

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Cuantificación de flavonoides y determinación de actividad antioxidante de las hojas en dos especies del género Piper (*Piper hispidum* y *Piper oradendron*) recolectadas en Samayac, Suchitepéquez.

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN FINAL

Presentado por

Pablo Jonatán Hernández Galindo

Ruth Noemí López Morales

Para optar al título de

Químicos Farmacéuticos

Guatemala, octubre de 2013

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.

Decano

Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.

Secretario

Licda. Liliana Vides de Urizar

Vocal I

Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares

Vocal II

Lic. Rodrigo José Vargas Rosales

Vocal III

Br. Fayver Manuel de León Mayorga

Vocal IV

Br. Maily Graciela Córdova Audón

Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a quien sin él nada de esto pudo ser posible.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, la casa de enseñanza por excelencia, por permitirnos formarnos en conocimiento y sabiduría.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, pero muy especialmente a la Escuela de Química Farmacéutica, por abrirnos sus brazos y compartir con nosotros la formación profesional y ser parte de nuestras vidas.

Al Laboratorio de Productos Naturales –LIPRONAT-, por brindarnos el apoyo necesario para realizar todo cuanto estaba planificado en este proyecto. También por permitirnos formar parte de la familia lipronense, conviviendo y compartiendo tiempos que quedan en el corazón.

A nuestra asesora, licenciada Sully Cruz, y a nuestra revisora, licenciada Beatriz Medinilla, por guiarnos en el desarrollo de nuestro trabajo de seminario.

A nuestras familias, amigos, y personas que Dios ha puesto en nuestro camino que han contribuido a moldear nuestras vidas para bien.

DEDICATORIA

A Dios, mi Creador, el que me amó desde antes que me formara, y a Jesucristo, mi Salvador, que me amó y entregó su vida por mí; porque a ellos debo todo cuanto soy.

A mis Papas, Pedro y Carola, por el amor inagotable, la paciencia incansable; porque ellos dejaron sus sueños para que yo lograra alcanzar los míos. Porque realmente, fueron y son los mejores padres que pudo haberme dado Dios. Los amo.

A mi Hermana, Pamela, porque siempre estuviste dispuesta a ayudarme cuando lo pedí, porque fuiste un regalo de Dios para apagar mi soledad.

A mi Abuelo, Humberto, mi segundo papá, con el que aprendí infinidad de cosas con su ejemplo; con el que pasé muchos momentos alegres, con el que aprendí a amar a Dios. Ejemplo de templanza, sabiduría, honradez, honor, fe y amor. Ahora ya en los brazos del Señor Jesús, volveré a verte un día.

A mis Abuelas: Consuelo y Martita, por su amor de segundas madres; porque aunque ambas diferentes, ambas dieron lo mejor de sí para mí. Porque no las cambiaría, porque son mis abuelitas queridas.

A mis Primos, Merari, Sarita, Paulina, Rebeca, Benjamín y Samuel, porque junto con mi hermana somos los "Inseparables", porque espero siempre poder contar con su compañía, con su amistad, con esa chispa que nos caracteriza y que nos une.

A mis tíos y tías que han sido importantes en mi vida, porque también fueron como padres y madres, que me cuidaron y me quisieron como si fuera hijo propio.

A mi iglesia, quienes han sido parte de mi vida, que han sido mi segunda familia; quienes me tomaron como a hijo, como a hermano, como amigo. Gracias a Dios por ellos.

A mis amigos: Abraam, Abel, Adán, Alejandra, Anabella, Andrea, Angélica, Carlos, Carolina, Charlie, Christy, Deivy, Fabiola, Gerber, Georgina, Javier, Judith, Karen, Karin, Kevin, Max, Marcela, Margarita, Marielos, Marleni, Mel, Mildred, Mirna, Nathaly, Nereida, Noemí, Sofía, Walter, los cuales espero que cada día la amistad sea más grande, y a los cuales agradezco su confianza, su paciencia, su interés en que yo estuviera bien, pero sobre todo ese amor sincero.

DEDICATORIA

Principalmente a mi padre celestial, por permitirme alcanzar un logro más y nunca abandonarme en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis padres, Felipe López Pérez y Aura Lidia Morales Peña por brindarme su amor y apoyo incondicional, por estar conmigo en cada etapa de mi vida, por consentirme, y motivarme siempre a seguir adelante. Gracias los amo.

