la cuantificación de fenoles para esta especie en particular, entre ellos, según lo reportado por Kuspradini et al., (2016)³⁶ y Shalini et al., (2018)⁵⁰. Ellos obtuvieron 841,85 y 76,74 mg EAG/100 g de droga cruda, para la variedad naranja y rosada respectivamente. En nuestro caso partimos de un extracto concentrado, y por ende aumenta notablemente el porcentaje del contenido fenólico.

Según lo reportado por Orozco et al., (2018)⁶⁷ para la especie *spectabilis* del género *Bougainvillea* (morada). Refiere que el contenido de fenoles fue 6,78 mg EAG/g E.S. Para la especie *x buttiana* del mismo género, según Figueroa, Navarro, Vera, & Petricevich, (2014)⁶⁸ reporta la mayor cantidad de fenoles en la variedad de color naranja (28,89 mg EAG/g ES), en comparación con la de color morado (20,71 mg EAG/g ES). Dichos estudios fueron realizados bajo las mismas condiciones de extracción (maceración) y disolvente utilizado (EtOH/H₂O 50:50).

En comparación a nuestro estudio, el método realizado fue extracción asistida por ultrasonido, existiendo mayor interacción entre el disolvente y la droga. Lo que provoca ruptura de la célula, debido a las ondas cavitacionales producidas por el equipo, favoreciendo el rendimiento de extracción de los metabolitos secundarios⁶⁹.

En otro estudio realizado por Villanueva, Abarca, & Petricevich, (2017)⁷⁰. Determinaron la concentración de fenoles en extractos etanólicos al 50% de brácteas rosadas de *B. xbuttiana*, obteniendo 320 mg EAG/g E.S. Dichos resultados son superiores a lo obtenido en nuestra investigación, tanto para la variedad naranja y morada. Esto es debido a que la *B. xbuttiana*, es un híbrido entre *B. glabra* y *B. peruviana*, que ha sido reportada en México⁴. Estos híbridos han sido manipulados por el hombre, para comercializar y sacar al máximo sus componentes químicos.

Con estos valores se puede apreciar, que el contenido de fenoles en la especie *B. glabra* C. es mayor a otras especies del mismo género, pero es menor a la *B. xbutiana* .

A pesar de ser una técnica sensible, puede haber interferencias con el reactivo de Folin Ciocalteu, algunos grupos químicos como la glucosa y fructosa interfieren en la cuantificación de fenoles ⁷¹. Debido a esto radica la importancia de tomar en cuenta la presencia de glúcidos en los productos vegetales para la cuantificación de fenoles por método de Folin Ciocalteu.

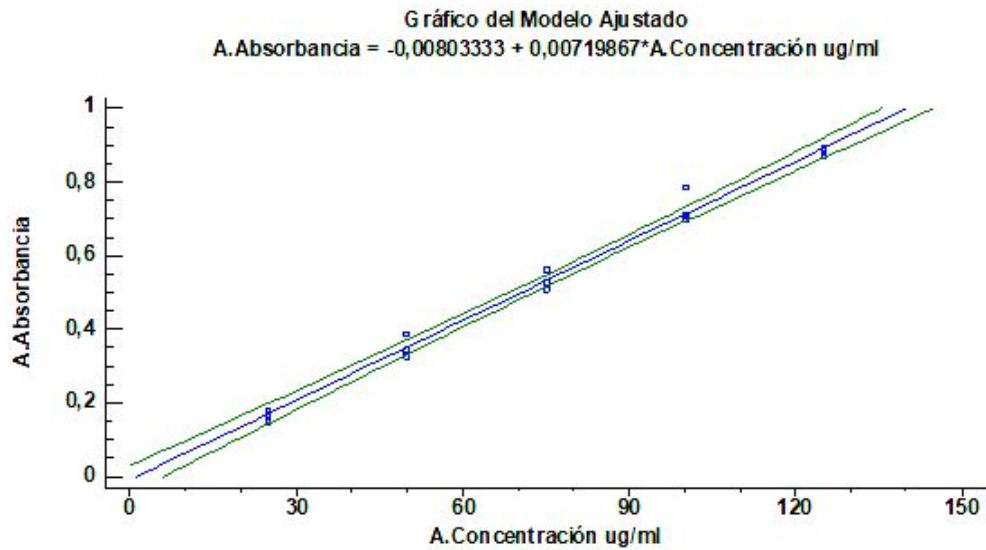
Hay que tomar en cuenta que en un principio el método de Folin Ciocalteu se lo utilizó para la cuantificación de tirosina en proteínas, pero al pasar el tiempo esta técnica ha sido modificada para la cuantificación de compuestos fenólicos en distintos productos vegetales ⁷¹. Dado que las betalainas son grupos constituyentes derivados de la tirosina, responsables del color en las brácteas del género *Bougainvillea* ⁹, y en su estructura química también poseen grupos fenólicos, pueden provocar interferencias con el reactivo de Folin Ciocalteu y por ende, un aumento en el contenido de fenoles totales.

