

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

**CARRERA:  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:  
Estudio fitoquímico e identificación molecular de las especies del género *Bomarea* del  
norte de los Andes del Ecuador, mediante el sistema BARCODE.**

**AUTORA:  
VICTORIA SALOMÉ SÁNCHEZ COLLANTES**

**TUTOR:  
MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS**

**Quito, febrero de 2020**

### Cesión de derechos de autor

Yo Victoria Salomé Sánchez Collantes, con documento de identificación N° 1719688085, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de grado/titulación intitulado: “Estudio fitoquímico e identificación molecular de las especies del género *Bomarea* del norte de los Andes del Ecuador, mediante el sistema BARCODE. ”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Victoria Salomé Sánchez Collantes

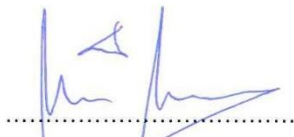
C.I: 1719688085

Quito, febrero de 2020

### **Declaratoria de coautoría del docente tutor**

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Estudio fitoquímico e identificación molecular de las especies del género *Bomarea* del norte de los Andes del Ecuador, mediante el sistema BARCODE.”, realizado por Victoria Salomé Sánchez Collantes, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero de 2020



Marco Fernando Cerna Cevallos

C.C. 0501872071

## **Dedicatoria**

A Dios, quien me concedió la sabiduría y fuerza necesaria en cada uno de mis pasos para lograr convertirme en una gran profesional.

A los pilares fundamentales de mi vida, mis padres Klever y Amparito, quienes depositaron su confianza en mí y con su esfuerzo me han apoyado incondicionalmente guiándome siempre en el camino hacia el éxito.

A mi abuelita Carmita Bastidas, quien con su cariño y apoyo incondicional ha sido un gran aporte durante este sueño que hoy logro culminar con total felicidad.

A mis hermanos Daniel y Josué, por su ejemplo de lucha y tenacidad que me han sabido brindar.

A mis sobrinos Monserrath, Noa y Thomas, por su cariño y la alegría que ponen en cada uno de mis días.

A Patricio, mi compañero de viaje en esta gran aventura llamada vida, por su amor, apoyo constante y motivación para lograr la culminación de esta meta tan anhelada.

Victoria Sánchez

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana, a la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, a mis docentes quienes compartieron conmigo sus enseñanzas para formarme como una excelente profesional.

A mi estimado docente tutor Marco Cerna Ph.D por su confianza, dirección, aporte y motivación durante el presente proyecto de investigación.

Al grupo de investigación NUNKUI WAKAN por su apoyo y financiamiento en la ejecución del presente trabajo.

Al laboratorio de Ciencias de la Vida, en especial al Ing. Byron Fuertes y a la Ing. Elisabeth Yugsi, por la colaboración brindada durante la ejecución de este proyecto.

A mis compañeros de investigación Cristhian Quinchuela, Israel Vaca e Ing. Luciana Vargas, por su asesoramiento durante la ejecución de este proyecto.

Al Herbario Nacional del Ecuador (QCNE), de manera especial a la Dra. Marcia Peñafiel por su apoyo con las colecciones almacenadas para identificación morfológica.

A mis amigos, quienes me brindaron su ánimo, alegría, apoyo y amistad incondicional durante mi carrera universitaria.

## Índice de Contenido

Introducción .....	1
Capítulo 1 .....	3
Marco Conceptual .....	3
1.1 Familia Alstroemeriaceae .....	3
1.2 Género <i>Bomarea</i> .....	3
1.2.1 Clasificación taxonómica .....	4
1.2.2 Descripción botánica .....	5
1.2.3 Distribución geográfica y hábitat .....	8
1.2.4 Nombres comunes y usos .....	9
1.2.5 <i>Bomarea</i> en el Ecuador .....	10
1.3 Composición química de interés .....	16
1.3.1 Fenoles .....	17
1.3.2 Flavonoides .....	18
1.3.3 Alcaloides .....	19
1.4 Análisis químico .....	19
1.4.1 Screening fitoquímico .....	20
1.4.2 Espectrofotometría uv- visible .....	21
1.5 Identificación molecular .....	21
1.5.1 Extracción de ADN .....	22

1.5.2 Marcadores moleculares .....	23
1.5.3 Región <i>rpoC1</i> .....	23
1.5.2 PCR.....	24
1.5.3 Secuenciación .....	25
1.5.4 Método BARCODE.....	25
1.5.5 Filogenia .....	26
Capítulo 2 .....	27
Metodología .....	27
2.1 Colección de muestras .....	27
2.2 Extracción de ADN .....	28
2.2.1 Extracción de ADN mediante el protocolo Doyle & Doyle modificado .....	28
2.2.2 Extracción de ADN mediante método directo.....	29
2.3 Cuantificación de ADN obtenido (Electroforesis) .....	30
2.4 Amplificación .....	31
2.5 Secuenciación .....	32
2.6 Filogenia .....	32
2.7 Georreferenciación .....	32
2.8 Análisis químico .....	33
2.8.1 Preparación de extractos .....	33
2.8.2 Screening fitoquímico .....	33
2.9 Cuantificación de metabolitos secundarios .....	35
2.9.1 Cuantificación de fenoles totales .....	35

2.9.2 Cuantificación de flavonoides totales .....	36
2.9.3 Evaluación de la actividad antioxidante .....	36
Capítulo 3 .....	39
Resultados y discusión .....	39
3.1 Colección de muestras .....	39
3.2 Estudio Molecular.....	39
3.2.1 Amplificación región <i>rpoC1</i> .....	40
3.2.2 Secuenciación .....	41
3.2.3 Análisis de secuencias.....	42
3.2.4 Análisis morfológico.....	42
3.2.5 Filogenia .....	42
3.2.6 Georeferenciación .....	48
3.3 Estudio fitoquímico .....	49
3.3.1 Resultados del screening fitoquímico .....	50
3.3.2 Resultados de la cuantificación de fenoles y flavonoides.....	51
3.3.3 Resultados de la actividad antioxidante.....	52
Conclusiones .....	55
Recomendaciones.....	56
Bibliografía.....	57
Anexos.....	65



## Índice de Tablas

Tabla 1. Especies del género <i>Bomarea</i> presentes en Ecuador. ....	11
Tabla 2. Programación de ciclos para PCR.....	31
Tabla 3. Resultados obtenidos de la cuantificación de fenoles totales.....	51
Tabla 4. Resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides.....	52
Tabla 5. Resultados IC50 en extractos de <i>Bomarea</i> .....	53

## Índice de Figuras

Figura 1. Filogenia de la familia Alstroemeriaceae. ....	4
Figura 2. Características botánicas del género <i>Bomarea</i> ( <i>Bomarea edulis</i> ). ....	8
Figura 3. Estructura del anillo bencénico presente en los fenoles. ....	18
Figura 4. Disposición de los grupos químicos en la estructura de flavonoides. ....	19
Figura 5. Gel de agarosa al 1% con muestras de ADN del género <i>Bomarea</i> . ....	40
Figura 6 Gel de agarosa al 1% con productos de PCR del género <i>Bomarea</i> . ....	41
Figura 7. Filogenia de las especies del género <i>Bomarea</i> , usando la región <i>rpoC1</i> . .	43
Figura 8. Puntos de ubicación geográfica de las especies de <i>Bomarea</i> en Ecuador. .	49
Figura 9. Resultados de IC50 en especies del género <i>Bomarea</i> . ....	54

## Índice de Anexos

Anexo 1. Colección de material vegetal del género Bomarea. ....	65
Anexo 2. Lista de especies del género Bomarea colectadas en Ecuador. ....	66
Anexo 3. Evaluación de la calidad de los productos del alineamiento de Sanger .....	69
Anexo 4. Identificación morfológica .....	70
Anexo 5. Alineamiento de secuencias.....	71
Anexo 6. Screening fitoquímico de fenoles en extractos de Bomarea. ....	72
Anexo 7. Screening fitoquímico de flavonoides en extractos de Bomarea.....	73
Anexo 8. Metabolitos secundarios presentes en especies del género Bomarea. ....	74
Anexo 9. Porcentaje de inhibición de DPPH en extractos del género Bomarea. ....	75
Anexo 10. Análisis estadístico .....	75

## Resumen

Alstroemeriaceae es una familia de plantas monocotiledóneas cuyos géneros más reconocidos son *Alstroemeria* y *Bomarea*, siendo el último el único presente en el Ecuador con flores vistosas campanuladas que lo distinguen. En la presente investigación se realizó un análisis molecular de las especies ubicadas en el norte de los Andes del Ecuador con la colección de 41 especímenes de donde se extrajo ADN de hojas jóvenes con la técnica Doyle & Doyle, se amplificó la región cloroplástica *rpoC1* mediante la técnica de PCR convencional usando el kit *Phire Plant Direct PCR Master Mix*, los productos obtenidos fueron secuenciados mediante el método Sanger y se realizó un análisis de la construcción filogenética con el software *Mega 7.0*, mientras que para el análisis biogeográfico se utilizó el programa *DIVA GIS* ; en la evaluación fitoquímica de metabolitos secundarios presentes se emplearon ensayos de screening y técnicas espectrofotométricas. Entre los resultados obtenidos se presentó la formación de un árbol filogenético con seis clados diferenciados entre especies, *Bomarea multiflora* presentó un amplio rango de distribución a lo largo del callejón interandino y el análisis fitoquímico permitió determinar la presencia de compuestos fenólicos donde se concluyó que *Bomarea linifolia* es la especie con mayor capacidad antioxidante en la reducción de radicales DPPH con IC<sub>50</sub> de 251.363 µg/mL y 3.729 mg GAE/ g de fenoles totales lo cual la ubica como una especie potencial para futuros estudios antitumorales.

**Palabras clave:** estudio fitoquímico, análisis molecular, *rpoC1*, antioxidante.

## Abstract

Alstroemeriaceae is a family of monocotyledonous plants whose most recognized genera are *Alstroemeria* and *Bomarea*, the latter being the only one present in Ecuador with colorful bell-shaped flowers that distinguish it. In this research, a molecular analysis of the species located in the north of the Andes of Ecuador was carried out with the collection of 41 specimens from which DNA was extracted from young leaves with the Doyle & Doyle technique, the chloroplastic region *rpoC1* was expanded using the conventional PCR technique using the *Phire Plant Direct PCR Master Mix kit*, the products obtained were sequenced using the Sanger method and a phylogenetic construction analysis was performed with *Mega 7.0* software, while for analysis the *DIVA GIS* program was used; screening assays and spectrophotometric techniques were used in the phytochemical evaluation of secondary metabolites present. Among the results obtained was the formation of a phylogenetic tree with six distinct clades between species, *Bomarea multiflora* presented a wide range of distribution along the interandean alley and phytochemical analysis determined the presence of phenolic compounds where It was concluded that *Bomarea linifolia* is the species with the greatest antioxidant capacity in the reduction of DPPH radicals with IC<sub>50</sub> of 251,363 g/mL and 3,729 mg GAE/ g of total phenols which places as a species for potential for potential future anti tumor studies.

**Keywords:** phytochemical study, molecular analysis, *rpoC1*, antioxidant.

## Introducción

*Bomarea* es un género de la familia Alstroemeriaceae que se caracteriza por tener flores vistosas de colores llamativos: rojo, rosado o anaranjado, generalmente son actinomorfas a ligeramente zigomorfas; con una forma campanulada (Hofreiter & Rodríguez, 2006).

Posee cerca de 120 especies de hierbas generalmente volubles o erectas, con un área de distribución que se extiende desde los Andes subtropicales húmedos hasta las montañas centroamericanas a una altura que oscila entre 1.500 a 4.000 m.s.n.m (Estrada, 2015). El mayor centro de diversidad en América se ubica entre Perú y Ecuador en donde es típico de los bosques montanos (Hofreiter & Rodríguez, 2006), su uso se enfoca principalmente como plantas ornamentales (Estrada, 2015).

En el Ecuador no existen registros de investigaciones moleculares realizadas en el género *Bomarea*, sin embargo, se han encontrado investigaciones como la de Alzate, Mort, y Ramirez (2008), donde secuenciaron tres regiones de cDNA (*psbA-trnH*, *rpoB-trnC*, *matK*) y las regiones *ITS* espaciadoras (*ITS 1* e *ITS 2*), obteniéndose como resultado tres linajes principales en el género, así como patrones de evolución para tres caracteres morfológicos que fueron investigados en su filogenia, de esta manera se llegó a la conclusión que el antepasado de *Bomarea* tenía umbelas compuestas. Otro estudio presentado por Vindas, Rojas y Tamayo, (2011) en el que muestra el análisis de ADN de 27 especies de plantas de Costa Rica, incluyendo a *Bomarea chiriquina*, en las cuales se realizó una amplificación y secuenciación de los marcadores *matK* y *rpoCl* del genoma plastídico y el espaciador intergénico *trnH-psbA*, mediante análisis bioinformáticos se buscó la utilidad que tienen estos marcadores como posibles códigos de barras y elementos para la discriminación entre especies, obteniéndose como resultado una amplia variabilidad genética con el espaciador *trnH-psbA*, por el contrario *matK* fue menos variable pero más útil en la discriminación de especies en árboles filogenéticos,

mientras que la región *rpoC1* fue altamente conservada y útil para estudios filogenéticos, pero de utilidad limitada para ser empleada en la elaboración de códigos de barras.

En el estudio de la filogenia de Alstroemeriaceae, basada en la región *rps16* y los datos de secuencias de *rbcL* de Aagesen y Sanso (2003), en la que analizaron un total de 27 especies de Alstroemeriaceae, incluidas 23 *Alstroemeria*, 3 *Bomarea* y 1 *Leontochir* con el objetivo de examinar la monofilia de *Alstroemeria* y *Bomarea*, así como explorar la posición filogenética de *Leontochir* dentro de la familia, de esta manera los resultados obtenidos demostraron la monofilia de *Alstroemeria* y *Bomarea*, así como la separación de *Bomarea* y *Leontochir* en un solo clado a diferencia de *Alstroemeria*.

Dentro de los estudios de composición química de este género, se puede tomar como referencia el de Alzate y otros (2011), donde se evalúan 11 extractos vegetales de *Bomarea*, con el fin de realizar su evaluación fitoquímica y de esta manera generar más información para este género, se encontró que algunos de los extractos presentan una marcada actividad antioxidante, representada por su capacidad para estabilizar los radicales libres DPPH, su alto contenido de compuestos fenólicos e inhibición de la peroxidación lipídica.

Revisando la información anterior se ha evidenciado que pese a que el país es uno de los lugares con gran diversidad a nivel de género en América, no existen estudios del género *Bomarea*, por lo cual esta investigación tiene como objetivo identificar mediante análisis molecular las especies presentes en la zona norte de los Andes del Ecuador mediante el sistema BARCODE, incluyendo la identificación morfológica, además se busca conocer sus compuestos químicos y su capacidad antioxidante para implementar su uso fito farmacéutico.

## Capítulo 1

### Marco Conceptual

#### 1.1 Familia Alstroemeriaceae

Las plantas que pertenecen a esta familia generalmente son hierbas perennes, de altura variable, con la presencia de tallos erectos o volubles y rizomas simpodiales, con raíces delgadas, otras engrosadas, sus hojas son alternas, generalmente resupinadas, lineares a lanceoladas, las inflorescencias son terminales ubicadas en cimas umbeliformes con una medida de 2 a 15 radios, con involucro de brácteas foliosas, sus flores son cigomorfas o actinomorfas, que presentan usualmente patrones de manchas, además presentan tépalos rectos o reflexos, ovario ínfero, placentación axilar o parietal, una cápsula loculicida, dehiscente, con numerosas semillas esféricas o elipsoides (Sanso & Kiesling, 2017).

La familia Alstroemeriaceae está distribuida desde Venezuela hasta Argentina especialmente en hábitats secos, en el Perú son reconocidos dos géneros: *Alstroemeria* y *Bomarea* y 85 especies básicamente hierbas y enredaderas (Hofreiter & Rodríguez, 2006).

#### 1.2 Género *Bomarea*

La distribución del género *Bomarea* en la región sur de América se extiende principalmente a la cordillera andina, desde México hasta localidades de Argentina y Chile, donde el mayor centro de diversidad se encuentra en el territorio de Ecuador y Perú, en la actualidad se encuentra dividido en 4 subgéneros: *Baccata* Hofreiter (3 especies), *Bomarea* s.str Baker (70 especies), *Sphaerine* (Herb.) Baker (12 especies) y *Wichuraea* (M. Roemer) Baker (18 especies) (Freire, 2016).



### 1.2.1 Clasificación taxonómica

El género *Bomarea* Mirb. inicialmente fue clasificado por Armen y otros (1965) dentro de la familia Amaryllidaceae, concepto que fue modificado por Cronquist en 1981, donde se lo clasifica dentro del orden Liliales que pertenece a la familia Alstroemeriaceae junto con *Alstroemeria* L (Kim, Hong, Chase, Fay, & Kim, 2013).

*Bomarea* se encuentra ubicado actualmente dentro de la familia Alstroemeriaceae por el sistema APG III de 2009. Ver Figura 1.

