

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia



**“Determinación y cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutracéuticos”**

Informe de Seminario de Tesis

Presentado por

Dina Jocabed Córdova Lemus  
Roxana Maribel Dardón Juárez  
José Emilio González de León  
Maria Cristina Menéndez Leiva

Para optar al título de  
Química Farmacéutica

Guatemala, agosto de 2009

## **MIEMBROS DE JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irvin Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Lilitiana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Aníbal Rodrigo Sevillanos Cambroner	Vocal V

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por darnos la oportunidad de crecer académicamente.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, especialmente a la Escuela de Química Farmacéutica por brindarnos todos los conocimientos necesarios para nuestro desempeño profesional.

Al Laboratorio de Productos Naturales – LIPRONAT-, por permitirnos trabajar dentro de sus instalaciones, así como de habernos permitidos compartir momentos muy especiales con nuestros compañeros de trabajo.

Al Departamento de Citohistología y Departamento de Bioquímica que dentro de sus instalaciones nos fue permitido realizar el presente trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Productos Naturales – FARMAYA S.A. – por permitirnos realizar una práctica complementaria a nuestra formación académica.

A nuestra asesora, Licenciada Sully Cruz por habernos orientado sabiamente para la elaboración del trabajo de investigación.

A nuestra revisora, Licenciada Aylin Santizo por sus sabios consejos y valiosa amistad. Además le agradecemos por instarnos a seguir adelante.

Al Licenciado Armando Cáceres, por su apoyo, colaboración y consejos, especialmente por su iniciativa hacia la investigación, sin lo cual no hubiéramos iniciado este trabajo.

Al Doctor Ruben Velásquez, por sus valiosas sugerencias.

A la Licenciada Sandra Lima, por su paciencia, por ser una persona de excelencia académica y además de su capacidad para orientarnos en todo momento.

A la Licenciada Karla Lange, por su apoyo y sobretodo su confianza en nosotros. Además le agradecemos sus enseñanzas en un área nueva para nosotros.

A nuestros catedráticos, por habernos instruido con dedicación para prepararnos para nuestro desempeño profesional.

A todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido en la culminación de esta etapa de nuestra carrera.

## **ACTO QUE DEDICO**

### **A DIOS:**

Quién me ha guiado todos mis pasos con sabiduría, quien me ha dado la fortaleza para afrontar cada obstáculo que se me ha presentado y que gracias a él he logrado todas mis metas.

### **A MI PADRE:**

Danilo Ernesto Dardón Ávila por su apoyo y confianza, por haberme enseñado mis valores, mis principios y por su comprensión en todos los momentos de mi vida.

### **A MI MADRE:**

Alba Amparo Juárez Barrera por su amor y por la motivación que me ha brindado para alcanzar todas mis metas. Le agradezco todos los esfuerzos que ha hecho para apoyarme sin pedir nunca nada a cambio. Las palabras no serán nunca suficientes para agradecerle.

### **A MIS HERMANOS:**

Danilo Ernesto Dardón Juárez y Jenifer Liliana Grajeda Albeño por compartir muchos momentos especiales que solo entre hermanos pueden ser compartidos.

### **A:**

Sandra Maritza Albeño Hernández, por ser una segunda madre y gran consejera, muchas gracias por su sinceridad, amistad y cariño.

### **A MIS ABUELOS:**

Celia Antonieta Ávila Ávila de Dardón (Q.E.P.D.), Elsa Barrera y César Juárez por todo su cariño y apoyo en mi vida.

### **A MI FAMILIA EN GENERAL:**

Gracias por su apoyo y cariño.

### **A MI NOVIO:**

Jonathan Josué Monterrosa López, por compartir conmigo muchos momentos especiales. Le agradezco por su constante apoyo, comprensión y cariño a lo largo del camino que hemos compartido juntos.

### **A LA FAMILIA MONTERROSA LÓPEZ:**

Por su aceptación y cariño que me han brindado.

### **A MIS AMIGOS:**

Con los que he realizado el presente trabajo de investigación, José Emilio González de León, María Cristina Menéndez Leiva y Dina Jocabed Córdova Lemus por todo el esfuerzo que realizaron para la culminación de esta etapa de nuestras vidas. Les agradezco además muchos años de amistad y muy buenos momentos. A mis compañeros y demás amigos, con los he compartido muy buenos momentos, les agradezco su amistad y sabios consejos cuando me han sido necesarios.

A todas aquellas personas que me han acompañado en el camino y me han guiado. Muchas Gracias.

Roxana Maribel Dardón Juárez

## **ACTO QUE DEDICO A:**

### **DIOS:**

Por ser la luz en mi vida, por amarme y bendecirme durante todo el tiempo y por permitirme llegar a cumplir una de las etapas más importantes en mi vida.

### **MIS PADRES:**

#### **Emilio González.**

Por ser ese ángel que siempre cuida de mi, por tu apoyo y por enseñarme a luchar por mis sueños y objetivos en la vida.

#### **Blanqui de León de González**

Por ser mi apoyo y la fortaleza que me empujó a alcanzar este triunfo.

Gracias a ambos por ese apoyo en los momentos difíciles, y porque los sacrificios se ven recompensados con este triunfo que es para ustedes.

### **A MIS HERMANOS:**

Aury, Hugo, Mario y Emanuel:

Por siempre estar conmigo, por su apoyo en los momentos cuando más lo necesite y por llenar mi vida de alegría y de orgullo.

### **A MI NOVIA:**

Nancy González

Por ser la fuerza que me motivó a seguir adelante, por tu amor, comprensión y ayuda incondicional, por llenar mi vida de felicidad y sobre todo porque juntos vamos cumpliendo nuestras metas y objetivos de vida.

### **A MIS SOBRINOS:**

Juan Pablo, Ana Beatriz, Maquito, Amy, Huguito y Renecito.

Quienes llenan de alegría cada día de mi vida, a quienes quiero con todo mi corazón.

### **A MIS AMIGOS:**

Quienes sin ellos los momentos vividos durante la carrera no hubieran sido lo mismos ya que cada experiencia es ya solo recuerdos que llevaré siempre en mi corazón. Gracias.

### **A MIS COMPAÑEROS DE PROMOCION:**

Por todas las experiencias compartidas.

### **A MI FAMILIA EN GENERAL:**

Por su apoyo y cariño.

### **A LA FAMILIA GONZALEZ PELLECCER:**

Por todas sus muestras de cariño y apoyo que siempre he recibido.

### **A TODAS:**

Aquellas personas que hoy me acompañan a compartir este momento tan importante en mi vida, Muchas Gracias.

José Emilio González de León

## **ACTO QUE DEDICO A:**

### **DIOS:**

Por ser mi guía a través del camino de la vida, por bendecirme con una familia y amigos maravillosos. Por permitirme ser la persona que soy y para que me de fuerzas para lograr convertirme en la persona que quiero llegar a ser.

### **MIS PADRES:**

#### **Rodolfo Menéndez.**

Por ser mi ejemplo de vida, por su amor y apoyo incondicional.

#### **Lourdes Leiva de Menéndez.**

Por enseñarme a siempre luchar por lo que se quiere y apoyarme en todo momento. Gracias a ambos por ser mi fortaleza, los quiero mucho y este triunfo es de ustedes.

### **A MIS HERMANOS:**

Carmen, Silvia, Georgina, Rodolfo, José y Paco:

Por su cariño, apoyo y todos los momentos alegres. Gracias por la confianza que han depositado en mí, los quiero.

### **A MI ABUELITA:**

#### **Gloria Leiva.**

Por ser esa personal especial para toda la familia, te quiero con todo mi corazón.

### **A MIS AMIGOS:**

Gracias por los momentos compartidos, ustedes no solo son mis amigos sino mi familia. Le agradezco a Dios el haberlos puesto en mi vida, los quiero. En especial a Marlene del Rosario García Astorga (Q.E.P.D.) gracias a la vida por haberme permitido conocerte, personas como tú son únicas, estarás en mi corazón por siempre.

### **A MIS COMPAÑEROS DE PROMOCION:**

Gracias por todas las experiencias vividas a través de toda la carrera.

### **A MI FAMILIA EN GENERAL:**

Por su apoyo y cariño. En especial a mis tíos y primos.

### **A LA FAMILIA FERNANDEZ:**

Por todas sus muestras de apoyo incondicional.

### **A LA FAMILIA DARDÓN JUAREZ:**

Por su cariño y apoyo en todo momento.

### **A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA:**

Por permitirme alcanzar de mi sueño, por llenar de ideas mi mente y abrirme las puertas a un mundo nuevo.

### **A TODAS:**

Aquellas personas que hoy me acompañan a compartir este momento tan importante en mi vida, Muchas Gracias.

María Cristina Menéndez Leiva

## **ACTO QUE DEDICO:**

### **A DIOS:**

Porque me has ayudado y bendecido todo este tiempo, y me has permitido llegar a ser lo que soy. Por poner a tantas personas maravillosas en mi camino que me han orientado y ayudado durante mi vida.

### **A MIS PADRES:**

#### **Margarito Córdova y Leonor Lemus de Córdova**

Con profunda gratitud sea este regalo y tributo a sus sacrificios, trabajo y desvelos. Gracias por creer en mí, por su amor, comprensión, ayuda y apoyarme en todo lo que me propongo en mi vida; por inculcar en mí el deseo de superarme y luchar hasta alcanzar mis metas. A ambos infinitas gracias, los quiero mucho.

### **A MIS HERMANOS:**

Billy, Mauricio, Maby y Gad:

Por el cariño brindado y por estar conmigo en los momentos más difíciles y felices de mí vida. Por su apoyo en todo momento y estar pendientes de mí.

### **A MIS SOBRINOS:**

Josue Javier, Estefany y Efrén:

Por llenar mi vida de risas y alegría.

### **A MI FAMILIA EN GENERAL:**

Por su apoyo y cariño.

### **A MIS AMIGOS:**

Un agradecimiento especial y mis más sinceros recuerdos, por todos aquellos momentos que compartimos a lo largo de nuestra carrera y que sin ustedes nunca hubiesen sido especiales, siempre los llevaré en mi corazón.

### **A MIS COMPAÑEROS DE PROMOCIÓN:**

Por acompañarme en esta carrera y por los experiencias y momentos especiales vividos.

### **A MIS CATEDRÁTICOS:**

Por sus enseñanzas que me permitieron conquistar el éxito.

### **A TODOS:**

Quienes por una razón u otra me ayudaron y apoyaron para la culminación de mi carrera.

Dina Jocabed Córdova Lemus

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
I. Ámbito de la investigación	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	4
3.1 Oxidaciones biológicas	4
3.2 Radicales libres	5
3.3 Efecto nocivo de los radicales libres	6
3.4 Especies de oxígeno reactivas (EOR) y prooxidantes	7
3.5 Papel fisiológico y patológico de las EOR	8
3.6 Importancia de los antioxidantes y modo de acción	8
3.7 Estudios de antioxidantes realizados en Guatemala	10
IV. Justificación	11
V. Objetivos	12
VI. Materiales y Métodos	13
VII. Resultados	33
VIII. Discusión de Resultados	45
IX. Conclusiones	53
X. Recomendaciones	55
XI. Referencias	56
XII. Anexos	65

## I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

### INVESTIGACIÓN:

La actividad antioxidante hace referencia a aquella sustancia que impide la oxidación perjudicial de otras sustancias químicas, ocasionada en la reacción metabólica o producida por los factores exógenos como las radiaciones ionizantes en el organismo. En la actualidad se ha visto un aumento en el uso de antioxidantes como complemento al tratamiento de enfermedades degenerativas causadas por la acción de radicales libres. Al ser Guatemala un país abundante en flora se considera necesaria la determinación de la actividad antioxidante de especies nativas que podrían utilizarse posteriormente como fuente de preservantes hidrofílicos, cosméticos y nutracéuticos.

La investigación se desarrolló de la siguiente manera: Se procedió a la obtención de material vegetal, y a la preparación de extractos crudos de cada especie. La caracterización fitoquímica fue realizada para cada especie incluyéndose la investigación de los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, antocianinas, taninos, aceites volátiles, cumarinas, entre otros, para determinar qué compuesto químico le otorga la actividad para inhibir a los radicales libres. La evaluación de actividad antioxidante fue realizada por el método de TLC (Cromatografía en Capa Fina) y por método colorimétrico; ensayo de la actividad antioxidante total usando el reactivo 2- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y la determinación de compuestos fenólicos. En la siguiente tabla se describe la distribución del trabajo de cada investigador:

Investigadores	Nombre de la planta		Parte a utilizar
	Nombre común	Nombre científico	
Dina Jocabed Córdova Lemus	Orégano	<i>Lippia graveolens</i>	Hoja
	Albahaca de Monte	<i>Ocimum micranthum</i>	Hoja
	Pimienta gorda	<i>Pimenta dioica</i>	Semilla
Roxana Maribel Dardón Juárez	Tres puntas	<i>Neurolaena lobata</i>	Hoja
	Calahuala	<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Hoja
	Zarzaparrilla	<i>Smilax dominguensis</i>	Rizoma
Maria Cristina Menéndez Leiva	Anona Cherimolla	<i>Annona cherimola</i>	Pulpa
	Anona	<i>Annona reticulata</i>	Pulpa
	Anona	<i>Annona purpurea</i>	Pulpa
José Emilio González de León	Pacaya	<i>Chamaedorea tepejilote</i>	Inflorescencia
	Flor de izote	<i>Yucca elephantipes</i>	Flor
	Güicoy	<i>Cucurbita Pepo</i>	Pulpa

Aportando información al campo de la investigación fitofarmacéutica y nutracéutica.

## II. RESUMEN

La capacidad antioxidante se define como la característica que tienen ciertas sustancias para impedir la oxidación de sustancias químicas ocasionadas por los procesos metabólicos, y/o procesos ajenos al organismo. El estudio a continuación tuvo como objetivo determinar y cuantificar la actividad antioxidante presentada por extractos secos de 12 especies nativas de Guatemala, así como la realización del tamizaje fitoquímico de los metabolitos secundarios de cada extracto.

Las plantas fueron colectadas en diferentes puntos del país, y posteriormente se sometieron a pruebas fisicoquímicas para evaluar la calidad de la materia vegetal. Luego se realizó el proceso de extracción por medio de percolación o maceración, de acuerdo a la parte de la planta que fue estudiada. Se utilizó etanol a diferentes concentraciones como disolvente, dicha concentración fue determinada de acuerdo al ensayo de sólidos totales.

Se realizó el respectivo tamizaje fitoquímico para evaluar la presencia de metabolitos secundarios que se relacionan con la actividad antioxidante (flavonoides, antocianinas, taninos, cumarinas, aceites volátiles y antraquinonas), así mismo se determinó la capacidad antioxidante por cromatografía de capa fina en donde se evidenció la intensidad de decoloración provocada por sustancias antioxidantes sobre el revelador.

Los análisis de cuantificación realizados para evaluar la capacidad antioxidante fueron, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante por medio del reactivo de DPPH (Difenil-Picril-Hidrazil), tanto en técnica macrométrica como micrométrica. El primero, es un método espectrofotométrico que utiliza el reactivo Folin Ciocalteu, pretende cuantificar el contenido de fenoles totales, los cuales son sustancias que se han relacionado con el poder antioxidante de las especies vegetales. Por este método se determinó, tanto en macrométrico como micrométrico, que de las especies vegetales estudiadas *Smilax dominguensis*, *Pimenta dioica* y *Phlebodium pseudoaureum* presentaron mayor contenido de fenoles. El segundo método determina la actividad antioxidante total basado en la capacidad de las sustancias antioxidantes en secuestrar radicales libres, para este caso se

utiliza el reactivo de DPPH. De acuerdo a los resultados obtenidos por este método *Smilax dominguensis*, *Pimenta dioica* y *Phlebodium pseudoaureum* mostraron mayor actividad antioxidante. Cabe mencionar que en ambos ensayos los extractos macerados de las frutas evaluadas no presentaron una actividad antioxidante significativa.

### III. ANTECEDENTES

El interés por los antioxidantes polifenólicos ha incrementado en la última década por la elevada capacidad de secuestrar radicales libres. Esta propiedad se ha evidenciado en numerosos estudios que han medido la actividad antioxidante *in vitro* <sup>(1)</sup>. Los compuestos polifenólicos han jugado un papel importante en la prevención de varios procesos patofisiológicos asociados con el estrés oxidativo, como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares <sup>(2)</sup>.

Los radicales libres son especies químicas muy reactivas que fácilmente conducen a reacciones incontroladas, resultando en daños oxidativos importantes en macromoléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos <sup>(3)</sup>.

Dietas con un alto contenido de antioxidantes naturales, como por frutas y vegetales; han sido asociadas con una disminución en los índices de enfermedades crónicas. Los antioxidantes naturales fortalecen el sistema antioxidante endógeno, reducen el estrés oxidativo y el riesgo de enfermedades crónicas. Hasta ahora, las investigaciones se han centrado en el papel de vitaminas E y C, Beta-caroteno y compuestos fenólicos vegetales, los cuales han demostrado ser atrapadores de radicales libres. Muchas hierbas y especias, utilizadas para darle sabor a los platillos, son una excelente fuente de compuestos fenólicos reportándose una buena actividad antioxidante <sup>(4)</sup>.

#### 3.1 Oxidaciones biológicas:

Un radical libre es una especie química con uno o más electrones desapareados en su orbital externo, por lo cual constituye una molécula altamente inestable. Entre los radicales libres más importantes, están los derivados del oxígeno: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno. Por sus propiedades oxidantes, los radicales libres reaccionan rápidamente con casi cada tipo de molécula biológica hallada en forma libre o formando parte de las diferentes estructuras celulares de los seres vivos, tales como: glúcidos, fosfolípidos, aminoácidos, nucléotidos, ácidos grasos, lipoproteínas y membranas celulares <sup>(5)</sup>.

Las fuentes más comunes de generación de radicales libres son: las radiaciones (ultravioleta, X, infrarrojo), el metabolismo (ejercicio extenuante, bebidas alcohólicas, drogas y péptidos alfa-amiloides), las sustancias químicas ambientales (ozono, nitrógeno, productos de combustión, tabaco, hidrocarburos halogenados y metales pesados) y las infecciones (bacterianas, víricas, parasitarias y priones). En la actualidad se reconoce que alrededor de 60 patologías pueden estar relacionadas con el aumento de radicales libres <sup>(5)</sup>.

### **3.2 Radicales libres:**

Desde el punto de vista químico, los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, que les da una configuración espacial generadora de gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar <sup>(5)</sup>.

Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo <sup>(5)</sup>.

No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, y la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis <sup>(5)</sup>.