4.5.2 Cuantificación de flavonoides totales por el método colorimétrico de cloruro de aluminio

El método más empleado comúnmente para cuantificar flavonoides se basa en la determinación espectrofotométrica de la complejación (Flavonoide-Cl₃Al) de los hidroxilos catecólicos (posición 3 y 5 del anillo A u otras variantes tanto en el anillo A como en el B) o del hidroxilo en 5 con el grupo carbonilo 4. Esto sucede principalmente en flavonoides del tipo flavona y flavonoles, el cual proporciona un desplazamiento batocrómico y un efecto hipercrómico. Este método es usado comúnmente para cuantificar flavonoides del tipo O-glicósidos sin descartar que la técnica ha sido utilizada indiscriminadamente para cuantificar flavonoides del tipo C-glicósidos ^{72,73}.

Para ello se realizó la curva de calibración (ilustración 18), empleando como sustancia patrón un flavonoide que cumplan con características químicas necesarias, por lo que se seleccionó a la quercetina como sustancia patrón.

Ilustración 18. Curva de calibración de quercetina



Obteniendo un $R^2=0,9891$ y mediante la ecuación de la recta, calcular a través de la absorbancia, la concentración de flavonoides en las brácteas de *B. glabra* C. Los resultados de flavonoides fueron expresados como mg equivalentes de quercetina equivalente EQ/g de extracto seco, en la tabla 8 se pueden divisar los resultados de flavonoides obtenidos para las brácteas de *B. glabra* C.

Tabla 8. Contenido de flavonoides en brácteas de *B. glabra* C.

Muestras	Concentración en mg EQ/g E.S. X/DS
BN11	40,10/2,47
BM4	9,06/0,70

BM= Brácteas morada; BN= Brácteas naranjas; = Media; DS=Desviación estándar

4= Av. Buenavista-Machala; 11= Vía Pasaje La Peaña

Para las brácteas naranjas de *B. glabra* C. fueron de $40,10 \pm 2,47$ mg EQ/g E.S. y para las brácteas moradas $9,06 \pm 0,70$ mg EQ/g E.S. para un extracto etanólico al 70%, cuyo

Valor-P fue 0,0000 ($p < 0,05$). Existe una diferencia estadísticamente significativa en el contenido flavonoides, siendo mayor en las brácteas naranjas, en comparación con las de color morado.

Se han reportado 21 compuestos del grupo de flavonoides en diferentes partes de la *B. glabra* C., en las brácteas los principales flavonoides reportados son rutina, apigenina, chrysoeriol, kaempferol, miricetina y quercetina ⁴.

Según lo reportado por Saleem et al., (2019)⁷⁴ utilizando como método de extracción maceración. Ellos obtuvieron 20,86 mg EQ/g ES para un extracto metanólico, en brácteas moradas de *B. glabra* C. Estos resultados superan al contenido de flavonoides de las brácteas moradas, pero son inferiores con respecto a las de color naranja, obtenidas en nuestra investigación.

En un estudio realizado por Markandan, Abdullah, Musa, Subramaniam, & Stockham, (2016)⁷⁵. Ellos obtuvieron 2,4953 mg EQ/g E.S en las brácteas moradas *B. glabra* C., para un extracto metanólico. Utilizaron como método de extracción maceración con agitación continua y recambio de disolvente (24 horas x 3). Observando que los valores de flavonoides obtenidos en nuestra investigación, para un extracto hidroalcohólico al 70%, fueron mayores para la variedad morada y naranja. Esto puede deberse al menstuo y método de extracción utilizado, además, considerando que los factores extrínsecos (clima, suelo y temperatura) e intrínsecos de la planta (estado fenológico) fueron diferentes.

En otro estudio propuesto por Petrova, Petkova, & Ivanov, (2016)⁷⁶ se reportó la mayor cantidad de flavonoides en un extracto etanólico al 95% (1,26 mg EQ/g de peso fresco) en brácteas de *B. spectabilis* Willd. Estos valores muestran diferencias notables con respecto a lo obtenido en nuestra investigación, debido a que los flavonoides en la mayoría de las plantas poseen cantidades relativamente bajas, por lo que al trabajar con un extracto concentrado aumentan el rendimiento de flavonoides.

Figuroa et al., (2014)⁶⁸ reportó la mayor cantidad de flavonoides en un extracto etanólico al 50% (129,38 y 102,7 mg EQ/g ES para la variedad violeta y naranja respectivamente), en la especie *B. xbuttiana*,. Apreciándose que el contenido de flavonoides para la especie *xbuttiana* son superiores a la especie *glabra* del mismo género *Bougainvillea*. Esto es debido a que es un híbrido, de igual manera que en la cantidad de fenoles habrá un aumento en la cantidad de flavonoides.

4.5.3 Evaluación de la actividad antioxidante por DPPH

Recientemente hay un aumento en el interés del potencial terapéutico de las plantas medicinales como antioxidantes naturales, para reducir las lesiones de los tejidos provocados por los radicales libres. A pesar de los múltiples usos farmacológicas de la *B. glabra* C., hay menos información sobre la actividad antioxidante ⁵.

En cromatografía en capa delgada descrita ...en la sección 4.4.2... (ilustración 13) se demostró que mediante el rociado de la disolución metanólica de DPPH (0,2%) se logró apreciar la decoloración amarilla positiva para la actividad antioxidante. Se visualizó mayor decoloración en las brácteas de *B. glabra* C. de color naranja. A partir de esos resultados cualitativos, se procedió a evaluar cuantitativamente la capacidad secuestradora de radicales libres para ambas variedades., Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la tabla 9.