A mis hermanas, Jessica, Keila y Sofía por ser guías y amigas, gracias por cuidarme, aconsejarme y sobretodo apoyarme.

A mis cuñados, Gerson y Gustavo gracias por el apoyo y el cariño incondicional.

A mis sobrinos, Gabriel, Zara, Andre, Madeline, Jonathan y Pablo, gracias por darle tanta alegría a mi vida.

A mis amigos Andrea, Andreita, Carlos, Christy, Edward, Estefania, Fabiola, Judith, Karen, Kevin, Lucky, Margarita, Mirna, Pablo, Shirley, Walter, y Zoily. Gracias por ser parte importante en mi vida y cultivar una buena amistad.

1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

En el género *Piper* se ha detectado la presencia de diversos metabolitos entre ellos flavonoides, que son un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales. Son sustancias fácilmente oxidables y, por tanto, tienen efecto antioxidante, ya que se oxidan más rápidamente que otro tipo de sustancias. Se encuentran en la mayoría de las plantas principalmente en frutos, hojas y tallos. En América Latina se encuentra una importante representación de estas especies, aunque pocas han sido estudiadas por su composición química y bioactividad que justifique su aprovechamiento agroindustrial. En los últimos años se han desarrollado algunos proyectos de investigación a nivel regional para conocer la composición química y actividad biológica, habiéndose descrito una gran complejidad en la composición y bioactividad. Es por ello que la finalidad de la presente investigación fue determinar el potencial bioactivo de las especies *Piper oradendron* y *Piper hispidum* para su aplicación agroindustrial y a la vez establecer una base de datos de referencia para futuras investigaciones en el género *Piper*.

Se tiene un indicio favorable en ambas especies en cuanto a su contenido de flavonoides, los cuales actualmente han tenido una aplicación industrial elevada, principalmente en fitoterapia. Gracias a sus propiedades antioxidantes y tomando en cuenta además su baja toxicidad, se han convertido en una gran alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades ocasionadas por el daño degenerativo de la oxidación celular.

En base a lo anterior y para lograr dicho fin se cuantificaron los flavonoides y fenoles totales presentes en ambas especies, por medio de espectrofotometría Ultravioleta-Visible. Dichos compuestos son los responsables de la actividad antioxidante, la cual se puede evaluar por medio de un método cualitativo, la cromatografía en capa fina (CCF) y dos métodos cuantitativos espectrofotométricos con 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-ainobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

2. RESUMEN

Teniendo en cuenta la importancia de los flavonoides dentro de la fitoterapia, y conociendo la riqueza del género *Piper* en Guatemala, se seleccionaron dos especies *P. oradendron* y *P. hispidum* ya que en estudios anteriores fueron las especies que mayor porcentaje de flavonoides presentaron. A partir de ello se inició con la investigación cualitativa y cuantitativa de dichos metabolitos, para corroborar la presencia de los mismos y proporcionar una cantidad definida del metabolito en cada una de las especies analizadas; además de ello se evaluó la actividad antioxidante, característica destacada en estos metabolitos, y a partir de la cual su uso y aplicación ha sido fundamental en procesos oxidativos. La colecta del material vegetal se realizó en Samayac, Suchitepéquez.

Para comprobar la presencia de flavonoides se realizó una cromatografía en capa fina y en ella se mostró la presencia de varios flavonoides, no obstante el único metabolito presente en ambas especies fue el hipérosido. A partir de la confirmación de la presencia de flavonoides se realizó la cuantificación, por medio de espectrofotometría Ultravioleta-visible, dando como resultado una cantidad aceptable para ambas especies, y mostrando para *Piper oradendron* en promedio un porcentaje de 1.56% con un desviación de ± 0.14 y para *Piper hispidum* 1.34% y ± 0.099 de desviación, cumpliendo con el planteamiento en que al menos una o ambas especies presentarían una cantidad mayor o igual a la encontrada en investigaciones anteriores.

Posteriormente se evaluó la actividad antioxidante a las particiones (hexánicas, de acetato de etilo y butanólicas) obtenidas del extracto etanólico. Se empleó un método cualitativo, la cromatografía en capa fina (CCF) y dos métodos cuantitativos espectrofotométricos con 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Las particiones butanólicas presentaron el mejor Cl_{50} en ambas especies (*P. oradendron* y *P. hispidum*). Sin embargo ninguna de las particiones es mejor que ninguno de los estándares a los cuales se compararon las muestras anteriormente dichas.