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidroxilo (HO)<sup>•</sup>
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

- Oxígeno singlete ( $1O_2$ )
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozono <sup>(5)</sup>

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales <sup>(5)</sup>.

### 3.3 Efecto nocivo de los radicales libres

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

3.3.1 *Lípidos*. Es aquí donde se produce el mayor daño en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular y se produce edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal; sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno.

3.3.2. *Proteínas*. Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos.

3.3.3. *Ácido desoxirribonucleico (ADN)*. Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes <sup>(5)</sup>.

### 3.4 Especies de oxígeno reactivas (EOR) y prooxidantes

Las EOR están implicadas en numerosos eventos fisiopatológicos como envejecimiento, cáncer, aterosclerosis y diabetes. Los antioxidantes naturales de frutas y vegetales proveen protección substancial que retrasa el proceso de daño oxidativo causado por EOR <sup>(6)</sup>.

Los prooxidantes son sustancias endógenas o exógenas que tienen la capacidad de oxidar algunas moléculas blanco, ya sea directamente por abstraer electrones o indirectamente produciendo intermediarios químicos altamente reactivos. Los radicales libres representan una clase de dichas entidades cuya reactividad deriva de la presencia de electrones desapareados en su estructura atómica, pero que son capaces de existir independientemente por un breve intervalo de tiempo. EOR es un término colectivo que incluye todas las formas reactivas de oxígeno, tanto las especies radicales y no radicales que participan en el inicio o en la propagación de reacciones en cadenas. El ozono es una forma tóxica del oxígeno que oxida a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos; el oxígeno individual es muy reactivo, aunque no contiene pares de electrones desapareados por lo que no es un radical libre; se forma *in vivo* por activación enzimática, mediante reacciones fisicoquímicas, como en las de transferencia de energía, descomposición térmica de endoperóxidos y dioxetanos, o por la reacción del ozono con los fluidos corporales. El oxígeno individual induce efectos genotóxicos, carcinógenos y mutagénicos por su acción en ácidos grasos poliinsaturados <sup>(7)(8)</sup>.

El superóxido es un radical aniónico formado por la reducción de oxígeno molecular a través de la aceptación de un electrón. El hidropéroxido, que es inestable a pH fisiológico, se disocia en superóxido. *In vivo*, es producido por las cadenas transportadoras de electrones en la mitocondria y microsomas, principalmente importante en el tejido cerebral. El anión superóxido no atraviesa las membranas celulares, por lo que no es muy reactivo contra los constituyentes celulares. El peróxido de hidrógeno es relativamente inactivo, pero si atraviesa fácilmente las membranas celulares <sup>(7)</sup>. El radical hidroxilo, tiene acción directa en regiones cercanas a su lugar de formación, por su corta vida media, pero es el miembro más reactivo de la familia EOR, y puede dañar severamente a diferentes tipos de moléculas, incluyen las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos <sup>(8)</sup>. Los radicales peróxidos se

producen durante la peroxidación de lípidos, aunque esta puede ser útil en algunos procesos biológicos.

Hay otras formas de EOR que contienen nitrógeno o cloro, además de oxígeno. El  $\text{NO}_2$  y el  $\text{NO}$  son radicales libres con un número impar de electrones. El  $\text{NO}_2$  es un oxidante fuerte, mientras que el  $\text{NO}$  actúa como agente reductor débil. Aunque se ha discutido el papel del  $\text{NO}$  como agente vasodilatador e hiperpolarizador de células endoteliales <sup>(7)</sup>.

### **3.5 Papel fisiológico y patológico de EOR**

Evidencia sugiere que EOR participan en la defensa del organismo contra cuerpos extraños y actúan como moduladores de procesos biológicos internos, incluyendo señales de transducción, transcripción o muerte celular programada. La señal de transducción se puede describir como el proceso mediante el cual los componentes celulares reciben información de otros componentes y de afuera de la célula. La exposición ambiental a radiación inicia señalización a través del factor de necrosis tumoral alfa y otros factores que requeridos para la activación del receptor de quinasas <sup>(7)</sup>.

Por su alta reactividad química, los niveles de EOR mayores a los requerimientos celulares, pueden dañar indiscriminadamente la integridad funcional y estructural, por medio de modificación celular del ADN, proteínas y lípidos, o iniciando una cadena de reacciones que pueden extender el daño oxidativo a estas moléculas. Aunque las células tienen una variedad de mecanismo de defensa y de sistemas reparadores ante EOR, no siempre son suficientes. El estrés oxidativo puede relacionarse con el desequilibrio entre la producción de prooxidantes/radicales libres y la defensas antioxidantes. El estrés oxidativo severo se ha implicado con enfermedades degenerativas, como aterosclerosis, diabetes, isquemia, enfermedades inflamatorias, cáncer, enfermedades neurológicas, hipertensión, enfermedades oculares, enfermedades pulmonares y enfermedades hematológicas <sup>(7)</sup>.

### **3.6 Importancia de los antioxidantes y modo de acción:**

El exceso de EOR es generalmente inactivado por moléculas antioxidantes endógenas y exógenas que tienen la habilidad que a concentraciones muy bajas pueden retrasar o inhibir la oxidación de un sustrato. Pueden actuar removiendo o disminuyendo

las concentraciones locales de uno o más de los participantes de una reacción, tales como el oxígeno, EOR, iones metálicos, que catalizan la oxidación, o al interferir con una cadena de reacciones. También pueden realzar las defensas antioxidantes del organismo. Los antioxidantes intervienen en cualquiera de los siguientes pasos: Iniciación, propagación o finalización de los procesos oxidativos <sup>(7)(8)</sup>.

Los antioxidantes se pueden clasificar de acuerdo a su naturaleza química y su modo de acción:

- Enzimas antioxidantes que actúan sobre EOR, luego degradado a formas menos dañinas.
- Antioxidantes preventivos, que actúan al unirse a promotores oxidantes y metales de transición.
- Antioxidantes que atrapan o rompen cadenas.

El aumento del consumo de frutas y vegetales se ha asociado a la protección contra varias enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades cardio y cerebrovasculares <sup>(9)</sup>. Esta asociación es usualmente atribuida a los antioxidantes, tales como la vitaminas C y E, carotenoides, licopenos y flavonoides que previenen el daño de radicales libres <sup>(10)</sup>. En frutas y vegetales abundan los flavonoides y otros compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante que, aunque no constituyen parte del sistema antioxidante endógeno, lo refuerzan.

La aplicación de antioxidantes como el ácido ascórbico para mantener los valores nutricionales y la calidad de los productos alimenticios se ha practicado por décadas en la industria alimenticia, la cual pretende el control de la oxidación lipídica para evitar su enranciamiento. Otros agentes antioxidantes en alimentos son los compuestos fenólicos los cuales tienen propiedades químicas únicas dentro de las que destaca la formación de radicales de baja energía a través de híbridos de resonancia estable. Entre los compuestos fenólicos sintéticos usados como preservante en alimentos destacan hidroxilanol butilado (BHA), dioxidiltolueno butilado (BHT), propil galato (PG), octal galato (OG) y dodecil galato (DG). Sin embargo, dichos compuestos han mostrado ser tóxicos o causa de efectos adversos por lo cual su uso como aditivos en comidas es regulado y controlado <sup>(11)</sup>.

Los derivados polifenólicos en general, y las proantocianidinas inhiben la acción nociva de los radicales libres y se encuentran involucrados en la génesis de diversos procesos patológicos, sus aplicaciones clínicas son variadas. Se ha recomendado una dosis diaria de 50 mg de proantocianidinas para propósitos generales de salud.

### **3.7 Estudios de antioxidantes realizados en Guatemala**

Desde 1996, el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala en colaboración con la Unidad de Investigación y Estudios Integrales sobre Alimentos Autóctonos de la Región (UNIAR) han realizado más de 12 investigaciones sobre actividad antioxidante en especies vegetales y jugos frutales <sup>(12)(13)</sup>, en los cuales se establecieron procedimientos para evaluar la actividad antioxidante por medio de DPPH, la determinación de vitamina C por HPLC y la cuantificación de polifenoles por Folin-Ciocalteu, evaluados por espectrofotometría. Se estudiaron los procedimientos de extracción más eficientes, se optimizaron métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales y se evaluó la actividad antioxidante de unas 20 especies vegetales entre frutas y hierbas comestibles, sobresaliendo la actividad de *Solanum americanum* <sup>(14)(15)</sup>.

#### **IV. JUSTIFICACION**

Guatemala es un país que cuenta con una gran diversidad de especies vegetales nativas, entre las que destacan plantas medicinales, especias, plantas comestibles, frutas y otras; las cuales presentan propiedades beneficiosas muy variadas; dentro de las propiedades beneficiosas está la capacidad antioxidante. Los antioxidantes son un conjunto heterogéneo de sustancias formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales, enzimas y otros compuestos vegetales, que bloquean el efecto dañino de los radicales libres <sup>(5)</sup>.

El uso de especies vegetales, tales como plantas medicinales, especias, plantas comestibles y frutas, con actividad antioxidante científicamente comprobada es una alternativa en la búsqueda de nuevas fuentes de tratamiento de costo reducido y al alcance de toda la población, para disminuir el riesgo de ciertas enfermedades degenerativas causadas por la generación de radicales libres en el organismo.

Por lo anterior se consideró de importancia realizar la investigación de la capacidad antioxidante de diferentes especies vegetales como plantas medicinales, especias, plantas comestibles y frutas que contienen metabolitos secundarios relacionados con esta propiedad y que además son de uso popular por la población guatemalteca, para así contribuir al desarrollo del conocimiento fitofarmacéutico y nutricional del país.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

Generar información química y biológica de 12 especies de plantas nativas usadas como alimento, condimento o medicina para determinar su posible potencial para el desarrollo de nutracéuticos.

### 5.2 Específicos

- 5.2.1 Revisar la información química y biológica en diferentes bases de datos y fuentes especializadas de las especies en estudio.
- 5.2.2 Colectar 12 especies cultivadas y caracterizar la materia prima (determinación botánica, % de humedad, cenizas).
- 5.2.3 Preparar extractos y determinar el rendimiento de 12 especies vegetales no estudiadas que son utilizadas como alimenticias, condimentarias o medicinales.
- 5.2.4 Caracterizar los compuestos fenólicos y grupos químicos más importantes de las especies evaluadas mediante ensayos macrométricos, micrométricos y cromatografía en capa fina (TLC).
- 5.2.5 Determinar y cuantificar el contenido de fenoles totales por medio del método de Folin Ciocalteu en extractos de las especies vegetales.
- 5.2.6 Determinar la actividad antioxidante total por medio del método con 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) en extractos de las especies vegetales.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Universo

Especies vegetales nativas de Guatemala.

### 6.2 Muestra

Materia vegetal seca de *Annona purpurea*, *Annona reticulata*, *Annona cherimolla*, *Chamaedorea tepejilote*, *Cucurbita pepo*, *Lippia graveolens*, *Neurolaena lobata*, *Ocimum micranthum*, *Phlebodium pseudoaureum*, *Pimenta dioica*, *Smilax dominguisensis*, *Yucca elephantipes*.

### 6.3 Recursos

#### 6.3.1 Recursos Humanos

Dina Jocabed Córdova Lemus	Autora
Roxana Maribel Dardón Juárez	Autora
María Cristina Menéndez Leiva	Autora
José Emilio González de León	Autor
Licda. Sully Cruz Velásquez	Asesora
Licda. Aylin Santizo Juárez	Revisora

#### 6.3.2 Recursos Institucionales:

- Biblioteca Central Universidad de San Carlos de Guatemala
- Biblioteca Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.
- Biblioteca Laboratorio de Productos Naturales Farmaya S.A.
- Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.
- Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.
- Laboratorio de Control de Calidad, Farmaya S.A.

- Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica. Departamento de Farmacognosia. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.
- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, (LIPRONAT). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.

## 6.4 Materiales

### 6.4.1 Materia vegetal desecada de:

- *A. cherimolla* (Pulpa)
- *A. purpurea* (Pulpa)
- *A. reticulata* (Pulpa)
- *C. tepejilote* (Inflorescencia)
- *C. pepo* (Pulpa)
- *L. graveolens* (Hoja)
- *N. lobata* (Hoja)
- *O. micranthum* (Hoja)
- *P. pseudoaureum* (Hoja)
- *P. dioica* (Semilla)
- *S. dominguensis* (Rizoma)
- *Y. elephantipes* (Flor)

### 6.4.2 Cristalería

- Asperjadores
- Balones aforados
- Balón con boca esmerilada para Neoclevenger.
- Balones de colecta para rotavapor
- Balones de evaporación para rotavapor
- Cámara cromatográfica
- Capilares graduados (tamaño 0,5 µl)

- Cápsulas de porcelana
- Condensador para rotavapor
- Crisoles
- Cristalizadores
- Erlenmeyers
- Embudos de vidrio
- Frascos de liofilizador
- Micropipetas
- Probetas
- Tubos de ensayo
- Varilla de vidrio
- Vaso de precipitar
- Viales de vidrio
- Vidrio de reloj

#### **6.4.3 Equipo de laboratorio**

- Balanza analítica
- Balanza de humedad
- Baño de María
- Baño de ultrasonido
- Campana de extracción
- Cámara de luz UV
- Centrifugadora
- Destilador tipo Neoclevenger
- Espectrofotómetro de Ultravioleta- Visible
- Espectrofotómetro de placas
- Estufa eléctrica
- Horno de secado
- Incubadora

- Lámpara de Ultravioleta-visible para 254 nm y 365 nm
- Liofilizador
- Mufla
- Potenciómetro
- Rotavapor
- Vortex

#### **6.4.4 Equipo misceláneo**

- Algodón
- Espátulas de metal
- Cromatoplaca de Sílica gel 60F-254
- Licuadora
- Papel aluminio
- Papel encerado
- Papel filtro
- Percoladores
- Pipetas automáticas
- Placas micrométricas de pozo de fondo plano
- Platillos de aluminio para balanza de humedad
- Pinza para crisoles
- Tamices No. 30
- Termómetro

#### **6.4.5 Reactivos**

- Acetato de etilo
- Acido acético glacial
- Acido ascórbico
- Ácido bórico en anhídrido acético
- Acido clorhídrico

- Acido fórmico
- Ácido sulfúrico concentrado
- Acido tricloroacético al 10%
- Agua destilada
- Anisaldehído
- Cloruro de férrico al 10%
- Cloruro de Sodio al 10%
- Estándar de ácido clorogénico
- Estándar de quercetina
- Estándar de rutina
- Etanol al 95%
- Éter de petróleo
- Etil-metil cetona
- Estándar de beta-caroteno
- Estándar de canela en metanol
- Diclorometano
- Difetilboriloxietilamina
- Hemoglobina
- Hidróxido de potasio
- Metanol
- Mentol
- N-butanol
- Polietilenglicol
- Reactivo de DPPH (2-difenil-1-picrilhidrazil)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Revelador de Vainillina-ácido sulfúrico
- Solución amortiguadora de Acetatos
- Solución amortiguadora de Fosfatos 0.2 M
- Solución amortiguadora de Fosfatos 0.05 M

- Solución de carbonato de sodio 700 mM
- Solución de carbonato de sodio al 10%
- Solución de gelatina al 1%
- Solución de gelatina-sal al 1%
- Solución de hexacianoferrato de potasio acuoso al 1%
- Timol
- Tiocianato de amonio al 30%
- Tolueno
- Vainillina
- Xileno

## **6.5 Métodos**

### **6.5.1 Obtención de material vegetal (delimitación de la Población):**

Se recopiló información de cada especie para contar con los estudios biológicos, químicos, farmacológicos y otras informaciones que se consideran relevantes, para la documentación de las doce especies a estudiar. El material fue obtenido de poblaciones cultivadas en condiciones específicas, y fue identificado por un botánico (Herbarios BIGU y del Laboratorio Farmaya).

El modelo de muestreo es de tipo estratificado, preferencial y por conveniencia. Los estratos (asociaciones vegetales homogéneas por cultivo) fueron definidos por contactos previos y coordinación con los productores.

Conforme a la naturaleza de la parte a estudiar para cada especie se obtuvo una muestra representativa de 1,000 g de material vegetal; 50 g de material fue identificado y guardado como muestra de cada población, y el material restante fue sometido a pruebas de laboratorio (estudio fitoquímico y evaluación de actividad antioxidante). Las muestras

fueron procesadas conforme a técnicas convencionales de secado y molienda. El almacenamiento, embalaje y transporte se realizó conforme a los principios aceptados de buenas prácticas de cultivo y poscosecha.

### **6.5.2 Preparación de extractos crudos de cada especie:**

Para la obtención del extracto de güicoy y las diferentes especies de anonas, fue necesario realizar una extracción en fresco, debido a que la materia vegetal a utilizar es la pulpa debe recibir el siguiente tratamiento:

Para la preparación del extracto a partir de la muestra fresca, se pesó 10 g de la fruta y homogenizó en mortero con 50 ml de metanol. Lo anterior se colocó en un erlenmeyer de borde esmerilado. Se saturó la atmósfera de nitrógeno gaseoso. Se agitó por dos horas utilizando un agitador magnético, asegurándose de proteger la muestra de la luz directa. Se filtró utilizando embudo y papel filtro, luego se repitieron las extracciones con fracciones de 25 ml hasta que el extracto obtenido fue incoloro. Se midió el volumen de cada extracto (15)

Se realizó una extracción por percolación de los materiales que se utilizaron secos, de la siguiente manera: Se pesaron 200 g de material vegetal seco y se colocaron húmedos en un percolador, se agregó el disolvente y se realizó una percolación durante 5 días con recambios diarios del disolvente hasta que la extracción fue exhaustiva; el mensturo extraído se reconcentró a presión reducida a una temperatura inferior a los 45°C en un rotavapor con recuperación del disolvente. El extracto obtenido se secó sobre sílica gel y se almacenó en condiciones correctas para su preservación.

### **6.5.3 Caracterización química:**

Se realizó con pruebas convencionales de tamizaje fitoquímico (escala semimicro, usando pruebas específicas para caracterizar flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, aceites volátiles, taninos, polifenoles) y mediante TLC (Cromatografía en capa fina), usando para la visualización y caracterización de los metabolitos reactivos cromógenos universales (vainillina- $H_2SO_4$  y anisaldehído) y específicos para grupos

funcionales (que en general son los mismos que para el tamizaje semimicro). Se realizó una réplica de cada ensayo por cada especie <sup>(15)(16)(17)(18)(20)</sup>.