Tabla 9. IC₅₀ de las brácteas de *B. glabra* C.

Muestras	IC ₅₀ ug/ml
BN11	37
BM4	270

BM= Brácteas morada; BN= Brácteas naranjas

4= Av. Buenavista-Machala; 11= Vía Pasaje La Peaña

Cabe recalcar que para poder evaluar la capacidad antioxidante en las brácteas naranjas se realizaron diluciones a concentraciones de 0,005-0,1 mg/ml, debido al alto poder antioxidante.

Se puede denotar que las brácteas naranjas logran inhibir el 50% del radical libre a una menor concentración (37 ug/ml) mientras que las brácteas moradas logran inhibir el radical libre a una concentración mayor (270 ug/ml). El Valor-P dio 0,000 ($p < 0,05$), existiendo una diferencia significativa para ambas variedades. Demostrando que a una menor concentración de las brácteas naranjas logran inhibir el 50 % del radical, respecto a las brácteas moradas.

Se requiere una mayor concentración del extracto de las brácteas moradas para inhibir el 50% del radical libre. Muy diferente a lo obtenido por Islam et al., (2016)¹ y Shalini et al., (2018)⁵⁰ que evaluaron la capacidad antioxidante mediante el método de DPPH de las brácteas de *B. glabra* (morada) en un extracto acuoso y etanólico respectivamente, obteniendo el IC₅₀ a 135,73 ug/ml y 75 ug/ml.

En otro estudio realizado por Abarca et al., (2016)⁵⁴ evaluó la actividad antioxidante en brácteas rosadas de *B. xbutiana*, por DPPH en diferentes disolventes. Obteniendo el IC₅₀ a concentraciones de 223,10 ug/ml para un extracto metanólico y 232,10 ug/ml para un extracto etanólico.

Según lo reportado por Figueroa et al., (2014)⁶⁸, obtuvieron el IC₅₀ a 108 ug/ml en un extracto etanólico de las brácteas naranjas, de la especie *B. x butiana*. A diferencia del IC₅₀ obtenido a menor concentración, para las brácteas naranjas en el presente estudio.

Con esto se pueden corroborar el potencial natural antioxidante de las brácteas de *B. glabra* C. demostrando que la planta podría ser utilizada en la prevención y mecanismo de reparación en un sistema biológico.

4.5.4 Correlación del contenido de fenoles totales, flavonoides y la actividad antioxidante

En términos estadísticos, la correlación es un método para evaluar una posible asociación lineal bidireccional entre 2 o más variables continuas. Se mide mediante el coeficiente de correlación, que representa la fuerza de la asociación lineal putativa entre las variables en cuestión. Puede tomar valores que van de -1 a +1, cuando toma valores positivos indica que las variables están directamente relacionadas (es decir que cuando una variable aumenta, la otra variable también tiende a hacerlo). Si, por otro lado, toma valores negativos, las variables están inversamente relacionadas (es decir que cuando una variable aumenta, la otra variable tiende a disminuir) se obtiene como valor 0 indica que no existe una relación lineal entre las variables continuas ⁷⁷.

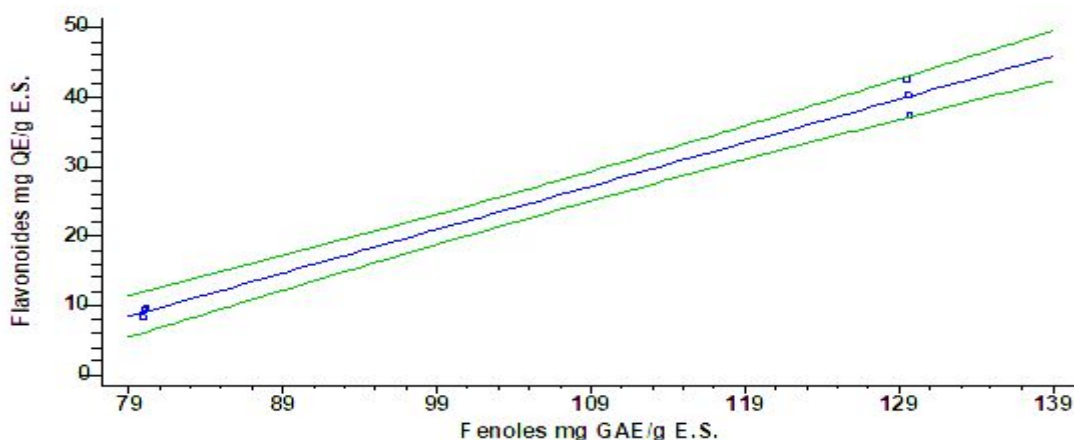
Para esto se llevó a cabo el análisis de correlación mediante el coeficiente de correlación de Pearson para establecer la relación que existe entre el contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante en las brácteas de *B. glabra* C. (tabla 10).