Además se cuantificó la cantidad de fenoles totales presentes en las particiones, en donde se pudo observar que la mayor presencia de fenoles presentes se encontró mayormente en las particiones butanólicas, tanto para *P. oradendron* como para *P. hispidum*.

3. ANTECEDENTES

3.1 Flavonoides

Flavo proviene del latín *flavus* y significa de color entre amarillo y rojo, como el de la miel o el del oro; y flavonoide, se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas. Por ende se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos. Siendo que al consumirlos se obtenga de ellos propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. De esta última, principalmente, radica su función en el sistema nervioso, pues se ha visto relación de protección en enfermedades neurodegenerativas (Escamilla, 2009).

3.2 Propiedades físicas

La mayor parte de los glucósidos flavonoides son sólidos cristalinos, amarillos. Su solubilidad en agua depende de los azúcares que contienen. En general son solubles en alcoholes bajos.

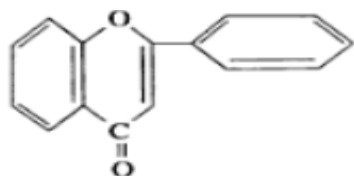
Los grupos fenólicos influyen en las propiedades; así, las geninas son solubles en Hidróxido de sodio (NaOH) y con Cloruro férrico (FeCl₃) dan colores típicos, generalmente violáceos. También son solubles en los ácidos fuertes por el carácter básico que les confieren los átomos de oxígeno del núcleo de la pirona, formándose sales de oxonio (sales de pirilio) llamadas, en este caso, sales de flavilio.

Debido al sistema de dobles enlaces conjugados, tanto las flavonas como los flavonoles son de color amarillo, mientras que las flavononas (hidroflavonas) son incoloras, puesto que al estar saturado el enlace que existía entre los átomos de carbono 2 y 3, queda interrumpida la conjugación (Primo, 2007).

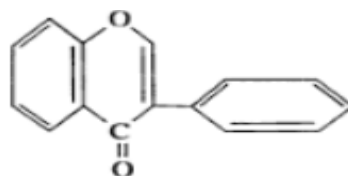
3.3 Aspectos químicos

Tienen una estructura química muy definida. Pueden observarse que de manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (ó aromáticos, para los químicos orgánicos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos C₆C₃C₆. (Martínez, 2005).

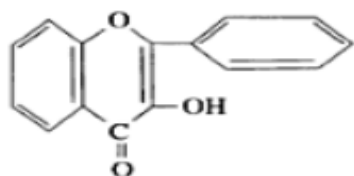
Hay cuatro tipos fundamentales de flavonoides, que derivan de los cuatro núcleos siguientes: flavona, isoflavona, flavonol y flavanona (Primo, 2007).



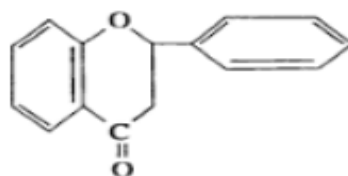
2-Fenilbenzopirona (flavona)



3-Fenilbenzopirona (isoflavona)



3-Hidroxi flavona (flavonol)



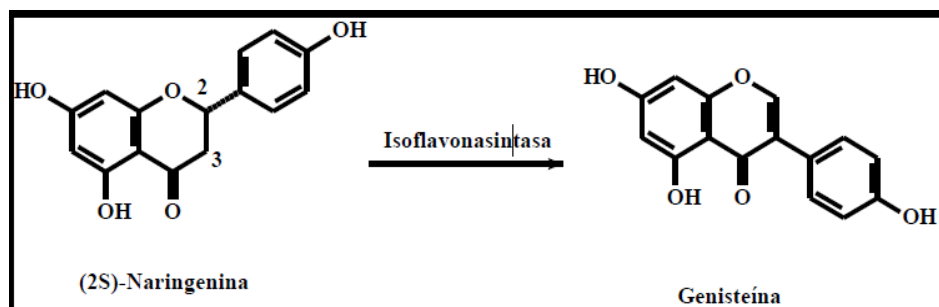
2,3-Dihidro flavona (flavanona)