**Reino:** Plantae

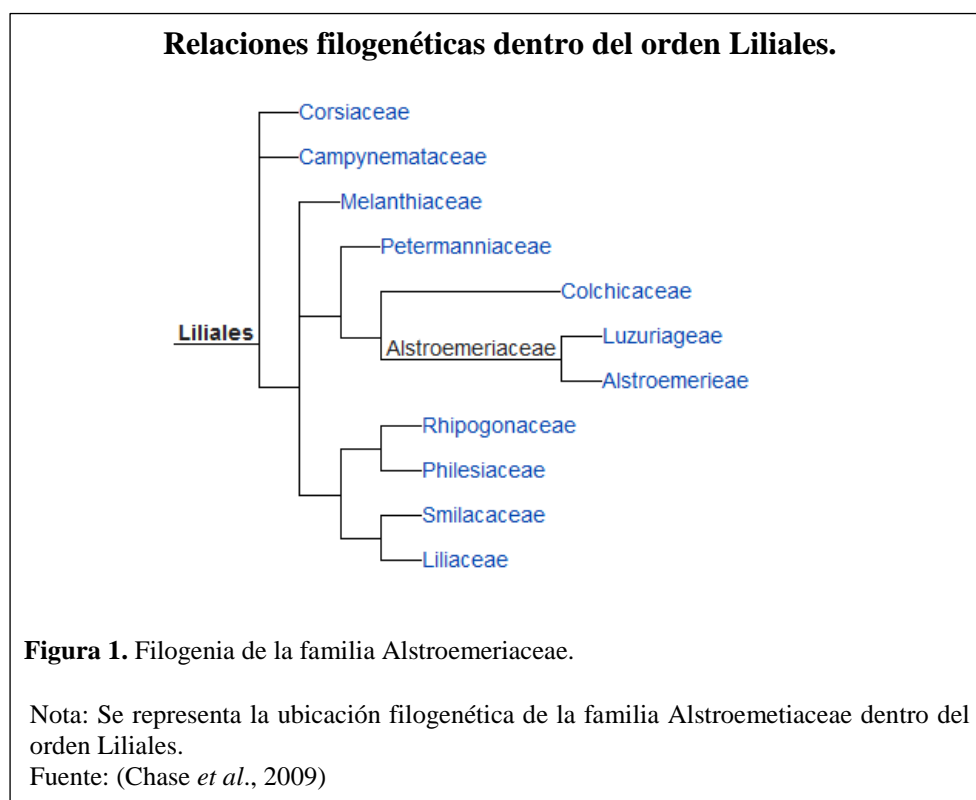
**División:** Angiospermae

**Clase:** Monocotyledoneae

**Orden:** Liliales

**Familia:** Alstroemeriaceae Dum

**Género:** *Bomarea* (Haston, Richardson, Stevens, Chase, & Harris, 2009)



## **1.2.2 Descripción botánica**

El género *Bomarea* presenta características especiales que lo distinguen de otras especies, ver Figura 2, entre ellas destacan las siguientes:

### **1.2.2.1 Raíz**

El sistema radicular en el género *Bomarea* se compone de ejes filamentosos formando nodos de almacenamiento de nutrientes que se unen mediante raíces fibrosas delgadas de color marrón y amarillo, cubriendo áreas hasta de 1.5 m de diámetro y profundidades de hasta 1 m (Alzate, 2016).

Varias especies producen tubérculos comestibles como por ejemplo *B. edulis*, sin embargo el mayor uso que se le da al género es como plantas ornamentales (Estrada, 2015).

### **1.2.2.2 Tallo**

Presenta tallos volubles y carentes de ramificaciones aéreas y en la mayoría de las especies crecen apoyados sobre otras plantas, alcanzando hasta 15 m de longitud y 1-15 mm de diámetro, cuando son jóvenes presentan un color verde y en algunas especies una pigmentación purpúrea, alcanzando coloración marrón en la madurez, son glabros o pubescentes, desarrollan un hábito herbáceo, hepaxántico, con ejes aéreos desde 0.2 m hasta 12-15 m, siendo la mayoría de las especies sarmentosas, pero unas pocas son erectas o sub-erectas (Alzate, 2016).

### **1.2.2.3 Hoja**

Alzate, (2016) menciona que las hojas en el género *Bomarea* son simples, alternas, enteras, de filotaxia espiralada, sus láminas foliares son ovadas, ovado-lanceoladas, lanceoladas u obovadas, con longitudes que van desde 1.5 cm hasta 21 cm y de 0.3 cm hasta 10.4 cm de ancho con una epidermis foliar que presenta una gruesa cutícula en el haz de especies que crecen predominantemente en tierras altas, mientras que las especies encontradas en tierras bajas poseen una cutícula delgada, sus estomas son anomocíticos ubicados densamente en el envés foliar, presentándose en menor cantidad en el haz, presenta un patrón de venación donde se alternan nervaduras mayores, reconocibles por su mayor grosor y prominencia, con nervaduras menores que presentan menor grosor, llegando a ser casi inconspicuas. Los peciolos presentan longitudes entre 2 y 27 mm, y están cubiertos por tricomas multicelulares en la mayoría de las especies.

### **1.2.2.4 Flor**

*Bomarea* es un género que presenta flores actinomorfas o de manera ligera son zigomorfas, con forma muy similar a una campana, pueden ser infundibuliformes o similares a un túbulo; se caracterizan por poseer tépalos libres, con pequeños pétalos que se encuentran unguiculados, con colores muy vistosos y llamativos a la vista: rojo, rosado o anaranjado; en la parte interna generalmente se encuentran patrones moteados de color marrón característicos; usualmente tienen 6 estambres separados de manera individual; sus filamentos tienen apariencia recta; con un pistilo compuesto; su ovario es ínfero, trilocular con un estilo trifurcado y la presencia de numerosos óvulos por cada lóculo, además que su placentación es axilar (Estrada, 2015).

Según Bolaños (2017) son flores perfectas, levemente tienen un solo plano de simetría, aparentando estar divididas en dos partes simétricas, pueden ser solitarias o agrupadas, semejantes a las varillas de un paraguas (umbelas).

#### **1.2.2.5 Fruto**

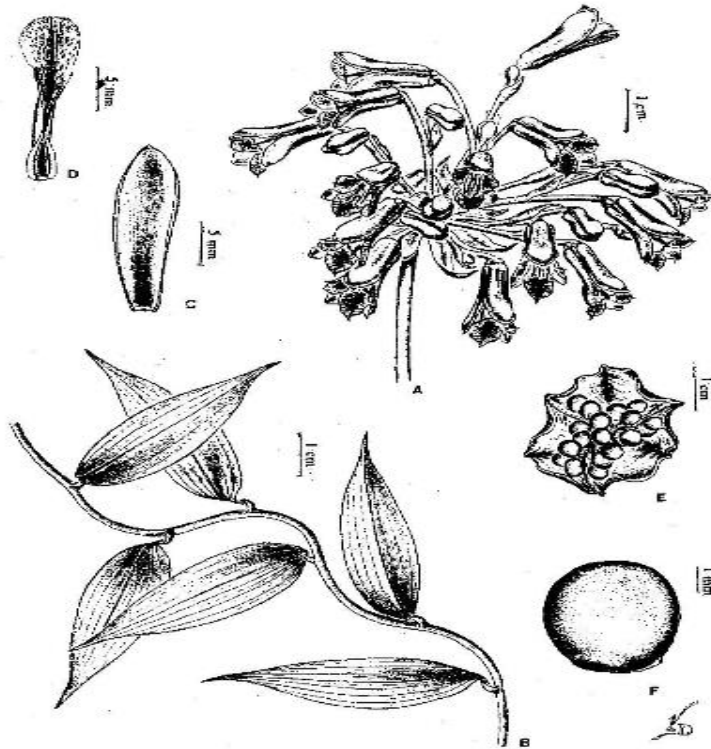
Presenta un cápsula de forma triangular con lóculos que en su interior contienen semillas globosas de color rojo o anaranjado y está cubierto por una sarcotesta carnosa característica (Estrada, 2015).

Las especies del género desarrollan bayas como *B. diffracta* Baker o cápsulas turbinadas, marcadamente rugosas, subesféricas, de superficie irregular, loculicidas o indehiscentes, con 3 ángulos prominentes (costillas) y 3 líneas costales deprimidas, con diámetro aproximado entre 1-6 cm, la dehiscencia en las cápsulas ocurre por la apertura longitudinal de los lóculos, iniciándose desde la parte más distal del fruto y expandiéndose hasta la base (basipétalo), tras lo cual quedan expuestas las semillas. Los frutos inicialmente son verdes o morados y de forma ligeramente esférica, tornándose marrón o amarillos, esclerenquimatizados y angulosos al madurar (Alzate, 2016).

#### **1.2.2.6 Semilla**

Se presentan como esferoideas, subglobosas a elipsoides con sarcotesta carnosa, pustulada, conformada por varias capas de células, de color amarillo, rojo o marrón. Las células del endospermo contienen aleurona, aceites y proteínas (Sanso & Xifreda, 2001).

## Descripción botánica de *Bomarea*



**Figura 1.** Características botánicas del género *Bomarea* (*Bomarea edulis*).

Nota: A: inflorescencia; B: tallo con hojas; C: tépalo externo; D: tépalo interno; E: fruto maduro; F: semilla.

Fuente: (Xifreda & Sanso, 1996).

### 1.2.3 Distribución geográfica y hábitat

Su área de distribución se extiende desde los Andes subtropicales húmedos hasta las montañas centroamericanas y en el caso de pocas especies las islas del Caribe, en altitudes que oscilan entre los 1.500-4.000 m.s.n.m., aunque también existen algunas especies que presentan crecimiento entre 120-500 m.s.n.m., en su mayoría son hierbas volubles, cuyo hábitat son los bosques húmedos de montano altos y otros aunque en menor proporción montano bajos, además de selvas nubladas entre otras, aquellas que presentan portes erectos se desarrollan en formaciones abiertas andinas como el páramo o puna, pueden crecer de manera aislada o en

grupos poco numerosos con preferencia a zonas cercanas a la sombra o con una intensidad lumínica media (Estrada, 2015).

En Ecuador este género se presenta en los bosques montanos hasta los páramos en donde se lo puede encontrar como trepadores de los árboles, se lo puede identificar porque sus flores son muy vistosas, especialmente en las especies que presentan umbelas de hasta 20 cm de diámetro (Freire, 2016).

#### **1.2.4 Nombres comunes y usos**

A las especies de este género se las conoce como bejuco de perro, cimarrona, cortapicos, pecosa, sacha y tetona (Alzate, 2016).

Algunas especies del género son utilizadas por indígenas de la Amazonía peruana y brasileña, como anticonceptivos, esto debido a la presencia de saponinas esteroidales; para algunas culturas indígenas del sur de Colombia, Ecuador y Chile, las raíces de *Bomarea* han representado una fuente de carbohidratos, alternativa a la papa, razón por la cual le han dado el nombre de Sacha papa lo que traduce papa de bejuco (Alzate, 2016).

Bussmann y Sharon (2006) en su compendio de plantas medicinales utilizadas en el norte del Perú mencionan a *Bomarea dulcis* como una planta usada en su forma fresca en varios rituales ancestrales para brindar protección, éxito, y buen consejo, mientras que *Bomarea angulata* Benth es empleada para el tratamiento de la infertilidad en mujeres a manera de infusión oral que se prepara a partir de 5 g de planta en 1 taza de agua hervida, la dosis recomendada es de 1 taza todos los días durante 8 meses.

### **1.2.5 *Bomarea* en el Ecuador**

Este género como lo menciona León-Yáñez y otros (2012) es el único representativo en el Ecuador de la familia Alstroemeriaceae donde se presentan 39 especies, 17 de las cuales tienen un rango de distribución geográfico restringido a su territorio, se ubican en los bosques nublados y altoandinos, especialmente entre los 1.000 y 4.500 m.s.n.m, aunque hay especies que pueden crecer en los bosques tropicales como *Bomarea obovata* que habita en los bosques bajos de la Costa y *Bomarea doliocarpa* en los bosques de la Amazonía ecuatoriana. Se conoce que *Bomarea multiflora*, es la especie con una distribución más amplia ya que se encuentra entre los 1.000 y 4.000 m.s.n.m en la Sierra; la mayoría de las especies endémicas dentro del país se encuentran bajo la categoría de amenaza, distribuidas de la siguiente manera: 1 en peligro crítico, 4 en peligro, 11 vulnerables y 2 casi amenazadas como lo menciona la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), algunos factores que pueden verse involucrados son la acelerada transformación de su hábitat natural que generalmente se convierte en fuentes de pastizales, campos agrícolas, monocultivos y en algunos casos en las localidades que se ven intervenidas por la minería.

#### **1.2.5.1 Especies representativas**

Ecuador es un país con gran diversidad en flora nativa, el género *Bomarea* está representado por varias especies vistosas que se detallan a continuación en la Tabla 1 de acuerdo a su ubicación:

**Tabla 1.**

Especies del género *Bomarea* presentes en Ecuador.

<b>Especies</b>	<b>Descripción</b>
<p data-bbox="300 465 695 504"><i>Bomarea brachysepala</i> Benth</p>  <p data-bbox="376 920 622 952">Fuente: (Cueva, 2012)</p>	<p data-bbox="820 465 1394 577">Hierba terrestre presente en el bosque andino alto a una altura de 2.500–3.500 m.</p> <p data-bbox="820 611 1394 869">Se encuentra ubicada en los bosques alto andinos de las provincias denominadas como el Austro del Ecuador como el Parque Nacional Podocarpus.</p>
<p data-bbox="292 1005 707 1043"><i>Bomarea chimborazensis</i> Baker</p>  <p data-bbox="201 1541 619 1572">Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2019a)</p>	<p data-bbox="820 1005 1394 1196">Hierba terrestre ubicada en el bosque andino alto, páramo húmedo de pajonal, hasta en el páramo arbustivo entre los 2.500–4.000 m.</p> <p data-bbox="820 1229 1394 1344">Principalmente se la puede encontrar desde la provincia de Pichincha hasta Loja.</p>
<p data-bbox="256 1624 743 1662"><i>Bomarea goniocaulon</i> subsp. <i>elegans</i></p>	<p data-bbox="820 1624 1394 1960">Bejuco localizado en el bosque andino alto hasta páramo arbustivo entre 2.000-3.000 m, presente en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Loja, Zamora Chinchipe, es una subespecie endémica que</p>





Fuente:(Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2019).

podría encontrarse en el Parque Nacional Podocarpus y la Reserva Ecológica Los Ilinizas.

*Bomarea goniocaulon* subsp. *goniocaulon*



Fuente: (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2019)

Bejuco localizado en el bosque andino alto entre los 2.500-3.000 m en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Zamora Chinchipe. Se la puede encontrar en la Reserva Ecológica Los Ilinizas, el Refugio de Vida Silvestre Pasochoa y la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo.

*Bomarea graminifolia* Sodiro



Fuente: (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2019).

Bejuco ubicado en el bosque andino alto entre los 2.500-3.000 m en las provincias de Chimborazo, Pichincha, Morona Santiago, Napo. Es posible encontrarla en la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo.

<p style="text-align: center;"><i>Bomarea lancifolia</i> Baker</p>  <p style="text-align: center;">Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2019)</p>	<p>Especie colectada ampliamente en la cordillera occidental de los Andes y sus estribaciones entre los 1.500-3.500 m, en las provincias de Pichincha, Bolívar, Cañar y Cotopaxi.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Bomarea longipes</i> Baker</p>  <p style="text-align: center;">Fuente:(Tropicos Specimen Data, 2019)</p>	<p>Bejuco ubicado en el bosque andino alto entre los 2.500-3.000 m en la provincia de Zamora. La zona de colecta registrada es la Reserva Tapichalaca, en la carretera Yangana-Valladolid, a 2.700 m.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Bomarea lutea</i> Herb</p>  <p style="text-align: center;">Fuente: (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2019)</p>	<p>Especie conocida por estar ubicada en el bosque andino bajo hasta bosque andino alto entre los 2.000-3.900 m dentro de las provincias de Azuay, Cotopaxi, Napo, Pichincha, Tungurahua. Sus poblaciones crecen en lugares muy húmedos.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Bomarea multipes</i> Benth</p>	<p>Especie endémica de los bosques andinos altos del sur del Ecuador, entre los 2.100-</p>



Fuente: (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2019)

3.000 m, ha sido colectada en los dos flancos de la cordillera de Los Andes, aproximadamente a la altura de Loja.

*Bomarea oxytepala* Harling & Neuendorf



Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2019)

Bejuco presente en el bosque andino alto entre 2.100-2.600 m. Esta especie es conocida por dos colecciones, ambas registradas en la carretera Loja-Zamora, en el límite del Parque Nacional Podocarpus.

*Bomarea patacocensis* Herb

Bejuco ubicado en el bosque andino alto entre los 2.400-3.300 m en las provincias de Bolívar, Cotopaxi, Imbabura, Napo y Pichincha.



Fuente: (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2019)

*Bomarea perglabra* Harling & Neuendorf



Fuente: (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2019)



*Bomarea spissiflora* Harling & Neuendorf



Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2019)

Bejuco localizado en el bosque andino alto entre los 3.100-3.400 m en la provincia de Cotopaxi. Esta especie ha sido encontrada en el límite superior del bosque, en los alrededores de Pilaló y Zumbahua. Su mayor amenaza que presenta es la destrucción del hábitat.

Bejuco localizado en el bosque amazónico piemontano hasta el bosque andino bajo entre los 600-1.300 m. Esta especie ha sido colectada en las estribaciones orientales de Los Andes en las provincias de Morona Santiago y Zamora Chinchipe.

<p><i>Bomarea trimorphophylla</i> Harling &amp; Neuendorf</p>  <p>Fuente: (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2019)</p>	<p>Especie de bejuco localizado en el bosque andino alto a 2.500 m en la provincia de Loja, ha sido registrada en el km 2 de la carretera El Cisne-San Pedro de la Bendita.</p>
<p><i>Bomarea uncifolia</i> Herb</p>  <p>Elaborado por: La autora, 2019</p>	<p>Especie que crece desde los bosques montano altos hasta los páramos en la zona centro sur del Ecuador, en provincias como Azuay, Bolívar, Cañar, Chimborazo, Cotopaxi, Loja y Tungurahua a una altura entre 2.500-4.000 m.</p>

Elaborado por: La autora, 2019 en base a la información de (León-Yáñez *et al.*, 2012).

### 1.3 Composición química de interés

Las plantas, poseen metabolismo primario que consiste en la producción de compuestos (carbohidratos, proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos) que son indispensables para el desarrollo

y multiplicación de las plantas, estos son comunes a todas ellas (Halliday, 2015). Así como también poseen metabolismo secundario cuyos compuestos se derivan de las rutas biosintéticas del metabolismo primario del carbono en las plantas, que aparecen en el citoplasma de las células vegetales (Augustin, Kuzina, Andersen, & Bak, 2011). Estos compuestos juegan un papel ecológico importante ya que muchos de los compuestos sirven como mecanismo de defensa contra herbívoros, virus, bacterias y hongos, otros tienen funciones fisiológicas, como los alcaloides y las pectinas, que sirven para el transporte de nitrógeno y otros compuestos de almacenamiento, en tanto que los compuestos fenólicos como son los flavonoides, realizan una función de protección frente a los rayos ultravioletas (Pérez & Jiménez, 2011).

Entre los metabolitos secundarios comunes en las plantas se encuentran aquellos que presentan funciones defensivas contra insectos, bacterias y hongos, dentro de los cuales como están los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides (Soto, 2015).

Una de las principales diferencias que presentan los metabolitos secundarios con relación a los primarios es su distribución limitada en el reino vegetal; mientras que los compuestos primarios se encuentran en todo el reino vegetal (Ramos, Ruiz, Frutos, & Giráldez, 1998).