Tabla 10. Correlación estadística entre fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante

Correlación	Coefficiente de correlación de Pearson (r)
Fenoles vs flavonoides	0,9953
Fenoles vs actividad antioxidante	-0,9995
Flavonoides vs actividad antioxidante	-0,9948

Al correlacionar la cantidad de fenoles totales vs el contenido de flavonoides en las brácteas de *B. glabra* C., obtuvimos un coeficiente de correlación ($r=0,9953$) denotándose que existe una correlación positiva, el análisis nos indica que la cantidad de fenoles totales y flavonoides están directamente relacionados. (Ilustración 19.)

Ilustración 19. Análisis de correlación fenoles vs flavonoides



Estos resultados se apreciaron en la cuantificación de fenoles y flavonoides, que mayores concentraciones de estos metabolitos secundarios se encuentran en las brácteas de color naranja. Mientras el coeficiente de correlación más se acerca a 1 existe una mayor fuerza de correlación entre las variables de estudio ⁷⁷. Al comparar los resultados de la correlación entre fenoles y flavonoides con lo reportado por Palomino, García, Gil, Rojano, & Durango, (2009)⁷⁸ obtuvieron un $r=0,80$ para propóleos, denotándose la fuerte correlación positiva en las brácteas de *B. glabra* C.

El análisis de correlación entre fenoles vs actividad antioxidante (IC_{50}) y flavonoides vs actividad antioxidante (IC_{50}) se obtuvo un coeficiente de correlación ($r= -0,9995$; $r= -0,9948$ respectivamente) denotando una correlación negativa en ambos casos, estos nos indica que la cantidad de fenoles y flavonoides están indirectamente relacionados con la actividad antioxidante (IC_{50}) (ilustración 20 y 21), es decir, que al obtener un mayor contenido de fenoles totales y flavonoides se necesita una menor concentración del extracto para inhibir el 50% del radical libre.

Ilustración 20. Análisis de correlación de fenoles vs actividad antioxidante

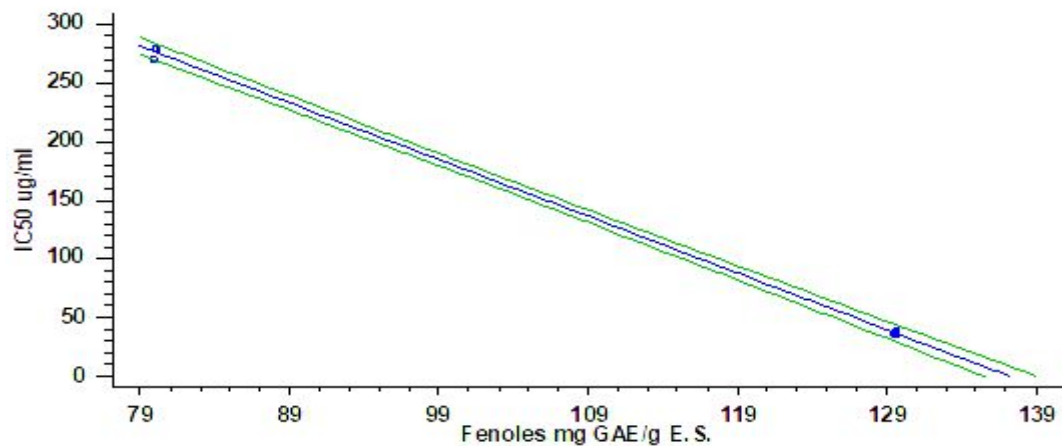
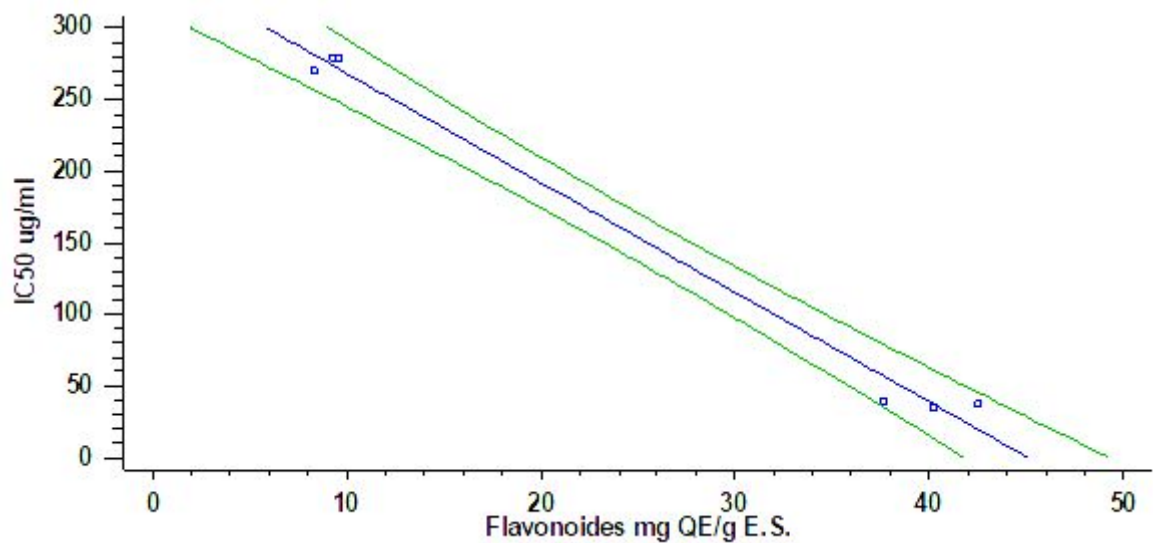