**a. Investigación de flavonoides y antocianinas** (ensayos macro y semimicro):

Extraer 3 g de material pulverizado con 10 mL de metanol al 80%, filtrar y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30 mL de metanol al 80%, filtrar y dividir en 7 tubos:

Tubo 1: agregar 0.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

Tubo 2: agregar 3 a 5 gotas de FeCl<sub>3</sub> al 10% (p/v).

Tubo 3: agregar 0.5 mL de HCl y calentar en baño de María por 5 min (leucoantocianinas).

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5 mL de HCl concentrado.

Tubo 5: agregar un álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: agregar solución de ácido bórico en anhídrido acético.

Tubo 7: testigo.

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavononas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración <sup>(16)</sup>.

*Confirmación por cromatografía en capa fina:* Extraer 1 g de material pulverizado con 10 mL de metanol por 5 min en baño de María a 60°C; filtrar y aplicar sobre cromatoplasmas de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Como estándar usar solución de flavonoides (quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido) al 0.05% en metanol (10 µL). Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50); acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-etilmetilcetona-agua (50:7:3:30:10). Detección: Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo de la estructura, fluorescen amarillo, azul o verde <sup>(16)</sup>.

**b. Investigación de taninos (Ensayos macro y semimicro):**

Extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80%, filtrar y evaporar a sequedad. Añadir 25 mL de agua caliente al residuo y agitar con varilla y dejar enfriar. Agregar 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10% y filtrar. Adicionar 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: testigo.

Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1% (p/v).

Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1% de gelatina y NaCl al 10%).

Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10% (p/v).

Observar la formación de precipitado y/o cambio de coloración. Con  $\text{FeCl}_3$ : grisáceo-negro: catecol; negro-azulado: pirogalol <sup>(16)</sup>.

**c. Investigación de aceites volátiles (TLC):**

Método A: Extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano agitando por 15 min. Filtrar y evaporar en baño de María (60°C) a sequedad. Disolver en 1 mL de tolueno y aplicar 20-50  $\mu\text{L}$  en cromatoplaca de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

Método B: Pesar 50 g de material vegetal y extraer los aceites esenciales por medio de Neoclevenger. Recolectar el aceite en pentano. Diluir la solución de aceite con tolueno 1:5 o si es muy concentrada 1:10 y aplicar 5  $\mu\text{L}$  (1:10) en cromatoplaca de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3  $\mu\text{L}$ ). Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7). Detección: anisaldehído- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , vanillina-  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible <sup>(16)</sup>.

**d. Investigación de cumarinas (ensayos macro y semi-micro):** Medir 5 mL de extracto metanólico; agregar 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro; a una mancha agregar 1 gota de KOH 0.5N. Observar en luz UV de 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

*Confirmación por cromatografía en capa fina:* A 1 g de muestra adicionar 10 mL de metanol y calentar 30 min en baño de María; filtrar y evaporar hasta 1 mL. Aplicar 20 µL en una cromatoplaque de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Utilizar como estándar canela en metanol al 1% (umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina). Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7); tolueno-éter (1:1 saturado con 10% de ácido acético, 50 mL de tolueno y 50 mL de éter se mezclan por 5 min con 50 mL de ácido acético al 10%, se filtra, se descarta la fase de abajo y se usa la mezcla de tolueno-éter). Detección: Sin tratamiento químico UV 254 nm fluorescencia. UV 365 nm todas las cumarinas muestras una intensa fluorescencia azul o verde-azul. Solución etanólica de KOH al 5-10%. UV-365 nm fluorescencia azul o verde <sup>(16)</sup>.

#### **e. Investigación de antraquinonas**

Prueba de Bornträger: Extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar en baño de maría (60°C). Disolver el residuo con 30 mL de agua destilada y filtrar. Extraer con 10 mL de benceno. A la fase bencénica añadir 5 mL de solución de test de amonio y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo). Prueba de Bornträger modificado: Calentar 0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento y calentar 10 minutos en baño de maría a 60°C. Añadir 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Extraer con 10 mL de benceno. A la capa bencénica adicionar 5 mL de solución de prueba de amonio y agitar. Observar cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: positivo) <sup>(16)</sup>.

*Cromatografía en capa fina:* Extraer 0.5 g de material vegetal seco pulverizado con 5 mL de metanol en baño maría (60°C) por 5 minutos. Filtrar y aplicar 10 µL en la cromatoplaque de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

Estándar: solución al 0.1 por ciento en metanol de antraquinonas (10 µL). (Aloína, flangulina A/B, glucofrangulina A/B y sus agliconas, reina, aloe-emodina, extracto

de sen) Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10).

Detección:

Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm fluorescencia amarilla o rojo-café. Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento.

Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV-365 nm.

Antronas y antranolas: zona amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm.

#### **6.5.4 Evaluación de la actividad antioxidante**

##### **a. Método de TLC:**

Aplicar 10  $\mu$ L de muestra y 5  $\mu$ L del estándar antioxidante (Beta-caroteno, Rutina, Quercetina) en una placa cromatográfica de silica gel 60F<sub>254</sub>. Colocar la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo:ácido acético:ácido fórmico:agua (100:11:11:26). Secar y asperjar con DPPH (1mg/mL en metanol).

-*Resultados*: Si los extractos presentan actividad antioxidante se observará la decoloración del DPPH en las bandas respectivas <sup>(21)</sup>.

#### **6.5.5 Determinación de los compuestos fenólicos (técnica macrométrica):**

- Preparación de los tubos de reacción y de la curva de lectura: Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran las sustancias contenidas en el agua del chorro <sup>(15)</sup>.

- Preparar una serie de tubos que contengan los reactivos que se citan a continuación:

	H <sub>2</sub> O (ml)	Acido gálico (μL) Sol. 1 μg/10μL	Reactivo Folin-Ciocalteu (ml)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10% (ml)
Blanco	4.000	0	0.4	0.8
Patron 1	3.975	25	0.4	0.8
Patron 2	3.950	50	0.4	0.8
Patron 3	3.900	100	0.4	0.8
Patron 4	3.850	150	0.4	0.8
Patron 5	3.800	200	0.4	0.8
Patron 6	3.750	250	0.4	0.8
<b>Muestra:</b>				
Muestra 1 a	3.950	50	0.4	0.8
Muestra 1 b	3.900	100	0.4	0.8

**Nota:** Los tubos muestra 1 a y muestra 1 b contienen la misma muestra con distintos volúmenes y se agitan en un vortex durante 30 segundos, luego incubar en baño de maría en un rango de 90-100° C por 1 minuto. Dejar enfriar y leer la absorbancia a 765 nm.

- Para realizar los cálculos obtener la media de las absorbancias de la muestra; luego determinar la concentración de la muestra utilizando la ecuación de la línea recta, despejando “x”. El resultado así obtenido se utiliza para calcular los μg equivalentes de ácido gálico / mg peso seco. El cálculo se realiza de la siguiente forma:

**μg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto =**

$[(\text{Concentración obtenida en base a la curva}/0.05) * (\text{peso alícuota}/\text{volumen reconstitución}) * 1000] * \text{Dilución}$

**Concentración en base a la curva:** Absorbancia – Intersecto/Pendiente

**μg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto seco =**

$[(\mu\text{g equivalentes de ácido gálico}/\text{g de extracto}) * (1/1 - \% \text{ Humedad de extracto seco})]$

### 6.5.6. Determinación de los compuestos fenólicos (técnica micrométrica):

#### a. Preparación de las soluciones

- **Solución de Carbonato de Sodio anhidro (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 700mM):** Pesar en balanza analítica 200g de carbonato de sodio anhidro con una espátula plástica y disolver en 800 ml de agua desmineralizada. Agitar la solución y conservar en un recipiente color ámbar <sup>(22)</sup>.

- **Solución de ácido gálico anhidro ( $C_7H_6O_5$ ):** Pesar 0.500 g de ácido gálico anhidro en una balanza analítica y disolver en 10 mL de etanol; aforar con agua desmineralizada en un balón de 100 mL. Conservar en un frasco color ámbar <sup>(22)</sup>.

**b. Preparación de los pozos de la placa de reacción y de la curva de lectura**

Utilizar placas de fondo plano con pozos con capacidad de 400  $\mu$ L, nuevas, para realizar la curva de calibración estándar controles y muestra, para lo cual se deben verter los reactivos como se establece en la siguiente Tabla:

Identificación de Pozo		Agua desmineralizada ( $\mu$ L)	Soluciones estándar de ácido gálico ( $\mu$ L)	Reactivo Folin-Ciocalteu ( $\mu$ l)	$Na_2CO_3$ [700mM] ( $\mu$ l)
A	Blanco	25	0	50	200
B	Estándar [50 $\mu$ M]	0	25	50	200
C	Estándar [250 $\mu$ M]	0	25	50	200
D	Estándar [500 $\mu$ M]	0	25	50	200
E	Estándar [1000 $\mu$ M]	0	25	50	200
F	Estándar [1500 $\mu$ M]	0	25	50	200
G	Estándar [2000 $\mu$ M]	0	25	50	200
H	Estándar [2500 $\mu$ M]	0	25	50	200
2A	Control 1	0	25	50	200
2B	Control 2	0	25	50	200

Agitar la placa en un vortex durante 30 segundos y luego incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 horas. Leer la absorbancia a 640 nm en espectrofotómetro de placas. Realizar este ensayo en duplicado. En días alternos. Plotear la curva de concentración estándar colocando en el eje de las abscisas concentración de los estándares y en el eje de las ordenadas la lectura registrada. Aplicar regresión lineal a la curva realizada. Determinar la concentración de las muestras por medio de la regresión lineal realizando un promedio de las lecturas. Se realizará una serie de 10 repeticiones por cada especie <sup>(22)</sup>. Realizar los cálculos siguientes:

**µg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto =**

$[(\text{Concentración obtenida en base a la curva}/0.025) * (\text{peso alícuota}/\text{volumen reconstitución}) * 1000] * \text{Dilución}$

**Concentración en base a la curva:** Absorbancia – Intersecto/Pendiente

**µg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto seco =**

$[(\mu\text{g equivalentes de ácido gálico/ g de extracto}) * (1/1 - \% \text{ Humedad de extracto seco})]$

### **6.5.7 Determinación de actividad antioxidante total por medio del reactivo de DPPH (técnica macrométrica):**

Se prepara el extracto a ensayar pesando aproximadamente 0.1 g de extracto seco, luego se procede a diluirlo en 5 mL de metanol, y finalmente se agita vigorosamente hasta diluir completamente el extracto.

**a. Preparación de los tubos de reacción:** Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran las sustancias contenidas en el agua del chorro. Los tubos se recubren completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C. Se prepara una serie de tubos que contienen los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Blanco Control	Control	Blanco de ensayo	Ensayo
Buffer de acetatos	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Metanol	2 ml	1.5 ml	1.9 ml	1.4 ml
Solución de DPPH	--	0.5 ml	--	0.5 ml
Muestra	--	--	0.1 ml	0.1 ml

Los tubos preparados de esta forma se agitan en un vortex durante 30 segundos y luego se incuban a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Se leen a una longitud de onda de 517nm. Siempre debe leerse la absorbancia del control y del ensayo versus el blanco respectivo. Realizar este ensayo en duplicado <sup>(15)</sup>.

**b. Preparación de la curva de lectura:** Se realiza una serie de diluciones del extracto de la siguiente forma, conservando siempre las mismas proporciones:

Extracto	Metanol	Dilución
1	4	0.2
2	3	0.4
3	2	0.6
4	1	0.8
5	0	1.0

Las mediciones de cada una de estas diluciones se realiza siguiendo el paso anterior en el que se cita como se preparan los tubos de reacción. Cada dilución corresponde a una muestra. Realizar cada uno de los ensayos de las diluciones en duplicado <sup>(15)</sup>.

Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \%$$

Absorbancia del control = Absorbancia del Control – Absorbancia del Blanco Control

Absorbancia del ensayo = Absorbancia del Ensayo – Absorbancia del Blanco respectivo

Luego con los valores de % de inhibición de la curva de lectura (Y) y la concertación aproximada (X) se procede a realizar la regresión lineal y calcular el valor de  $r^2$ , el cual debe ser preferiblemente lo mas cercano a 1 para tomar como valida la curva realizada, de lo contrario se deberá realizar nuevamente el ensayo, hasta obtener un valor de  $r^2$  adecuado.

Realizar los siguientes cálculos para obtener la actividad antioxidante total:

Para extractos secos:

IC<sub>50</sub>: 50 % - pendiente

Intersecto

mg de materia vegetal seca:

$$\frac{(\text{Peso alícuota/ ml reconstitución}) * 1000}{1} * \text{IC}_{50}$$

mg de extracto:

$$\frac{\text{mg materia vegetal seca}}{\text{Dilución}}$$

mg de extracto seco:

$$\text{mg extracto} - [(\text{mg Extracto}/100) * \% \text{ Humedad}]$$

### **6.5.8 Determinación de actividad antioxidante total por medio del reactivo de DPPH (técnica micrométrica):**

Se prepara el extracto a ensayar pesando aproximadamente 0.1 g de extracto seco, luego se procede a diluirlo en 6 mL de metanol, y finalmente se agita vigorosamente hasta diluir completamente el extracto.

**a. Preparación de los pozos de reacción:** Utilizar microplacas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos a utilizar deben ser nuevos. La preparación de las placas se realiza bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C.

Se prepara una serie de pozos que contienen los reactivos que se citan a continuación (todas las mediciones de volumen se realizan con pipetas automáticas):

<b>Pozo</b> \ <b>Reactivo</b>	<b>Muestra</b>	<b>Metanol</b>	<b>Solución de DPPH (500µM)</b>
Blanco Control	---	X	---
Control	---	---	X
Blanco de Ensayo	X	---	---
Ensayo	X	---	X

Antes de proceder a realizar la curva de lectura se procede a realizar una lectura directa del extracto, de la siguiente forma:

		<b>Muestra (µL)</b>	<b>Metanol (µL)</b>	<b>Solución de DPPH (500µM)</b>
<b>Blanco Control</b>		---	50	---
<b>Control</b>		---	---	150
<b>A</b>	<b>Blanco</b>	50	---	---
	<b>Ensayo</b>	50	---	150
<b>B</b>	<b>Blanco</b>	15	35	---
	<b>Ensayo</b>	15	35	150

Se realizan los cálculos de % de inhibición y si se obtiene un porcentaje de inhibición de aproximadamente 70% - 10% (mayor y menor concentración respectivamente) se procede a realizar la curva de lectura como se indica; si se obtienen valores mayores a los ya mencionados se procederá a realizar diluciones a partir del extracto y con cada una realizar la lectura directa hasta obtener % de inhibición adecuados y luego proceder a realizar la curva de lectura con la dilución que presente el % de inhibición adecuado.

**b. Preparación de la curva de lectura:** se prepara una curva de lectura con 8 pozos de reacción utilizando para cada pozo el blanco respectivo. La muestra y reactivos para cada pozo siguen las siguientes proporciones:

	Pozo	Muestra (μL)	Metanol (μL)	Solución de DPPH (500μM)	Concentración aproximada
	<b>Blanco Control</b>	---	50	---	-----
	<b>Control</b>	---	---	150	
<b>1</b>	<b>Blanco 1</b>	50	---	---	1
	<b>Ensayo 1</b>	50	---	150	
<b>2</b>	<b>Blanco 2</b>	45	5	---	0.9
	<b>Ensayo 2</b>	45	5	150	
<b>3</b>	<b>Blanco 3</b>	40	10	---	0.8
	<b>Ensayo 3</b>	40	10	150	
<b>4</b>	<b>Blanco 4</b>	35	15	---	0.7
	<b>Ensayo 4</b>	35	15	150	
<b>5</b>	<b>Blanco 5</b>	30	20	---	0.6
	<b>Ensayo 5</b>	30	20	150	
<b>6</b>	<b>Blanco 6</b>	25	25	---	0.5
	<b>Ensayo 6</b>	25	25	150	
<b>7</b>	<b>Blanco 7</b>	20	30	---	0.4
	<b>Ensayo 7</b>	20	30	150	
<b>8</b>	<b>Blanco 8</b>	15	35	---	0.3
	<b>Ensayo 8</b>	15	35	150	

La microplaca se agita en un vortex para placas durante 30 segundos y luego se incuba a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Se lee en lector de microplacas de 96 pozos a una longitud de onda de 490 nm.

Para calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los pozos de reacción se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del ensayo}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ Inhibición}$$

Absorbancia del control = Absorbancia del Control – Absorbancia del Blanco Control  
Absorbancia del ensayo = Absorbancia del Ensayo – Absorbancia del Blanco respectivo

Luego con los valores de % de inhibición de la curva de lectura (Y) y la concentración aproximada (X) se procede a realizar la regresión lineal y calcular el valor de  $r^2$ , el cual debe ser preferiblemente lo mas cercano a 1 para tomar como valida la curva realizada, de lo contrario se deberá realizar nuevamente el ensayo, hasta obtener un valor de  $r^2$  adecuado. Realizar los cálculos siguientes:

**IC<sub>50</sub>:** 50 % - pendiente  
**Intersecto**

**mg de materia vegetal seca:**

$$\frac{(\text{Peso alícuota/ ml reconstitución}) * 1000}{1} * \text{IC}_{50}$$

**mg de extracto:**

$$\frac{\text{mg materia vegetal seca}}{\text{Dilución}}$$

**mg de extracto seco:**

$$\text{mg extracto} - [(\text{mg Extracto}/100) * \% \text{ Humedad}]$$

## 6.6 Diseño de la investigación

Se realizó un estudio observacional tipo descriptivo.

## **6.7 Diseño estadístico**

Descripción de datos para organizar, resumir y analizar.

Se realizó un muestreo no probabilístico a conveniencia de las distintas especies vegetales. A continuación se detalla el número de réplicas realizadas para cada ensayo: Una réplica por especie para la extracción, determinación del porcentaje de extracción y tamizaje fitoquímico debido a conveniencia y limitaciones. Se realizaron 10 réplicas por especie de los siguientes ensayos tanto en macro como en micrométrico: determinación del contenido de fenoles y determinación de actividad antioxidante total por medio del reactivo de DPPH. Para estos últimos se calcularon las medidas de tendencia central (promedio) y medidas de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación).

## VII. RESULTADOS

**7. 1. Recolección e Identificación Botánica de las especias vegetales:** En la tabla No.1 se pueden observar los datos generales sobre la procedencia y parte de la planta recolectada que se utilizó para obtener los extractos necesarios para las pruebas de capacidad antioxidante. Es de importancia incluir las coordenadas geográficas para establecer las condiciones climáticas en las cuales se encontraron las especias vegetales y el número de herbario para confirmar la identidad botánica de la planta.