3.4 Biogénesis

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto: El anillo A proviene de la ruta de la malonil Co-enzima A y el anillo B y la cadena C3 provienen de la ruta del ácido shikímico. Un tricétido se cicliza y se condensa con una molécula de ácido *p*-cumárico. La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonil Co-A da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas. Estas a su vez son los precursores de las demás clases de flavonoides. Es importante recalcar que este proceso de biosíntesis sustenta el hecho de que en la mayoría de flavonoides el anillo A sea *meta*-oxigenado, es decir como es característico de los anillos aromáticos originados por la vía de la malonil Co-A; y por otro lado, el anillo B proveniente de la ruta del ácido shikímico, generalmente es *orto*-oxigenado.

Para el caso de la biogénesis de los isoflavonoides tales como las isoflavonas, pterocarpanos y rotenoides, los experimentos realizados por diversos investigadores sugieren que hay un proceso de migración 2,3.

Por ejemplo se ha demostrado que la (2S)-naringenina (una flavanona) es convertida por una isoflavonasintasa de la soya (*Glycine max*) en genisteína (una isoflavona) (Martínez, 2005).



3.5 Actividad antioxidante de los flavonoides

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Aunado a esto, se ha visto que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa.

Con respecto a su estructura, los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y es potenciado este efecto por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4. Además, las agliconas se muestran más potentes en sus acciones antilipoperoxidativas que sus correspondientes glicósidos.

Conforme a lo anterior mencionado, la quercetina es el flavonoide que reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante, pues ésta es cinco veces mayor que la de las vitaminas C y E, además de poseer una hidrosolubilidad similar a esta última.

Existe efecto sinérgico con las vitaminas aludidas, pues el ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones durante más tiempo. Por su parte la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E.

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. Bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células. Donde se ha corroborado la protección antioxidante de los flavonoides en: Queratinocitos, fibroblastos dérmicos, ganglios sensoriales, endotelio, tejido nervioso y en lipoproteínas de baja densidad (Escamilla, 2009).

3.6 Radicales libres

Son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos ya que tienden a robar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas y a membranas celulares. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos. De hecho, nuestro propio cuerpo los fabrica en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus. Los radicales libres producidos por el cuerpo para llevar a cabo determinadas funciones son neutralizados fácilmente por nuestro propio sistema. Con este fin, nuestro cuerpo produce unas enzimas (como la catalasa o la dismutasa) que son las encargadas de neutralizarlos. Estas enzimas tienen la capacidad de desarmar a los radicales libres sin desestabilizarse (Avello y Suwalsky, 2002).

3.7 Antioxidantes

Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo y son necesarias para la salud, pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, liberando electrones en nuestra sangre que son captados por los radicales libres, manteniendo su estabilidad.

Nuestro organismo está constantemente luchando contra los radicales libres. El problema para nuestra salud se produce cuando se tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por contaminantes externos que penetran en nuestro organismo como consecuencia de la contaminación atmosférica, el humo de cigarrillos que

contiene hidrocarburos aromáticos polinucleares así como aldehídos que producen distintos tipos de radicales libres. El consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina y el consumo de ácidos grasos trans como los de las grasas de la carne y de la leche también contribuye al aumento de los radicales libres (Avello y Suwalsky, 2002).

3.8 Metabolitos con actividad antioxidante:

3.8.1 Tocoferoles y tocotrienoles:

La vitamina E pertenece al grupo de vitaminas liposolubles ampliamente distribuidas en los alimentos. Su principal función descrita es como antioxidante natural que reacciona con los radicales libres solubles en los lípidos de las membranas, también desempeña una función fisicoquímica en el ordenamiento de las membranas lipídicas, estabilizando las estructuras de membranas. Su absorción es relativamente pobre y va unida a los lípidos de la dieta.

La forma del α -tocoferol es la más importante de los antioxidantes liposolubles y protege las membranas de la célula contra la oxidación reaccionando con los radicales del lípido producidos en la reacción en cadena de peroxidación de lípidos (Herrera, 2001).

3.8.2 Carotenoides:

Los carotenoides se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomate, pimentón, etc.), y en menor proporción en raíces (por ejemplo la zanahoria). Están involucrados en la eliminación de dos de las especies reactivas del oxígeno, el oxígeno singlete y el radical peroxilo. Además son efectivos desactivando moléculas excitadas electrónicamente las cuales están involucradas en la generación tanto de radicales como del propio oxígeno singlete (Haafte, 2003).