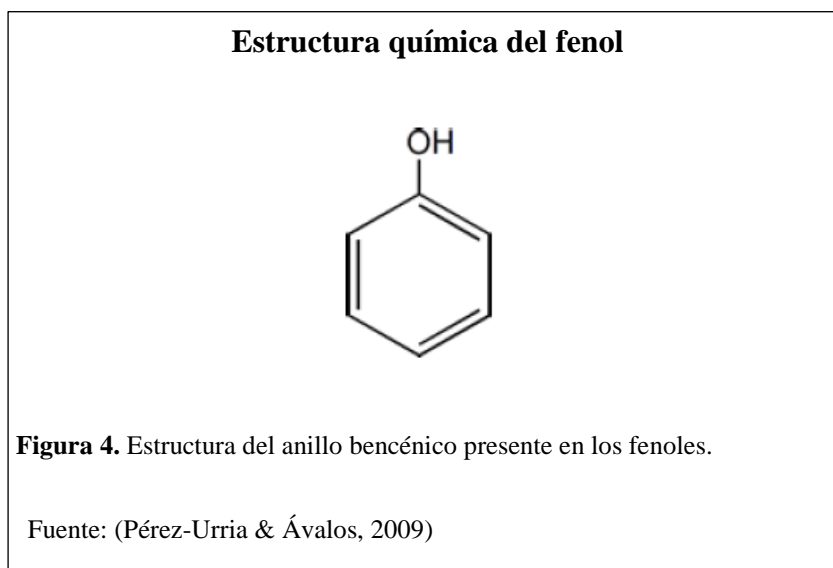
### **1.3.1 Fenoles**

Su nombre se deriva de “feno”, una antigua forma de designar al benceno, se trata de compuestos que contienen uno o varios grupos OH unidos directamente al núcleo aromático (Beyer & Wlter, 1987).

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y

derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo como se puede apreciar en la Figura 3 (Pérez-Urria & Ávalos, 2009).

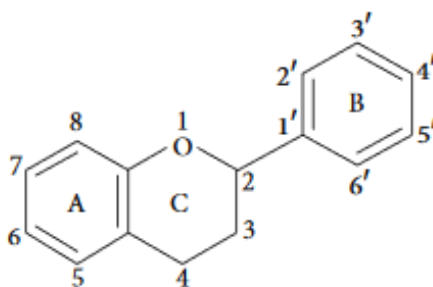
Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de 10.000 compuestos, tienen funciones diversas en las plantas, como la defensa contra herbívoros o patógenos, soporte mecánico, atracción de polinizadores y dispersantes de frutos (Taiz & Zeiger, 2006).



### 1.3.2 Flavonoides

Como lo menciona Kumar y Pandey (2013) son metabolitos secundarios que se encuentran presentes en las plantas, los cuales tienen una estructura química de quince carbonos con dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirano heterocíclico (ver Figura 4), se los puede clasificar en función de su estado de oxidación y también por el patrón para la sustitución del anillo pirano en: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas, y flavan-3-oles; son importantes en la investigación de productos naturales ya que presentan actividad biológica, como antioxidante, antiinflamatorio, hepatoprotector, antibacteriano y antiviral.

### Estructura química de los flavonoides



**Figura 5.** Disposición de los grupos químicos en la estructura de flavonoides.

Fuente: (Kumar & Pandey, 2013)

### 1.3.3 Alcaloides

Loyola y otros (2004) mencionan que los alcaloides son uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios encontrados en los organismos vivos, siendo parte de al menos el 20 % de la población vegetal; una gran cantidad de ellos empleados en la medicina, convirtiéndose muchos de ellos en potenciales fármacos; este grupo incluye alrededor de 12.000 productos, a los cuales se lo puede clasificar de acuerdo a su origen biogénico en cuatro grupos: 1) alcaloides derivados de aminoácidos tales como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptofano, y del ácido antranílico y el ácido nicotínico; 2) alcaloides purínicos; 3) terpenos aminados y 4) alcaloides policétidos.

### 1.4 Análisis químico

El estudio de los metabolitos secundarios presentes en las plantas está a cargo de la fotoquímica, disciplina que se encarga del análisis de compuestos de interés como los alcaloides, cumarinas,



esteroides, fenoles, flavonas, flavonoides, glúcidos, lectinas, polifenoles, polipéptidos, quinonas, saponinas, taninos, terpenoides y xantonas (Prashant et al., 2011).

El uso de diferentes técnicas como la cromatografía de gases, cromatografía de capa delgada, cromatografía líquida de alta resolución, espectrofotometría infrarroja y de masa, así como el tamizaje fitoquímico permiten reconocer los tipos de compuestos que se hallan en los tejidos vegetales así como su cuantificación en muchos casos (Lock & Ugaz, 1998).

#### **1.4.1 Screening fitoquímico**

La aparición de técnicas avanzadas que permiten la determinación de la composición química de los metabolitos presentes en plantas ha sido de gran importancia, sin embargo los ensayos utilizados tradicionalmente en fitoquímica como el tamizaje fitoquímico donde se emplean extractos vegetales elaborados a partir de solventes (agua, alcohol, acetona, cloroformo), todavía constituyen una manera confiable de realizar un análisis cualitativo rápido donde se presente información preliminar útil que indique el potencial de muchas especies para ser utilizadas con fines farmacológicos y descartando aquellas que no presenten mayor actividad, de esta manera son un indicador previo al uso de tecnologías de análisis más avanzadas ya que conociendo la presencia de compuestos se puede continuar con el análisis cuantitativo (Prashant et al., 2011). Las reacciones de coloración son las más empleadas en estudios de screening ya que son fácilmente reproducibles además de que su costo es bajo y sus resultados son de interpretación rápida con una simple presencia o ausencia (+) o (-) del metabolito que está siendo analizado en cuestión, usualmente se las emplea luego de los procesos de extracción, son muy utilizadas en investigación como una pauta para la evaluación de grupos de sustancias o, en algunos casos de compuestos específicos relevantes como en el caso de azúcares, polisacáridos, ácidos grasos, entre otros (Sharapin, 2000).

El tamizaje fitoquímico está relacionado con el estudio fitoquímico, de manera que, los compuestos aislados se puedan estudiar y utilizar para descubrir el efecto farmacológico, ya sea beneficioso o tóxico (Dash, 2016).

#### **1.4.2 Espectrofotometría uv- visible**

Esta técnica está basada en la absorción de radiación electromagnética por parte de los analitos en la zona ultravioleta y visible del espectro (Kuo *et al*, 2019). Cuando la radiación de dicha zona del espectro incide en un compuesto, al tener la energía adecuada, esta será absorbida por el compuesto y en efecto se producirá la promoción de un electrón a un nivel de energía superior, en otras palabras, la molécula pasa a un estado excitado de mayor energía (Gallego, Garcinuño, & Morcillo, 2013).

#### **1.5 Identificación molecular**

Como lo menciona Escobar (2018), la identificación molecular consiste en el estudio de secuencias de ADN cuya finalidad es lograr una identificación de los individuos pertenecientes a una misma familia y de esta manera diferenciarlos, para lo cual es necesario tener conocimiento previo de la secuencia a estudiarse, es decir los genes involucrados o un genoma completo que puedan servir como marcadores moleculares para poder lograr una óptima comparación entre secuencias.

En la identificación de una especie, el primer paso a desarrollar es el aislamiento del ADN o material genético, el cual debe estar lo suficientemente puro para su manipulación y amplificación (Herrera, 2010). Para la amplificación del material genético aislado se utiliza una técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, la cual es útil ya que llega

a generar varias copias de ADN, colocándolas de acuerdo al orden de magnitud en el que se encuentran y de esta manera se pueden obtener miles de copias de una secuencia específica utilizada, de esta manera se obtienen los resultados de la cadena amplificada mediante secuenciación, por lo tanto es necesario el uso de software que permiten la comparación de las secuencias que han sido obtenidas con otras secuencias que han sido guardadas en bibliotecas genómicas cuyo acceso es libre para investigación y de esta manera lograr observar la similitud que presentan o las diferencias que las separan con la posterior construcción de árboles filogenéticos (Sahil *et al.*, 2015).

### **1.5.1 Extracción de ADN**

Es un procedimiento empleado para separar el ADN del núcleo, mitocondrias y cloroplastos celulares; el proceso se debe iniciar rompiendo las células y liberando el material genético, para lograrlo se pueden utilizar métodos físicos como la maceración o molienda que ayuda a atravesar las membranas celulares con el uso de un detergente y una solución buffer, a continuación es necesario separar el ADN de proteínas y otros desechos celulares para de esta manera obtener una muestra limpia eliminando cualquier tipo de desechos, esto se realiza mediante la adición de una proteasa (enzima proteínica) para degradar las proteínas asociadas y otras proteínas celulares, después se precipita con un alcohol, para lo cual se añade cuidadosamente a la muestra isopropanol frío; de esta manera el ADN logra precipitarse, por último se limpia el ADN, puede ser con lavados de etanol y finalmente se resuspende en un tampón ligeramente alcalino (Science Learning Hub, 2009).

### **1.5.2 Marcadores moleculares**

Conocidos también como marcadores genéticos, se los define como un segmento de ADN ubicados en un lugar específico del genoma, a lo que se denomina locus cuya herencia genética puede ser rastreada, estos pueden ser genes codificantes o no codificantes (Azofeifa-Delgado, 2006). Según Rocha (2003), los marcadores moleculares son secuencias de ADN que se han convertido en herramientas de gran utilidad para la detección y el uso de la diversidad genética, con su empleo en programas de selección genética de plantas, animales y microorganismos.

Los marcadores moleculares como lo menciona Alfonso y otros (2016), permiten estimar la distancia genética, la identificación y la discriminación de poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos; además establecen relaciones de parentesco y localizan e identifican regiones del ADN que afectan caracteres cuantitativos, son muy útiles por el polimorfismo que detectan, la insensibilidad a los factores ambientales o al desarrollo de la planta y su fácil identificación y codominancia.

### **1.5.3 Región *rpoC1***

Este gen codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa que participa en el proceso de transcripción de los genes del cloroplasto, así como también presenta las tasas de evolución más altas como lo menciona Cruz (2011). Pertenece a plantas superiores y se integra en los procesos de fotosíntesis al igual que *rpoA*, *rpoB* y *rpoC2* (S. Lee, Ng, Mahat, Nazre, & Mohamed, 2016).

Es recomendable la utilización de *rpoC1* por su buen rendimiento al ser amplificado con una gama limitada de condiciones de PCR como lo menciona Vindas y otros (2011) además por ser los primeros grupos analizados para la discriminación confiable entre especies de diferentes

grupos de plantas. Su tamaño molecular oscila entre los 550 a 750 pares de bases, resultados que han sido corroborados mediante el uso de geles de agarosa en electroforesis horizontal (Zhitao *et al.*, 2017).

### **1.5.2 PCR**

El ensayo enzimático denominado Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tiene como objetivo lograr la amplificación de un segmento específico de ADN, para lo cual se requiere de la presencia de ciertas moléculas como la cadena de ADN, cebadores específicos, nucleótidos y una enzima que permita la unión de nucleótidos individuales, la ADN polimerasa y así formar el producto de PCR, al mencionar la presencia de nucleótidos se incluyen las bases nitrogenadas indispensables en el proceso como son la adenina, citosina, guanina y timina, cuya función es la de actuar como cimientos sobre los cuales se formarán peldaños a manera de escalera que serán utilizados por la enzima ADN polimerasa para poder formar un producto resultante de utilidad (Garibyan & Avashia, 2013). Para realizar la PCR se deben seguir 3 pasos básicos: primero, se debe empezar con la desnaturalización donde se utilizan temperaturas altas entre 90 y 97 °C, posteriormente se realiza el reconocimiento de un segmento de ADN específico con la ayuda de cebadores a una temperatura aproximada de 50 a 60 °C, es ahí cuando la enzima Taq polimerasa se encarga de unir los nucleótidos que se hallan libres, formando de esta manera una cadena complementaria de ADN a 72 °C, finalmente, luego de completar 25-30 ciclos, en una muestra de ADN se obtendrá como resultado la formación de varias copias de ADN formadas a partir de una muestra original utilizada para el análisis (Joshi & Deshpande, 2011).

### **1.5.3 Secuenciación**

Este proceso que comprende los métodos que pueden ser usados para la determinación del orden de posicionamiento de las bases nitrogenadas en la molécula de ADN (Munshi, 2012). El método utilizado para desnaturalizar ADN diana es conocido como secuenciación de Sanger, aquí la molécula en estudio se hibrida con un cebador que contiene una cadena de oligonucleótidos para luego realizar una extensión con la ayuda de la ADN polimerasa, para lo cual utiliza una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato conocidos como dNTP y también didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP), los cuales carecen de un grupo 3 OH, su función es agregar el siguiente dNTP de la cadena de ADN formada en crecimiento; es así que cuando la sintetización de cadenas finaliza se obtiene una mezcla con longitudes variadas, de esta manera estas secuencias se las puede visualizar mediante una electroforesis vertical con el uso de geles de acrilamida como se dispone cada base dentro de la secuencia analizada (Applied Biosystems, 2009).

### **1.5.4 Método BARCODE**

Conocido mundialmente como Consortium for the Barcode of Life (CBOL), permite la identificación de los organismos vivos mediante códigos de barras que se construyen en base a las secuencias de ADN presentes; es un método que ha sido estandarizado para brindar fiabilidad en sus resultados, su propósito es relacionar las secuencias de una muestra analizada con la especie a la cual tiene una gran similitud, determinando un origen común, de esta manera se puede realizar una clasificación y definir relaciones evolutivas dentro de la biodiversidad; en el caso de las plantas, los genes cloroplásticos más empleados para análisis son *rbcL*, *matK*,

*trnLF* y los genes nucleares multicopia *ITS* (López-Herraz, Betekhtin, Catala, & López-Alvarez, 2012).

### **1.5.5 Filogenia**

Los árboles filogenéticos han sido utilizados a través del tiempo para describir relaciones taxonómicas entre especies; el establecimiento de relaciones entre los miembros de una familia está determinado por la filogenia que busca definir su evolución mediante el conocimiento de una huella poblacional; en la estructura de un árbol filogenético se puede observar la presencia de segmentos nodales cuya conexión se da a través de ramas, en cada rama se puede observar la representación de un linaje genético distinto marcado a través del tiempo, mientras que un nodo es la representación del nacimiento de un nuevo linaje (Yang & Rannala, 2012).

Gracias al análisis de datos moleculares en taxonomía vegetal se han podido establecer relaciones evolutivas entre plantas utilizando material genético como punto de partida para el análisis (Liu, Abdullah, Huang, & Nishioka, 2017).

## Capítulo 2

### Metodología

#### 2.1 Colección de muestras

El material genético colectado proveniente de especies del género *Bomarea*, fue tomado de varias zonas localizadas en distintas provincias del Ecuador (ver Anexo 1), gracias a la ayuda de la base de datos Tropicos, la cual ofrece puntos de georeferencia de los especímenes registrados.

En campo, se realizó la colección de dos tipos de muestras por especie vegetal: una fue destinada para almacenamiento en el herbario de la Universidad Politécnica Salesiana donde se tomaron especímenes con hojas y flores cuidadosamente con el fin de extraer la menor cantidad de material vegetal y evitar la destrucción de las especies en su lugar de origen, mientras que otra se dispuso para extracción de ADN y elaboración de extractos.

Tanto para la identificación morfológica como molecular, se realizó un registro con los datos obtenidos por colección (ubicación, fecha, coordenadas geográficas), los cuales fueron anotados en el libro de campo número 11 de Marco Cerna (códigos 3869 al 4403), luego se las etiquetó para proceder a realizar una limpieza superficial y finalmente un secado donde se prensa cada muestra envuelta en papel periódico entre dos tablas de madera que la presionan, con el objetivo de evitar la descomposición vegetal que podría ser provocada por la presencia de microorganismos como hongos e insectos presentes en las mismas en el momento de la colección, para ello, una vez dispuestas las muestras se realizó un secado en estufa a una temperatura de 60 °C, durante dos días, una técnica descrita por (Arnelas, Invernón, De la estrella, López, & Devesa, 2012).

Para la posterior extracción de ADN, Iza (2018) menciona que se debe tomar tejido foliar joven sin daños mecánicos y libre de enfermedades, almacenarlo en bolsas de papel kraft y estas a su



vez, en bolsas de plástico con cierre hermético con silica gel en su interior, para luego ser transportadas en un recipiente térmico frío con el fin de que las muestras no se degraden ni se oxiden desde el sitio de recolección hacia el laboratorio, al emplear esta técnica se logra mantener conservadas las muestras durante el transporte donde finalmente, en el laboratorio se almacenan a -20 °C.

## **2.2 Extracción de ADN**

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Quito, campus Girón.

El procedimiento de extracción de ADN en tejido vegetal foliar fue realizado por dos métodos: el primero, denominado Doyle & Doyle modificado, un proceso largo y minucioso que utiliza técnicas físicas y reactivos para lograr liberar material genético y el segundo mediante el kit de extracción *Phire Plant Direct PCR Master Mix Thermo scientific* que permite realizar el procedimiento de PCR de una manera más directa sin la extracción previa de ADN.

### **2.2.1 Extracción de ADN mediante el protocolo Doyle & Doyle modificado**

Para este procedimiento se utilizó el protocolo Doyle & Doyle, modificado por Iza (2018); este protocolo de extracción química simple de ADN foliar inicia con una toma de muestra de 20 a 30 mg de muestra pulverizada previamente en nitrógeno líquido y colocarla en microtubos de 2 mL, se añadieron 600 µL de Buffer de Lisis (100 mM TrisCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8) y 500 mM NaCl), realizando agitación constante de los tubos hasta homogenizar la mezcla por un tiempo estimado de 30 segundos, luego se añadió 94 µL de Dodecilsulfato de sodio (SDS 10 %) realizando una mezcla por inversión de 5 a 8 veces seguidas, posteriormente se calentó la solución durante 10 minutos a 65 °C en un termo bloque para posteriormente añadir 100 µL

de acetato de potasio (5M), realizando una mezcla por inversión de 5 a 8 veces, luego se almacenó en refrigeración por un estimado de 5 minutos; transcurrido este tiempo se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos, finalizando se observó la formación de dos fases, de las cuales la superior se trasvasó a un microtubo limpio con capacidad de 1.5 mL de forma manual, luego se añadió 600  $\mu$ L de fenol: cloroformo (1:1) agitando de manera constante para posteriormente centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos; se observó nuevamente la presencia de dos fases, de esta manera con ayuda de una micropipeta se extrajo un volumen de 250  $\mu$ L de la fase superior, removiendo cuidadosamente la primera, evitando tomar la fase inferior que contiene contaminantes y depositándola en un nuevo microtubo de 1.5 mL, a continuación se añadieron 360  $\mu$ L de isopropanol frío, realizando proceso de agitación por inversión de 5 a 8 veces para proceder a almacenarla a -20 °C por un periodo de 3 horas o toda una noche; transcurrido el tiempo estimado, se centrifugaron los tubos por 3 minutos a una velocidad 13.000 rpm, observándose la formación de un pellet de ADN en el fondo del tubo el cual debe ser limpiado de la presencia de contaminantes, para ello, se realizaron cuatro lavados añadiendo 400  $\mu$ L de etanol (70 %) y centrifugando cada vez por 3 minutos a 13.000 rpm, finalmente se evaporan las fracciones de alcohol restantes con la ayuda de un termo bloque a 37 °C y se resuspende el pellet en 30 $\mu$ L de TE 1X (con 10 mM TrisCl a un pH 8 y 1 mM de EDTA), finalmente se almacenó a -20 °C para su conservación posterior.