Ilustración 21. Análisis de correlación de flavonoides vs actividad antioxidante



Existen pocos estudios que demuestran la correlación entre estos componentes bioactivos especialmente la correlación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante. Al comparar nuestros resultados con lo reportado por Sant'Ana, Buarque, Lorenzon, Berbara, & Castro, (2014)⁷⁹ que obtuvieron un coeficiente de correlación negativo ($r=-0,8$) entre fenoles y la actividad antioxidante por DPPH de las mieles (EC_{50}), podemos denotar la fuerte correlación que existe entre estos componentes en las brácteas de *B. glabra* C. al obtener un coeficiente de correlación cercano a -1.

Según Méndez et al., (2018)⁸⁰ al hacer un estudio de correlación entre flavonoides y actividad antioxidante obtienen una correlación significativamente alta, infiriendo que la capacidad antioxidante pueden atribuirse a los flavonoides ⁸⁰. Dichos resultados se pueden demostrar en el presente estudio obteniendo una correlación fuerte entre estos componentes.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES

Se establecieron parámetros de calidad; humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico y sustancias solubles, encontrándose dentro de los parámetros establecidos por la OMS.

En el control de calidad de los extractos acuosos y etanólicos se determinó el índice de refracción, densidad, y pH respectivamente.

Mediante el tamizaje fitoquímico, se identificó los posibles metabolitos secundarios presentes en las brácteas naranjas y moradas, lo que se complementa aplicando cromatografía en capa delgada.

Las brácteas naranjas de *B. glabra* C. son las que poseen mayor contenido de fenoles y flavonoides y por ende posee mayor capacidad de inhibir el 50% del radical libre en comparación con las brácteas moradas, lo cual se evidenció estadísticamente en el estudio de correlación.

CAPÍTULO VI RECOMENDACIONES

- Para la cuantificación de fenoles se debe tomar en cuenta el porcentaje de glucosa y fructosa (glúcidos) para evitar interferencias con el reactivo de Folin – Ciocalteu por lo que se recomienda trabajar con un extracto purificado en cromatografía en columna.
- Caracterizar los compuestos fenólicos por diferentes técnicas cromatográficas.
- Realizar un estudio de metales pesados y minerales para asegurar la calidad e inocuidad de las brácteas y descartar posibles efectos nocivos para la salud.
- Cuantificar los metabolitos secundarios en diferentes estados fenológicos de la planta.
- Evaluar preclínicamente la actividad antioxidante de las brácteas para en un futuro elaborar fármacos o cosméticos con esta actividad.
- Ejecutar un estudio cinético de la actividad antioxidante para las brácteas moradas y naranjas.
- Aumentar el número de la población muestral para realizar el estudio de correlación.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Islam, M. Z.; Hossain, M. T.; Hossen, F.; Akter, M. S.; Mokammel, M. A. In-Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Bougainvillea glabra* Flower. *Res. J. Med. Plants* **2016**, *10* (3), 228–236. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2016.228.236>.
- (2) Gallegos, M. Las Plantas Medicinales: Principal Alternativa Para El Cuidado de La Salud, En La Población Rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac med.* **2016**, *77(4)* (10.15381), 327–332. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>.
- (3) Organización Mundial de la Salud. *Estrategia de La OMS Sobre Medicina Tradicional*; Ginebra, 2013.
- (4) Abarca, R.; Petricevich, V. L. *Bougainvillea* Genus: A Review on Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2018**, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9070927>.
- (5) Sahu, N.; Saxena, J. *Bougainvillea glabra* a Natural Antioxidant: A Review. *Chemistry (Easton)*. **2012**, *46* (March 2012), 4113–4117.
- (6) Kuppusamy, P.; Lee, K. D.; Song, C. E.; Ilavenil, S.; Sriganpalram, S.; Arasu, M. V.; Choi, K. C. Quantification of Major Phenolic and Flavonoid Markers in Forage Crop *Lolium multiflorum* Using HPLC-DAD. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2018**, *28* (3), 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>.
- (7) Lin, J.; Tang, C. Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents in Selected Fruits and Vegetables , as Well as Their Stimulatory Effects on Mouse Splenocyte Proliferation. *Food Chem.* **2007**, *101*, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.014>.
- (8) Barrón-Yáñez, R.; García-Mateos, M.; Soto-Hernández, M.; Colinas-León, T.; Kite, G. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort .) Yakovlev. *Rev. Fitotec. Mex.* **2011**, *34* (3), 151–157.