3.8.3 Polifenoles:

La actividad antioxidante de los polifenoles se debe a su facilidad para reducir la producción de radicales libres, bien por inhibición de las enzimas que intervienen, bien por quelación con los metales de transición responsables de la generación de los

radicales libres. Además, los flavonoides por su bajo potencial redox, son capaces de reducir las especies de oxígeno reactivo (ROS), altamente oxidadas (Halliwell, 2005).

Los flavonoides tienen una poderosa acción antioxidante In Vitro, siendo capaces de barrer un amplio rango de especies reactivas del oxígeno, nitrógeno, y cloro, tales como el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peroxilo, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores (Halliwell, 2005).

3.9 Estudios sobre Flavonoides y su actividad antioxidante

En el 2004, se publicó un artículo en el que se evaluó la capacidad antioxidante de los flavonoides en manzanas rojas con y sin cáscaras, fresas, tomates y cebollas frescas y tratadas térmicamente. Se realizó la medición en un espectrofotómetro de fluorescencia y los resultados mostraron que la capacidad antioxidante de los flavonoides de las frutas y verduras disminuía con la aplicación de los tratamientos térmicos, obteniendo el menor valor en las manzanas rojas con y sin cáscaras, fresas y tomates tratadas por calor seco (horno); y en cebollas, por calor húmedo (hervido y vapor). Los flavonoides presentaron mayor actividad antioxidante en estado fresco, disminuyendo al ser sometidos a los distintos tipos de calor (cocción) (Agostini, 2004).

En el 2007, se menciona sobre la actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano identificándose ciertos flavonoides que fueron contribuciones importantes en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas. El extracto de acetato de etilo presentó la actividad antioxidante más alta, lo cual fue ventajoso para el aislamiento de nuevos compuestos con actividad biológica. En conclusión el tallo de *L. graveolens* var. *berlandieri* mostro ser una fuente potencial de flavonoides que podría contribuir al desarrollo de nuevos compuestos con aplicaciones en agronomía y medicina (Soto,2007).

En el 2007, se dio a conocer el artículo “Relación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles y flavonoides de extractos etanólicos de polen de distinto origen floral”. Este artículo presenta la cuantificación de los compuestos polifenólicos totales por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como referencia. Para cuantificar los flavonoides se determinó la absorbancia, a 428 nm del complejo flavonoides-

aluminio, obtenido por reacción del extracto polínico con una solución metánolica de AlCl_3 al 2%. La Quercetina fue utilizada como compuesto de referencia. Todas las muestras de polen analizadas presentaron moderada actividad antirradicalaria y antioxidante, y se encontró que existe correlación lineal directa entre el contenido de polifenoles y la capacidad atrapadora de radicales libres. Sin embargo, la actividad antioxidante es moderada para estos extractos y se relaciona directamente con el contenido de flavonoides (Medina, 2007).

En el 2009, se publicó el artículo “Actividad antioxidante e inmunológica de flavonoides aislados de hojas de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón)” el cual determinó la actividad antioxidante de las hojas de Yacón mediante el método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), midiendo la actividad inhibidora de la formación de radicales libres y la producción de malondialdehído como indicador de lipoperoxidación. En todos los casos, la fracción flavónica mostró actividad antioxidante dependiente de la concentración, a mayor concentración mayor actividad antioxidante; pero no se mostraron diferencias cuando se comparó con la vitamina C, los flavonoides estándar quercetina y rutina, tuvieron una actividad antioxidante comparativamente similar a la vitamina C (Aguilar y Bonilla, 2009).

En el 2009, se realizó un estudio que evaluó la contribución de los flavonoides en el potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri harms*. Se determinó que los antioxidantes de dichas hojas mostraron capacidad para estabilizar radicales libres, poder reductor del ion Fe^{+3} , habilidad para quelar el Fe^{+2} y descomponer el peróxido de hidrógeno, así como también aptitud para capturar especies reactivas de nitrógeno, entre ellas el óxido nítrico (NO). Complementariamente, la capacidad de la especie vegetal para quelar el ion Fe^{+2} es fundamentalmente soportada por los flavonoides que posee en las hojas y la corteza. Es importante tener en cuenta que la actividad antioxidante evidenciada en *B. kalbreyeri* se basó en los derivados fenólicos, los cuales sustentan, al menos en parte, las pruebas *in vitro* a que fue sometida (Ortiz, 2009).