### **2.2.2 Extracción de ADN mediante método directo.**

Para realizar este procedimiento se empleó el protocolo directo para plantas con tejido fresco del kit comercial *Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR*, para lo cual se tomó una hoja fresca a la que se le desinfectó su superficie con una solución de alcohol al 70 % y con la ayuda de un punch o sacabocados de la marca *Thermo Scientific* se realizó una punción sobre el

material vegetal, así de esta manera se obtuvo tejido foliar con un corte circular de 0.5 mm (Thermo Scientific, 2019) y se colocó en un microtubo de PCR para posteriormente añadir una solución “master mix” y realizar así el proceso de amplificación.

### **2.3 Cuantificación de ADN obtenido (Electroforesis)**

Para observar las moléculas de ADN que se obtuvieron luego del proceso de extracción se realizó una electroforesis, por lo cual se elaboró un gel de agarosa de concentración 1 %, para lo cual se pesó 0.5 g de agarosa que fue añadida a 50 mL de solución TBE 1X diluida a partir de una solución concentrada de TBE 10X (54 g de tris base, 27.5 g ácido bórico y 2.93 g EDTA concentración 0.5 M, aforando a 500 mL a pH 8), posteriormente se calentó en horno microondas durante 60 segundos, luego se esperó hasta que la temperatura descendiera a 50 °C, se adicionó 5 µL del fluorocromo *SYBR Safe*, se depositó el gel en un molde plástico de la cámara electroforética, sobre él se colocó un peine para formar pocillos y depositar las muestras de ADN, la placa de gel preparado fue colocada en la cámara de electroforesis *Labnet*, a la cual se le adicionó TBE 1X hasta completar el volumen en la línea de aforo. En cada pocillo del gel se depositó una mezcla de 4 µL de ADN y 4µL del tampón de carga *Blue Juice* concentración 2X. Para la estimación del tamaño y concentración de las bandas de ADN que fueron obtenidas se colocó 3 µL del marcador molecular *O`GeneRuler Express DNA Ladder* que tiene un tamaño de 100 a 5.000 bp, de acuerdo con el protocolo de Thermo Scientific (2019). La cámara se programó a 90 voltios, durante 40 minutos. Finalmente, los resultados fueron visualizados y fotografiados en un foto documentador de la marca *Bio- imagin systems*.

## 2.4 Amplificación

Posterior al proceso de extracción de ADN, se amplificó la región cloroplástica *rpoCl* empleando la técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional mediante el kit *Phire Plant Direct PCR Master Mix* de Thermo Scientific (2019), para lo cual se preparó una solución con un volumen de 25  $\mu\text{L}$  que contiene: 12.5  $\mu\text{L}$  de *Phire Plant Direct PCR Master Mix 2X*, 1.25  $\mu\text{L}$  de *Disolution Buffer*, 0.5  $\mu\text{L}$  de primer forward *rpoCl* (GTGGATACACTTCTTGATAATGG) y 0.5  $\mu\text{L}$  de primer reverse *rpoCl* (TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC), finalmente se añade a la solución preparada 3 pedazos de hoja fresca de 0.5 mm de diámetro (ADN), 9.25  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, la solución se agita en un vórtex por 10 segundos y luego a centrifugación de 3.000 rpm por 15 segundos para homogenizar la mezcla; la master mix debe prepararse conservado la cadena de frío. Posteriormente, se la colocó en un termociclador *Labnet Multigene* con el programa de la tabla 2, referido por Iza (2018).

**Tabla 2.**

Programación de ciclos para PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
<b>Inicio de la Desnaturalización</b>	94	2 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94	30 s	35
<b>Alineamiento</b>	55.3	30s	
<b>Extensión</b>	72	40 s	
<b>Final de la Extensión</b>	72	5 min	1
<b>Enfriamiento</b>	4	-	-

Nota: Se presentan las condiciones necesarias para PCR en el termociclador *Labnet Multigene*.

Fuente: en base a Iza 2018.

Los resultados obtenidos de la amplificación en PCR se evaluaron por medio de electroforesis horizontal, método indicado en el numeral 2.3.

## **2.5 Secuenciación**

El proceso de secuenciación y purificación de los productos de PCR obtenidos fueron realizados por la empresa *Macrogen Inc* en Seoul- Corea mediante la técnica Sanger automatizada. Para preparar la muestra se llevó a una concentración de 20 ng/μL de ADN amplificado con la adición de agua libre de nucleasas en micro tubos de 1.5 mL a los cuales se los etiquetó de acuerdo al código asignado registrado en el libro de campo.

## **2.6 Filogenia**

Para comprobar la calidad de las secuencias obtenidas se evaluó mediante un análisis de electroferogramas en el programa *FinchTV* versión 1.4.0 ver Anexo 2, que permite la edición de las secuencias, obteniendo secuencias libres de ruido, posteriormente se alinearon los datos con la herramienta *MUSCLE*, a continuación, se elaboró un árbol filogenético mediante el método *Maximum likelihood* con 1.000 réplicas, programa disponible en el software *Mega 7*.

## **2.7 Georreferenciación**

Para realizar el análisis geográfico de los puntos registrados se utilizó el programa *DIVA GIS*, donde se ingresó la ubicación y distribución de las especies del género *Bomarea* mediante las coordenadas geográficas de colecta (WGS84), además se toma como referencia los datos de colecciones registradas en la base de datos Tropicos para estimar diversidad poblacional.

## **2.8 Análisis químico**

### **2.8.1 Preparación de extractos**

Para la elaboración de extractos se limpiaron las hojas colectadas, se las cortó en trozos pequeños y posteriormente se pesó 100 mg de droga que se colocó en un vaso de precipitación de 25 mL en el cual se añadió 10 mL de etanol al 50 %. A continuación, se sometió a 20 minutos de ultrasonido y se filtró con jeringa para obtener el extracto libre de impurezas, un protocolo basado en la metodología de Aldana y Guayasamín (2014).

Este procedimiento se realizó con el material vegetal colectado, de esta manera se realizaron 7 extractos para las pruebas posteriores.

### **2.8.2 Screening fitoquímico**

Este análisis se realizó para comprobar de manera cualitativa la presencia de compuestos de interés presentes en el material vegetal colectado, dentro de estas pruebas realizadas estuvieron fenoles, flavonoides y alcaloides. Cuando la reacción era positiva, se procedía a realizar su análisis cuantitativo.

#### **2.8.2.1 Fenoles**

Se empleó la reacción de Cloruro Férrico, una metodología adaptada de Ardoino y otros (2013) para lo cual, del extracto preparado previamente se tomó 1 mL depositándolo en un tubo de ensayo con capacidad de 10 mL y se agregaron 3 gotas de  $\text{FeCl}_3$  al 1 % acuoso; luego de unos minutos se observó la presencia de una coloración amarilla, verde grisácea o azul negro de acuerdo al grupo OH que presente cada extracto. Como control positivo se utilizó hojas de

alcachofa secas y maceradas con etanol al 96 % al cual se le aplicó el mismo tratamiento que a los extractos con  $\text{FeCl}_3$  al 1 %; como control negativo se utilizó agua destilada.

### **2.8.2.2 Flavonoides**

En este análisis se empleó la reacción de Shinoda donde se colocaron 0.5 mL de extracto elaborado en un tubo de ensayo con capacidad de 10 mL, posteriormente se agregó una granalla de zinc más 0.2 mL de ácido clorhídrico concentrado llevando a ultrasonido por 20 minutos para ayudar a disolver la granalla y finalmente se agregó 0.2 mL de alcohol amílico y finalmente 2 mL de agua destilada, se observó la aparición de coloración marrón, pardo rojiza o rosada en cada tubo (Ardoino *et al.*, 2013). Como control positivo se utilizó ralladura de manzana a la cual se le aplicó al mismo tratamiento que a los extractos vegetales, mientras que el control negativo usado fue agua destilada.

### **2.8.2.3 Alcaloides**

Para este procedimiento se preparó un reactivo de Mayer disolviendo 1.358 g de cloruro mercuríco en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua, se mezclan las dos soluciones preparadas y se aforan a 100 mL. Con el reactivo listo se tomó 1 mL de cada extracto vegetal y se colocaron en tubos de ensayo de 10 mL, donde se añadieron 5 gotas del reactivo de Mayer y se procedió a esperar la formación de un precipitado de color blanco en la base del tubo (Chávez & Gutiérrez, 2013).

## **2.9 Cuantificación de metabolitos secundarios**

La cuantificación de los metabolitos se realizó mediante espectrofotometría, siguiendo la metodología empleada en el estudio de Gracia (2015).

### **2.9.1 Cuantificación de fenoles totales**

#### **2.9.1.1 Preparación de la curva de calibración**

Para este procedimiento se empleó la metodología utilizada por Gracia (2015) donde a partir de una solución estándar compuesta de ácido gálico de 0.1 mg/mL, se tomaron diferentes volúmenes entre 0 a 160  $\mu$ L en intervalos de 20  $\mu$ L para cada uno completándose el volumen de cada vial empleado con 500  $\mu$ L de agua destilada.

#### **2.9.1.2 Procedimiento**

Se inició con 5 ml de extracto que se mezclaron con 1 mL de agua destilada, posteriormente se realizó una dilución 1:10, de la cual se tomaron 100  $\mu$ L para llevar a un aforo de 500  $\mu$ L con agua destilada; a continuación, se añadió 1.250  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 % a cada estándar preparado, así como a cada una de las muestras y se dejaron en reposo por 2 horas; transcurrido el tiempo estimado se midió la absorbancia tanto del blanco (alcohol, 96 %) como de los extractos a 765 nm en el espectrofotómetro *JASCO V-730*, y los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por g de extracto (Gracia, 2015).



## **2.9.2 Cuantificación de flavonoides totales**

### **2.9.2.1 Preparación de la curva de calibración**

Para preparar la curva de calibración es necesario emplear una solución estándar de quercetina de 0.1 mg/mL a partir de la cual se tomaron volúmenes entre 0  $\mu$ L a 100  $\mu$ L en un intervalo de 20  $\mu$ L cada uno colocándolos en viales ámbar de 10 mL para su análisis (Gracia, 2015).

### **2.9.2.2 Procedimiento**

Se tomaron 5 ml de extracto que se mezclaron con 1 mL de agua destilada, posteriormente se realizó una dilución 1:10, de la cual se tomaron 100  $\mu$ L para llevar a un aforo de 500  $\mu$ L con agua destilada; y después 75  $\mu$ L de NaNO<sub>2</sub> al 5 %, dejando reposar por 6 minutos, luego, se colocaron 500  $\mu$ L de NaOH 1M y se completó el volumen de cada vial a 2.5 mL con agua destilada; finalmente, se agitaron las muestras a 80 rpm por un tiempo de 30 minutos luego del cual se midió su absorbancia a 415 nm en el espectrofotómetro *JASCO V-730*, expresándose los resultados en mg de quercetina por gramo de extracto (Gracia, 2015).

## **2.9.3 Evaluación de la actividad antioxidante**

### **2.9.3.1 Preparación de la solución DPPH**

Para este análisis se utilizó la técnica empleada por Mencias y Salazar (2018) donde se pesaron 19.70 mg de reactivo DPPH y se disolvieron con 200 mL de alcohol potable al 96 %, aforando la solución a 500 mL, posteriormente se la almacenó en un frasco ámbar envuelto en papel

aluminio para evitar su degradación por presencia de la luz y se la conserva en refrigeración hasta ser empleada en el ensayo.

### **2.9.3.2 Curva estándar de vitamina C**

Se preparó un estándar siguiendo la metodología de Mencias y Salazar (2018) disolviendo 20 mg de ácido ascórbico en 100 mL de agua ultra pura, a partir de esta se realizaron las siguientes diluciones:

100  $\mu$ L de vitamina C + 0  $\mu$ L de agua pura

80  $\mu$ L de vitamina C + 20  $\mu$ L de agua pura

60  $\mu$ L de vitamina C + 40  $\mu$ L de agua pura

40  $\mu$ L de vitamina C + 60  $\mu$ L de agua pura

20  $\mu$ L de vitamina C + 80  $\mu$ L de agua pura

0  $\mu$ L de vitamina C + 100  $\mu$ L de agua pura

Posteriormente las diluciones preparadas fueron depositadas en viales ámbar de 10 mL y a cada una se le añadió 2.9 mL de la solución DPPH previamente preparada, se realizó una agitación rápida y se las almacenó en oscuridad por 30 minutos. Finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro *JASCO V-730* con una longitud de onda de 517 nm, siguiendo el procedimiento de Mencias y Salazar (2018) donde se colocaron las muestras en celdas plásticas con capacidad de 3 mL, este proceso se realiza por triplicado.

### **2.9.3.3 Preparación de muestras para análisis en el espectrofotómetro**

Se emplearon los extractos elaborados en el punto 2.8.1 y se realizaron una serie de diluciones que se muestran a continuación:

10  $\mu\text{L}$  de extracto + 90  $\mu\text{L}$  de etanol 96 %

50  $\mu\text{L}$  de extracto + 50  $\mu\text{L}$  de etanol 96 %

80  $\mu\text{L}$  de extracto + 20  $\mu\text{L}$  de etanol 96 %

100  $\mu\text{L}$  de etanol 96 % + 2.9 mL DPPH

Para analizar las soluciones preparadas se siguió el mismo procedimiento empleado por Mencias y Salazar (2018) utilizado para vitamina C en el equipo *JASCO V-730* a 517 nm.

## Capítulo 3

### Resultados y discusión

#### 3.1 Colección de muestras

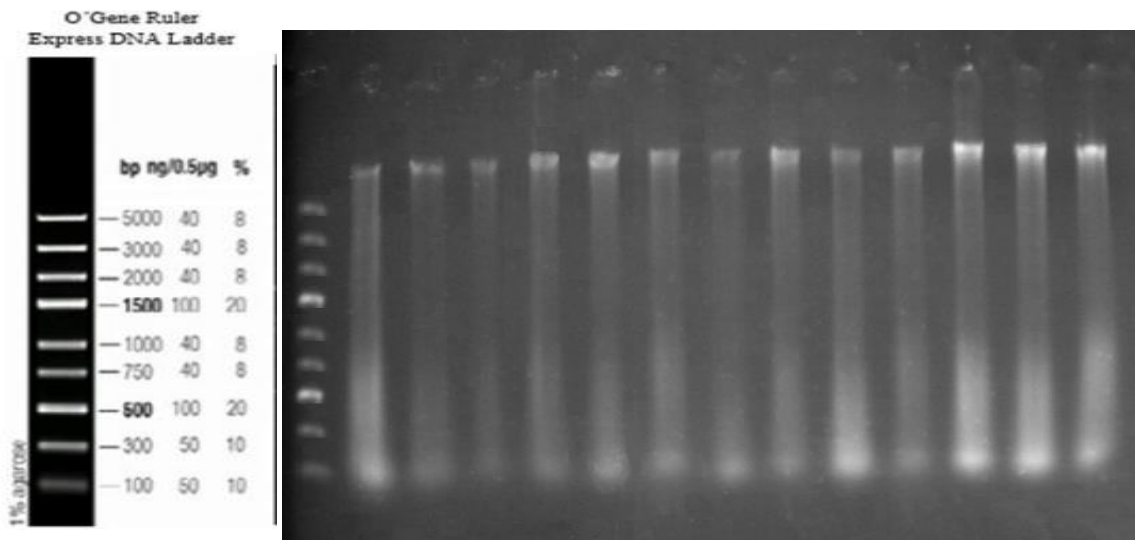
Se obtuvo una colección de 41 muestras de tejido foliar de plantas del género *Bomarea* en diversas localidades ubicadas en el norte de los Andes del Ecuador, este procedimiento se lo realizó sin provocar daños físicos que comprometan el estado natural de las especies, véase Anexo 1.

#### 3.2 Estudio Molecular

De las muestras obtenidas se realizó la extracción de ADN con el método modificado Doyle & Doyle 1987, para conocer el peso del material genético se lo evaluó mediante Electroforesis en gel de agarosa 1 % que fue revelado en un foto documentador (Figura 5.). De esta manera se obtuvieron bandas diferenciadas de ADN con un peso molecular de 5.000 pb, este resultado es similar al estudio de Montalvo y Vargas (2019) “Revisión de las especies Latinoamericanas de orquídeas del género *Dracula* mediante la técnica molecular BARCODE” donde se reportan los mismos valores.