*Tabla No. 1: Recolección de material vegetal e identificación botánica*

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta recolectada	Cantidad de materia vegetal recolectada	Estado	Procedencia	Coordenadas Geográficas	Número de Herbario*
<i>Annona cherimolla</i>	Anona	Fruto	1.5 Kg	Fresco	San Bartolomé Milpas Altas Sacatepéquez	Lat. 14°36'9.72" N Long. 90°40'12.47" O	1013
<i>Annona purpurea</i>	Anona	Fruto	2.0 Kg	Fresco	Samayac, Suchitepéquez	Lat. 14°33'49.3" N Long. 91°27'28.2" WO	1052
<i>Annona reticulata</i>	Anona	Fruto	1.0 Kg	Fresco	Asunción Mita, Jutiapa	Lat. 14°19'58" N Long. 89°42'34" WO	1051
<i>Chamaedorea tepejilote</i>	Pacaya	Inflorescencia	0.5 Kg	Seca	Salamá, Baja Verapaz	Lat. 15°06'05" N Long. 90°19'7" O	1045
<i>Cucurbita pepo</i>	Güicoy	Fruto	1.5 Kg	Fresco	San Juan, Sacatepéquez	Lat. 14°43'09" N Long. 90°38'25" O	1047
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	Hojas	1.0 Kg	Seca	Samayac, Suchitepéquez	Lat. 14°33'05" N Long. 91°28'15" WO	1083
<i>Neurolaena lobata</i>	Tres Puntas	Hojas	1.0 Kg	Seca	Samayac, Suchitepéquez	Lat. 14°33'37" N Long. 91°28'17" WO	482
<i>Ocimum micranthum</i>	Albahaca de Monte	Hojas	1.0 Kg	Seca	Samayac, Suchitepéquez	Lat. 14°33'07" N Long. 91°27'14" WO	723
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Calahuala	Hojas	1.0 Kg	Seca	San José Pinula, Guatemala	Lat. 14°32'41.5" N Long. 90°24'47.4" O	1039
<i>Pimenta dioica</i>	Pimienta gorda	Fruto	1.0 Kg	Seca	Salamá, Baja Verapaz	Lat. 15°06'10" N Long. 90°19'30" O	1050
<i>Smilax dominguisis</i>	Zarzaparrilla	Hojas	1.0 Kg	Seca	Samayac, Suchitepéquez	Lat. 14°33'37" N Long. 91°28'15" WO	662
<i>Yucca elephantipes</i>	Izote	Inflorescencia	0.5 Kg	Seca	San Juan, Sacatepéquez	Lat. 14°43'14.1" N Long. 90°38'34.53" O	1046

\* Fuente: Datos Experimentales

\*Herbario del Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA S.A.

**7. 2. Pruebas fisicoquímicas:** En la tabla No.2 se describe las pruebas fisicoquímicas realizadas en la materia vegetal, útiles para obtener una idea general de la calidad de las muestras utilizadas en las diversas pruebas.

**Tabla No. 2: Pruebas fisicoquímicas realizadas en la materia vegetal**

Nombre científico	Nombre común	Humedad (%) <sup>1</sup>	Cenizas totales (%) <sup>2</sup>	Prueba de Mejor Solvente	
				Sólidos totales (%)	Mejor solvente de extracción
<i>Annona cherimolla</i>	Anona	N/A	N/A	N/A	Etanol 95%
<i>Annona purpurea</i>	Anona	N/A	N/A	N/A	Etanol 95%
<i>Annona reticulata</i>	Anona	N/A	N/A	N/A	Etanol 95%
<i>Chamaedorea tepejilote</i>	Pacaya	7.93	3.56	1.67	Etanol 95%
<i>Cucurbita pepo</i>	Güicoy	N/A	N/A	N/A	Etanol 95%
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	5.45	4.46	2.56	Etanol 95%
<i>Neurolaena lobata</i>	Tres Puntas	5.87	3.76	0.49	Etanol 70%
<i>Ocimum micranthum</i>	Albahaca de Monte	8.43	4.86	2.06	Etanol 95%
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Calahuala	6.25	3.40	1.78	Etanol 50%
<i>Pimenta dioica</i>	Pimienta gorda	7.35	4.30	2.45	Etanol 50%
<i>Smilax dominguensis</i>	Zarzaparrilla	8.50	4.45	3.45	Etanol 70%
<i>Yucca elephantipes</i>	Izote	6.75	4.78	4.84	Etanol 50%

\* Fuente: Datos Experimentales

<sup>1</sup> Valores aceptables de humedad: Menor al 10 %.

<sup>2</sup> Valores aceptables de cenizas totales: Menor al 5 %.

\* N/A: no aplica

**7.3 Proceso de extracción utilizando concentración por medio de rotavapor y maceración cinética:** En la Tabla No.3 se describen los resultados obtenidos durante el proceso de extracción utilizando rotavapor y el rendimiento de este proceso. En la Tabla No.4 se observan los resultados de las especies vegetales sometidas al proceso de maceración cinética para extracción de metabolitos secundarios, así mismo incluye los resultados obtenidos en la prueba de secado hasta alcanzar un peso constante, obtenido a partir de un gramo de muestra.

**Tabla No. 3:** Proceso de extracción por medio de rotavapor utilizando etanol como disolvente

Nombre científico	Nombre común	Tintura		Extracto seco (g)	% Rendimiento de extracción	Humedad de Extracto seco (%)
		Material vegetal (g)	Cantidad de solvente (L)			
<i>C. tepejilote</i>	Pacaya	200	2.0	15.83	7.92	6.89
<i>L. graveolens</i>	Orégano	200	2.0	31.05	15.52	6.06
<i>N. lobata</i>	Tres Puntas	200	2.0	8.25	4.12	6.14
<i>O. micranthum</i>	Albahaca de Monte	150	2.0	11.91	7.94	12.19
<i>P. pseudoaureum</i>	Calahuala	200	2.0	13.2	6.60	11.49
<i>P. dioica</i>	Pimienta gorda	200	2.0	48.65	24.32	11.24
<i>S. dominguensis</i>	Zarzaparrilla	200	2.0	28.27	14.13	9.16
<i>Y. elephantipes</i>	Izote	200	2.0	26.54	13.27	11.89

\* Fuente: Datos Experimentales

**Tabla No. 4:** Proceso de extracción por medio de maceración cinética utilizando etanol como disolvente

	Materia fresca para macerado (g)	Volumen total de macerado (ml)	Peso constante de un gramo de muestra
<i>A. reticulata</i>	10.00	240	0.2953
<i>A. cherimolla</i>	10.00	165	0.2993
<i>A. purpurea</i>	10.00	160	0.4117
<i>C. pepo</i>	10.00	141	0.1030

\* Fuente: Datos Experimentales

**7.4 Caracterización química:** Esta sección comprende los ensayos de tamizaje fitoquímico de los metabolitos que poseen un grupo fenol dentro de su estructura química, ya que este grupo es el causante de la acción antioxidante de las especies vegetales. En las Tablas No. 5 al 13 se detallan los resultados obtenidos en cada una de las pruebas.

**Tabla No.5: Prueba macrométrica para Flavonoides y Antocianinas**

Muestra Reactivo	Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Cloruro férrico (FeCl <sub>3</sub> )	Ácido clorhídrico (HCl)+ calor	Magnesio metálico + HCl	Álcali	Resultado
<i>A. cherimolla</i>	-	-	-	-	-	Negativo
<i>A. purpurea</i>	-	-	-	-	-	Negativo
<i>A. reticulata</i>	-	-	-	-	-	Negativo
<i>C. tepejilote</i>	-	-	+	-	+	<b>Positivo</b>
<i>C. pepo</i>	-	-	+	-	-	<b>Positivo</b>
<i>L. graveolens</i>	-	-	-	-	+	<b>Positivo</b>
<i>N. lobata</i>	-	-	-	-	-	Negativo
<i>O. micranthum</i>	-	-	-	-	-	Negativo
<i>P. pseudoaureum</i>	-	-	+	-	-	<b>Positivo</b>
<i>P. dióica</i>	-	-	-	-	-	Negativo
<i>S. dominguensis</i>	-	+	+	-	+	<b>Positivo</b>
<i>Y. elephantipes</i>	-	-	+	-	+	<b>Positivo</b>

\* Fuente: Datos Experimentales

(+) indica cambios de color y formación de precipitado comparado con el testigo.

(Ver Anexo No. 3, Fotografía No. 13)

**Tabla No 6: Determinación de Flavonoides y Antocianinas por medio de Cromatografía en Capa Fina**

<b>Muestra</b>	<b>No. de Bandas</b>	<b>Valor Rf</b>	<b>Coloración UV de la Banda</b>	<b>Resultado</b>
Estándar de Quercetina	1	0.83	Amarillo	<b>Positivo</b>
Estándar de Rutina	1	0.75	Amarillo	<b>Positivo</b>
Estándar de Hiperósido	1	0.72	Amarillo	<b>Positivo</b>
Estándar de ácido clorogénico	1	0.52	Amarillo	<b>Positivo</b>
<i>A. cherimolla</i>	--	--	--	Negativo
<i>A. purpurea</i>	--	--	--	Negativo
<i>A. reticulata</i>	3	0.18, 0.28, 0.46	Amarillo, Amarillo, Amarillo	<b>Positivo</b>
<i>C. tepejilote</i>	3	0.46, 0.67, 0.73	Amarillo, Azul, Azul	<b>Positivo</b>
<i>C. pepo</i>	--	--	--	Negativo
<i>L. graveolens</i>	3	0.52, 0.70, 0.87	Amarillo, Amarillo, Amarillo	<b>Positivo</b>
<i>N. lobata</i>	2	0.78, 0.84	Amarillo, Verde	<b>Positivo</b>
<i>O. micranthum</i>	4	0.46, 0.55, 0.72, 0.88	Amarillo, Verde, Amarillo, Verde	<b>Positivo</b>
<i>P. pseudoaureum</i>	5	0.28, 0.49, 0.57, 0.72, 0.79	Verde, Amarillo, Verde, Amarillo, Amarillo	<b>Positivo</b>
<i>P. dioica</i>	2	0.67, 0.82,	Amarillo, Amarillo,	<b>Positivo</b>
<i>S. dominguensis</i>	3	0.58, 0.75, 0.87	Verde, Amarillo, Verde	<b>Positivo</b>
<i>Y. elephantipes</i>	3	0.46, 0.67, 0.73	Amarillo, Azul, Azul	<b>Positivo</b>

\*Fuente: Datos experimentales

Fase móvil: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial-agua (100:11:11:27)

Detección: reactivo de Productos Naturales (NP/PEG).

Fluorescencia azul o amarilla. Dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

(Ver Anexo No. 3, Fotografía No. 14)

**Tabla No. 7: Determinación macrométrica para Taninos**

<b>Muestra</b>	<b>Gelatina 1%</b>	<b>Gelatina-Sal</b>	<b>FeCl<sub>3</sub> 10%</b>	<b>Resultado</b>
<i>A. cherimolla</i>	-	-	-	Negativo
<i>A. purpurea</i>	-	-	-	Negativo
<i>A. reticulata</i>	-	-	-	Negativo
<i>C. tepejilote</i>	-	-	-	Negativo
<i>C. pepo</i>	-	-	-	Negativo
<i>L. graveolens</i>				Negativo
<i>N. lobata</i>	-	-	-	Negativo
<i>O. micranthum</i>	-	-	-	Negativo
<i>P. pseudoaureum</i>	-	-	-	Negativo
<i>P. dioica</i>	-	-	+	Negativo
<i>S. dominguensis</i>	+	+	+	<b>Positivo</b>
<i>Y. elephantipes</i>	-	-	-	Negativo

\* Fuente: Datos Experimentales

(+) Formación de precipitado y/o cambio de coloración.

(Ver Anexo No. 3, Fotografía No. 15)

**Tabla No. 8: Determinación Aceites Volátiles por medio de Cromatografía en Capa Fina**

<b>Muestra</b>	<b>No. de Bandas</b>	<b>Valor Rf</b>	<b>Coloración UV de la Banda</b>	<b>Resultado</b>
Estándar de citral	2	0.07, 0.24	Azul, Verde	<b>Positivo</b>
Estándar de limoneno	8	0.14,0.23, 0.35,0.42, 0.49,0.59, 0.70, 0.87	Verde, Rojo, Azul, Azul, Azul, Verde, Azul, Morado.	<b>Positivo</b>
<i>A. cherimolla</i>	6	0.13, 0.20 0.25, 0.35, 0.40, 0.51	Azul, Violeta, Violeta, Azul, Violeta, Violeta	<b>Positivo</b>
<i>A. purpurea</i>	5	0.20, 0.30, 0.46, 0.86, 0.93	Azul, Azul, Azul, Violeta, Violeta	<b>Positivo</b>
<i>A. reticulata</i>	4	0.07, 0.25, 0.36, 0.48	Violeta, Violeta, Azul, Violeta	<b>Positivo</b>
<i>C. tepejilote</i>	5	0.28, 0.34, 0.46, 0.84, 0.94	Azul, Azul, Azul, Azul, Violeta	<b>Positivo</b>
<i>C. pepo</i>	--	--	--	Negativo
<i>L. graveolens</i>	9	0.08 0.13, 0.22, 0.25, 0.30, 0.35, 0.42, 0.52, 0.58	Azul, Rojo, Verde, Azul, Verde, Azul, Azul, Verde, Verde	<b>Positivo</b>
<i>N. lobata</i>	7	0.16, 0.23, 0.40, 0.48, 0.55, 0.62, 0.93	Café, Violeta, Verde, Verde, Verde, Verde, Violeta	<b>Positivo</b>
<i>O. micranthum</i>	10	0.19 0.26, 0.32, 0.36, 0.40, 0.45, 0.52, 0.58, 0.65, 0.93	Azul, Azul, Verde, Azul, Verde, Azul, Verde, Verde, Violeta, Violeta	<b>Positivo</b>
<i>P. pseudoaureum</i>	5	0.23, 0.36, 0.52, 0.59, 0.94	Violeta, Violeta, Verde, Verde, Violeta	<b>Positivo</b>
<i>P. dioica</i>	2	0.22, 0.36	Azul, Azul	<b>Positivo</b>
<i>S. dominguensis</i>	1	0.93	Violeta	<b>Positivo</b>
<i>Y. elephantipes</i>	3	0.26, 0.84, 0.96	Violeta, Azul, Violeta	<b>Positivo</b>

\* Fuente: Datos Experimentales

Fase móvil: Tolueno:Acetato de Etilo (93:7)

Detección: Vainillina - ácido sulfúrico.

Zonas azules, verdes, violetas, rojas y cafés en visible.

(Ver Anexo No. 3, Fotografía No. 16)

**Tabla No. 9: Determinación macrométrica para Cumarinas**

<b>Muestra</b>	<b>Fluorescencia con KOH 0.5 N</b>	<b>Resultado</b>
<i>Annona cherimolla</i>	-	Negativo
<i>Annona purpurea</i>	-	Negativo
<i>Annona reticulata</i>	-	Negativo
<i>Chamaedorea tepejilote</i>	-	Negativo
<i>Cucurbita pepo</i>	-	Negativo
<i>Lippia graveolens</i>	+	<b>Positivo</b>
<i>Neurolaena lobata</i>	-	Negativo
<i>Ocimum micranthum</i>	-	Negativo
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	-	Negativo
<i>Pimenta dioica</i>	-	Negativo
<i>Smilax dominguensis</i>	+	<b>Positivo</b>
<i>Yucca elephantipes</i>	-	Negativo

\* Fuente: Datos Experimentales

(+): Fluorescencia azul o verde.

KOH: Hidróxido de potasio

**Tabla No. 10: Determinación de Cumarinas por medio de Cromatografía en Capa Fina**

<b>Muestra</b>	<b>No. de Bandas</b>	<b>Valor Rf</b>	<b>Coloración UV de la Banda</b>	<b>Resultado</b>
Estándar Umbeliferona	1	0.15	Azul	<b>Positivo</b>
Estándar de Ácido p- cumárico	1	0.15	Azul	<b>Positivo</b>
Estándar de cumarinas	2	0.18, 0.52	Azul, Verde	<b>Positivo</b>
<i>A. cherimolla</i>	---	---	---	Negativo
<i>A. purpurea</i>	---	---	---	Negativo
<i>A. reticulata</i>	---	---	---	Negativo
<i>C. tepejilote</i>	---	---	---	Negativo
<i>C. pepo</i>	---	---	---	Negativo
<i>L. graveolens</i>	1	0.52	Verde	<b>Positivo</b>
<i>N. lobata</i>	---	---	---	Negativo
<i>O. micranthum</i>	---	---	---	Negativo
<i>P. pseudoaureum</i>	---	---	---	Negativo
<i>P. dioica</i>	---	---	---	Negativo
<i>S. dominguensis</i>	---	---	---	Negativo
<i>Y. elephantipes</i>	---	---	---	Negativo

\* Fuente: Datos Experimentales

Fase móvil: Tolueno- Acetato de etilo (93:7)

Detección: Solución etanólica de Hidróxido de Potasio del 5 al 10 %.

(Ver Anexo No. 3, Fotografía No. 17)

**Tabla No. 11: Determinación macrométrica para Antraquinonas**

<b>Muestra</b>	<b>Bornträger</b>	<b>Bornträger Modificado</b>	<b>Resultado</b>
<i>A. cherimolla</i>	-	-	Negativo
<i>A. purpurea</i>	-	-	Negativo
<i>A. reticulata</i>	-	-	Negativo
<i>C. tepejilote</i>	-	-	Negativo
<i>C. pepo</i>	-	-	Negativo
<i>L. graveolens</i>	-	-	Negativo
<i>N. lobata</i>	-	-	Negativo
<i>O. micranthum</i>	-	-	Negativo
<i>P. pseudoaureum</i>	-	-	Negativo
<i>P. dioica</i>	-	-	Negativo
<i>S. dominguensis</i>	+	+	<b>Positivo</b>
<i>Y. elephantipes</i>	-	-	Negativo

\* Fuente: Datos Experimentales

(+): cambio de color, color rojo o rosado.