- (9) Robles, M. V.; Jaramillo, C. G.; Lucina, R. L. Contenido de Betalainas y Actividad Antioxidante en brácteas de *Bougainvillea glabra* Choisy. *Rev. Cuba. Farm.* **2018**, *51* (2).
- (10) Gaurav, P.; Kumar, J. N.; Narendra, N.; Chatap, V. K. *Bougainvillea glabra* - A Natural Indicator. *Pharmacogn. J.* **2010**, *2* (5), 25–28.
- (11) Espinosa Arauz Ana Celia, E. L. J. J. Evaluar el crecimiento de estacas de veranera (*Bougainvillea glabra* Choisy) bajo el efecto de biofertilizante líquido a base de estiércol vacuno, Universidad Técnica de Machala, 2008.
- (12) Pivat, H. Y. P. Enraizamiento de estacas y protocolo de desinfección para la iniciación in vitro de trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) Cv. *Sanderiana variegata*, Universidad Central de Venezuela, 2003.
- (13) Cáceres, A. *Plantas de Uso Medicinal En Guatemala.*, Editorial.; Guatemala, 1996.
- (14) Sahu, N.; Saxena, J. A Comparative Phytochemical Analysis of *Bougainvillea glabra* Choisy and California Gold. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **2012**, *3* (3), 247–250.
- (15) Sahu, N.; Saxena, J. Phytochemical Analysis of *Bougainvillea glabra* Choisy by FTIR and UV-VIS Spectroscopic Analysis. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2013**, *21* (1), 196–198.
- (16) Tomar, R. S.; Sisodia, S. S. Assessment of Antidiabetic Activity of *Bougainvillea glabra* Choisy in Streptozotocin Induced Induced Diabetic Rats. *Asian J. Biochem. Pharm. Res.* **2013**, *3* (2), 79–91.
- (17) Sahu, N.; Saxena, J. Quercetin-3-O- α -L-Rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-Glucopyranoside Isolated from *Bougainvillea glabra*. *Int. J. Pharm. Res. Sch. (IJPRS)* **2014**, *3* (1), 489–491.
- (18) Narayan, S.; Kumar, A.; Ritesh, S. K.; Sharmila, G.; Muthukumaran, C. Extraction Optimization and Characterization of Water Soluble Red Purple Pigment from Floral Bracts of *Bougainvillea glabra*. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S2145–S2150. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.047>.
- (19) Creus, E. V. A. G. Compuestos Fenólicos. **2004**, *23*, 80–84.

- (20) Vanaclocha, B.; Cañigueral Folcara, S. *Fitoterapia: Vademécum de Prescripción*, 4a ed.; Masson, 2003.
- (21) Peñarrieta, J.; Tejeda, L.; Mollinedo, P.; Vila, J.; Bravo, J. Compuestos Fenólicos y su presencia en alimentos. *Rev. Boliv. Química* **2014**, *31* (2), 68–81. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-2002-2>.
- (22) Martínez, S.; González, J.; Culebras, J.; Tuñón, M. Los flavonoides: propiedades y acciones Antioxidantes. *Nutr. Hosp.* **2002**, 271–278. https://doi.org/10.3305/nutr_hosp.v17in06.3338.
- (23) Escamilla Jiménez, C. I.; Cuevas Martínez, E. Y.; Fonseca, J. G. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM* **2009**, *52* (2), 73–75.
- (24) Isaza Martínez, J. H. Taninos o polifenoles vegetales. *Sci. Tech.* **2007**, *13* (33), 13–18. <https://doi.org/0122-1701>.
- (25) Olivas Aguirre, F. J.; Wall Medrano, A.; González Aguilar, G. A.; López Díaz, J. A.; Álvarez Parrilla, E.; De la Rosa, L. A.; Ramos Jiménez, A. Taninos Hidrolizables; Bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la Salud. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31* (1), 55–66. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7699>.
- (26) Arango, G. J. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados, Universidad de Antioquía, 2008.
- (27) Mena Valdés, L.; Tamargo Santos, B.; Salas Olivet, E.; Plaza Paredes, L. E.; Blanco Hernández, Y.; Otero González, A.; Sierra González, G. Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (Jaboncillo). *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2015**, *20* (1), 106–116.
- (28) Ahumada, A.; Ortega, A.; Chito, D.; Benítez, R. Saponinas de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Un Subproducto con alto potencial Biológico. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm* **2016**, *45* (3), 438–469. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62043>.
- (29) Slimen, I. B.; Najar, T.; Abderrabba, M. Chemical and Antioxidant Properties of Betalains. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (4), 675–689. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04208>.

- (30) Khan, M. I. Stabilization of Betalains: A Review. *Food Chem.* **2016**, *197*, 1280–1285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.043>.
- (31) Khan, M. I. Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15* (2), 316–330. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12185>.
- (32) Rahimzadeh Karvansara, P.; Shalizar-Jalali, A. Betalains: Multifunctional Medicinal Bio-Pigments. *J. Nat. Ayurvedic Med.* **2018**, *2* (3). <https://doi.org/10.23880/JONAM-16000129>.
- (33) Cai, L. Thin Layer Chromatography. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* **2014**, *2014* (February 2014), 6.3.1-6.3.18. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0603s08>.
- (34) Kumar, S.; Jyotirmayee, K.; Sarangi, M. Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2013**, *18* (1), 126–132.
- (35) Sherma, J.; Fried, B. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*; 1996; Vol. 331. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)90561-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(96)90561-9).
- (36) Kuspradini, H.; Rosiarto, A. M.; Putri, A. S.; Wijaya, K. I. Antioxidant and Toxicity Properties of Anthocyanin Extracted from Red Flower of Four Tropical Shrubs. *Nusant. Biosci.* **2016**, *8* (2), 135–140. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n080201>.
- (37) Fazel, S.; Hamidreza, M.; Rouhollah, G.; Verdian-Rizi, M. Spectrophotometric Determination of Total Alkaloids in Some Iranian Medicinal Plants. *J. Appl. Hortic.* **2010**, *12* (1), 69–70.
- (38) Suri, A.; Bhavani, K.; Rajesh, B.; Krishna, S.; Peddineni, Y. Anti-Inflammatory Activity of *Bougainvillea glabra* Linn . Flowers by Carrageenan Induced Model in Rats. *Der Pharma Chem.* **2018**, *10* (4), 170–173.
- (39) Jaramillo Alcívar, V. H. Determinación Cuantitativa de saponinas totales y su actividad cicatrizante presentes en doce especies vegetales medicinales., Universidad Técnica de Machala, 2014.