## Gel electroforético con productos de extracción de ADN

MM 4115 4116 4117 4118 4119 4120 4121 4122 4123 4124 4125 4126 4127



**Figura 8.** Gel de agarosa 1 % con resultados de la extracción de ADN del género *Bomarea*.

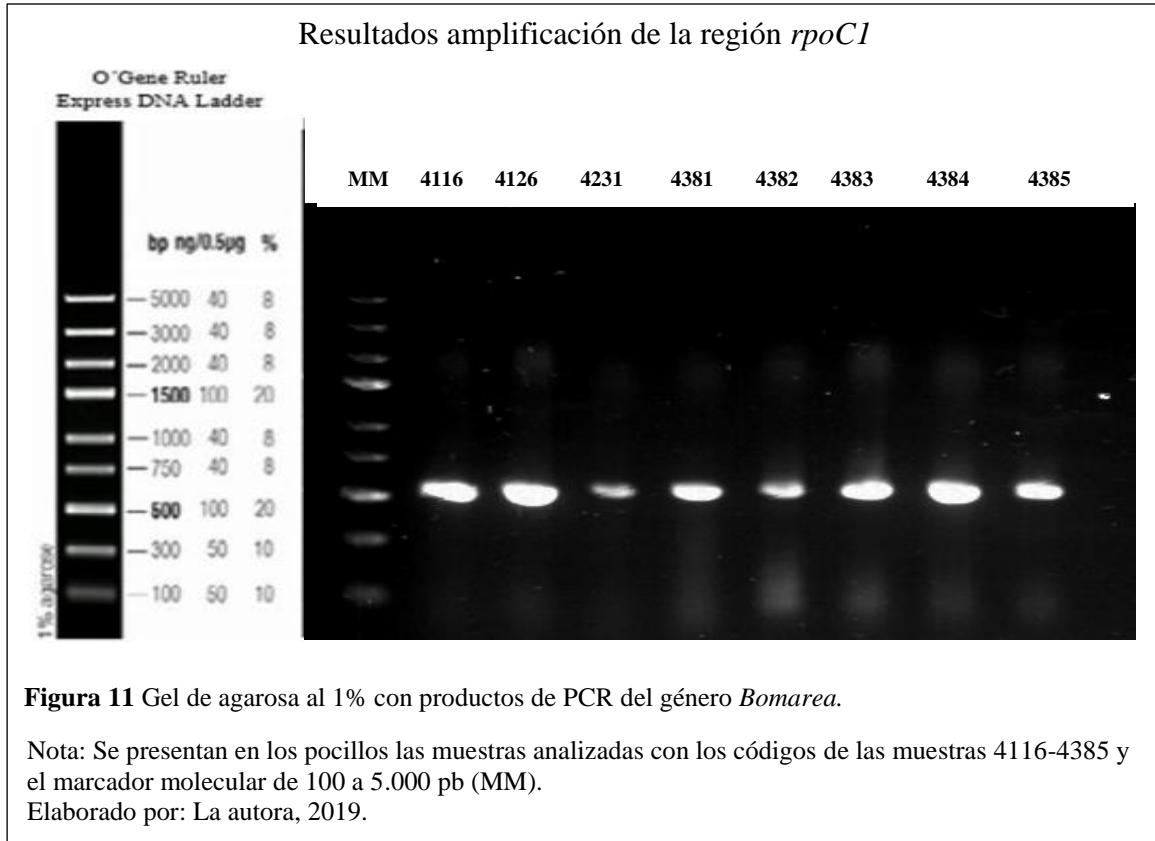
Nota: Se presentan en los pocillos las muestras analizadas con los códigos 4115-4127 y el marcador molecular de 100 a 5.000 pb (MM).

Elaborado por: La autora, 2019.

### 3.2.1 Amplificación región *rpoC1*

De las 41 muestras colectadas, se estudió la región cloroplástica *rpoC1* que ha sido utilizada en estudios de poblaciones, como resultado se obtuvo un peso de 520 pb para este gen como se presenta en la Electroforesis de la Figura 6; resultados similares a los de P. Lee, Costumbrado, Hsu, y Kim (2012) quienes encontraron valores entre 500 a 600 pb. En cuanto a la temperatura de hibridación empleada en la PCR de la región *rpoC1* se obtuvieron buenos resultados con 55.3 °C, misma que fue modificada del estudio de Vindas y otros (2011), donde se utilizó 48 °C; lo cual indica que pese a la diferencia de temperatura se obtuvieron buenas bandas durante la amplificación. Por otro lado, Han, Kwon, Kang, Jeon, y Jang (2013) en su análisis identificación y análisis del gen cloroplástico diferencial *rpoC1* en ginseng utilizaron una

temperatura de hibridación de 56 °C con resultados favorables, lo cual demuestra que el rango de temperatura de amplificación para este marcador está dentro de lo aceptable.



### 3.2.2 Secuenciación

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y secuenciados con el método Sanger en la empresa Macrogen (Seoul-Corea), para la región *rpoC1* se enviaron 41 muestras, obteniéndose 41 secuencias de buena calidad, para el análisis posterior de los electroferogramas de ADN en el programa *FinchTV*.

### **3.2.3 Análisis de secuencias**

En la base de datos *GenBank* solo se encuentran registradas las secuencias de 2 especies del género *Bomarea* con el marcador *rpoC1*, una de ellas no verificada aún, es por ello que no se pudo hacer un estudio comparativo.

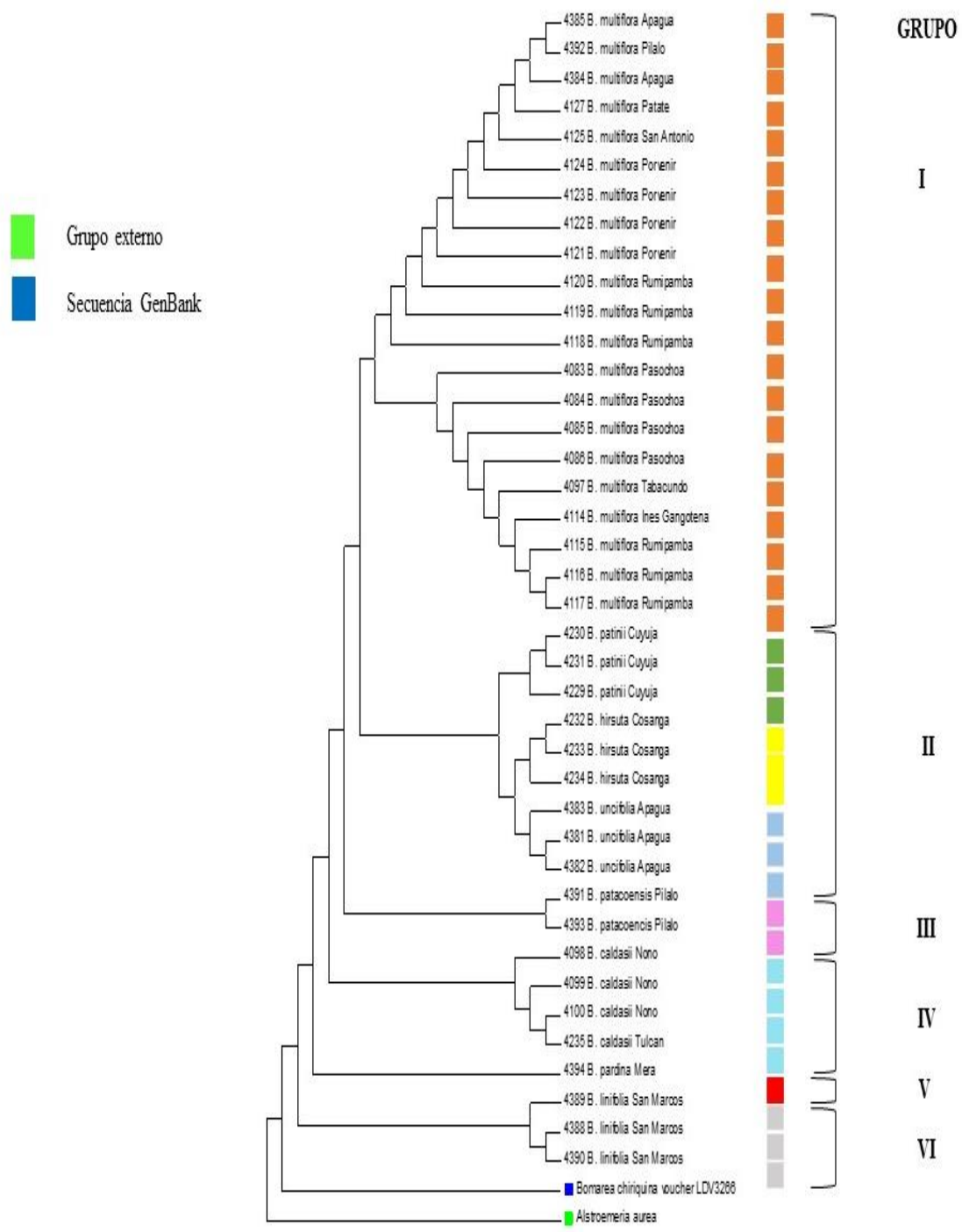
### **3.2.4 Análisis morfológico**

Para comparar la morfología de las muestras colectadas, se realizó una identificación con muestras almacenadas en el Herbario Nacional del Ecuador (Anexo 3), así como también se tomó como referencia el libro “El género *Bomarea* (Alstroemeriaceae) en la Flora de Colombia” de Alzate (2016).

### **3.2.5 Filogenia**

Luego de haber procedido con la identificación morfológica, se realizó el alineamiento de las 41 secuencias obtenidas del secuenciamiento Sanger, utilizando el programa *MEGA 7.0* (Anexo 4) y posteriormente se realizó la construcción del árbol filogenético mediante el método de estimación *Maximum Likelihood* basado en el modelo *Tamura-Nei* (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016), cuyos resultados se pueden observar en la Figura 7, donde se aprecia la formación de 6 clados a nivel de especie.

### Árbol filogenético de las especies del género *Bomarea* con la región *rpoC1*



**Figura 14.** Relaciones filogenéticas en las especies del género *Bomarea*, con la región *rpoC1*.

Nota: Construcción del árbol filogenético de *Bomarea* utilizando el programa *Mega 7.0* mediante el método de estimación *Maximum Likelihood* mediante el modelo *Tamura-Nei*. Se detalla la formación de grupos distribuidos de la siguiente manera: ■ *Bomarea multiflora*, ■ *Bomarea patinii*, ■ *Bomarea hirsuta*, ■ *Bomarea uncifolia*, ■ *Bomarea patacoensis*, ■ *Bomarea caldasii*, ■ *Bomarea pardina*, ■ *Bomarea linifolia*. ■ *Bomarea chiriquina* (Secuencia tomada de GenBank), ■ *Alstroemeria aurea* (Grupo externo).

Fuente: (Kumar *et al.*, 2016), modificado por la autora, 2019.



**GRUPO I:** Dentro de este grupo se encuentra *Bomarea multiflora* (L.f.) Mirb, especie que presenta tallos brillantes, con una forma ligeramente pendular en el ápice, hojas ovadas, pubescentes con base redondeada, una inflorescencia en cima de apariencia umbeliforme característica, flores con tépalos externos rojo-amarillos e internos amarillos con manchas marrón, descripción que concuerda con la de Alzate (2016).

En cuanto a su distribución geográfica, se la localizó entre 1.200 y 4.000 m.s.n.m en las provincias de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua; aunque también existen registros en la base de datos Tropicos (2019) a lo largo del callejón interandino ecuatoriano desde Carchi hasta Azuay y en la región Oriental entre 2.350 y 4.000 m.s.n.m en Napo y Morona Santiago, datos similares con la descripción de Alzate (2016) quien reporta especies en los bosques que comprenden altitudes entre 1.700 y 3.800 m.s.n.m del territorio colombiano, entre las cordilleras Central, Occidental y Oriental, y en la Sierra Nevada de Santa Marta, *Bomarea multiflora* se ubica en el primer clado, muy cercana a *B. patinii*, esto debido a que ambas desarrollan inflorescencias con cima umbeliforme con tépalos de tamaño subigual; sin embargo, *B. multiflora* se diferencia por presentar segmentos periantales de tamaño marcadamente diferente, motivo por el cual no se agrupan dentro del mismo grupo.

**GRUPO II:** *Bomarea patinii* Baker se presenta como una especie con tallos gruesos pubescentes, de color púrpura dando la apariencia de un estado oxidado, sus hojas son pubescentes en el envés, con forma ovada a ovado-lanceolada, su inflorescencia encima umbeliforme y racemosa, sus flores con tépalos externos elípticos, rojos, con tépalos internos rojos-amarillos con manchas moradas internamente; *Bomarea hirsuta* (Kunth) Herb presenta tallos puberulentos con una ligera inclinación dando una apariencia pendular, hojas ovaladas lanceoladas con pubescencia en el envés, su inflorescencia es una cima umbeliforme con flores que tienen tépalos externos rojos y los internos rojos e internamente amarillos con puntos morados y bordes púrpura, características que coinciden con las descritas por Alzate (2016).

Estas especies fueron colectadas a una altura 2.500 m.s.n.m, datos que se encuentran dentro de la zona mencionada por la base de datos Tropicos (2019) donde se las registra entre los 1.500 y 3.700 m.s.n.m en las estribaciones del callejón interandino en Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Pichincha, Napo y Sucumbíos.

*Bomarea uncifolia* Herb se ubica como la última especie que se une en este clado, presenta tallos ascendentes, con hojas resupinadas ovaladas, su inflorescencia es una cima umbeliforme con flores que tienen tépalos externos rosados y los internos verdes notorios y de una longitud mayor que los anteriores, estos datos fueron corroborados con las muestras de los archivos del Herbario Nacional del Ecuador. Esta especie fue colectada en la localidad de Apagua en la provincia de Cotopaxi a los 3.400 m.s.n.m, sin embargo también existen registros dentro del bosque andino alto, páramo arbustivo y de pajonal entre 2.500 y 4.000 m.s.n.m en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Chimborazo, Cotopaxi, Loja y Morona Santiago bajo la categoría Casi amenaza de acuerdo a la UICN (León-Yáñez *et al.*, 2012). Su agrupación dentro de este clado se da debido a que presenta segmentos en el perianto floral similar a las anteriores.

**GRUPO III:** *Bomarea patacocensis* Herb es una hierba con tallo rastrero, delgado con pubescencia corta y ligeramente pendular, sus hojas son resupinadas, presenta una inflorescencia en cima umbeliforme de margen entero; las flores son segmentadas de manera longitudinal, de diferente tamaño con tépalos externos ovalados rojos con manchas pardas y tépalos internos cortamente doblados en el ápice, de color rojo anaranjados con manchas pardas. Dentro de este estudio se localizó a esta especie en Cotopaxi a 3.411 m.s.n.m, León-Yáñez y otros (2012) mencionan que se distribuye en el bosque alto andino entre los 2.400 y 3.300 m.s.n.m en las provincias de Bolívar, Cotopaxi, Imbabura, Napo y Pichincha en la cordillera Occidental de la serranía ecuatoriana, la especie se encuentra en la categoría Vulnerable de acuerdo a la UICN, por otro lado, Alzate (2016), registra la especie en altitudes entre 1.000 y 2.500 m.s.n.m en el departamento de Nariño, Colombia.

**GRUPO IV:** *Bomarea caldasii* (Kunth) Herb. se encuentra en este grupo cercana a *Bomarea patacocensis* ya que presenta gran similitud, siendo una especie con tallos rastreros, pubescentes con ligera pigmentación púrpura, sus hojas son resupinadas ovaladas muy delgadas de textura granular en el haz y con decoloración en el envés, tiene una inflorescencia en umbela con brácteas pecioladas ligeramente purpúreos ovados, tépalos externos color rojo en la base y naranja en el ápice, los tépalos internos son amarillos con manchas marrones, descripción similar a la corroborada con la colección del Herbario Nacional del Ecuador, en esta investigación se la colectó a 2.700 m.s.n.m en la parroquia de Nono perteneciente a la provincia de Pichincha, aunque también existen registros entre 2.000 y 3.600 m.s.n.m en las provincias de Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua según la base de datos Tropicós (2019).

**GRUPO V:** *Bomarea pardina* Herb se presenta en un clado diferente por presentar tallos rastreros, con ligera pubescencia; hojas resupinadas lanceoladas, laminadas con nervios prominentes en el envés, su inflorescencia es umbeliforme con brácteas pecioladas, sus flores presentan tépalos externos de color rosado oscuros con líneas paralelas marrón, los tépalos internos presentan un color blanco característico con manchas pardas, descripción botánica que coincide en gran similitud con las de Alzate (2016). La muestra se la colectó en el cantón Mera de la provincia de Pastaza a una altura de 1.120 m.s.n.m, según los registros de Tropicós (2019), se la puede localizar entre 1.100 y 2.250 m.s.n.m dentro de las provincias Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Morona Santiago, Napo y Pastaza. Dentro del territorio colombiano, esta especie es poco abundante como lo menciona Alzate (2016), se la puede localizar en la parte sur de las cordilleras Central y vertiente de la cordillera Oriental andina, en altitudes entre 1.200 y 3.400 m.s.n.m.

**GRUPO VI:** *Bomarea linifolia* (Kunth) Baker se encuentra en el último clado debido a que su morfología característica la distingue del resto de especies estudiadas por presentar un tallo

erecto, hojas resupinadas, lineares, reticuladas en el envés y un ápice obtuso; una inflorescencia en cima umbeliforme, flores segmentadas de igual tamaño con tépalos externos amarillos con bandas rojas, tépalos internos rojo-anaranjados, descripción corroborada con la mencionada por Alzate (2016), en este estudio se registró la muestra colectada a 3.400 m.s.n.m, en la localidad Laguna de San Marcos en la provincia de Pichincha, León-Yáñez y otros (2012) la ubican desde el bosque andino bajo hasta el páramo arbustivo entre 1.500 y 3.500 m.s.n.m en las provincias de Azuay, Carchi, Imbabura, Napo y Pichincha. Su diversidad es más escasa en comparación al resto de especies, principalmente porque se encuentra en categoría en Peligro de extinción de acuerdo a la UICN, información que difiere con la de Alzate (2016), quien por el contrario menciona que esta especie presenta un distribución muy amplia en Colombia en las cordilleras Central, Occidental, Oriental tanto en la vertiente occidental como en la oriental y en la Sierra Nevada de Santa Marta, en altitudes entre 2.200 y 4.000 m.s.n.m en zonas abiertas, principalmente en páramos, donde crece en forma abundante.

*Bomarea chiriquina*, especie cuya secuencia fue ingresada desde la base de datos *GenBank*, un bejuco herbáceo o leñoso, que se encuentra dentro del árbol filogenético como parte de los géneros que conforman la familia *Alstroemeriaceae*, sin embargo, no se agrupa con ninguna de las especies estudiadas ya que se desarrolla en una altitud cercana entre 1.300 y 2.100 m.s.n.m, siendo endémica de Costa Rica y Panamá, únicos lugares de colecta reportados en Tropicós (2019).