(Ver Anexo No. 3, Fotografía No. 18 y 19)

**Tabla No. 12: Determinación de Antraquinonas por medio de Cromatografía en Capa Fina**

<b>Muestra</b>	<b>No. de Bandas</b>	<b>Valor Rf</b>	<b>Coloración UV de la Banda</b>	<b>Resultado</b>
Estándar : Hoja de Sen	2	0.60, 0.94	Rojo, Rojo	<b>Positivo</b>
<i>A. cherimolla</i>	---	---	---	Negativo
<i>A. purpurea</i>	---	---	---	Negativo
<i>A. reticulata</i>	---	---	---	Negativo
<i>C. tepejilote</i>	---	---	---	Negativo
<i>C. pepo</i>	---	---	---	Negativo
<i>L. graveolens</i>	1	0.97	Rojo	Negativo
<i>N. lobata</i>	1	0.97	Rojo	Negativo
<i>O. micranthum</i>	1	0.97	Rojo	Negativo
<i>P. pseudoaureum</i>	1	0.97	Rojo	Negativo
<i>P. dióica</i>	---	---	---	Negativo
<i>S. dominguensis</i>	2	0.11, 0.93	Rojo, Rojo	<b>Positivo</b>
<i>Y. elephantipes</i>	---	---	---	Negativo

\* Fuente: Datos Experimentales  
 Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13)  
 Detección: Solución etanólica de Hidróxido de Potasio.  
 Zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV a 365 nm.  
 (Ver Anexo No. 3, Fotografía No. 20)

**Tabla No. 13: Determinación de Actividad Antioxidante por medio de Cromatografía en Capa Fina**

<b>Muestra</b>	<b>Número de bandas</b>	<b>intensidad</b>	<b>Resultado</b>
Estándar: Ácido gálico (1mg/ml)	1	+++	<b>Positivo</b>
Estándar: Ácido gálico 1/40	1	++	<b>Positivo</b>
Estándar: Ácido gálico 1/80	1	+	<b>Positivo</b>
Estándar: Acido ascórbico (1mg/ml)	1	+++	<b>Positivo</b>
Estándar: Acido ascórbico 1/6	1	++	<b>Positivo</b>
Estándar: Acido ascórbico 1/12	1	+	<b>Positivo</b>
<i>A. cherimolla</i>	0	-	Negativo
<i>A. purpurea</i>	0	-	Negativo
<i>A. reticulata</i>	0	-	Negativo
<i>C. tepejilote</i>	0	-	Negativo
<i>C. pepo</i>	0	-	Negativo
<i>L. graveolens</i>	1	+	<b>Positivo</b>
<i>N. lobata</i>	1	+	<b>Positivo</b>
<i>O. micranthum</i>	2	+	<b>Positivo</b>
<i>P. pseudoaureum</i>	3	++	<b>Positivo</b>
<i>P. dióica</i>	4	++	<b>Positivo</b>
<i>S. dominguensis</i>	4	+++	<b>Positivo</b>
<i>Y. elephantipes</i>	0	-	Negativo

\* Fuente: Datos Experimentales

Fase móvil: Acetato de etilo: Ácido fórmico: Acido acético glacial: Agua (100:11:11:26)

Detección: Reactivo de DPPH (1 mg/ml). Decoloración de bandas.

Nota: +: Bajo ; ++: Medio; +++: Fuerte

(Ver Anexo No. 4, Fotografía No. 21)

**7.5 Determinación del Contenido de Fenoles Totales por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu:** De la Tabla No. 14 a la 17 se presentan los valores del contenido de fenoles totales expresados como ug equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco, en la prueba macrométrica y micrométrica.

**Tabla No. 14: Resultados de La determinación de Compuestos Fenólicos por medio de Reactivo de Folin- Ciocalteu (Ensayo Macrométrico)**

Planta	Peso Alícuota (g)	Volumen Reconstitución (mL)	Factor de Dilución	Determinación de compuestos fenólicos		
				ug equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco*	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>A. cherimolla</i>	0.1284	2	1:1	12.3034 ± 0.4721	11.4332	13.0634
<i>A. reticulata</i>	0.0768	2	1:1	20.1598 ± 0.8641	18.7091	22.2038
<i>C. tepejilote</i>	0.1026	3	1 : 4	30.0293 ± 0.8269	27.8801	32.7822
<i>L. graveolens</i>	0.1042	3	1 : 10	55.3112 ± 1.0619	47.2150	63.7820
<i>N. lobata</i>	0.1117	3	1: 10	47.5177 ± 5.1141	25.1037	49.3578
<i>O. micranthum</i>	0.1042	3	1 : 10	55.6270 ± 1.4916	52.1803	60.3772
<i>P. pseudoaureum</i>	0.1051	3	1 : 20	119.1882 ± 1.4559	111.0070	124.7556
<i>P. dioica</i>	0.1050	3	1 : 30	152.5086 ± 2.6528	127.8461	179.5103
<i>S. dominguensis</i>	0.1115	3	1 : 50	287.7790 ± 3.7047	270.4675	298.1378
<i>Y. elephantipes</i>	0.1103	3	1 : 4	33.4625 ± 0.7642	32.2241	33.6334

\*Promedio ± Desviación Estándar

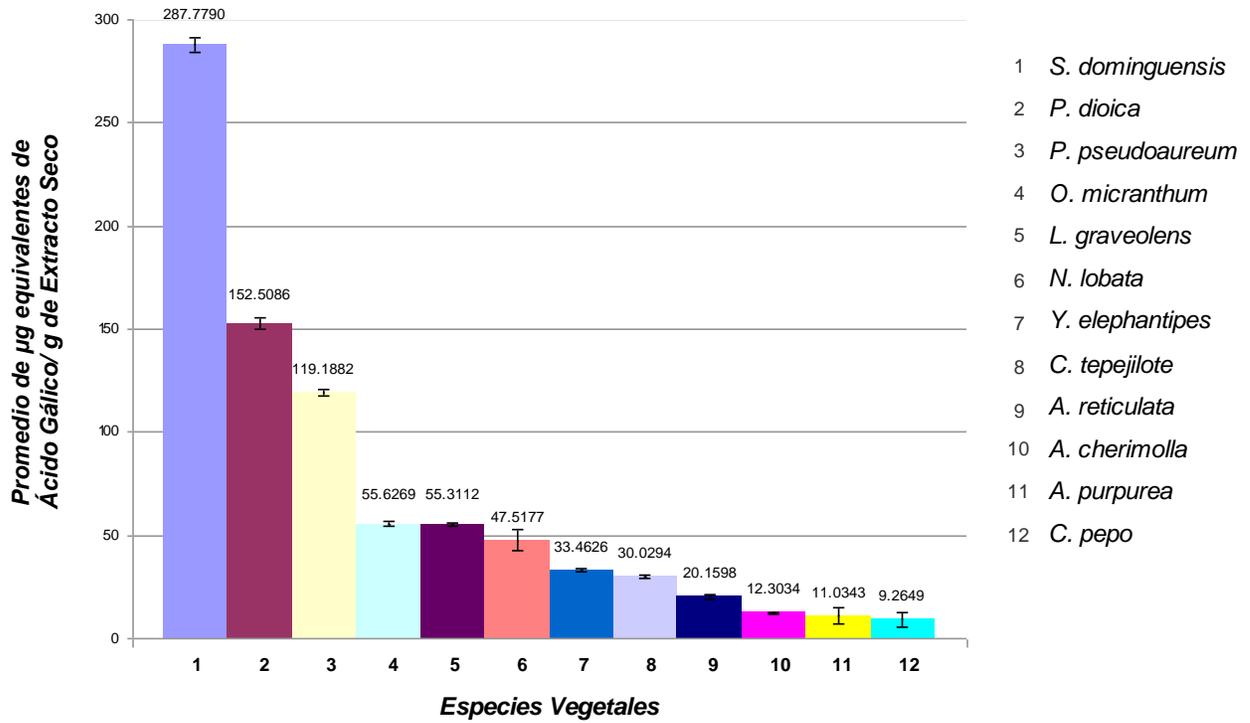
**Tabla No. 15: Resultados de La determinación de Compuestos Fenólicos por medio de Reactivo de Folin- Ciocalteu (Ensayo Macrométrico) en macerados con proceso de concentración.**

Planta	Peso Alícuota (g)	Volumen Concentrado (mL)	Factor de concentración	Determinación de compuestos fenólicos		
				ug equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco*	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>A. purpurea</i>	0.0876	6	3	11.0343 ± 4.3120	6.4000	19.8800
<i>C. pepo</i>	0.0324	6	3	9.2649 ± 3.5407	2.5748	12.6111

\*Promedio ± Desviación Estándar

(Ver Anexo No. 5, Fotografía No. 22)

**Gráfica No. 1: Contenido de Fenoles Totales (método macrométrico) expresado como  $\mu\text{g}$  de Equivalentes de Ácido Gálico por gramos de extracto seco de las especies vegetales bajo estudio.**



**Tabla No.16: Resultados de La determinación de Compuestos Fenólicos por medio de Reactivo de Folin- Ciocalteu (Ensayo Micrométrico)**

Planta	Peso Alícuota (g)	Volumen Reconstitución (mL)	Factor de Dilución	Determinación de compuestos fenólicos		
				ug equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco*	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>A. cherimolla</i>	0.1284	2	1:1	9.3812 ± 1.7969	5.4301	11.7873
<i>A. reticulata</i>	0.0768	2	1:1	11.0933 ± 0.3737	10.0600	13.5720
<i>C. tepejilote</i>	0.1026	3	1 : 5	13.4067 ± 0.0836	8.8837	13.9129
<i>L. graveolens</i>	0.1042	3	1 : 5	28.5436 ± 0.0342	19.9533	30.9885
<i>N. lobata</i>	0.1117	3	1 : 10	28.1131 ± 0.0785	25.7011	29.9038
<i>O. micranthum</i>	0.1042	3	1 : 5	33.8389 ± 0.0685	29.1430	37.1846
<i>P. pseudoaureum</i>	0.1051	3	1 :50	74.2898 ± 0.6542	64.6353	84.6641
<i>P. dioica</i>	0.1050	3	1 : 10	75.8995 ± 0.1572	68.8788	87.0405
<i>S. dominguensis</i>	0.1115	3	1 : 50	184.2921 ± 0.4170	176.5911	196.5449
<i>Y. elephantipes</i>	0.11031	3	1 : 5	15.5431 ± 0.1031	13.1366	16.5414

\*Promedio ± Desviación Estándar

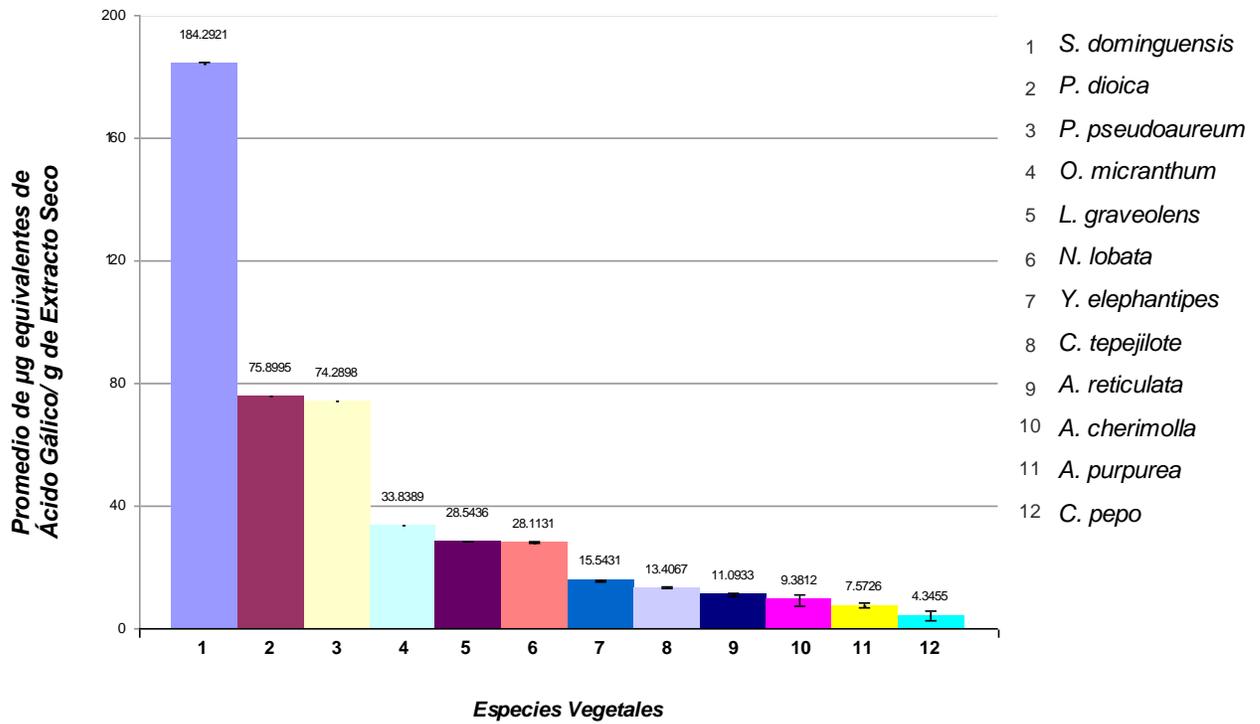
**Tabla No. 17: Resultados de La determinación de Compuestos Fenólicos por medio de Reactivo de Folin- Ciocalteu (Ensayo Micrométrico) en macerados con proceso de concentración.**

Planta	Peso Alícuota (g)	Volumen Concentrado (mL)	Factor de concentración	Determinación de compuestos fenólicos		
				ug equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco*	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>A. purpurea</i>	0.0876	6	3	7.5726 ± 0.6534	6.6741	8.7539
<i>C. pepo</i>	0.0324	6	3	4.3455 ± 1.6820	1.5362	7.3522

\*Promedio ± Desviación Estándar

(Ver Anexo No. 6, Fotografía No. 23)

**Gráfica No.2: Contenido de Fenoles Totales (método micrométrico) expresado como  $\mu\text{g}$  de Equivalentes de Ácido Gálico por gramos de extracto seco de las especies vegetales bajo estudio.**



### 7.6 Determinación de Actividad Antioxidante Total por medio del Reactivo de DPPH:

De la Tabla No. 18 a la 21 se describen los resultados obtenidos en la prueba de actividad antioxidante total expresado como miligramo de extracto seco para producir el 50% de inhibición del reactivo de DPPH (IC<sub>50</sub>) tanto en pruebas macrométricas y micrométricas.

**Tabla No. 18: Resultados de Actividad Antioxidante Total por medio del Reactivo de DPPH (Ensayo Macrométrico)**

Planta	Peso Alícuota (g)	Volumen Reconstitución (mL)	Factor de Dilución	Actividad antioxidante total (IC <sub>50</sub> ) expresada como		
				mg Extracto Seco*	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>A. cherimolla</i>	0.1284	1	1:2	4.8637 ± 0.1847	4.5767	5.0862
<i>A. reticulata</i>	0.0768	0	1:2	2.2261 ± 0.0248	2.1814	2.2682
<i>C. tepejilote</i>	0.1077	5	1	1.1553 ± 0.0194	1.1272	1.1856
<i>L. graveolens</i>	0.1037	5	1:7	0.1369 ± 0.0011	0.1354	0.1383
<i>N. lobata</i>	0.1017	5	1:4	0.2679 ± 0.0083	0.2594	0.2822
<i>O. micranthum</i>	0.1027	5	1:10.5	0.1253 ± 0.0012	0.1234	0.1264
<i>P. pseudoaureum</i>	0.1037	5	1:25	0.0516 ± 0.0004	0.0509	0.0525
<i>P. dioica</i>	0.1037	5	1:90	0.0160 ± 0.0001	0.0150	0.0154
<i>S. dominguensis</i>	0.1000	5	1:100	0.0158 ± 0.0001	0.0155	0.0160
<i>Y. elephantipes</i>	0.1000	5	1	1.5005 ± 0.0260	1.4483	1.5217

\*Promedio ± Desviación Estándar

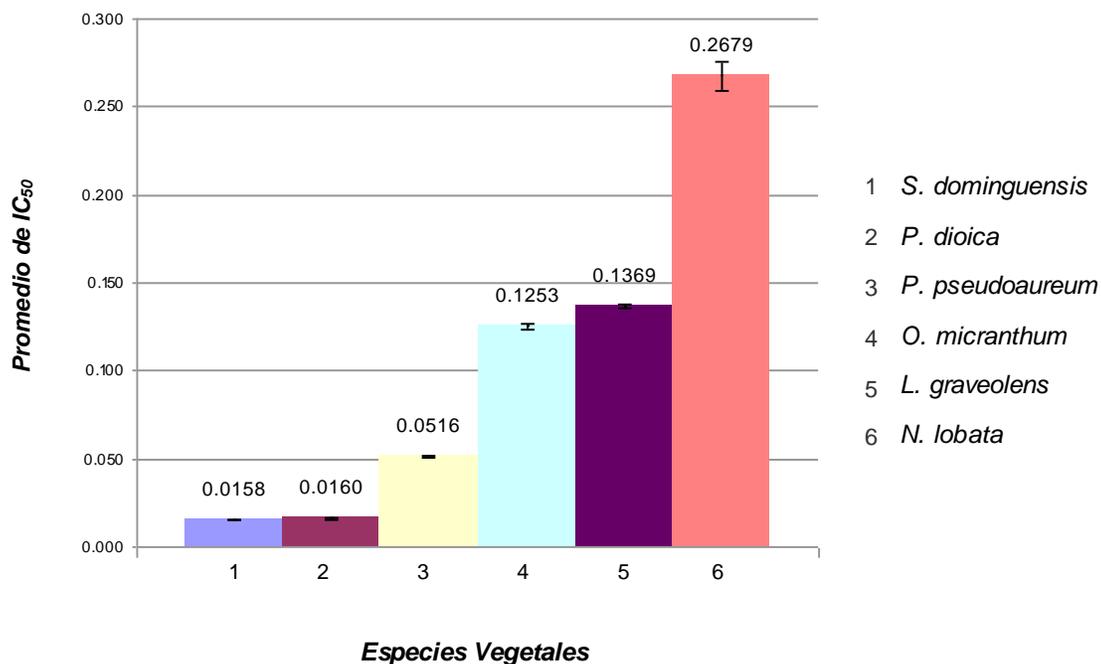
**Tabla No. 19: Resultados de Actividad Antioxidante Total por medio del Reactivo de DPPH (Ensayo Macrométrico) en macerados con proceso de concentración**

Planta	Peso Alícuota (g)	Volumen Concentrado (mL)	Factor de concentración	Actividad antioxidante total (IC <sub>50</sub> ) expresada como		
				mg Extracto Seco*	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>A. purpurea</i>	0.365	25	13	5.0862 ± 0.2924	4.7678	5.6031
<i>C. pepo</i>	0.135	25	12.5	7.5350 ± 0.2335	7.1596	7.9045

