

SECRETARÍA NACIONAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

PROYECTO PROMETEO

FORMATO DE PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

<b>Nombres del Investigador (a) / Asesor (a)</b>	Luisa Lucina	<b>Apellidos del Investigador (a) / Asesor (a)</b>	Rojas de Astudillo	
<b>Área de investigación</b>	Química Analítica			
<b>Título de PhD.</b>	PhD. en Química	<b>Universidad que otorgo el doctorado</b>	The University of The West Indies. Trinidad & Tobago.	
<b>Institución de acogida (PRINCIPAL) – Ciudad de localización</b>	Universidad Técnica de Machala	<b>Nombre de la contraparte en la institución de acogida</b>	Dr. Favián Maza	
<b>Institución de Educación Superior de acogida (COMPLEMENTARIA) – Ciudad de localización</b>	NO APLICA	<b>Nombre de la contraparte en la institución de acogida</b>	NO APLICA	
<b>Nombre de la investigación con la que el Investigador (a) / Asesor (a) contribuye</b>	Caracterización química cuantitativa de metabolitos secundarios en plantas medicinales.			
<b>Objetivo general de la investigación</b>	Evaluar espacial y temporalmente cuantitativamente los metabolitos secundarios presentes en plantas medicinales, tomando en consideración la calidad del material vegetal.			
<b>Fecha de inicio de actividades</b>	1ER PERIODO 05-08-2013 2DO PERIODO 12-07-2014 3ER PERIODO 10-02-2015	<b>Fecha final de actividades</b>	1ER PERIODO 15-02-2014 2DO PERIODO 08-10-2014 3ER PERIODO 28-04-2015	
<b>Total meses de vinculación</b>	11 meses y 26 días			
<b>Número de vinculación</b>	Primera	( x )	<b>Individual</b>	( x )
	Segunda	( )	<b>Postulación Institucional</b>	( )

**Perfil de Investigador (a)/ Asesor (a)**

La Dra. Luisa Rojas ha realizado el asesoramiento de proyectos de investigación y los resultados obtenidos han sido publicados en congresos y revistas científicas indexadas. Coordinación de equipos científicos multidisciplinarios para desarrollar proyectos de investigación. Competencia para el uso y optimización de técnicas instrumentales para análisis cuantitativo de compuestos y elementos químicos; en el desarrollo y la implementación de métodos analíticos confiables, estandarizados y trazados, usando las buenas prácticas de laboratorio y control de calidad analítico de acuerdo a las norma ISO 17025. Docente en los cursos de Análisis Instrumental para estudiantes de pre y postgrado, y en jornadas para comunicar conocimientos científicos a audiencias no especializadas.

### 1. Pregunta de investigación, así como su delimitación espacial, temporal.

Las informaciones de revisiones bibliográficas indican que en Ecuador, la industria farmacéutica, basada en las plantas medicinales es exigua. Lo poco que se produce sale al mercado sin un control de calidad adecuado y sin condiciones favorables para la población, lo que los hace, primero, que la comunidad ecuatoriana que los compra en tiendas naturistas o en puestos callejeros, los consume sin la precaución de que pueden ser más bien tóxicos para su salud; y, segundo, incompetentes en comparación con los preparados en la industria farmacéutica foránea; de allí que la mayoría de los productos que se expenden en el país provienen de industrias farmacéuticas extranjeras, a pesar de que el país tiene una gran riqueza en las plantas medicinales generadoras de esos productos fitofármacos comercializados.

La finalidad de este proyecto es ser base para un programa de investigación y desarrollo en Ecuador, para la obtención de materia prima y productos nutraceúticos y farmacéuticos de calidad, eficientes e inocuos, con validaciones científicas, tanto en farmacología como en toxicología, para su incorporación a la atención primaria de la salud, provenientes del cultivo de plantas medicinales en las mejores condiciones agroecológicas, generando una industria farmacéutica de prestigio, en provecho del desarrollo económico y social del país.

La presente investigación se basará en cuantificar espectrofotométricamente los metabolitos secundarios (Alcaloides, Fenoles (flavonoides y taninos), Terpenos (aceites esenciales) y Glicósidos (saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales) presentes en doce plantas medicinales.