En el 2011, se publicó un artículo en el que se comparó la actividad antioxidante, detección y cuantificación de flavonoides y compuestos fenólicos en tres especies de la familia *Passifloraceae* (*Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora ligularis*); dicha actividad se determinó cualitativamente por CCF, en donde todos los extractos evidenciaron una actividad

positiva; la cuantificación de esta actividad se realizó por el método de DPPH que sirve para determinar dicha actividad de compuestos con característica polares, con este método se determinó que la mejor actividad la presentó el extracto de metanol de *P. ligularis*. Con el método de ABTS se cuantifica la actividad de compuestos con características más apolares y por este método la mejor actividad también se presentó con el extracto de metanol de *P. ligularis* (Marroquín, 2011).

3.10 Estudios de flavonoides en el género *Piper*

En el 2000, se realizó un estudio Fitoquímico de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida *in vitro*. Los resultados más relevantes fueron: el extracto CH₂Cl₂ (orgánico) PA, evaluado por la prueba antifúngica contra *N. crassa* presentó una actividad a una concentración de 60 µg/ml y contra *C. albicans* no presentó actividad; en la prueba antiparasitaria presentó un CI₅₀ de 37 µg/ml contra *L. braziliensis*, 25 µg/ml frente a *L. amazonensis* y 46 µg/ml frente a *L. donovani*. El extracto fue llevado a una cromatografía líquida al vacío (CLV) obteniéndose 4 fracciones, resultando activa la fracción PA2, a una concentración de 60 µg/ml. Esta fracción fue sometida a una cromatografía en Sephadex LH-20, posteriormente purificada mediante cromatografía en capa fina aislándose tres metabolitos secundarios: 5,7 dihidroxi flavanona, Pinocembrina, (P-1); 5,7 dihidroxi-4'-metoxi-flavanona, Angophorol, (P-2) y el ácido 3 (3',7' dimetil-2'-6-' octadienil)- 4-metoxi benzoico (P-3). Los tres metabolitos aislados fueron evaluados biológicamente y presentaron actividad antifúngica positiva (Flores, 2000).

En el año 2008, se efectuó un análisis de Flavonoides en *Piper hostmannianum var. bervicense*, utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con presión atmosférica y los comportamientos de la fragmentación de chalconas, dihidrocalconas y flavonoides fueron estudiados por la APCI (Ionización Química por Presión Atmosférica) en el modo negativo del ión. Los espectros obtenidos revelaron la fragmentación específica, lo que permitió incrementar el conocimiento sobre la estructura de estas agliconas. Con base en las reglas de espectrometría de masa/ fragmentación, la estructura de los once flavonoides encontrados se propuso a partir del extracto de acetato de etilo de *P. hostmannianum var. Berbicense*. La mayor parte de los flavonoides se identificaron de forma inequívoca. Algunos

isómeros y análogos se podían distinguir unas de otras mediante la comparación de los ultravioleta visibles, los espectros MS/Ms y MS3. Este trabajo representa un buen modelo para la rápida identificación de los flavonoides bioactivos de menor importancia en los extractos de plantas en crudo (Portet, 2008).

En el 2008 se publicó un estudio sobre los flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum Kunth* (piperaceae) y derivados acetilados, dicho estudio se realizó a partir del extracto etanólico y fueron aislados tres flavonoides: 5-hidroxi-7-metoxiflavanona, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona y 2',4',6'-trimetoxidihidrochalcona. De las flavanonas aisladas fueron obtenidos los derivados acetilados: 5-acetoxi-7-metoxiflavanona y 5-acetoxi-4',7-dimetoxiflavanona. Las estructuras fueron elucidadas empleando técnicas espectroscópicas y por comparación con datos de literatura. Los compuestos naturales y sus derivados fueron sometidos al bioensayo de letalidad frente a *Artemia salina*. El flavonoide 5-hidroxi-7-metoxiflavanona presentó la mayor actividad tóxica frente a los microcrustáceos CL_{50} 1.8 $\mu\text{g/ml}$ (Plazas et. al., 2008).