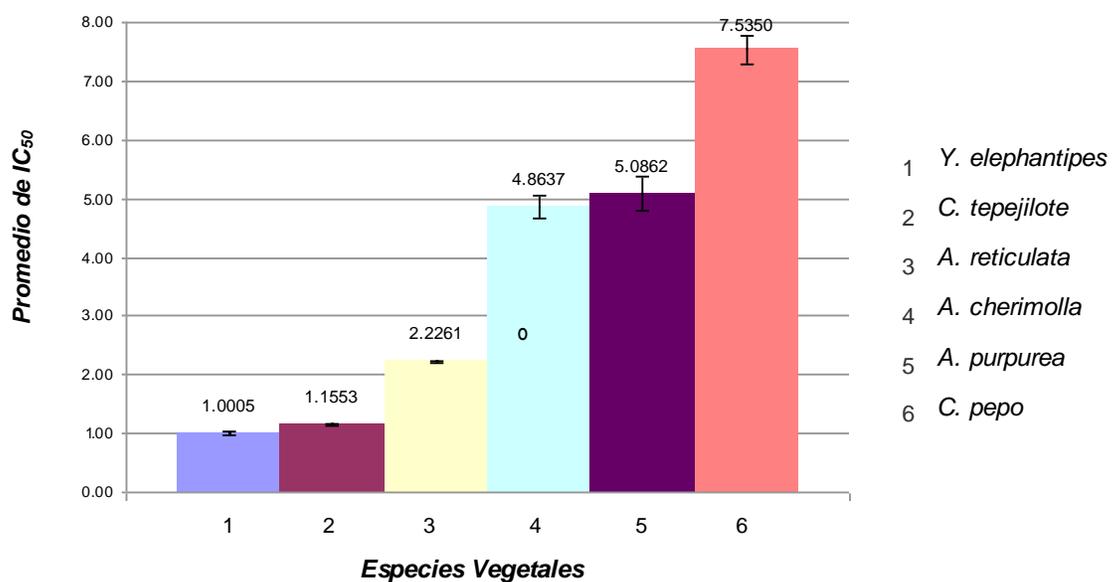
\*Promedio ± Desviación Estándar

(Ver Anexo No. 7, Fotografía No. 24)

**Gráfica No.3: Actividad Antioxidante Total (método macrométrico) expresado como mg de extracto seco necesario para producir el 50 % de inhibición del Reactivo de DPPH de las especies vegetales con mayor actividad antioxidante.**



**Gráfica No.4: Actividad Antioxidante Total (método macrométrico) expresado como mg de extracto seco necesario para producir el 50 % de inhibición del Reactivo de DPPH de las especies vegetales con menor actividad antioxidante.**



**Tabla No.20: Resultados de Actividad Antioxidante Total por medio del Reactivo de DPPH (Ensayo Micrométrico)**

Planta	Peso Alícuota (g)	Volumen Reconstitución (mL)	Factor de Dilución	Actividad antioxidante total (IC <sub>50</sub> ) expresada como		
				mg Extracto Seco*	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>A. cherimolla</i>	0.1284	1	1:2	4.4265 ± 0.1774	4.1652	4.6289
<i>A. reticulata</i>	0.0768	0	1:2	2.1333 ± 0.0203	2.0904	2.1737
<i>C. tepejilote</i>	0.1097	6	1:1	1.1620 ± 0.0190	1.1210	1.1950
<i>L. graveolens</i>	0.1073	6	1:8	0.1277 ± 0.0036	0.1220	0.1340
<i>N. lobata</i>	0.1037	5	1:8	0.1615 ± 0.0154	0.1360	0.1790
<i>O. micranthum</i>	0.1052	6	1:8	0.1213 ± 0.0028	0.1170	0.1260
<i>P. pseudoaureum</i>	0.1072	6	1:20	0.0406 ± 0.0021	0.0390	0.0470
<i>P. dioica</i>	0.1075	6	1:70	0.0158 ± 0.0003	0.0150	0.0160
<i>S. dominguensis</i>	0.1032	3	1:200	0.0085 ± 0.0001	0.0085	0.0090
<i>Y. elephantipes</i>	0.1070	6	1:1	1.0332 ± 0.0104	1.0200	1.0153

\*Promedio ± Desviación Estándar

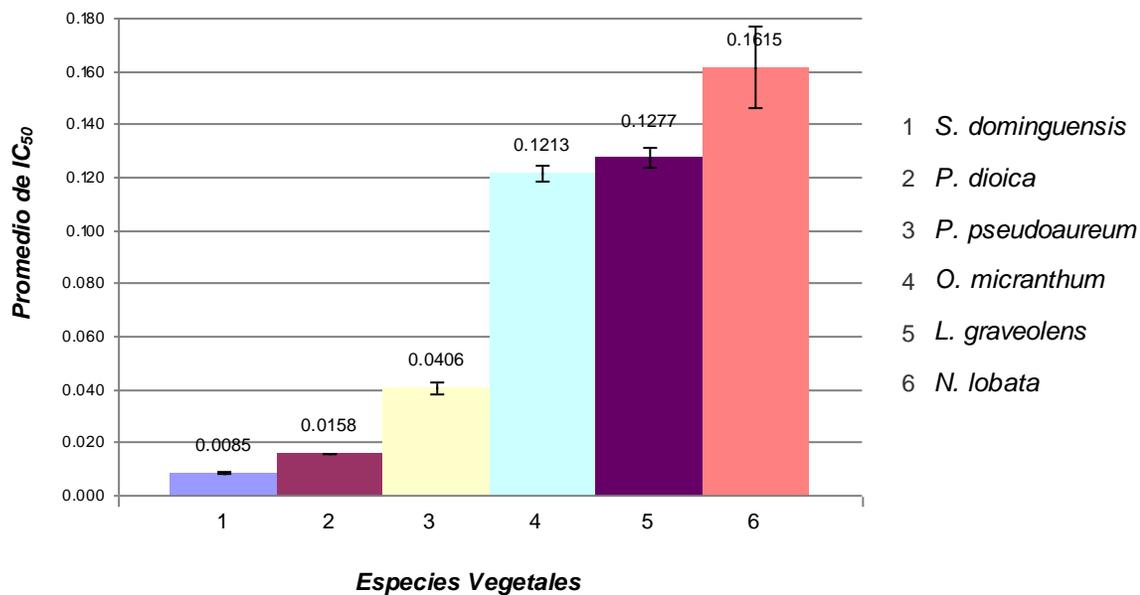
**Tabla No. 21: Resultados de Actividad Antioxidante Total por medio del Reactivo de DPPH (Ensayo Micrométrico) en macerados con proceso de concentración**

Planta	Peso Alícuota (g)	Volumen Concentrado (mL)	Factor de concentración	Actividad antioxidante total (IC <sub>50</sub> ) expresada como		
				mg Extracto Seco*	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>A. purpurea</i>	0.5840	80	40	5.0881 ± 0.2925	4.7697	5.6051
<i>C. pepo</i>	0.1620	30	15	7.5351 ± 0.2335	7.1596	7.9045

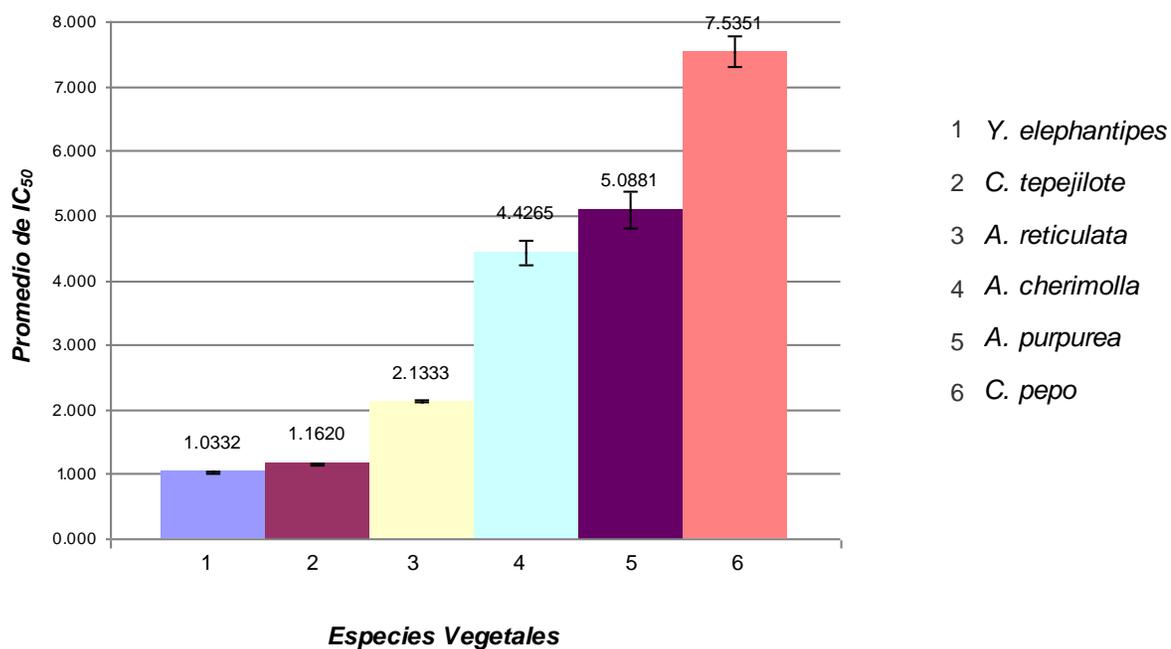
\*Promedio ± Desviación Estándar

(Ver Anexo No. 8, Fotografía No. 25)

**Gráfica No. 5: Actividad Antioxidante Total (método micrométrico) expresado como mg de extracto seco necesario para producir el 50 % de inhibición del Reactivo de DPPH de las especies vegetales con mayor actividad antioxidante.**



**Gráfica No. 6: Actividad Antioxidante Total (método micrométrico) expresado como mg de extracto seco necesario para producir el 50 % de inhibición del Reactivo de DPPH de las especies vegetales con menor actividad antioxidante.**



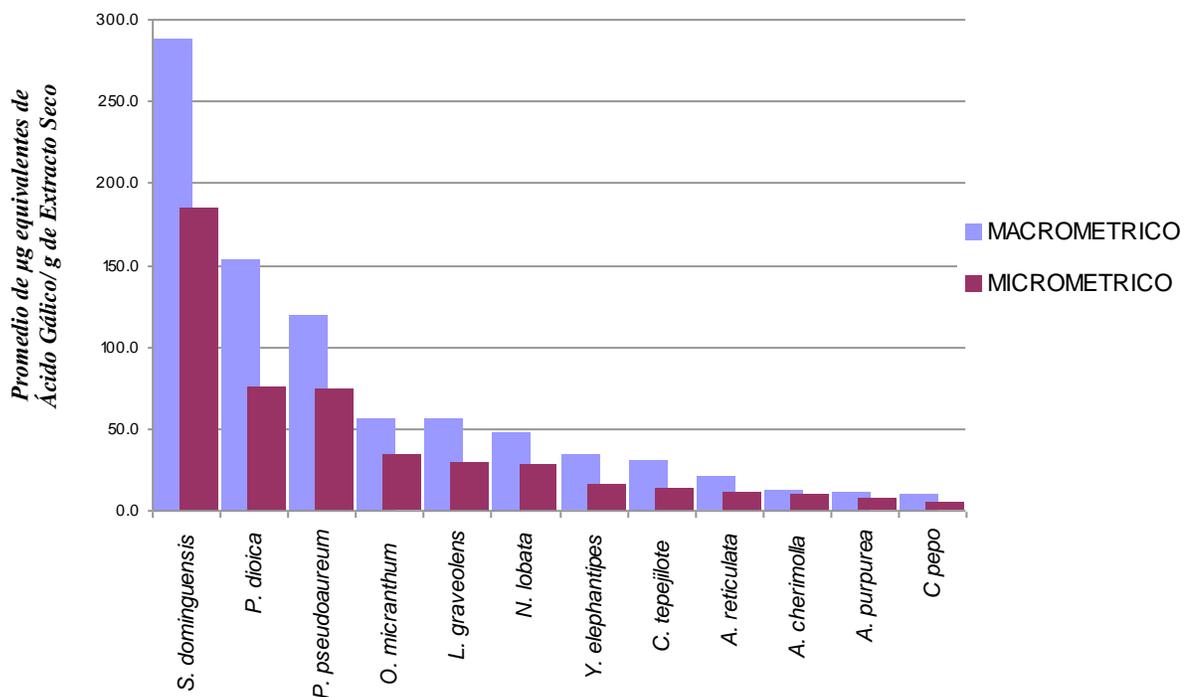
**Tabla No.22: Resumen de resultados de Tamizaje Fitoquímico y Determinación de Actividad Antioxidante**

	Tamizaje Fitoquímico					Determinación de Actividad Antioxidante				
	Flavonoides y Antocianinas (Cromatografía en Capa Fina)	Taninos (Ensayo Macrométrico)	Aceites volátiles (Cromatografía en Capa Fina)	Cumarinas (Cromatografía en Capa Fina)	Antraquinonas (Cromatografía en Capa Fina)	Capacidad Antioxidante por medio de Cromatografía en Capa Fina	Determinación de Fenoles Totales (Ensayo macrométrico)	Determinación de Fenoles Totales (Ensayo micrométrico)	Determinación de Actividad Antioxidante Total (Ensayo macrométrico)	Determinación de Actividad Antioxidante Total (Ensayo micrométrico)
							µg Eq. de ácido gálico/g de extracto seco	µg Eq. de ácido gálico/g de extracto seco	mg de extracto seco	mg de extracto seco
<i>Smilax dominguensis</i>	+	+	+	-	+	+++	287.7790 ± 3.7047	184.2921 ± 0.4170	0.0158 ± 0.0001	0.0085 ± 0.0005
<i>Pimenta dioica</i>	+	-	+	-	-	++	152.5086 ± 2.6528	75.8995 ± 0.1572	0.0160 ± 0.0001	0.0158 ± 0.0003
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	+	-	+	-	-	++	119.1882 ± 1.4559	74.2898 ± 0.6542	0.0516 ± 0.0004	0.0406 ± 0.0021
<i>Ocimum micranthum</i>	+	-	+	-	-	+	55.6269 ± 1.4916	33.8389 ± 0.0685	0.1253 ± 0.0022	0.1213 ± 0.0028
<i>Lippia graveolens</i>	+	-	+	+	-	+	55.3112 ± 1.0619	28.5436 ± 0.0342	0.1369 ± 0.0011	0.1277 ± 0.0036
<i>Neurolaena lobata</i>	+	-	+	-	-	+	47.5177 ± 5.1141	28.1131 ± 0.0785	0.2679 ± 0.0083	0.1615 ± 0.0154
<i>Yucca elephantipes</i>	+	-	+	-	-	-	33.4626 ± 0.7642	15.5431 ± 0.1031	1.0005 ± 0.0260	1.0332 ± 0.0104
<i>Chamaedorea tepejilote</i>	+	-	+	-	-	-	30.0294 ± 0.8269	13.4067 ± 0.0836	1.1553 ± 0.0194	1.1620 ± 0.0190
<i>Annona reticulata</i>	+	-	+	-	-	-	20.1598 ± 0.8641	11.0933 ± 0.3737	2.2261 ± 0.0248	2.1333 ± 0.0203
<i>Annona cherimolla</i>	-	-	+	-	-	-	12.3034 ± 0.4721	9.3812 ± 1.7969	4.8637 ± 0.1847	4.4265 ± 0.1774
<i>Annona purpurea</i>	-	-	+	-	-	-	11.0343 ± 4.3120	7.5726 ± 0.6534	5.0862 ± 0.2924	5.0881 ± 0.2925
<i>Cucurbita pepo</i>	-	-	-	-	-	-	9.2649 ± 3.4507	4.3455 ± 1.6820	7.5350 ± 0.2335	7.5351 ± 0.2335
						<b>Intensidad</b>	<b>Promedio ± desviación estándar</b>	<b>Promedio ± desviación estándar</b>	<b>Promedio ± desviación estándar</b>	<b>Promedio ± desviación estándar</b>
							<b>Valor de p:=1.40 E<sup>-17</sup></b>		<b>Valor de p= 8.26 E<sup>-9</sup></b>	

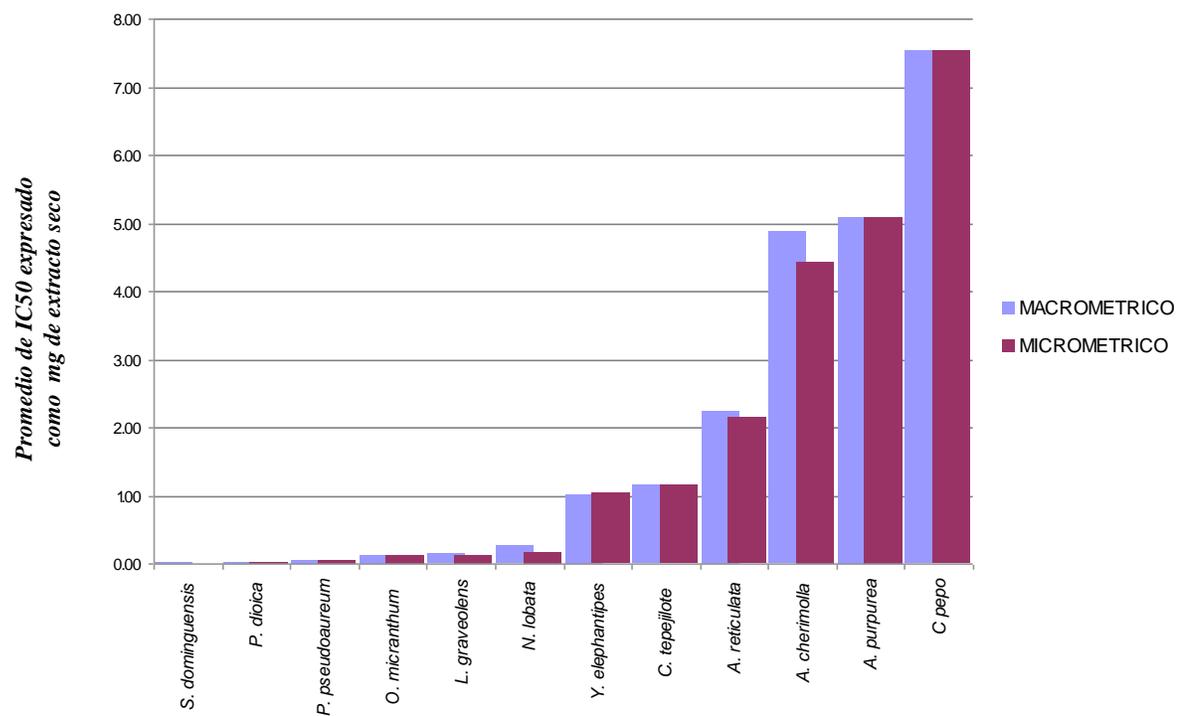
\*Fuente: Datos Experimentales

<sup>1</sup>Especies Vegetales en Orden Descendente de Actividad Antioxidante

**Grafica No. 7: Comparación de los resultados obtenidos en técnica macrométrica y micrométrica para el ensayo de determinación de fenoles totales.**



**Grafica No. 8: Comparación de los resultados obtenidos en técnica macrométrica y micrométrica para la determinación de actividad antioxidante total.**



## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el Anexo No. 1 se encuentra la revisión bibliográfica realizada para cada especie vegetal, la cual incluye la descripción botánica, distribución geográfica y hábitat, usos tradicionales, forma de obtención, la composición química y los estudios farmacológicos y/o toxicológicos.