Las especies a estudiar serán: *Cynara scolymus* (Alcachofa), *Cnidioscolus aconitifolius* (Chaya), *Myroxylon toluifera* (Tolu), *Artemisia absinthium* (Ajenjo), *Achicoria amarga* (Diente de Leon), *Chuquiraga jussieui* (Chuquiragua), *Schkuhria pinnata* (Canchalagua), *Ambrosia artemisiifolia* (Altamisa), *Momordica charantia* (Achochilla), *Coriandrum sativum* L. (Culantro), *Borago officinalis* (Hiedra) y *Croton lechleri* (Sangre de grado).

### 2. En esta parte señale claramente cuál será la contribución de la investigación en el área del conocimiento respectiva.

Las plantas producen una sorprendente diversidad de metabolitos secundarios, los cuales tienen múltiples funciones a través del ciclo de vida de las plantas. Además esos metabolitos son recursos invaluable, tanto nutraceúticos como farmacéuticos (Yazaki, 2006). De allí que es de gran interés evaluar la presencia y cantidad de esos metabolitos en las plantas seleccionadas, tales como los (Alcaloides, Fenoles (flavonoides y taninos), Terpenos (aceites esenciales) y Glicósidos (saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales) en diferentes extractos (acuosos, etanólicos y etéreos) y en las diferentes partes de cada una de las plantas medicinales seleccionadas en este estudio.

Debido a que los metabolitos secundarios son sintetizados en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies, se compararán los niveles de los metabolitos secundarios presentes en las diferentes plantas medicinales seleccionadas en este estudio, de allí se identificará el potencial de cada planta como proveedora de compuestos activos.

Se ha demostrado que los metabolitos secundarios varían dependiendo de la localidad y temporada del año. Por lo que se hará una evaluación espacial y temporal de los niveles de metabolitos secundarios en las plantas medicinales seleccionadas. Dentro de la espacial y temporal variación se determinará si la humedad, metales esenciales y no esenciales afectan el contenido de los metabolitos secundarios.

La validación analítica permite disminuir o controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de los resultados generados, provoca una mayor fiabilidad y aceptación de los datos generados, estando estas en proporción con la calidad del proceso de obtención de los mismos. En este estudio se harán las validaciones respectivas de los métodos analíticos para la determinación cuantitativa de los metabolitos secundarios, de acuerdo a las normas ISO 17025 y a las Buenas Prácticas de Laboratorio.

**3. La metodología a utilizarse en la investigación. En esta parte se debe demostrar la viabilidad de la investigación.**

**Muestreo**

La muestra será constituida por doce plantas autóctonas de Ecuador, de las cuales se desconocen cuantitativamente sus valores nutriceúticos y farmacéuticos.

Debido a la posible variabilidad que se pueda encontrar entre una sola especie, se harán hasta cinco (5) réplicas de cada planta.

**Técnicas instrumentales seleccionadas**

Se utilizará la espectrofotometría de absorción, los instrumentos a utilizar será evaluado con la finalidad de verificar si los parámetros fotométricos se encuentran dentro de los rangos de aceptabilidad establecidos de acuerdo a las normativas internacionales.

**Tratamiento de las muestras para la cuantificación de los diferentes metabolitos:**

**Alcaloides totales (Shamsa *et al.* 2008).**

El contenido de alcaloides totales se determinará formando un complejo colorido con verde de bromocresol. El método ofrece las ventajas de sensibilidad y estabilidad. La absorbancia del complejo obedece a la Ley de Beer. Este procedimiento puede ser llevado a cabo en la presencia de otros compuestos sin interferencias. El método para la obtención de alcaloides totales se comparará con un método gravimétrico (Montoro *et al.* 2004). Todo el procedimiento se realizará por triplicado.

**Fenoles totales (Julián-Loeza *et al.*, 2011).**

Para cuantificar fenoles totales se empleara el reactivo de Folin-Ciocalteu, cuyas sales de molibdato y tungstato sódico en presencia de compuestos fenólicos se reducen formando un complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico de color azul.

**Flavonoides (Julián-Loeza *et al.*, 2011)**

- a) Cuantificación del contenido de flavonoides totales empleando tricloruro de aluminio, el cual forma un complejo de color rosa con los flavonoides en medio básico. Todos estos complejos coloridos se miden espectrofotométricamente para cuantificar los metabolitos de interés.
- b) Con fines de comparación de métodos, también se determinará cuantitativamente por el método de Dewanto *et al.* (2002) y modificado por Maimona *et al.* (2011).