En el 2009, se realizó el estudio sobre la actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de *Piper tuberculatum* en el cual se demostró que todas las especies de dermatofitos estudiados resultaron altamente susceptibles a la actividad inhibitoria de los tipos de extractos ensayados. Los extractos de (CH_2Cl_2 :MeOH) (2:1) exhibieron una mayor actividad antifúngica que los extractos de EtOH, y estos que los obtenidos por decocción. Así mismo, los extractos de inflorescencias fueron más eficientes que los de hojas y estos que los obtenidos de tallos, en tanto que las concentraciones de 0,5 a 1,5 mg/mL mostraron, también, la más alta actividad biológica contra *T. rubrum*, *M. canis* y *M. gypseum* (Palacios, 2009).

Durante el 2011, se publicó el estudio sobre la caracterización de la actividad antioxidante de extractos de especies nativas del género *Piper* y cuantificación de metabolitos secundarios con potencial de desarrollo. Se recolectaron 11 especies de *Piper* de tres localidades, se procesaron de acuerdo a buenas prácticas, se verificó que todas contenían <10% de humedad, se depositó una muestra de referencia y se obtuvieron extractos CH_2Cl_2 y MeOH. De los extractos CH_2Cl_2 el mayor rendimiento se obtuvo de las hojas de *P. schippianum* (10.24%) y la raíz de *P. umbellatum* (7.43%), de los MeOH de las hojas de *P. patulum* (15.73%) y *P. variabile*

(15.53%). Los mayores rendimientos de aceite esencial se obtuvieron de las hojas de *P. variable* ($0.993 \pm 0.347\%$) y *P. patulum* ($0.846 \pm 0.168\%$). Por CCF todos los extractos demostraron tener flavonoides, el extracto MeOH de *P. variable* presentó el mayor número de bandas, pero al cuantificarlo solamente dio 0.38%. Al cuantificar los flavonoides macrometricamente se demostró una cantidad importante en las hojas de *P. oradendron* (1.57%) y *P. hispidum* (0.87%). Todos los extractos mostraron la presencia de saponinas, los MeOH de las raíces de *P. variable* evidenciaron la presencia de cuatro bandas y los de *P. psilorhachis* y *P. retahuleuense* tres bandas. Al cuantificarse las saponinas, las hojas con mayor porcentaje fueron las de *P. amalago* (2.43%) y *P. patulum* (1.77%), en la raíz la mayor cantidad la presentó *P. amalago* (1.50%) y *P. oradendron* (0.44%) (Cáceres, 2011).

3.11 Monografías:

3.11.1 Nombre de la especie:

Piper oradendron Trel. & Standl. (Piperaceae)



Imagen No. 1 *Piper oradendron*, Samayac, Suchitepequez. Foto: Armando Cáceres.

3.11.1.1 Descripción botánica:

Arbusto de 1-2.5 m de alto. Ramas delgadas, densamente hispidulosas con pelos cortos, reflexos. Pecíolos delgados, 1-2 cm de largo, no alados, hispidulosos, dilatados en la bases (Cáceres, 2011).

Hojas delgadas, usualmente verdes o verde oscuras cuando están secas, densa y diminutamente pelucido-puntado, nada o levemente lustrosas,

ovadas u ovado-elípticas, principalmente 13-18 cm de largo y 6-9 cm de ancho, abruptamente acuminadas o largamente acuminadas, oblicuas y conspicuamente desiguales en la base, usualmente agudas en un lado y obtusas o aún redondeadas en el otro, no buladas, escabrosas o hirtelosas en el haz a lo largo de la costa, en cualquier otro lado glabras o casi glabras, usualmente muy suaves al tacto, esparcidamente estrigilosas en el envés en los nervios y venas o en edad glabras, suaves al tacto, penninervias. Los nervios 3-4 en cada lado, ascendiendo en un ángulo usualmente menor de 45°, levemente arqueados o casi erectos, muy delgados, prominentes, las venas prominentes, usualmente pálidas, laxamente reticuladas. Pedúnculos opuestos a las hojas, algo gruesos, cerca de 6 mm de largo, hispidulosos o glabros. Espigas delgadas, las inmaduras 5-6 cm de largo y 2 mm de diámetro, obtusas. Brácteas densamente pubescentes (Cáceres, 2011).