- (40) Organización Mundial de la Salud. Directrices de La OMS Sobre Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de Plantas Medicinales. **2003**, 87.
- (41) de la Luz, C. L. A.; Guerra, C. C.; Ramos, R. Control de Calidad de Drogas Vegetales: Lavado y Desinfección de *Artemisia Annua* L. y *Tagetes lucida* Cav. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2012**, *17* (1), 101–107.
- (42) Miranda, M. .; Cuellar, A. *Farmacognosia y Productos Naturales*, 2da Edición.; Varela, E. F., Ed.; La Habana, 2001.
- (43) World Health Organization. *Quality Control Methods for Herbal Materials*; Ginebra, 2011.
- (44) Ulloa, J. A.; Ulloa, P. R.; Ramírez, C. J. Ultrasonido : Aplicaciones En El Campo de Los Alimentos. *Rev. Fuente nueva época* **2013**, *14* (1), 1–13.
- (45) Márquez Hernández, I.; Bastidas Guerrero, T. L.; Fernández Valarezo, G. K.; Campo Fernández, M.; Jaramillo Jaramillo, C. G.; Rojas De Astudillo, L. Estudio Farmacognóstico Preliminar de Tallo y Raíz de La Especie *Moringa oleifera* Lam Cosechada En Machala. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2017**, *22* (1), 1–13.
- (46) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
- (47) Cabrera, H.; Morón, C. F.; Victoria, M. del C.; García, A.; Acosta, C. L. Composición Fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2012**, *17* (3), 268–278.
- (48) World Health Organization. Monographs on Selected Medicinal Plants. In *WHO*; Geneva, 2002.
- (49) Rakam, K.; Raja, S. Standardization and Phytochemical Screening of *Bougainvillea glabra*. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **2017**, *9* (5), 75–80.
- (50) Shalini, M.; Aminah, A.; Khalid, H. M.; Vimala, S.; Katherine, S.; Khoo, M. G. H. In-Vitro Antioxidant Activities , Phytoconstituent and Toxicity Evaluation of Local *Bougainvillea glabra* Bract (Bunga Kertas). *Int. J. ChemTech Res.* **2018**, *11* (09), 22–30.

- (51) Juson, A. E. D. S.; Martinez, M. K. M.; Ching, J. A. Accumulation and Distribution of Heavy Metals in *Leucaena leucocephala* Lam. and *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Plant Systems. J. Exp. Biol. Agric. Sci.* **2016**, *4* (1), 1–6. [https://doi.org/10.18006/2015.4\(1\).01.06](https://doi.org/10.18006/2015.4(1).01.06).
- (52) Romero Amezcua, J. C.; Flores Lara, M. El Zinc En Las Plantas. *Ciencia* **2017**, *68* (3), 28–35.
- (53) Sharapin, N. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*; Pinzón, R., Ed.; Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo: Colombia, 2000.
- (54) Abarca, R.; Peña, C.; Petricevich, V. Characterization of Chemical Compounds with Antioxidant and Cytotoxic Activities in *Bougainvillea xbutiana* Holtum and Standl, (Var. Rose) Extracts. *Antioxidants* **2016**, *5* (4), 45. <https://doi.org/10.3390/antiox5040045>.
- (55) Bruneton, J. *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*, 2nd ed.; 2001; Vol. 1.
- (56) Cañigüeral, S.; Vila, R. La Fitoterapia Como Herramienta Terapéutica. *Ginecol. y Obstet. Clin.* **2005**, *6* (1), 43–51.
- (57) Zambrano, K.; Ramón, S.; Jaramillo, C. Evaluación preliminar de la actividad antitusiva de las brácteas de *Bougainvillea glabra* Choisy de La Ciudad de Machala, Universidad Técnica de Machala, 2017.
- (58) Osorio, E. Aspectos Básicos de Farmacognosia; Medellín, 2009.
- (59) Echavarría, A.; D' Armas, H.; Matute, N.; Jaramillo, C.; Rojas, L.; Benítez, R. Evaluación de La Capacidad Antioxidante y Metabolitos Secundarios de Extractos de Dieciséis Plantas Medicinales. **2016**, *9* (20), 29–35.
- (60) Kuklinski, C. *Farmacognosia: Estudio de Las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural*; Ediciones Omega, 2000.
- (61) Amal, H. Biologically Active Saponins from *Bougainvillea spectabilis* Growing in Egypt. *Asian J. Chem.* **2009**, *21* (7), 5510–5516.
- (62) Herrera, A. P.; Villegas, M. A.; López, R. Evaluación de La Respuestas Morfogénica y Tamizaje Fitoquímico de Callo Obtenido a Partir de Disco