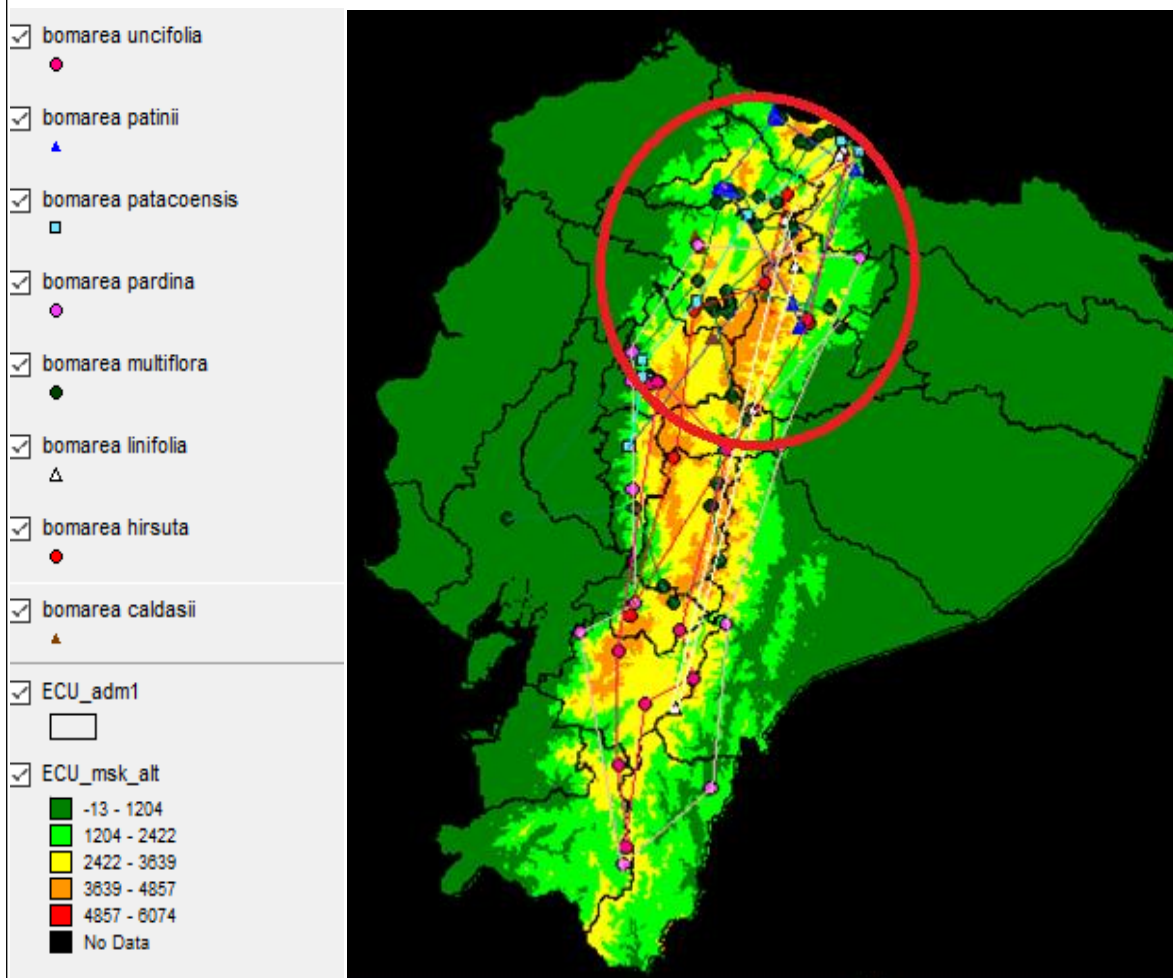
Se utilizó como grupo externo para verificar el correcto alineamiento a *Alstroemeria aurea*, secuencia de *GenBank* con genoma completo de donde fue recortada la región *ropC1* para poder realizar el respectivo análisis.

### 3.2.6 Georeferenciación

La distribución geográfica de las especies colectadas del género *Bomarea* fue estudiada mediante el uso del software *DIVA GIS*, donde se ingresaron tanto las coordenadas geográficas de colecta del presente estudio como las obtenidas en Tropicos (2019). Como resultado se obtuvo la distribución de las ocho especies en un mapa físico del Ecuador (Figura 8), de esta manera se pueden relacionar los puntos de ubicación con los resultados obtenidos en el estudio molecular.

Las especies de este género se hallan distribuidas a lo largo del callejón interandino de la región Sierra del Ecuador entre la cordillera Occidental dentro de las principales elevaciones del volcán Chimborazo Guagua Pichincha, Atacazo, Corazón y los Ilinizas, también existen registros en la cordillera Oriental en el Cotopaxi, Cayambe, Antisana, Tungurahua, Altar y Sangay; su mayor distribución se da en la zona norte y centro del país, lugar preferente por estas especies.

### Distribución geográfica del género *Bomarea*



**Figura 15.** Puntos de ubicación geográfica de las especies de *Bomarea* en Ecuador.

**Nota:** Los puntos de ubicación geográfica geográficos se obtuvieron de la página web Tropicos, 2019. Se representa la mayor zona de distribución geográfica de *Bomarea* dentro de la circunferencia de color rojo.

Elaborado por: La autora, 2019 mediante *DIVA GIS*.

### 3.3 Estudio fitoquímico

Mediante el estudio cualitativo de metabolitos secundarios, se obtuvo la presencia de fenoles y flavonoides en las muestras analizadas.

### 3.3.1 Resultados del screening fitoquímico

Al emplear la reacción de cloruro férrico en el screening de compuestos fenólicos, se obtuvieron resultados positivos en todos los extractos analizados que se pudieron evidenciar por un cambio en su coloración (Anexo 6). En los extractos de *Bomarea multiflora*, *Bomarea patinii* y *Bomarea pardina* se presentó una coloración verde grisácea lo cual indica la presencia de un grupo 2 –OH, mientras que en los extractos de *Bomarea uncifolia*, *Bomarea caldasii*, *Bomarea patacocensis* y *Bomarea linifolia* presentaron una coloración amarilla, lo cual indica la presencia de un grupo 1 –OH (Ardoino *et al.*, 2013).

Para la determinación cualitativa de flavonoides mediante el empleo de la reacción de Shinoda se evidenció la aparición de una coloración rosada tenue únicamente en los extractos de *Bomarea multiflora*, *Bomarea patinii*, *Bomarea uncifolia* y *Bomarea caldasii* como se puede observar en el Anexo 7, lo cual concuerda con lo descrito por Ardoino y otros (2013), quien menciona que la escala colorimétrica para los grupos de flavonoides se presenta desde una coloración marrón, pardo rojiza o rosada tenue a rojo oscuro hasta púrpura en la fase orgánica. Con el reactivo de Mayer empleado para la determinación cualitativa de alcaloides, se reportaron resultados negativos en todos los extractos utilizados para el ensayo, ya que como lo menciona Chávez y Gutiérrez (2013), cuando la reacción es positiva se da la presencia de un precipitado blanco en la base del tubo de ensayo, lo cual no se pudo evidenciar en los extractos empleados en esta prueba.

En el Anexo 8 se resume el resultado del screening fitoquímico de fenoles, flavonoides y alcaloides empleados en extractos etanólicos de *Bomarea*.

### 3.3.2 Resultados de la cuantificación de fenoles y flavonoides

En el análisis espectrofotométrico de fenoles totales se obtuvieron los resultados presentes en la Tabla 3, el extracto de la especie que presentó mayor actividad fue el de *Bomarea linifolia* que presenta 3.729 mg GAE/g de droga, por el contrario, *Bomarea patacocensis* presentó la menor actividad de fenoles (0.99906 mg GAE/g de droga), estos resultados se los puede comparar con los Alzate y otros (2011) donde *B. glaucescens*, presentó un contenido de fenoles de 97.89 GAE / mg en extractos de tallo.

**Tabla 3.**

Resultados obtenidos de la cuantificación de fenoles totales

<b>Muestra</b>	<b>Promedio de absorbancia a 765 nm</b>	<b>mg GAE/g droga</b>
<i>Bomarea linifolia</i>	0.3161	3.7290
<i>Bomarea uncifolia</i>	0.1617	1.7984
<i>Bomarea multiflora</i>	0.1450	1.5903
<i>Bomarea patinii</i>	0.1298	1.4003
<i>Bomarea caldasii</i>	0.1160	1.2272
<i>Bomarea pardina</i>	0.1027	1.0616
<i>Bomarea patacocensis</i>	0.0977	0.9991

Nota: En la siguiente tabla se presentan los resultados de la cuantificación de fenoles en extractos de *Bomarea* con una concentración en mg GAE/g a una absorbancia promedio a 765nm.

Elaborado por: La autora, 2019

Para la cuantificación de flavonoides se obtuvo como resultado que el extracto con mayor contenido presente de flavonoides es *Bomarea uncifolia* con 0.7226 mg QE/g de droga; por el contrario, *Bomarea patinii* registró el menor contenido de todas las especies analizadas con 0.2771 mg QE/ g de droga, en la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos por especie.



**Tabla 4.**

Resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides

<b>Muestra</b>	<b>Promedio de absorbancia a 415 nm</b>	<b>mg QE/g droga</b>
<i>Bomarea uncifolia</i>	0.3027	0.7226
<i>Bomarea patacocensis</i>	0.2768	0.6576
<i>Bomarea linifolia</i>	0.2438	0.5751
<i>Bomarea multiflora</i>	0.2052	0.4788
<i>Bomarea caldasii</i>	0.1922	0.4461
<i>Bomarea pardina</i>	0.1820	0.4207
<i>Bomarea patinii</i>	0.1246	0.2771

Nota: En la siguiente tabla se presentan los resultados de la cuantificación de flavonoides en extractos de *Bomarea* con una concentración en mg GAE/ g de droga a una absorbancia de 415nm.

Elaborado por: La autora, 2019.

### 3.3.3 Resultados de la actividad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos de las especies de *Bomarea* con 4 repeticiones cada una, calculando el porcentaje de inhibición del radical DPPH, los resultados presentados en el Anexo 8 muestran que las especies analizadas que tienen capacidad antioxidante significativa son *Bomarea linifolia* y *Bomarea uncifolia* con 80.55 % y 57.99 % respectivamente, logrando sobrepasar el 50 % en comparación al estudio de Mencias y Salazar (2018) donde no se reporta actividad antioxidante significativa en el extracto del género *Caucaea* sin lograr sobrepasar el 50 % de inhibición.

En la determinación de la actividad antioxidante, el extracto que presentó mejores resultados para eliminar radicales libres (IC50) fue *Bomarea linifolia* con un valor de 251.363 µg/mL (ver Tabla 5), lo que concuerda con lo mencionado por Abad y Cabezas (2014) quienes describen

que mientras más bajo sea el IC50 de un extracto y entre más cercano se encuentre al control positivo, mayor es su actividad antioxidante.

En comparación con el estudio de Alzate y otros (2011) donde se estudiaron 11 extractos de *Bomarea*, y *B. glaucescens*, presentó el mejor resultado con CE50 = 39.0 µg/mL, esta diferencia se debe al material vegetal de partida; en el primer estudio se utilizaron hojas, mientras que en el segundo estudio se utilizaron tallos, lo que varía el contenido de fenoles reportándose diferencias significativas entre estos órganos vegetales ya que como lo menciona Espinosa-Leal y otros (2015), la mayor capacidad antioxidante de extractos etanólicos en tallo es muy superior a la de hojas.

Los resultados de la actividad IC50 en los extractos de *Bomarea* se presentan a continuación en la Tabla 5 y en la figura 9.

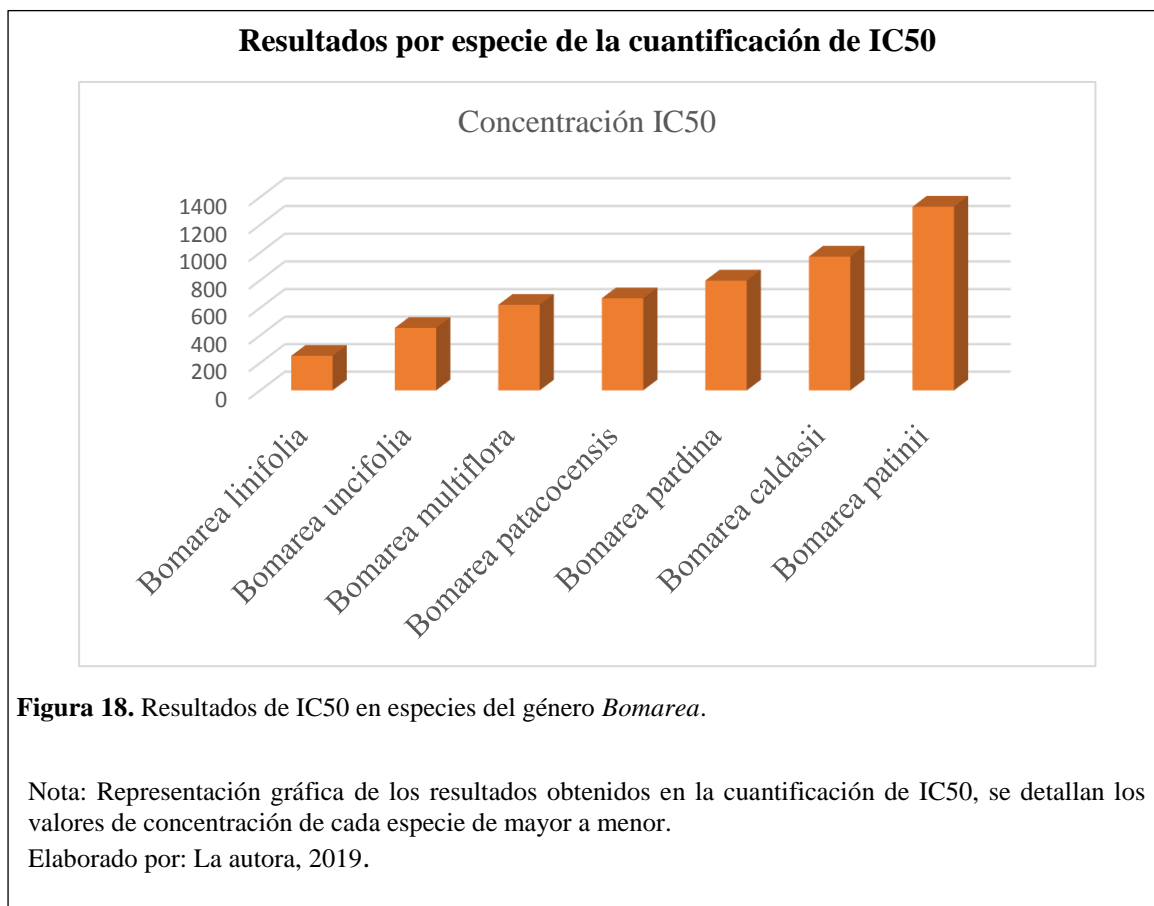
**Tabla 5.**

Resultados IC50 en extractos de *Bomarea*.

Muestra	IC 50 µg/mL
Ácido ascórbico	17.9562
<i>Bomarea linifolia</i>	251.3630
<i>Bomarea uncifolia</i>	454.2123
<i>Bomarea multiflora</i>	622.3832
<i>Bomarea patacocensis</i>	669.6147
<i>Bomarea pardina</i>	797.7355
<i>Bomarea caldasii</i>	970.8560
<i>Bomarea patinii</i>	1330.4945

Nota: Se presentan los resultados del cálculo de IC50 en extractos del género *Bomarea* con ácido ascórbico como control.

Elaborado por: La autora, 2019.



Para comprobar la efectividad entre los extractos de *Bomarea* se realizó un Análisis de Varianza del cual se obtuvo un p valor de 0.0043 altamente significativo por lo cual posteriormente se realizó la prueba de Tukey obteniéndose como resultado la formación de 3 grupos diferenciados; en el primero se encontró *Bomarea linifolia* (A), el segundo conformado por *Bomarea uncifolia*, *bomarea multiflora* y *Bomarea pardina* (A B), mientras que en el grupo final se ubicaron *Bomarea patacocensis*, *Bomarea caldasii* y *Bomarea patinii* (B), demostrando así que las especies de los primeros grupos presentan mayor capacidad antioxidante a diferencia de las últimas debido a un valor más pequeño de la media, *Bomarea linifolia* es la especie que registró la mayor capacidad antioxidante ubicándose en un grupo diferenciado con una media de 252.12, comprobando los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad antioxidante (ver Anexo 10).

## Conclusiones

Se obtuvieron 41 secuencias de ADN producto de la secuenciación de Sanger con la región cloroplástica *rpoC1* y con la construcción filogenética se formaron 6 clados diferenciados entre las especies estudiadas: 1 *Bomarea multiflora*, 2 *Bomarea patinii*, *Bomarea hirsuta* y *Bomarea uncifolia*, 3 *Bomarea patacoensis*, 4 *Bomarea caldasii*, 5 *Bomarea pardina* y 6 *Bomarea linifolia*.

El género *Bomarea* se distribuye a través del callejón interandino, sin embargo, la mayor diversidad se presenta en la zona centro-norte del Ecuador en las estribaciones de las cordilleras Oriental y Occidental, siendo *Bomarea multiflora*, la especie con mayor distribución geográfica dentro del territorio ecuatoriano.

Entre los extractos analizados, *Bomarea linifolia* presentó la mayor cantidad de fenoles totales con 3.729 mg GAE/g de droga, así como también tiene la mayor capacidad antioxidante en la reducción de radicales DPPH con un IC 50 de 251.363  $\mu\text{g/mL}$ , resultados que fueron comprobados por medio de un Análisis de Varianza que estableció alta significancia y mediante la prueba de Tukey que la separó como un grupo diferenciado del resto de especies.

## Recomendaciones

Dentro de los métodos para la extracción de ADN, en hojas jóvenes se recomienda usar el método de Doyle y Doyle modificado, combinado con el uso previo de sustancias que eviten la oxidación de la muestra vegetal como el *B-mercaptoetanol* antes del proceso de ruptura de la membrana celular y así evitar la degradación del material genético, también se puede emplear la combinación de 2 o más pares de primers para amplificar regiones que permitan poder realizar la comparación de árboles filogenéticos y así tener una separación más clara entre especies.

Se recomienda aplicar estudios de actividad sobre células tumorales con la especie *Bomarea linifolia* ya que presentó la mejor capacidad antioxidante entre los extractos evaluados.

Las especies estudiadas: *Bomarea patacocensis* Herb, *Bomarea uncifolia* Herb y *Bomarea linifolia* (Kunth) Baker se encuentran bajo las categorías de Amenaza o Peligro de extinción de acuerdo a la UICN, por lo cual se debe considerar la realización de estudios de conservación para evitar la pérdida de diversidad genética dentro de las zonas estudiadas.