En la Tabla No.1 se detallan los resultados obtenidos del proceso de recolección e identificación de las especies vegetales, en ella se puede observar la parte de la planta recolectada, la cual fue utilizada para la realización de ensayos fisicoquímicos y para la obtención de extractos secos y macerados según el caso. Así mismo, se describen los datos de la procedencia de las especies vegetales, incluyendo los datos geográficos de los sitios de recolección que son de suma importancia para obtener la localización de colecta en cada región, lo cual puede afectar la cantidad de metabolitos secundarios que puede contener una planta. La identificación botánica fue realizada por el Herbario del Laboratorio de Productos Naturales, Farmaya S.A., por lo que se incluye el número de herbario asignado a cada especie.

Las especies vegetales utilizadas como plantas medicinales (*Neurolaena lobata*, *Phlebodium pseudoaureum*, *Smilax dominguensis*), como condimentos (*Pimenta dioica*, *Occimum micranthum*, *Lippia graveolens*) y como alimentos (*Chamadorea tepejilote*, *Yucca elephantipes*) fueron secadas utilizando un horno con circulación de aire caliente, manteniendo una temperatura constante no mayor a 40°C para evitar degradación de principios activos<sup>(24)</sup>. La materia se almacenó en condiciones que aseguraran la preservación de los principios activos (protegidos de la luz y de la humedad)<sup>(24)</sup>. Los frutos utilizados en alimentación (*Annona cherimolla*, *Annona reticulata*, *Annona purpurea* y *Cucurbita pepo*) se procesaron de acuerdo al siguiente procedimiento: obtención de la pulpa, trituración, obtención de una mezcla acuosa de pulpa, la cuál se congeló a condiciones que mantuvieran una temperatura menor a -70°C<sup>(23)</sup> de esta manera se evita la degradación de principios activos.

Inicialmente se utilizó en frutos, el proceso de liofilización como método de concentración, siendo un método de secado en frío, por medio del cual se evita degradación

de principios activos que sean termolábiles y se logra eliminar completamente la humedad para la preservación de la materia vegetal.<sup>(23)</sup> Sin embargo, de acuerdo a pruebas preliminares realizadas es un método efectivo de secado y conservación de material vegetal, pero presentó el inconveniente que la muestra no pudo ser reconstituida completamente para poder realizar los ensayos de determinación del contenido de fenoles y de actividad antioxidante total. Por lo anterior, se optó por realizar maceración cinética.

Dentro de las pruebas fisicoquímicas realizadas a la materia vegetal se incluyen: Determinación del contenido de humedad, determinación del contenido de cenizas totales y determinación del mejor disolvente de extracción (prueba de sólidos totales), los resultados pueden observarse en la Tabla No.2.

El contenido de humedad es un parámetro que no debe ser mayor al 10 %, ya que por encima de este límite, los principios activos pueden sufrir degradación por medio de hidrólisis.<sup>(24)</sup> Además la presencia de humedad en la muestra vegetal puede facilitar el crecimiento de microorganismos, especialmente hongos que van a deteriorar el estado de la muestra. Todas las especies vegetales contenían un porcentaje de humedad aceptable de acuerdo al límite establecido.

La determinación del contenido de cenizas totales, es un método basado en la destrucción de materia orgánica por medio de calcinación y luego se determina por gravimetría el peso del residuo. Este parámetro indica el contenido de minerales, metales pesados, arcilla y material orgánico presentes en la muestra vegetal, lo cuál es importante para obtener una idea general de la calidad de la muestra. Este parámetro no debe sobrepasar el 5%.<sup>(24)</sup> De acuerdo a los resultados obtenidos de este ensayo se puede asegurar que la calidad de las especies bajo estudio es adecuada.

Para la presente investigación se utilizó como disolvente de extracción etanol a diferentes concentraciones. El etanol es utilizado por su propiedad de ser un solvente polar y las moléculas bajo estudio poseen grupos fenol que les confiere cierta polaridad. Se realizó la prueba de sólidos totales; método que permite determinar la cantidad de sólidos extraíbles por etanol a diferente concentración, permitiendo establecer la concentración del mismo más apropiada para la extracción.<sup>(24)</sup> La diferencia en la concentración del solvente delimitará el tipo de metabolito secundario a extraer, ya que dependerá de la polaridad de

éste; a una concentración de etanol al 95% se extraerán metabolitos con menor polaridad que los extraídos con etanol al 50 %. Las especies vegetales cuyo mejor solvente de extracción fue etanol al 95% fueron *Chamaedorea tepejilote*, *Lippia graveolens* y *Ocimum micranthum*, mientras que *Phlebodium pseudoaureum*, *Pimenta dioica* y *Yucca elephantipes* presentaron que etanol al 50 % fue el mejor disolvente de extracción. *Smilax dominguisis* y *Neurolaena lobata* se trabajaron con etanol al 70 % ya que esta concentración presentaron mayor contenido de sólidos extraíbles.

Para las muestras vegetales secas se utilizó como método de extracción percolación y posteriormente se obtuvo un extracto seco por medio de concentración utilizando rotavapor. En este caso se trabaja a temperaturas menores a 40°C y en ausencia de oxígeno, además para la presente investigación se realizó la concentración en condiciones de oscuridad. Las condiciones de la concentración tienen la finalidad de disminuir la degradación térmica y alteración del efecto antioxidante de principios activos por medio de la luz y el oxígeno.<sup>(26)</sup> De acuerdo al proceso anterior se puede observar en la Tabla No.3 que las especies que presentaron un mayor porcentaje de rendimiento de extracción fueron *Pimienta dioica*, *Lippia graveolens* y *Smilax dominguisis*, se debe tomar en cuenta los diversos factores que pueden afectar el porcentaje de extracción, como pérdidas que ocurren en el proceso y polaridad de todos los metabolitos secundarios de la muestra, las características propias de la planta y tiempo de percolación, entre otros.<sup>(26)</sup>

Para los frutos se realizó el proceso de extracción denominado maceración cinética. Para realizar este proceso se utilizó etanol al 95 % como disolvente y una atmósfera saturada con nitrógeno; el cuál es un gas inerte que no produce reacción química o biológica, fue utilizado para sustituir el oxígeno evitando que éste promueva oxidaciones químicas en la pulpa del fruto.<sup>(25)</sup>

Los extractos secos y los macerados, mezclas complejas de varios constituyentes químicos, fueron utilizados para realizar la caracterización fitoquímica y los ensayos para determinación del contenido de fenoles totales y determinación de actividad antioxidante total.

Los metabolitos secundarios juegan un papel importante en la inhibición de reacciones oxidativas a nivel biológico. Utilizando diversos mecanismos para ejercer el

efecto antioxidante, dentro de los cuales se incluyen el atrapamiento de radicales, la interrupción de la reacción en cadena de peroxidación y la formación de quelatos de iones metálicos aceleradores de la oxidación.<sup>(26)</sup> Se debe tener en cuenta que la mezcla de estos fitoquímicos es la que brinda el efecto antioxidante beneficioso para disminuir el estrés oxidativo.

Entre estos, los compuestos fenólicos tienen una gran importancia porque presentan mecanismos complementarios o sobrepuestos para neutralizar oxidantes, estimular el sistema inmune, regular la expresión génica en la proliferación celular y de apoptosis, metabolismo de hormonas y efectos antibacterianos y antivíricos y por la neutralización de los radicales libres. Los compuestos fenólicos comprenden una amplia gama de compuestos antioxidantes, como lo son flavonoides, taninos, antraquinonas y cumarinas. Los polifenoles que presentan mayor actividad antioxidante son los flavonoides y los taninos. Los primeros son secuestradores de radicales libres y además tienen aplicación en la estabilización de los alimentos debido a la protección contra el proceso de peroxidación. La importancia de los taninos se debe a que aumentan la estabilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) interviniendo en la peroxidación.<sup>(27) (28)</sup> De forma general se observó que la mayoría de especies vegetales presentaron flavonoides y monoterpenos.

En las Tabla No. 5 y 6 se observa que *Phlebodium pseudoaureum*, *Smilax dominguensis*, *Chamadorea tepejilote* y *Yucca elephantipes* fueron las especies vegetales que presentaron mayor presencia de flavonoides, ya que presentaron resultados positivos en prueba macrométrica y micrométrica (mayor número de bandas).

En la Tabla No. 7 se observa que solamente *Smilax dominguensis* dio resultado positivo en el ensayo de taninos, mientras que *Pimenta dioica* solamente dio positivo en la prueba de cloruro férrico pero no en las pruebas de gelatina y gelatina-sal, indicando que si no existe precipitado en las últimas dos pruebas mencionadas no son taninos, ya que éstos se caracterizan por la propiedad de precipitar proteínas; mientras que la prueba de cloruro férrico solamente indica compuestos fenólicos pero no la presencia de taninos.<sup>(24)</sup>

En la Tabla No. 8 se observa que la mayoría de las plantas posee presencia de Aceites Volátiles, en especial *Ocimum micranthum*, *Lippia graveolens* y *Neurolaena lobata*.

En el caso de los aceites esenciales el mecanismo funcional antioxidante es por medio de peroxidación. <sup>(26)</sup>

En la Tabla No. 9 y No. 10 se observa que solamente *Lippia graveolens* muestra presencia de cumarinas en ambas pruebas y *Smilax dominguensis* presentó un resultado positivo en la prueba macrométrica pero no fluorescencia en Cromatografía de Capa fina, lo que da un resultado negativo, debido a la especificidad de la prueba.

En las Tablas No. 11 y 12 se observa que *Smilax dominguensis* fue la única especie que dio resultado positivo para el ensayo de Antraquinonas, debido a que presentó resultados positivos tanto en ensayo macrométrico y en micrométrico.

En el ensayo de determinación de Actividad Antioxidante por medio de Cromatografía en Capa Fina, presentado en la Tabla No. 13 se observa en orden descendente según la intensidad de la banda *Smilax dominguensis* > *Pimenta dioica* > *Phlebodium pseudoaureum* > *Ocimum micranthum* > *Lippia graveolens*. El resto de las muestras no presentaron bandas significativas a la concentración utilizada en la prueba que fue de 10mg de extracto/ml. Los antioxidantes presentes en los diversos extractos no operan en la misma manera inhibiendo al reactivo DPPH, sugiriendo que pueden ser efectivos frente a otros radicales libres diferentes a este. Para esta prueba se utilizaron como estándares el ácido gálico y el ácido ascórbico debido a que ambos compuestos poseen actividad antioxidante conocida.

La determinación de actividad antioxidante de las especies bajo estudio fue realizada por medio de técnicas macrométricas y micrométricas. La diferencia entre ambas técnicas se basa en que la primera utiliza un espectrofotómetro que determina valores de absorbancia, dirigiendo el haz de luz de forma horizontal, el cual atraviesa una celda individual, y además el equipo permite establecer la longitud de onda específica a la cual se realizarán las determinaciones. El segundo método utiliza un lector de placas ELISA, cuyo principio se basa en utilizar filtros de longitud de onda específicos, cuyo haz de luz se dirige en forma vertical atravesando una placa con 96 pozos.

Debido a la importancia, de los compuestos fenólicos mencionada con anterioridad, se realizó la cuantificación del contenido de fenoles totales en las especies vegetales. Se utilizó el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como

compuesto de referencia. Dicho método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. <sup>(29)</sup>

El contenido de fenoles totales fue reportado como  $\mu\text{g}$  Equivalentes de ácido gálico por miligramo de extracto seco, basándose en la curva de calibración de ácido gálico como referencia. La forma de reportar dicho contenido indica la cantidad de extracto seco que produce el mismo efecto que un microgramo de ácido gálico. El ácido gálico es un ácido fenólico presente en especies vegetales, puede encontrarse en su forma libre como formando parte de taninos. <sup>(26)</sup> De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla No. 22 se observa que a mayor contenido de compuestos fenólicos mayor será la actividad antioxidante; se puede observar que las especies que presentaron mayor contenido de fenoles fueron *Smilax dominguensis*, *Pimenta dioica* y *Phlebodium pseudoaureum* tanto en el método macrométrico como en micrométrico. Sin embargo, se observa diferencia en los valores obtenidos entre ambos métodos debido a que en la técnica macrométrica se adiciona calor a la muestra para separar los compuestos fenólicos, paso que no se realizó en la técnica micrométrica. El calor dañaba las microplacas y producía un precipitado, que en la lectura de las muestras provocaba, posiblemente una disminución en la detección de los compuestos fenólicos en dicha técnica. Otro factor importante que debe considerarse es la longitud de onda a la cuál se llevaron a cabo las cuantificaciones. El equipo utilizado no cuenta con el filtro de la longitud de onda específico para realizar el ensayo, motivo por el cual se utilizó una longitud de onda menor a la requerida. Debido a este cambio de longitud de onda, el método micrométrico mostró resultados menores a los del método macrométrico.

La determinación de actividad antioxidante total fue realizada utilizando el reactivo de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). EL DPPH se caracteriza por poseer un electrón desapareado que es un radical libre, estabilizado por resonancia. Por esta propiedad, el

DPPH se utiliza como material de referencia para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres.<sup>(26)</sup> Para este método los resultados fueron expresados en base al valor de IC<sub>50</sub>, el cuál indica la cantidad de extracto seco que puede disminuir el 50 % del color de una solución del radical libre DPPH, un valor menor indica una mayor capacidad antioxidante. En base a lo anterior, en las Tablas No. 18 y 19 se observa que las especies que presentaron mayor actividad antioxidante total fueron *Smilax dominguensis*, *Pimenta dioica* y *Phlebodium pseudoaureum* debido a que poseen valores de IC<sub>50</sub> más bajos.

En la Tabla No. 22 se observa la diferencia que existe entre el método macrométrico y el micrométrico, estas diferencias pueden ser causadas por las variaciones propias de cada método, entre las cuales se encuentran la concentración de la solución metanólica de DPPH y la adición de buffer de acetatos. En el caso del macrométrico se utiliza una concentración de solución de DPPH mayor y se adiciona buffer de acetatos que tiene el objetivo de estabilizar la reacción. Por lo anterior los valores presentados en el método macrométrico suelen ser mayores que en la técnica micrométrica. En algunas mediciones no se observó una diferencia significativa, debido a que las características de la alícuota fueron similares. Las diferencias observadas en algunos casos se puede deber a variaciones en el peso de la alícuota, el volumen de reconstitución y el factor de dilución.<sup>(26)</sup> Esta metodología presenta el mismo problema que el método de cuantificación de fenoles en cuanto a las diferencias en longitud de onda a la cual se realizan las mediciones. Se realizó un análisis estadístico de prueba de t de student para muestras emparejadas. El valor de p en el ensayo de fenoles muestra un valor de  $1.40 \times 10^{-17}$  el cual es mayor a  $\alpha$  (0.05) lo que indica una diferencia significativa entre el método macrométrico y el micrométrico. La misma tendencia presentó el ensayo de determinación de actividad antioxidante total donde el valor de p fue de  $8.26 \times 10^{-9}$  el cual también es mayor a  $\alpha$  (0.05) mostrando que las técnicas macrométrica y micrométrica no son equivalentes.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa una relación inversamente proporcional entre el contenido de fenoles totales con la actividad antioxidante total. Una muestra que presente un alto contenido de fenoles totales, mostrará un porcentaje de inhibición bajo, ya que se requiere una menor cantidad de extracto seco para producir el

50 % de la inhibición del radical libre (DPPH), y por lo tanto expresa una mayor actividad antioxidante.

La Tabla No. 22 resume todos los resultados obtenidos en el presente estudio. Las metodologías utilizadas se encuentran relacionadas con los compuestos fenólicos, ya que éstos se encuentran presentes en la mayoría de plantas y son los causantes de la actividad antioxidante. La cromatografía en capa fina de actividad antioxidante permite obtener un panorama general sobre el comportamiento que presentaran las diferentes especies vegetales durante las pruebas posteriores sobre actividad antioxidante. El tamizaje fitoquímico posee la importancia de identificar el tipo de compuesto fenólico presente en cada especie. El ensayo de determinación del contenido de fenoles totales permite conocer la cantidad de compuestos fenólicos presente en cada planta, lo cuál esta relacionado directamente con la capacidad antioxidante ( $IC_{50}$ ). De acuerdo a los resultados se encuentra una relación inversamente proporcional entre la cantidad de fenoles y el  $IC_{50}$ . El tamizaje fitoquímico relaciona la diversidad de compuestos fenólicos con el aumento de la capacidad antioxidante, ya que cada metabolito posee un mecanismo de acción antioxidante diferente, que actúan finalmente de forma sinérgica para disminuir reacciones oxidativas. Lo anterior es observable en el comportamiento presentado por *Smilax dominguensis*, la cual presentó la mayoría de compuestos fenólicos, de forma cualitativa y cuantitativa, demostrando que se requiere una cantidad muy pequeña de extracto seco para llevar a cabo el 50 % de acción antioxidante. Por el contrario, las especies vegetales sometidas al proceso de maceración presentaron los valores más bajos de todos los ensayos realizados. Esto puede deberse al proceso de extracción, la interferencia provocada por la presencia de azúcares, la época en que fueron colectadas las muestras y la manipulación de las mismas. <sup>(27)</sup>

## IX. CONCLUSIONES

1. Las bases de datos más valiosas en la recopilación de información bibliográfica de las especies vegetales fueron artículos científicos obtenidos de ELSEVIER, el libro titulado “Plantas Medicinales de Guatemala” y diversas tesis realizadas en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
2. El mejor solvente de extracción para *Chamadorea tepejilote*, *Lippia graveolens*, *Ocimum micranthum* fue etanol al 95 %.
3. El mejor solvente de extracción para *Neurolaena lobata* y *Smilax dominguensis* fue etanol al 70 %.
4. El mejor solvente de extracción para *Phlebodium pseudoaureum*, *Pimenta dioica* y *Yucca elephantipes* fue etanol al 50%.
5. Todas las especies vegetales cumplieron con los parámetros establecidos para determinar la calidad fisicoquímica.
6. La especie que presentó mayor porcentaje de rendimiento de extracción fue *Pimenta dioica*. (24. 32%).
7. La mayoría de especies vegetales presentaron flavonoides y monoterpenos, como metabolitos de interés.
8. *Smilax dominguensis* fue la especie vegetal que presentó la mayoría de grupos químicos clasificados como grupos fenólicos, que fueron flavonoides y antocianinas, taninos, aceites volátiles y antraquinonas.