**Saponinas**

El método consiste en hidrolizar la saponina para separar las moléculas de azúcar de la sapogenina..

Para determinar la cantidad de azúcares generados por la hidrólisis de saponinas, se elaborará una curva de calibración con una saponina triterpénica, la cual se someterá al proceso de hidrólisis con HCl y en igualdad de condiciones se procesarán otra serie de soluciones sin la adición de ácido, sólo al ajustar el pH, en ambos casos se determinará el contenido de azúcares y con base en la diferencia entre la cantidad de éstos en las muestras hidrolizadas menos el contenido en las muestras sin hidrolizar se obtiene la cantidad neta de azúcares generados por el rompimiento de las moléculas de saponina en sapogenina y azúcares.

Se evaluarán los posibles factores que puedan influir en el rendimiento para la obtención de saponinas, entre ellos la temperatura, solventes no polares, variación en el tipo de ácidos y los tiempos de reacción. La variable de respuesta serán los azúcares generados por la hidrólisis de la molécula.

**Aceites esenciales (Boligon *et al.*, 2012)**

El material fresco de la planta será extraída por hidrodestilación por 4 horas. El aceite será secado usando sulfato de sodio anhidro y después filtrado. Almacenado a -4°C hasta la cuantificación. El producto obtenido se cuantificará por porcentaje de masa fresca del material vegetal. La cantidad relativa de cada componente individual será calculado en base a las áreas de los picos en un cromatografo de gases con detector de ionización a la llama (FID).

**Control de calidad de las medidas espectrofotométricas**

Se evaluarán los siguientes parámetros para el control de calidad de las medidas fotométricas:

- a) Selección de la longitud de onda de máxima absorción
- b) Linealidad e intervalo
- c) Límite de detección
- d) Robustez
- e) Exactitud
- f) Precisión
- g) Incertidumbre

**Análisis estadístico**

Los datos generados mediante la aplicación del diseño experimental se analizarán estadísticamente.

**4. Productos esperados**

COMPONENTES	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	RESULTADOS POR OBJETIVO
1 INVESTIGACION	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Evaluar cada uno de los parámetros fotométricos en el espectrofotómetro de absorción.</li> <li>2. Determinar cuantitativamente los alcaloides totales presentes en las plantas medicinales seleccionadas.</li> <li>3. Cuantificar fenoles totales presentes en las plantas medicinales seleccionadas.</li> <li>4. Cuantificar del contenido de flavonoides totales espectrofotométricamente y gravimétricamente.</li> <li>5. Determinar el contenido de saponinas presentes en las plantas medicinales seleccionadas, tomando en cuenta los posibles factores que puedan influir en el rendimiento para la obtención de saponinas.</li> <li>6. Cuantificar los aceites esenciales extraídos por procesos de hidrodestilación.</li> <li>7. Determinar la cantidad relativa de cada componente individual de aceites esenciales por cromatografía de gases.</li> <li>8. Evaluar los parámetros analíticos para el control de calidad de las medidas fotométricas.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Garantía de que los parámetros fotométricos del espectrofotómetro se encuentran dentro de los rangos de aceptabilidad establecidos de acuerdo a las normativas internacionales.</li> <li>2. De acuerdo a las concentraciones encontradas de alcaloides se pueden elaborar productos vegetales que sean de beneficio de la salud y no efectos adversos.</li> <li>3. Dependiendo de la cantidad de fenoles totales se puede evaluar el efecto sinérgico de los fenoles en las plantas como antioxidantes e inhibitorio de la angiogénesis y actividad de proliferación celular.</li> <li>4. Los flavonoides son de particular importancia, de los resultados obtenidos se puede determinar cuáles plantas medicinales pueden ser usadas como antioxidantes, agentes antiinflamatorios y para prevenir riesgos de enfermedades cardiovasculares y cancerígenas.</li> <li>5. Lograr un método menos oxidante y con mayor repetitividad, así como un alto índice de correlación entre el contenido de azúcares y la cantidad de saponinas presentes.</li> <li>6. Con el uso de los métodos de extracción por hidrodestilación se espera obtener mayor concentración de aceites esenciales, ya que son mezclas</li> </ol>