## Bibliografía

- Aagesen, L., & Sanso, A. (2003). The phylogeny of the Alstroemiaceae, based on morphology, rps16 intron, and rbcL sequence data. *Systematic Botany*, 28(1), 47–69. <https://doi.org/10.1043/0363-6445-28.1.47>
- Aldana, C., & Guayasamín, L. (2014). *Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos (Alcohólico y acuoso) de las hojas de Ficus Citrifolia y caracterización química de los polifenoles*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Alfonso, Y., Noriega, C., Isidró, M., Andraca, L., Alfonso, D., & Rodríguez, D. (2016). Optimización de los protocolos de extracción de ADN y del marcador molecular tipo RAPD en Anonaceas. *Cultivos Tropicales*, 37(especial), 91–98. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3356.1207>
- Alzate, F. (2016). *El género Bomarea (Alstroemiaceae) en la Flora de Colombia*. (F. y N. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Ed.). Bogotá: Gente Nueva.
- Alzate, F., Gil, J., Jiménez, N., Arango, G., & Weniger, B. (2011). Antioxidant potential of some species of the genus bomarea (Alstroemiaceae). *Vitae*, 18(2), 201–207.
- Alzate, F., Mort, M., & Ramirez, M. (2008). Phylogenetic analyses of Bomarea (Alstroemiaceae) based on combined analyses of nrDNA ITS, psbA-trnH, rpoB-trnC and matK sequences. *Taxon*, 57(3), 853–862. <https://doi.org/10.1002/tax.573014>
- Applied Biosystems. (2009). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. Molecular Probes. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/brands/applied-biosystems.html>
- Ardoino, S., Boeris, M., & Toso, R. (2013). Caracterización fitoquímica de Prosopis flexuosa var. flexuosa (algarrobo) y Prosopis flexuosa var. depressa (alpataco), plantas con acción farmacológica. *Revista Ciencias Veterinarias*, 15, 115–125.

- Armen, T., Cronquist, A., & Zimmermann, W. (1965). International Association for Plant Taxonomy. *Taxon*, *14*(9), 303–306. <https://doi.org/10.1002/j.1996-8175.1965.tb01964.x>
- Arnelas, I., Invernón, V., De la estrella, M., López, E., & Devesa, J. (2012). Manual de laboratorio de Botánica . El herbario . Recolección , procesamiento e identificación de plantas vasculares. *Reduca (Biología). Serie Botánica*, *5*(2), 15–24.
- Augustin, J., Kuzina, V., Andersen, S., & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, *72*(6), 435–457. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, *17*(2), 221–241.
- Beyer, H., & Wlter, W. (1987). *Manual de química orgánica*. Barcelona: Reverté.
- Bolaños, M. (2017). *Escuela Superior Politécnica De Chimborazo*. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/6541>
- Bussmann, R., & Sharon, D. (2006). Traditional medicinal plant use in Northern Peru: Tracking two thousand years of healing culture. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *2*, 60–70. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-47>
- Chávez, L., & Gutiérrez, D. (2013). *Estudio fitoquímico y evaluación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de Tanacetum vulgareL., 'Palma real.'* <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Cueva, E. (2012). Tropicos | Image -. Retrieved November 10, 2019, from <http://www.tropicos.org/Image/100367186>
- Dash, P. (2016). *Phytochemical Screening and Pharmacological Investigations on Hedychium coronarium*. Hamburg: Anchor Academic Publishing.
- Escobar, E. (2018). *Identificación molecular de las especies del género Brugmansia (Solanaceae), presentes en la zona norte de los Andes del Ecuador. Tesis*. Retrieved

from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

- Espinosa-Leal, C., Treviño-Neávez, J., Garza-Padrón, R., Verde-Star, M., Rivas-Morales, C., & Morales-Rubio, M. (2015). Contenido de fenoles totales y actividad anti-radical de extractos metanólicos de la planta silvestre y cultivada in vitro de *Leucophyllum frutescens*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(3), 52–56.
- Estrada, J. (2015). Sinopsis taxonómica de *Bomarea Mirb.* subgenero *Bomarea* (Alstroemeriaceae) para Venezuela. *Fac. Ciencias, ULA.*, 52(January 2001), 12–30.
- Freire, A. (2016). Texto del libro “botanica sistematica ecuatoriana.” In *Botánica sistematica ecuatoriana* (Vol. 2004, pp. 1–131).
- Gallego, A., Garcinuño, M., & Morcillo, M. (2013). *Experimentación en química analítica*. Madrid: UNED.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gracia, M. (2015). *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Halliday, A. (2015). Boletín de la Sociedad Entomológica Argentina Boletín de la Sociedad Entomológica Argentina, 26(2), 24–27.
- Han, Y., Kwon, K., Kang, W., Jeon, E., & Jang, J. (2013). Identification and Analysis of the Novel pGAPDH-w Gene Differentially Expressed in Wild Ginseng. *Journal of Pharmacopuncture*, 16(1), 30–36. <https://doi.org/10.3831/kpi.2013.16.002>
- Haston, E., Richardson, J., Stevens, P., Chase, M., & Harris, D. (2009). The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: A linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 128–131. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.01000.x>
- Herrera, J. (2010). *Optimización de protocolos para la extracción de ADN y uso del*



*marcador SCAR ISPJ1 en Piñón (Jatropha curcas L.).*

Hofreiter, A., & Rodríguez, F. (2006). The Alstroemeriaceae in Peru and neighbouring areas

*Alstroemeriaceae en Perú y áreas vecinas, 13(1), 5–69.*

Iza, M. (2018). *Identificación molecular de especies de orquídeas del género Dracula,*

*mediante el sistema BARCODE. Tesis.* Retrieved from

<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

Joshi, M., & Deshpande, J. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods, principles and

application. *International Journal of Biomedical Research.*

Kim, J., Hong, J., Chase, M., Fay, M., & Kim, J. (2013). Familial relationships of the

monocot order Liliales based on a molecular phylogenetic analysis using four plastid

loci: MatK, rbcL, atpB and atpF-H. *Botanical Journal of the Linnean Society, 172(1), 5–*

*21.* <https://doi.org/10.1111/boj.12039>

Kumar, S., & Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An

overview. *The Scientific World Journal, 2013.* <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics

Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution, 33(7),*

*1870–1874.* <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Kuo, Y.-T., Chao, Y.-T., Chen, W.-C., Shih, M.-C., & Chang, S.-B. (2019). Segmental and

tandem chromosome duplications led to divergent evolution of the chalcone synthase

gene family in phalaenopsis orchids. *Annals of Botany, 123(1), 69–77.*

<https://doi.org/10.1093/aob/mcy136>

Lee, P., Costumbrado, J., Hsu, C., & Kim, Y. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the

Separation of DNA Fragments, (April), 1–5. <https://doi.org/10.3791/3923>

Lee, S., Ng, W., Mahat, M., Nazre, M., & Mohamed, R. (2016). DNA barcoding of the

endangered aquilaria (Thymelaeaceae) and its application in species authentication of

- Agarwood Products traded in the market. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–21.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154631>
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2012). Libro Rojo, Segunda Edición, 2012: History of Portugal - Susana León-Yáñez, Renato Valencia, Nigel Pitman, Lorena Endara, Carmen Ulloa Ulloa & Hugo Navarrete - Google Libros. Retrieved October 26, 2019, from <https://books.google.com.ec/books?id=UeteDwAAQBAJ&pg=PA80&lpg=PA80&dq=género+Bomarea+libro+rojo+de+las+especies&source=bl&ots=H8H9I81OeM&sig=ACfU3U1VRqcDgMANQ9oneWa0nxf1Ie-9mA&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjsquWS6LrlAhWhxVkJHeLYAfoQ6AEwBnoECAkQAQ#v=onepa>
- Liu, K., Abdullah, A., Huang, M., & Nishioka, T. (2017). Novel Approach to Classify Plants Based on Metabolite-Content Similarity. *BioMed Research International*, (January).  
<https://doi.org/10.1155/2017/5296729>
- Lock, O., & Ugaz, S. (1998). Avances en el estudio del género *Werneria* y sus metabolitos secundarios. *Revista de Química*, *7*(1), 69–85.
- López-Herraz, M., Betekhtin, A., Catala, P., & López-Alvarez, D. (2012). A DNA Barcoding Method to Discriminate between the Model Plant *Brachypodium distachyon* and Its Close Relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *PLoS ONE*, *7*(12).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051058>
- Loyola, V., Sánchez, P., Canto, B., Gutiérrez, L., Moreno, R., & Galaz, O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Revista de La Sociedad Química de México*, *48*(001), 67–94.
- Mencias, H., & Salazar, T. (2018). *Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros Epidendrum, Oncidium y Caucaea*”.

- Montalvo, M., & Vargas, L. (2019). *Revisión de las especies Latinoamericanas de orquídeas del género Dracula mediante la técnica molecular BARCODE. Tesis*. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Munshi, A. (2012). *DNA sequencing – Methods*.
- Pérez-Urria, E., & Ávalos, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3), 119–145.
- Pérez, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador. (2019). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved January 21, 2020, from <https://www.puce.edu.ec/centros-de-investigacion.php>
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K., & Harleen, K. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106.
- Ramos, G., Ruiz, Á., Frutos, P., & Giráldez, F. (1998). Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los hervíboros. *Archivos de Zootecnia*, 47(180), 1.
- Rocha, P. (2003). Marcadores moleculares , una herramienta útil para la selección genética de palma, (July 2003).
- Sahil, P., Tejas, B., Hiren, B., Pratibha, S., & Abhay, K. (2015). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Magazine of Agricultural and Biological Sciences*, 14(12 SUPPL.), 10–12. <https://doi.org/10.1002/0471203076.emm1120>
- Sanso, A., & Kiesling, R. (2017). January 2009. *Flora de San Juan*, IV(December), 392–393.
- Sanso, A., & Xifreda, C. (2001). Generic delimitation between *Alstroemeria* and *Bomarea* (Alstroemeriaceae). *Annals of Botany*, 88(6), 1057–1069. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1548>

- Science Learning Hub. (2009). DNA extraction. Retrieved January 14, 2020, from <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2036-dna-extraction>
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Retrieved January 13, 2020, from [https://books.google.com.ec/books?id=XH2HzSIJPywC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=Sharapin,++N.++\(2000\).+Fundamentos++de++tecnología++de++productos++fitoterapéuticos.+Bogotá:+Convenio+Andrés+Bello;+RIPROFITO+del+subprograma+X+del+CYTED.&source=bl&ots=iUvpJUQBEo&sig=ACfU](https://books.google.com.ec/books?id=XH2HzSIJPywC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=Sharapin,++N.++(2000).+Fundamentos++de++tecnología++de++productos++fitoterapéuticos.+Bogotá:+Convenio+Andrés+Bello;+RIPROFITO+del+subprograma+X+del+CYTED.&source=bl&ots=iUvpJUQBEo&sig=ACfU)
- Soto, M. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. *In Crescendo*, 6(1), 33. <https://doi.org/10.21895/incres.2015.v6n1.04>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Sunderland: Universitat Jaume.
- Thermo Scientific. (2019). Fast-Cycling PCR Enzymes & Master Mixes. Retrieved December 14, 2019, from <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-pcr/thermo-scientific-pcr-enzymes-master-mixes/fast-cycling-pcr-master-mixes-thermo-scientific.html>
- Tropicos Specimen Data. (2019a). *Bomarea chimboracensis* Baker. Retrieved January 21, 2020, from <https://www.gbif.org/species/2753943>
- Tropicos Specimen Data. (2019b). Specimen search. Retrieved January 13, 2020, from <http://legacy.tropicos.org/SpecimenSearch.aspx>
- Tropicos Specimen Data. (2019c). Tropicos Specimen Data. Retrieved January 21, 2020, from <https://www.gbif.org/dataset/7bd65a7a-f762-11e1-a439-00145eb45e9a#citation>
- Vindas, M., Rojas, K., & Tamayo, G. (2011). Evaluation of three chloroplast markers for barcoding and for phylogenetic reconstruction purposes in native plants of Costa Rica. *Ciencia y Tecnología: Revista de La Universidad de Costa Rica*, 27(1), 24–34.

Xifreda, C., & Sanso, A. (1996). Aportes botánicos de Salta - Ser. Flora, (Cic), 1–13.

Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Publishing Group*, 13(5), 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>

Zhitao, N., Shuying, Z., Jiajia, P., Ludan, L., Jing, S., & Xiaoyu, D. (2017). Comparative analysis of *Dendrobium* plastomes and utility of plastomic mutational hotspots. *Scientific Reports*, (April), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02252-8>

## Anexos

### Anexo 1. Colección de material vegetal del género *Bomarea*.



Nota: Recolección de material vegetal para colección. a y b: colección de material sano y joven para extracción de ADN, c: colección de material para muestra de herbario.  
Elaborado por: La autora, 2019.

**Anexo 2.** Lista de especies del género *Bomarea* colectadas en Ecuador.

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>Especie</b>	<b>Provincia</b>	<b>Localidad</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
1	4083	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Pasochoa	-0.472444	-78.520.694
2	4084	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Pasochoa	-0.453162	-78.541.356
3	4085	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Pasochoa	-0.454325	-78.540.604
4	4086	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Pasochoa	-0.452338	-78.546.303
5	4097	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Tabacundo	0.079802	-78.235.373
6	4098	<i>Bomarea caldasii</i> (Kunth) Herb.	Pichincha	Nono	-0.059035	-78.609.073
7	4099	<i>Bomarea caldasii</i> (Kunth) Herb.	Pichincha	Nono	-0.059174	-78.608.429
8	4100	<i>Bomarea caldasii</i> (Kunth) Herb.	Pichincha	Nono	-0.059485	-78.608.247
9	4114	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Inés Gangotena	-0.395493	-78.433.420
10	4115	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Rumipamba	-0.437282	-78.418.319
11	4116	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Rumipamba	-0.438061	-78.418.276
12	4117	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Rumipamba	-0.461952	-78.426.371
13	4118	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Rumipamba	-0.461952	-78.426.371

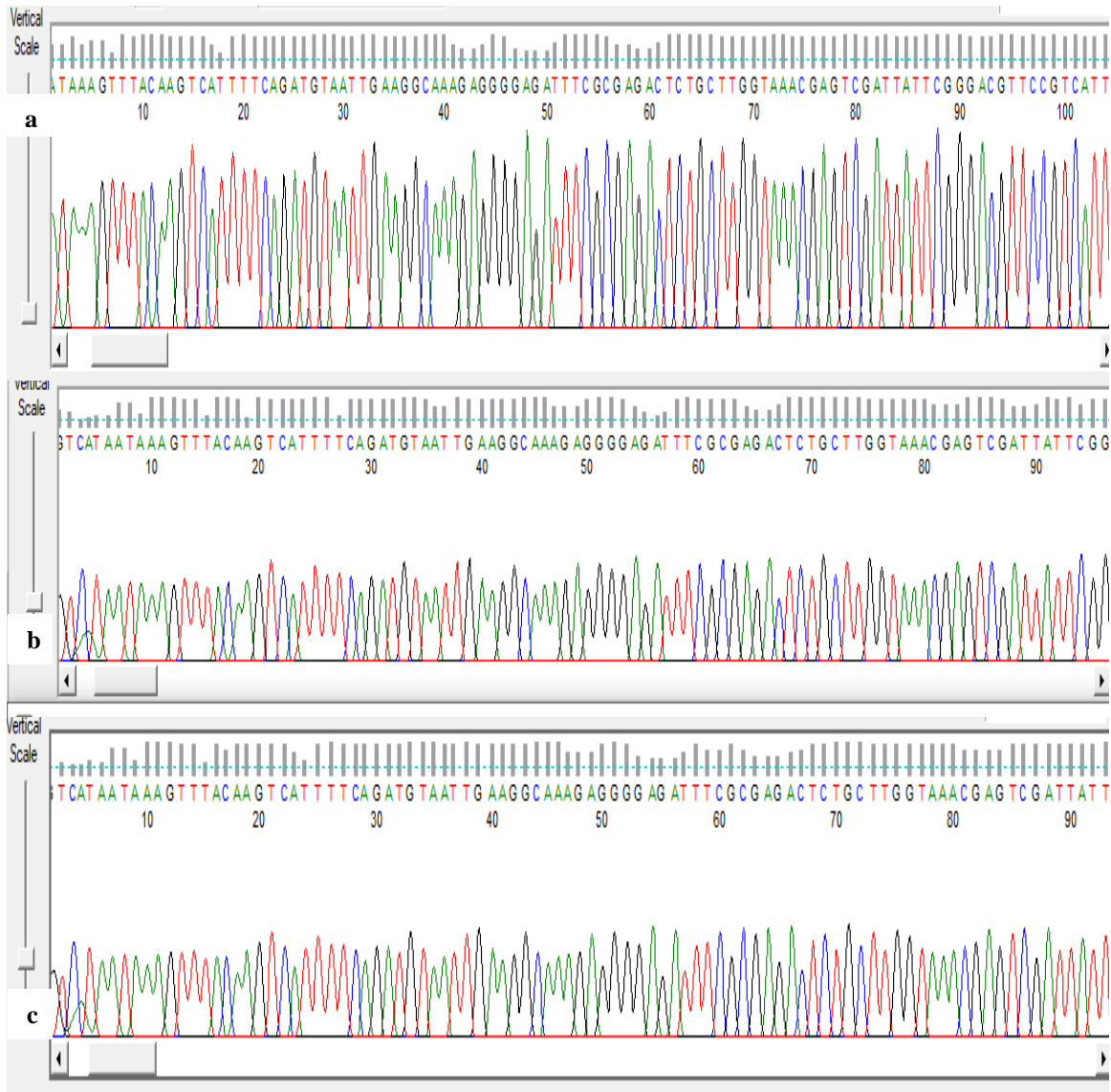
14	4119	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Rumipamba	-0.464194	-78.426.500
15	4120	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Rumipamba	-0.464194	-78.426.500
16	4121	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Porvenir	-0.486078	-78.434.993
17	4122	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Porvenir	-0.486078	-78.434.993
18	4123	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Porvenir	-0.487724	-78.436.240
19	4124	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Porvenir	-0.487724	-78.436.240
20	4125	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	San Antonio	-0.486429	-78.432.745
21	4126	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Pichincha	Rumipamba	-0.456569	-78.423.908
22	4127	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Tungurahua	Patate	-1.337.418	-78.467.073
23	4229	<i>Bomarea patinii</i> Baker	Napo	Cuyuja	-0.430613	-77.976.072
24	4230	<i>Bomarea patinii</i> Baker	Napo	Cuyuja	-0.430506	-77.975.900
25	4231	<i>Bomarea patinii</i> Baker	Napo	Cuyuja	-0.429667	-77.970.177
26	4232	<i>Bomarea hirsuta</i> (Kunth) Herb.	Napo	Cosanga	-0.565138	-77.874.788
27	4233	<i>Bomarea hirsuta</i> (Kunth) Herb.	Napo	Cosanga	-0.565138	-77.874.788
28	4234	<i>Bomarea hirsuta</i> (Kunth) Herb.	Napo	Cosanga	-0.540578	-77.889.478
29	4235	<i>Bomarea caldasii</i>	Carchi	Tulcán	0.734938	-77.726.183



		(Kunth) Herb.				
30	4381	<i>Bomarea uncifolia</i> Herb.	Cotopaxi	Apagua	-0.987815	-78.968.682
31	4382	<i>Bomarea uncifolia</i> Herb.	Cotopaxi	Apagua	-0.987815	-78.968.682
32	4383	<i>Bomarea uncifolia</i> Herb.	Cotopaxi	Apagua	-0.987812	-78.968.704
33	4384	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Cotopaxi	Apagua	-0.987812	-78.968.704
34	4385	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Cotopaxi	Apagua	-0.987850	-78.968.690
35	4388	<i>Bomarea linifolia</i> (Kunth) Baker	Pichincha	San Marcos/Olmedo	0.129244	-78.025.791
36	4389	<i>Bomarea linifolia</i> (Kunth) Baker	Pichincha	San Marcos/Olmedo	0.108450	-77.967.959
37	4390	<i>Bomarea linifolia</i> (Kunth) Baker	Pichincha	San Marcos/Olmedo	0.111342	-77.968.881
38	4391	<i>Bomarea patacocensis</i> Herb.	Cotopaxi	Pilaló	-0.958197	-78.979.830
39	4392	<i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.	Cotopaxi	Pilaló	-0.958218	-78.979.733
40	4393	<i>Bomarea patacocensis</i> Herb.	Cotopaxi	Pilaló	-0.958401	-78.979.712
41	4394	<i>Bomarea pardina</i> Herb.	Pastaza	Mera	-1.409.651	-78.051.395

Nota: Se presentan las muestras colectadas para estudio junto con sus puntos de distribución geográfica.  
Elaborado por: La autora, 2019.