9. *Cucurbita pepo* no presentó ninguno de los grupos químicos evaluados en tamizaje fitoquímico.

10. La concentración de 10 mg/ml es la ideal para establecer la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina.

11. *Smilax dominguensis*, *Pimenta dioica* y *Phlebodium pseudoaureum* presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos y por lo tanto mayor actividad antioxidante, tanto en ensayos macrométricos como micrométricos.

12. *Cucurbita pepo*, *Annona purpurea* y *Annona cherimolla* presentaron menor contenido de compuestos fenólicos en el ensayo de cuantificación de fenoles totales y menor actividad antioxidante total, tanto en ensayos macrométricos como micrométricos.

13. Los factores que influyeron directamente en los resultados obtenidos para los métodos micrométricos y macrométricos se encuentran, la longitud de onda, la concentración de la muestra, la concentración del reactivo, el factor de dilución y la adición de calor.

14. Existe una relación inversamente proporcional entre el contenido de fenoles totales y el valor de  $IC_{50}$ .

15. *Smilax dominguensis* presentó mayor actividad antioxidante en comparación a las otras especies estudiadas debido a la diversidad y contenido de compuestos fenólicos.

16. La preparación de los extractos puede influir en los resultados, ya que las especies trabajadas por medio de maceración cinética presentaron menor actividad antioxidante en comparación con las especies cuyos extractos vegetales se obtuvieron por concentración a presión reducida.

17. *Smilax dominguensis*, *Pimenta dioica* y *Phlebodium pseudoaureum* son las especies más promisorias para ser utilizadas como fuente para el desarrollo de nutracéuticos de acuerdo a los resultados de actividad antioxidante.

## X. RECOMENDACIONES

1. Consultar revistas científicas para obtener información actualizada sobre el tema de antioxidantes.
2. Comparar los resultados de actividad antioxidante de extractos vegetales con un estándar sintético utilizado en la industria como preservante, como el BHT y BHA.
3. Implementar diferentes técnicas de análisis de actividad antioxidante, con un mecanismo de acción diferente al secuestro de radicales libres, como peroxidación de ácido linoleico o reducción de hierro.
4. Utilizar otro método de extracción al trabajar frutos frescos, como extraer la pulpa en etanol al 60% y después evaporar en rotavapor.
5. Unificar el peso de las alícuotas y el volumen de reconstitución de los extractos secos para disminuir la variación de los resultados en los ensayos de determinación del contenido de fenoles totales y la determinación de actividad antioxidante.
6. Realizar la determinación de absorbancias a la longitud de onda adecuada en los métodos micrométricos para la cuantificación del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante total.
7. Continuar con el estudio de actividad antioxidante por medio de técnicas de aislamiento para identificar los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad.
8. Evaluar el uso de *Smilax dominguensis*, *Pimenta dioica* y *Phlebodium pseudoaureum* como preservantes de productos cosméticos y alimenticios.

9. Realizar estudios complementarios para evaluar el uso *Smilax dominguensis*, *Pimenta dioica* y *Phlebodium pseudoaureum* como posibles nutracéuticos, para brindar una opción fitoterapéutica para reducir el estrés oxidativo y mejorar la salud de la población.

## XI. REFERENCIAS

1. Hirayama O *et al.* 1997. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. *Anal. Biochem.* 247:237-241.
2. Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoides. *Pharmacol. Therapeut.* 96:67-202.
3. Imark C *et al.* 2001. Occurrence and activity of natural antioxidants in herbal spirits. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 1:239-243.
4. Hinneburg I *et al.* 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* 97:122-129.
5. Montero, M. 2007. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Editorial Ciencias Médicas. España.
6. Kamath V, Rajini PS. 2006. The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. *Food Chem.* 103:428-433.
7. Cui K *et al.* 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 28:771-799.
8. Carvalho JCT. 2004. *Fitoterápicos Antiinflamatórios Aspectos químicos, farmacológicos y aplicaciones terapéuticas.* Sao Paulo, Tecmedd, 480 p.
9. Serrano J *et al.* 2007. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res. Inter.* 40:15.21.
10. Du Toit R *et al.* 2001. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicol.* 166:63-69.
11. Sin DWM *et al.* 2006. Determination of five phenolic antioxidants in edible oils: Method validation and estimation of measurement uncertainty. *J. Food Comp. Anal.* 19:784-791.
12. Barahona A, Bolaños P, Calderón P, Ramírez I, Caballeros K, Salazar de Ariza J, Velásquez RD. 2002. Actividad antioxidante de frutas autóctonas de Guatemala.

Atti-Resumenes. XI Congresso Italo-Latino-americano di Etnomedicina. Roma-Pavia, Setiembre, P9.

13. Bolaños BP. 2003. Determinación de las propiedades antioxidantes de los jugos de frutas producidos industrialmente disponibles para su consumo en la área metropolitana de la ciudad de Guatemala (Tesis). Guatemala, Fac. CCQQ y Farmacia, USAC, 53 p.
14. Caballeros K. 2001. Optimización de dos métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales (Tesis). Guatemala, Fac. CCQQ y Farmacia, USAC, 54 p.
15. Lima S .2003. Evaluación de distintos solventes para el proceso de extracción en la determinación de la actividad antioxidante de quilete (*Solanum americanum*) y mamey (*Mammea americana*) (Tesis). Guatemala, Fac. De CCQQ y Farmacia, USAC, 53 p.
16. Wagner, H. *et.al.* 1984. Plan Drug Análisis. Springer-Verlang. Berlin. 320 p.
17. Cuendet, M. 1999. Research de nouveaux composes captures de radicaux libres et antioxydants a partir dune plante d'Indonesie: *Fagrae blumei* (Loganiaceae) et de trios plans d'altitude: *Bartsia alpine* (Scrophylariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) et *Campanula barbata* (Campanulaceae). These de Doctorat présentée á la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne.
18. Bondet, V. 1997. Kineticsand mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Lebensmittel-Wissenschaft-and-Technologie. 609-615 p.
19. Schlesier, K. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. Free Radical Research. 177-187 p.
20. Wagner, H. 1996. Segunda Edición. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Munich, Springer. 384 p.
21. Ainsworth, E. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plan tissues using Folin Ciocalteu reagent.
22. Ailerslev, Kart. 2007. Phytochemical Analysis of Bioactive Constituents from edible Myrtaceae Fruits. Nueva York.

23. Manual del usuario. Liofilizador marca Freezone Labconco.
24. Solís, P, *et al.* Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y productos fitoterapéuticos.
25. Fernández, M, *et al.* 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in Vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Venezuela
26. Stashenko, E, *et al.* 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in Vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de las plantas de la Familia Verbenaceae. Revista Académica Colombiana.
27. Alvarez, M, *et al.* 2004. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cáscara de naranja en el aceite de soja desodorizado. Interciencia. Caracas.
28. I Simposio Iberoamericano de Vegetales Frescos Cortados, San Pedro, Brasil. 2006
29. Gutiérrez, d, *et al.* 2008. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
30. Standley, P. *et al.* 1946. Flora of Guatemala, FIELDIANA: Botany, Volumen 24, Part IV. Chicago Natural History Museum. Estados Unidos. 272 p.
31. Estrella, E. 1988. El Plan de América. Segunda Edición. Ediciones ABYA-AYALA. Ecuador. 390 p.
32. Pérez, E. 1990. Plantas Útiles de Colombia. 14<sup>a</sup> Edición. Editorial Víctor Hugo A.A. Colombia. 831 p.
33. Aguilar A. *et.al.* 1994. Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social Información Etnobotánica. Redacta S.A. México. 253 p.
34. Mendieta R. *et al.* 1981. Plantas Medicinales del Estado de Yucatán. México. 428 p.
35. Correa, E. *et al.* 1989. Especies Vegetales Promisorias. Tomo 1. Editorial Guadalupe Ltda. Colombia. 547 p.
36. Betancourt, I. *et.al.* Medicinal Herbolaria Familiar. Editorial inter Graf. México. 158 p.

37. Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello –SECAB-. 1983. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andres Bello. Editora Guadalupe. Colombia. 250 p.
38. García, M. 1992. Flora Medicinal de Colombia. Tomo I. Segunda Edición. Tercer Mundo. Colombia. 559 p.
39. Martínez, M. 1992. Las Plantas Medicinales de México. Ediciones Botas. Sexta Edición. México. 656 p.
40. Zamora, N. *et al.* 2000. Árboles de Costa Rica. Volumen II. Editorial INBIO. Costa Rica. 374 p.
41. Hoyos, J. 1989. Frutales en Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales la Salle, Venezuela. 375 p.
42. National Academy Press. 1989. Lost Crops of the Incas. Estados Unidos. 415 p.
43. Alonso, C. *et.al.* Plantas Medicinales de México. Primera Edición. México. 177 p.
44. Escobar, N. 1972. Flora toxica de Panamá. Editorial Tupan. Panamá. 279 p.
45. Witsberger, D. *et.al.* 1982. Árboles del Parque Deininger. Ministerio de Educación. Dirección de Publicaciones. El Salvador. 336 p.
46. Geilpus, F. 1989. El Árbol al Servicio del Agricultor Manual de Agroforesteria para el Desarrollo Rural Vol. 2 Guía de Especies. Santo Domingo, Enda-Caribe y CATIE. 778 p.
47. Ferradiz, V. 1974. Medicina Vegetal. Primera Edición. Ediciones CEDEL. España. 415 p.
48. Vélez, F. *et al.* 1990. Plantas Alimenticias de Venezuela. Fundación Brigott, Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Venezuela. 277 p.
49. Laure I. Et al. 2003. Manual de Cultivo y Conservación de Plantas Medicinales, Tomo III. Árboles Dominicanos. Editora Graphic Colonia. Primera Edición. Republica Dominicana. 154 p.
50. Ayala, G. 1999. Agrobiodiversidad de Guatemala Riqueza Nativa Estrategia Nacional para la conservación y uso sostenible de la biodiversidad -GEF-PNUD. Editorial Semiprensa. Guatemala. 85 p.

51. Asociación Bioatlas. 2001. Plantas Medicinales Utilizadas por los Itzaes San Jose Peten Primera Edición. Guatemala. 118 p.
52. Nuñez, E. 1986. Plantas Medicinales de Costa Rica y su Folclore. Segunda Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica. p.318.
53. Morton, J. 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Primera Edición. Editorial Thomas Charles Publisher. Estados Unidos. p. 1420.
54. León, J. Botánica de los Cultivos Tropicales. Segunda Edición. Servicio Editorial. IICA. San José, Costa Rica. 1987. p. 995
55. House, PR. *et.al.* 1995. Plantas Medicinales Comunes de Honduras. Primera Edición. Litografía López S. de R.L. Honduras. 555 p.
56. Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Guatemala. 287 p.
57. Gupta, M. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Primera Edición. CYTED y Convenio Andrés Bello. Editorial Presencia Ltda. Colombia. 617 p.
58. Menena, G. 1994. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña. Primera Edición. Editorial universitaria. 559 p.
59. Argueta, A. *et.al.* 1994. Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional. Editorial Instituto Tradicional Mexicana. Primera Edición. 497 p.
60. Bonilla, G. 2003. Evaluación de la Reproducción Sexual y Asexual de Orégano *Lippia graveolens* HBK (Tesis). Guatemala. Facultad de agronomía. USAC.
61. Germosén, L. 2005. Farmacopea Vegetal Caribeña. Segunda Edición. Editorial Universitaria, UNAN- León. León, Nicaragua. 486 p.
62. Cáceres, A. 2006. Vademécum Nacional de Plantas Medicinales. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social junto con la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 262 p.
63. Vásquez, V. 2007. Validación Farmacológica del Efecto Antiinflamatorio de hoja de *Lippia graveolens* (orégano mexicano), hoja de *Lippia chiapasensis* (Salviyá) y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum* (Calahuala). (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 35 p.

64. Morales, J. 2004. Estudio Farmacológico de los Extractos Etanólicos, hexánicos, cloroformico, acetato de etilo y acuosos de las hojas del orégano como diurético. (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 35 p.
65. López, C. 1999. Evaluación Farmacológica de la acción diurética de las infusiones de las plantas de *Lippia graveolens* (orégano), *Ruta chalapensis* (Ruda), y *Brassica oleraceae* (Repollo). (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 35 p.
66. Martínez, J., Bernal, N y Cáceres, A. 2000. Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED). Colombia. 536 p.
67. Roig, J. 1988, Plantas Medicinales Aromáticas o Venenosas de Cuba. Segunda Edición. Editorial Científico-técnica La Habana. Cuba. 548 p.
68. ASPROAL. 1999. Medicina veterinaria tradicional de los indígenas Zenú. ASPROAL. Colombia. 45 p.
69. Ciccio, J.F.; Calzada, J.G., *et al.*. 1978. Preliminary phytochemical study of plants of the family compositae in Costa Rica. I. Sesquiterpene lactones. *Rev. Biol. Trop.* 26:159-165.
70. Manchand, P.S. & Blount, J.F. 1978. Stereostructures of neurolenins A and B, novel germacranolide sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. *J. Org. Chem.* 43:4352-4354.
71. Borges Del Castillo, J.; Manresa-Ferrero, M.T., *et al.* 1982. Panama flora. II. New sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *J. Nat. Prod.* 45:762-765.
72. Passreiter, C.M., Wendisch, D., *et al.* 1995. Sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *Phytochem.* 39: 133-137.
73. Bohlmann, F, Natsu, A.A., *et al.* 1979. Thymol-derivate aus *Neurolaena*-arten. *Phytochem.* 18:489-490.
74. François, G.; Passreiter, C.M., *et al.* 1996. Antiplasmodial activities and cytotoxic effects of aqueous extracts and sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *Planta Med* 62: 126-129.

75. Medinilla, B. 1993. Evaluación farmacológica y toxicológica “in vitro: de algunas plantas comúnmente empleadas en Guatemala contra la malaria. Rev. Cient. Fac. CCQQ 8: 7-10.
76. Berger, I.; Barrientos, A.C., et al. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. J. Ethnopharmacol. 62: 107-115.
77. Diaz, L.P. 1996. Determinación de la actividad citostática de cinco plantas de uso medicinal en el departamento de Alta Verapaz (Tesis). Guatemala. Facultad de CCQQ y Farmacia. USAC. 63 p.
78. Villar, R., Calleja, J.M., et al. 1997. Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiaggregant activity. Phytother. Res. 11:441-445.
79. Anderson, M. 1996. Evaluación de la Toxicidad Aguda de *Neuroleña lobata* (Tres Puntas) y *Simarouba glauca* (Aceituno). (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 35 p.
80. Rodas, S. 1996. Caracterización farmacológica de 4 poblaciones naturales de *Neuroleña lobata* (Tres puntas) evaluadas “in situ” y en dos localidades “ex situ” con el propósito de su domesticación. (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 34 p.
81. Gómez, C. 1997. Evaluación comparativa del contenido de principios activos amargos en hojas de *Neuroleña lobata* (Tres puntas) provenientes de 4 poblaciones y dos cultivares para su domesticación. (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 36 p.
82. Fundación Virginia Wellington Labot, Usemos Plantas Medicinales de Petén, 1era. Edición, ProPetén, Conservación Internacional, 84 p.
83. Pinedo M., 1997, Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana, Estudio de su Uso y Cultivo, Impresión Imprenta del Ejercito, 303 p.
84. Villamar A., 1994, Atlas de las Plantas de la Medicina tradicional Mexicana II, Primera Edición, Instituto Nacional Indigenista, Mexico. 89 p.

85. Cruz, S. 2001. Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fotoquímico del extracto etanólico con actividad antiartemia de *Ocimum micranthum* Willd. (Albahaca de Monte). (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC,
86. Cáceres, A. 2006. Propuesta de Monografías Farmacopeicas de 10 Plantas Medicinales Centroamericanas. Organización de los Estados Americanos y Agencia Interamericana de Cooperación para el Desarrollo. Guatemala. 58-63 pp.
87. Vásquez, V. 2007. Validación Farmacológica del Efecto Antiinflamatorio de hoja de *Lippia graveolens* (orégano mexicano), hoja de *Lippia chiapasensis* (Salviyá) y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum* (Calahuala). (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 35 p.
88. Duke, J. 2001. Handbook of Nuts, Primera Edición, CRC Press, Estados Unidos. 245 p.
89. Rodríguez, H. 2006. La Utilidad de las Plantas Medicinales en Costa Rica. Primera Edición. Editorial Universidad Nacional. Costa Rica. 213 p.
90. Sánchez, M. 2003. Evaluación de la toxicidad aguda y subcrónica de la planta *Smilax dominguensis* (Zarzaparrilla). (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 34 p.
91. Méndez, E. 2003. Determinación de la actividad diurética de la raíz de *Smilax dominguensis*, del fruto de *Averrhoa carambola* (Carambola dulce) y del fruto de *Capsicum annum* (Chile pimiento). (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 36p.
92. Sutherland, C. 1986. Plantas comunes de Honduras. Primera Edición, Tomo II Editorial Universitaria. Honduras. 484 p.
93. MacVean A. 2003. Plantas Útiles de Peten Guatemala, Herbario UVAL, Instituto de Investigaciones Universitaria del Valle de Guatemala, 155 p.
94. CECON (Centro de estudios Conservacionistas). 1984. Plantas Comestibles y Toxicas de Guatemala. Guatemala. 150 p.
95. Lurseen, L. 2001. Cuantificación de saponinas esferoidales en *Yucca elephantipes*. (Tesis). Guatemala, Fac. de CCQQ y Farmacia, USAC, 38 p.

96. Obtención y aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña 1989. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. El Salvador.
97. Oliva J.E. 2,004. Estudio Etnobotánico de la pacaya (*Chamaedorea tepejilote Liebm*) en la comunidad el cangrejal, San Luis, Peten. (Tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. Guatemala. 52 p.
98. Pelaez P.R. 1993. Caracterización Biológica de la Pacaya (*Chamaedorea tepejilote Liebm*) en el municipio de san Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz. (Tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. Guatemala. 93 p.
99. Lock. O. 1994. Investigación Fitoquímica. Segunda Edición. Fondo Editorial. Perú. 300 p.