- de Hoja de *Azadirachta indica* A . Juss (Meliaceae). *Rev. Investig. Univ. Quindío* **2011**, No. 22, 100–112.
- (63) Roberts, M. F.; Strack, D.; Wink, M. Biosynthesis of Alkaloids and Betalains. In *Annual Plants Review Volume 40. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2010; pp 20–91. <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch2>.
- (64) Stafford, H. A. Anthocyanins and Betalains: Evolution of the Mutually Exclusive Pathways. *Plant Sci.* **1994**, *101* (2), 91–98. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90244-5](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90244-5).
- (65) Brockington, S. F.; Walker, R. H.; Glover, B. J.; Soltis, P. S.; Soltis, D. E. Complex Pigment Evolution in The. *New Phytol.* **2011**, *190*, 854–864.
- (66) Kalirajan, A.; Mariselvam, R.; Savarimuthu, J.; Narayanan, K.; Narayanan, G.; Ranjit, A. Utilization Of *Bougainvillea glabra* For Prepared Natural Colouring Agent And Biopesticides. *Int. J. Curr. Res.* **2012**, *4* (9), 009-011.
- (67) Orozco, J.; Escobar, A.; Buendía, L.; García, C.; Hernandez, C.; Alvarez, J. Evaluation of the Protection and Release Rate of *Bougainvillea (Bougainvillea spectabilis)* Extracts Encapsulated in Alginate Beads. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2018**, *0* (0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/01932691.2018.1496834>.
- (68) Figueroa, L. A.; Navarro, L. B.; Vera, M. P.; Petricevich, V. L. Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents, and Cytotoxicity Evaluation of *Bougainvillea xbutiana*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6* (5), 497–502.
- (69) Vinatoru, M. An Overview of the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles from Herbs. *Ultrason. Sonochem.* **2001**, *8* (3), 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2).
- (70) Villanueva, R. G.; Abarca, R. V.; Petricevich, V. L. Chemical Compounds and Biological Activity of an Extract from *Bougainvillea xbutiana* (Var. Rose) Holttum and Standl. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2017**, *9* (3), 42. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i3.16190>.

- (71) Muñoz, Ó. A.; Torres, G. A.; Núñez, J. A.; de la Rosa, L. A.; Rodrigo, J.; Ayala, J. F.; Álvarez, E. Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales. *Tip Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* **2017**, *20* (2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>.
- (72) Ramos, R. T. M.; Bezerra, I. C. F.; Ferreira, M. R. A.; Lira, L. A. Dual Anti-Cholinesterase Activity of Ajoene by In Silico and In Vitro Studies. *Pharmacognosy Res.* **2017**, *9* (3), 253–260. <https://doi.org/10.4103/pr.pr>.
- (73) Dantas, A. J.; Assunção, M. R.; Perrelli, K.; Pereira, T.; Lira, L. A. Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). *Sci. World J.* **2012**. <https://doi.org/10.1007/BF00796455>.
- (74) Saleem, H.; Htar, T. T.; Naidu, R.; Zengin, G.; Ahmad, I.; Ahemad, N. Phytochemical Profiling, Antioxidant, Enzyme Inhibition and Cytotoxic Potential of *Bougainvillea glabra* Flowers. *Nat. Prod. Res.* **2019**, 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1543684>.
- (75) Markandan, S.; Abdullah, A.; Musa, K. H.; Subramaniam, V.; Stockham, K. Determination of Antioxidant Activities, Total Phenolic and Flavonoid Contents in *Bougainvillea glabra* Bracts at Various Methanol Concentrations. *AIP Conf. Proc.* **2016**. <https://doi.org/10.1063/1.4966776>.
- (76) Petrova, I.; Petkova, N.; Ivanov, I. Five Edible Flowers – Valuable Source of Antioxidants in Human Nutrition. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **2016**, *8* (4), 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.iej.2013.06.004>.
- (77) Mukaka, M. Statistics Corner: A Guide to Appropriate Use of Correlation Coefficient in Medical Research. *Malawi Med. J.* **2012**, *24* (3), 69–71. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2016.01.020>.
- (78) Palomino, L. R.; García, C. M.; Gil, J. H.; Rojano, B. A.; Durango, D. L. Determination of Phenolic Content and Evaluation of Antioxidant Activity of Propolis from Antioquia (Colombia). *Rev. la Fac. Química Farm.* **2009**, *16* (3), 388–395.
- (79) Sant’Ana, L. D. O.; Buarque, A. B.; Lorenzon, M. C. A.; Berbara, R. L. L.; Castro, R. N. Correlation of Total Phenolic and Flavonoid Contents of

- Brazilian Honeys with Colour and Antioxidant Capacity. *Int. J. Food Prop.* **2014**, *17* (1), 65–76. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.614368>.
- (80) Méndez, L.; Rojas, J.; Contreras, B.; Velasco, J.; Rosezweig, P.; Celis, M. Actividades Biológicas Analizadas En Los Extractos de *Jatropha curcas* Linn. *Rev. Cienc. e Ing.* **2018**, *39* (2), 153–160