### Anexo 3. Evaluación de la calidad de los productos del alineamiento de Sanger



Nota: Electroferogramas obtenidos del secuenciamiento de productos de PCR del género *Bomarea*. a: *Bomarea caldasii*, b: *Bomarea multiflora*, c: *Bomarea patinii*.  
Elaborado por: La autora, 2019.

#### Anexo 4. Identificación morfológica



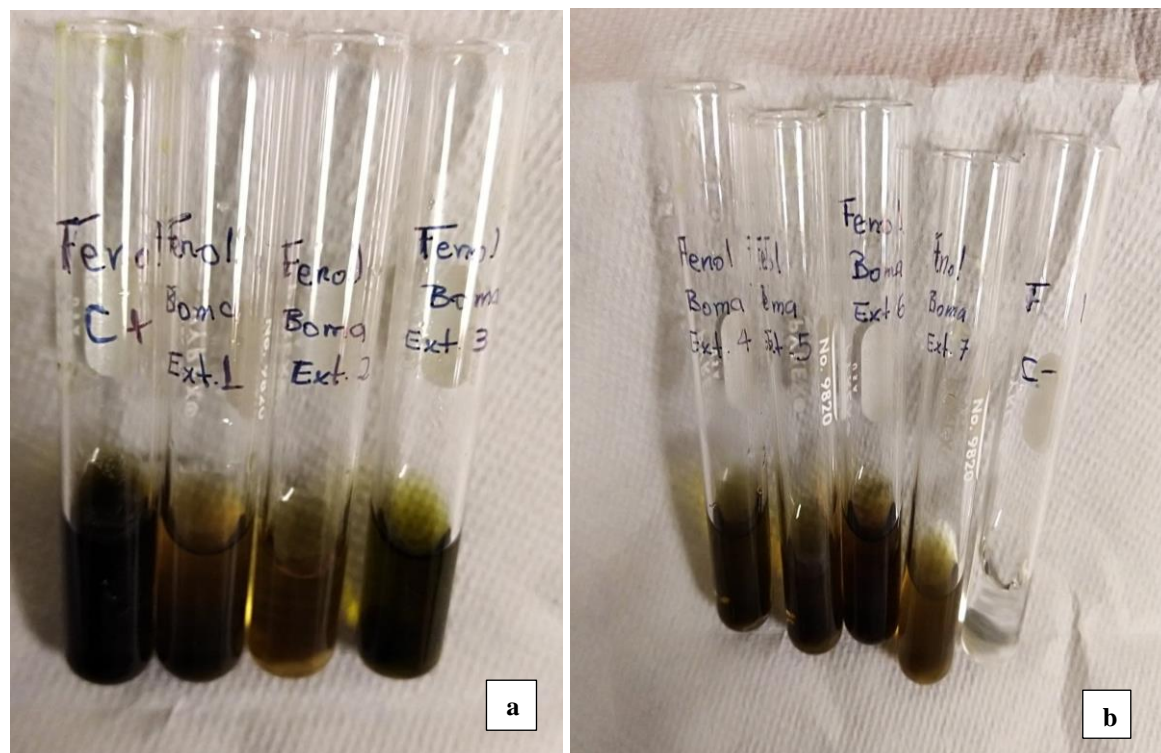
Nota: Identificación morfológica de las especies del género *Bomarea* colectadas con las almacenadas en el archivo nacional del Herbario Nacional del Ecuador (QCNE).  
Elaborado por: La autora, 2019.

### Anexo 5. Alineamiento de secuencias

Species/Abbv	Group Name	
1. 4083 Bomarea multiflora		T A A T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A
2. 4084 Bomarea multiflora		T A A T A G T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C G
3. 4085 Bomarea multiflora		A A T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G
4. 4086 Bomarea multiflora		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
5. 4097 Bomarea multiflora		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
6. 4098 Bomarea caldasii Kunth		T A A T T T A C A A G T C A T T T T C G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C G A T
7. 4099 Bomarea caldasii Kunth		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
8. 4100 Bomarea caldasii Kunth		T A A T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A
9. 4114 Bomarea multiflora		T A A T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A
10. 4115 Bomarea multiflora		T A A T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A
11. 4116 Bomarea multiflora		T A A T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A
12. 4117 Bomarea multiflora		T A A T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A
13. 4118 Bomarea multiflora		A T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T
14. 4119 Bomarea multiflora		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C G
15. 4120 Bomarea multiflora		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
16. 4121 Bomarea multiflora		T A A A G T T T G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C G A T T
17. 4122 Bomarea multiflora		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
18. 4123 Bomarea multiflora		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
19. 4124 Bomarea multiflora		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
20. 4125 Bomarea multiflora		T A T A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G A G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C G A T T A T T C
21. 4126 Bomarea multiflora		G A T T A T T C G G G A C G T T C C G T C A T T G T C G T G G G C C T T T G C T T T C A T T A C A T T G T G G A T T A C C T C G A G A A T A G C A A
22. 4127 Bomarea multiflora		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
23. 4229 Bomarea patinii Baker		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C G A T A C B T T C G G T
24. 4230 Bomarea patinii Baker		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
25. 4231 Bomarea patinii Baker		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
26. 4232 Bomarea hirsuta (Kunth) Herb		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C G
27. 4233 Bomarea hirsuta (Kunth) Herb		T T T A A G T C A T T T T C G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G C A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C G A T T A T T C G G G A C G T T C C
28. 4234 Bomarea hirsuta (Kunth) Herb		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
29. 4235 Bomarea caldasii		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C
30. 4381 Bomarea chimboracensis Bake		T A A A G T T T A C A A G T C A T T T T C A G A T G T A A T T G A A G G C A A A G A G G G G A G A T T T C G C G A G A C T C T G C T T G G T A A C G A G T C

Nota: Alineamiento de secuencias obtenidas como resultado de la secuenciación de Sanger por la empresa **MACROGEN** con el marcador *rpoCl*.  
Elaborado por: La autora, 2019.

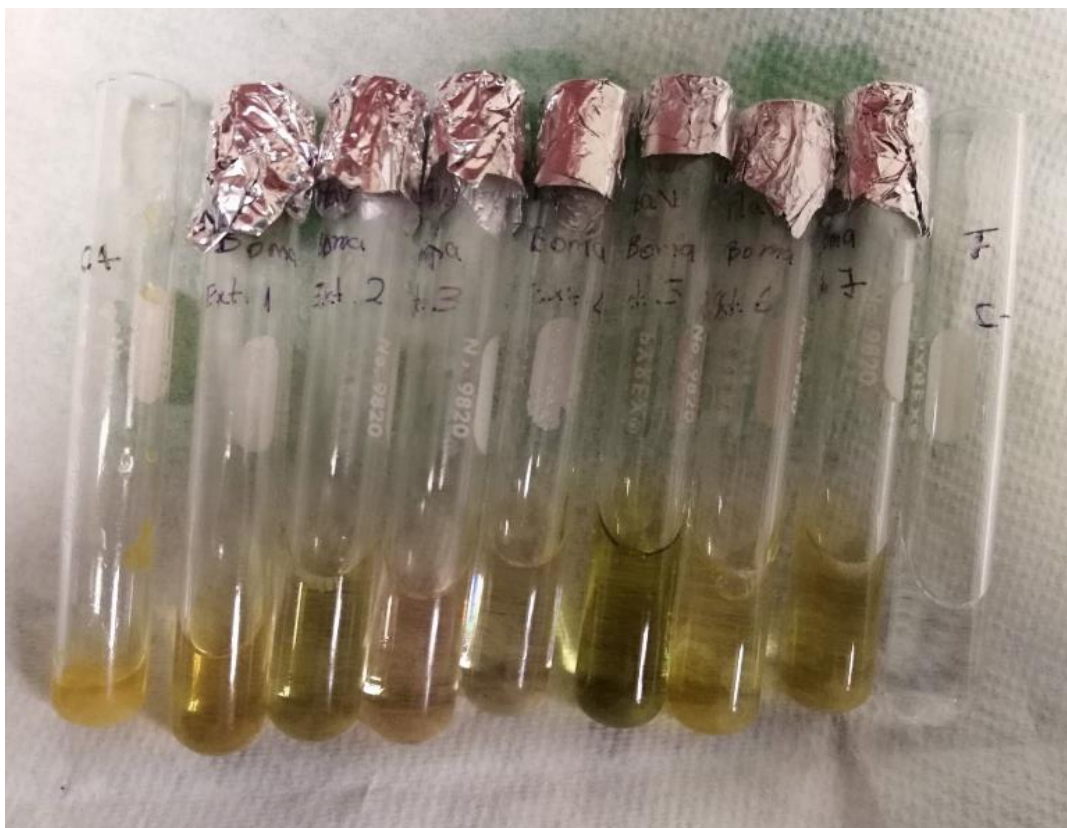
## Anexo 6. Screening fitoquímico de fenoles en extractos de *Bomarea*.



Nota: Resultados del screening fitoquímico de compuestos fenólicos en extractos de *Bomarea*. a: Control positivo (C+), extracto 1 *Bomarea multiflora*, extracto 2 *Bomarea patinii*, extracto 3 *Bomarea pardina*. b: extracto 4 *Bomarea uncifolia*, extracto 5 *Bomarea caldasii*, extracto 6 *Bomarea patacocensis* y extracto 7 *Bomarea linifolia*, control negativo (C-).

Fuente: La autora, 2019.

**Anexo 7.** Screening fitoquímico de flavonoides en extractos de *Bomarea*.



Nota: Resultados del screening fitoquímico de flavonoides en extractos de *Bomarea*: Control positivo (C+), extracto 1: *Bomarea multiflora*, extracto 2: *Bomarea patinii*, extracto 3: *Bomarea uncifolia*, extracto 4: *Bomarea caldasii*, extracto 5: *Bomarea patacensis*, extracto 6: *Bomarea pardina* y extracto 7: *Bomarea linifolia*, control negativo (C-).

Fuente: La autora, 2019.

**Anexo 8.** Metabolitos secundarios presentes en especies del género *Bomarea*.

Género	Especie	Metabolitos secundarios		
		Alcaloides	Fenoles	Flavonoides
<i>Bomarea</i>	C+	-	+++	++
	<i>Bomarea multiflora</i>	-	+++	+
	<i>Bomarea patinii</i>	-	+++	+
	<i>Bomarea uncifolia</i>	-	+++	++
	<i>Bomarea caldasii</i>	-	+++	++
	<i>Bomarea patacocensis</i>	-	+++	-
	<i>Bomarea linifolia</i>	-	+++	-
	<i>Bomarea pardina</i>	-	+++	-
	C-	-	-	-

Nota: Control positivo (C+), control negativo (C-), negativo (-), poca presencia (+), moderada presencia (++), alta presencia (+++).

Elaborado por: La autora, 2019.

**Anexo 9.** Porcentaje de inhibición de DPPH en extractos del género *Bomarea*.

Muestra	µL de muestra	Concen. µg/uL	Absorbancia				Absorbancia Prom.	% Inhibición
			R1	R2	R3	R4		
Ácido ascórbico	0	0	0.5311	0.5318	0.5309	0.5309	0.5311	0
	5	0.1666	0.5257	0.5255	0.5254	0.5247	0.5253	1.1013
	10	0.3333	0.5238	0.5228	0.5228	0.5228	0.5230	1.5296
	20	0.6666	0.5213	0.5202	0.5144	0.5141	0.5175	2.5744
	50	1.6666	0.5133	0.5133	0.5129	0.5128	0.5130	3.4075
	80	2.6666	0.5128	0.5126	0.4598	0.4594	0.4861	8.4764
<i>Bomarea multiflora</i>	0	0	0.5218	0.5218	0.5218	0.5214	0.5217	0
	5	33.3333	0.5008	0.5006	0.4990	0.4965	0.4992	4.3080
	10	66.6666	0.4312	0.4310	0.4264	0.4258	0.4286	10.4989
	20	133.3333	0.4173	0.4173	0.4090	0.4089	0.4131	16.8455
	50	333.3333	0.4072	0.4071	0.4025	0.4021	0.4047	29.4218
	80	533.3333	0.3251	0.3250	0.3048	0.3046	0.3148	41.6444
<i>Bomarea patinii</i>	0	0	0.5169	0.5167	0.5086	0.5081	0.5125	0
	5	33.3333	0.5081	0.5033	0.5031	0.5030	0.5043	2.5863
	10	66.6666	0.5009	0.5008	0.4751	0.4750	0.4879	4.8041
	20	133.3333	0.4742	0.4739	0.4715	0.4706	0.4725	7.4347
	50	333.3333	0.4676	0.4676	0.4528	0.4528	0.4602	14.4952
	80	533.3333	0.4152	0.4145	0.4113	0.4112	0.4130	20.1658
<i>Bomarea uncifolia</i>	0	0	0.5495	0.5481	0.5207	0.5202	0.5346	0
	5	33.3333	0.4992	0.4990	0.4940	0.4938	0.4965	7.1311
	10	66.6666	0.4535	0.4533	0.4427	0.4425	0.4480	16.2029
	20	133.3333	0.4403	0.4395	0.4334	0.4331	0.4365	18.3399
	50	333.3333	0.3586	0.3585	0.3203	0.3202	0.3394	36.5162
	80	533.3333	0.2375	0.2369	0.2123	0.2116	0.2245	57.9939
<i>Bomarea caldasii</i>	0	0	0.5221	0.5215	0.5183	0.5183	0.5200	0
	5	33.3333	0.5154	0.5148	0.5059	0.5058	0.5104	1.8411
	10	66.6666	0.4925	0.4923	0.4841	0.4840	0.4882	6.1196
	20	133.3333	0.4794	0.4793	0.4738	0.4735	0.4765	8.3741
	50	333.3333	0.4580	0.4580	0.4251	0.4250	0.4415	15.0995
	80	533.3333	0.3742	0.3737	0.3641	0.3640	0.3690	29.0452
<i>Bomarea patacensis</i>	0	0	0.5230	0.5230	0.5183	0.5182	0.5206	0
	5	33.3333	0.5090	0.5090	0.4948	0.4947	0.5018	5.7240
	10	66.6666	0.4488	0.4486	0.4390	0.4388	0.4438	10.2352
	20	133.3333	0.4345	0.4344	0.4328	0.4327	0.4336	15.3693
	50	333.3333	0.4213	0.4213	0.3980	0.3977	0.4095	26.9954
	80	533.3333	0.3943	0.3940	0.3379	0.3377	0.3659	39.5284



<i>Bomarea tinifolia</i>	0	0	0.5508	0.5504	0.4642	0.4640	0.5073	0
	5	33.3333	0.4551	0.4548	0.4022	0.4013	0.4283	15.5711
	10	66.6666	0.3992	0.3985	0.3924	0.3924	0.3956	22.0212
	20	133.3333	0.2840	0.2836	0.2279	0.2278	0.2558	49.5762
	50	333.3333	0.1478	0.1474	0.1300	0.1299	0.1387	72.6470
	80	533.3333	0.1000	0.1000	0.0973	0.0973	0.0986	80.5558
<i>Bomarea pardina</i>	0	0	0.4718	0.4717	0.4620	0.4618	0.4668	0
	5	33.3333	0.4502	0.4489	0.4372	0.4372	0.4433	5.0233
	10	66.6666	0.4487	0.4486	0.4243	0.4239	0.4363	6.5227
	20	133.3333	0.4016	0.4015	0.3982	0.3969	0.3995	14.4111
	50	333.3333	0.3620	0.3615	0.3509	0.3503	0.3561	23.7026
	80	533.3333	0.3178	0.3176	0.3094	0.3091	0.3134	32.8495

Nota: Se presentan los resultados de cada una de las repeticiones a distintas concentraciones, de las absorbancias calculadas en los extractos de *Bomarea* y Ácido ascórbico usado como control, así como sus promedios para realizar el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Elaborado por: La autora, 2019.

## Anexo 10. Análisis estadístico

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2241614,29	6	373602,38	4,52	0,0043
Especie	2241614,29	6	373602,38	4,52	0,0043
Error	1734062,66	21	82574,41		
Total	3975676,96	27			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=660,53488

Error: 82574,4126 gl: 21

Especie	Medias	n	E.E.
B. linifolia	252,12	4	143,68 A
B. uncifolia	454,50	4	143,68 A B
B. multiflora	708,76	4	143,68 A B
B. pardina	797,64	4	143,68 A B
B. Patascocensis	949,54	4	143,68 B
B. caldasii	972,49	4	143,68 B
B. patinii	1113,19	4	143,68 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Nota: Análisis de Varianza y test de Tukey realizado en el programa *Infostat, 2019* con los extractos del género *Bomarea*.

Elaborado por: La autora, 2019 mediante el programa *Infostat*.