COMPONENTES	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	RESULTADOS POR OBJETIVO
		<p>compleja y volátiles y generalmente están en bajas concentraciones.</p> <p>7. La separación de cada componente de los aceites esenciales por cromatografía permitirá diferenciar de manera aproximada el componente activo y su actividad biológica respectiva.</p> <p>8. Garantizar que los métodos espectrofotométricos propuestos para la cuantificación de metabolitos secundarios fueron validados para el control químico de calidad del material vegetal, que son fiables, y demuestran mantener los criterios fundamentales de linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y especificidad.</p>
<p>EL PLAN ESTRATÉGICO DE CAPACITACIÓN CIENTÍFICA EN EL ÁREA PERTINENTE A SU ESPECIALIDAD (teórico y formativo)</p> <p>2</p>	<p>1. Contribuir en el desarrollo y la implementación de métodos analíticos y técnicas instrumentales confiables, estandarizados y trazados, para la determinación cuantitativa de metabolitos secundarios. Dirigido a investigadores en el área.</p> <p>2. Evaluar apropiadamente las diferentes aplicaciones analíticas de la espectrofotometría de absorción molecular y atómica y sus principales limitaciones. Dirigido a Investigadores en el área</p> <p>3. Dictar talleres y jornadas a la comunidad de productores de plantas medicinales.</p>	<p>1. Implantación de sistemas de garantía de la calidad para generar confianza en los resultados, tomando en cuenta las normas ISO 17025 y las buenas prácticas de laboratorio.</p> <p>2. Uso adecuado de la espectrofotometría de absorción para resolver un problema analítico dado.</p> <p>3. Fomentar un proceso de aprendizaje en la comunidad que puedan tener conocimientos de la calidad de las plantas medicinales.</p>
<p>ASESORÍA EN LA ELABORACIÓN DE POLÍTICAS PÚBLICAS</p> <p>3</p>	NO APLICA	NO APLICA
<p>DOCENCIA</p> <p>4</p>	<p>1. Dictar Cursos de confiabilidad en los métodos analíticos Dirigido a estudiantes de Postgrado de Química, Biología, Bioquímica, Farmacia y ciencias afines.</p> <p>2. Dictar Curso de Espectroscopia de absorción atómica y molecular Dirigido a estudiantes de Pregrado de Química, Biología, Bioquímica,</p>	<p>1. Capacitación de estudiantes en los procesos que generan confiabilidad en los métodos analíticos.</p> <p>2. Adquisición de conocimientos por parte de los estudiantes en espectrofotometría de absorción molecular y atómica, de forma tal que al finalizar el mismo, el</p>

COMPONENTES	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	RESULTADOS POR OBJETIVO
	Farmacia y ciencias afines.	participante pueda describir los fundamentos teóricos en los cuales se basan las técnicas analíticas espectroquímicas,
5 ASESORIA Y DISEÑO DE PROGRAMAS DE POSTGRADO	NO APLICA	NO APLICA
6 GESTIÓN DE RECURSOS NACIONALES E INTERNACIONALES (administrativos, humanos, económicos, etc.)	NO APLICA	NO APLICA
7 RELACIONAMIENTO ESTRATÉGICO INTERINSTITUCIONAL A NIVEL NACIONAL E INTERNACIONAL	1. Asesoría interinstitucional en las investigaciones dirigidas para evaluar la calidad de la composición química de los vegetales usados como medicina complementaria, que puedan ser utilizados en la elaboración de Fitofármacos con su respectivo registro sanitario para ser comercializadas legalmente a bajos costos, aprovechando sus cualidades como hipoglucemiante, expectorante, quelante, cicatrizante y otras actividades, sin el riesgo de toxicidad prestando así "servicios a la comunidad" como lo dispone en el artículo 88 de la Ley Orgánica Orgánica de educación superior (LOES).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lograr vinculación con la Universidad de Oriente, Venezuela, que posteriormente genere un convenio interinstitucional</li> <li>- Realizar acuerdos de cooperación con los entes gubernamentales de Ecuador, responsables del control en la elaboración y comercialización de fitonutrientes y fitofármacos</li> <li>- Ser promotor para el desarrollo de talleres, Jornadas y reuniones con otras instituciones locales para el intercambio de conocimientos y saberes relacionados con el control de calidad toxicológica y farmacéutica de las plantas medicinales.</li> </ul>

Firma y sello de la contraparte de la institución de acogida	
Nombre de la contraparte de la institución de acogida	Favián Maza Valle
Fecha de la propuesta	