3.11.1.2 Hábitat:

Matorrales húmedos a secos o bosques mixtos. Es un arbusto común de las colinas y llanuras del declive del Pacífico (Cáceres, 2011).

3.11.1.3 Altura y distribución geográfica:

Se encuentra a una altura de 1,200 msnm o menos a temperaturas de 23-34° y humedad relativa entre 51-85%. Se cree que es una especie endémica de Guatemala, se ha reportado para Izabal, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Retalhuleu, San Marcos y Suchitepéquez (Cáceres, 2011).

3.11.1.4 Usos populares:

No hay información disponible.

3.11.1.5 Composición Química:

Las hojas contienen alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceite volátil y cumarinas. El aceite esencial contiene β -pineno, germacreno e iso-espatulenol se presentan como mayoritarios y citonelal, linalool, cineol, limoneno y citral (Cáceres, 2011).

3.11.1.6 Farmacología y toxicología:

No hay información disponible.

3.11.2 Nombre de la especie:

***Piper hispidum* Swartz (Piperaceae)**



Imagen No. 1 *Piper hispidum*, Samayac, Suchitepequez. Foto: Luis Álvarez.

3.11.2.1 Descripción botánica:

Arbustos profusamente ramificados de 1-4 m de alto. Hojas pinnatinervias, asimétricas, elíptico-ovadas, ovadas o ampliamente ovadas, ocasionalmente obovadas, (9-) 11-18 (-20) cm de largo y (4.5-) 6-8(-9.5) cm de ancho, acule cilíndrico color verde claro, nodoso, áspero, ramos jóvenes pubescentes. Hojas con ápice acuminado, base inequilátera, el lado más largo obtuso, el más corto cuneado, ocasionalmente cuneadas sobre ambos lados, densamente punteado-glandulares en ambas superficies,

particularmente en el envés, verde nítidas en ambas superficies, cartáceas, verde cafés y opacas en ambas superficies cuando secas, tardíamente rugosas, estrigosas o hispídas en la haz, hispído adpresas en el envés. Pecíolos 0.3-0.7 cm de largo, densamente estrigosos, con un desarrollo estipular prominente, 68 mm de largo, caduco. Inflorescencias erectas en todos los estadios, blanco-amarillentas en la antesis, verde pálidas en fruto. Pedúnculo 0.5-0.7 (-1) cm de largo, hispído-estigoso, glabrescente. Raquis 6-7.5 (-11) cm de largo, glabro. Brácteas florales triangulares, 0.2 mm de ancho, dorsal y marginalmente fimbriadas. Flores densamente agrupadas en el raquis formando bandas alrededor de la espiga, sésiles. Estambres 4, filamentos tan largos como las anteras, éstas con dehiscencia horizontal. Pistilo oblongo con 3 estigmas sésiles. Frutos ovoides, 0.6-0.8 mm de largo, comprimidos lateralmente, apicalmente obtusos, estrigosos, granulados, café oscuros cuando secos. Raíces adventicias con estructura primaria con epidermis uniestratificada y corteza parenquimatosa la cual contiene ideoblastos con material lipofílico (Cáceres, 2011).

3.11.2.2 Hábitat:

Frecuentemente en matorrales, pasto grueso o bosques húmedos, lluviosos o secos, bosques premontanos. Común en sitios expuestos o en sombrío de bosques secundarios (Cáceres, 2011).

3.11.2.3 Altura y distribución geográfica:

Se encuentra a 1,900 m o más bajo, más comúnmente debajo de los 1,000 m. Se reporta para el sur de México (Veracruz), Guatemala (Petén, Alta Verapaz, Izabal, Santa Rosa, Escuintla, Sacatepéquez, Chimaltenango, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos, Quiché, Huehuetenango), Belice, Caribe y toda Centroamérica hasta Suramérica (Cáceres, 2011).

3.11.2.4 Época de floración y fructificación:

Florece en los meses de noviembre y de febrero a agosto (Cáceres, 2011).

3.11.2.5 Usos medicinales atribuidos:

La infusión de hojas se usa para regular la menstruación y proteger contra las caries. Los Achuales, del río huasaga mastican las hojas para ennegrecer los dientes y protegerlos de la caries. Los Boras usan un baño de las hojas para tratar las llagas en la boca de los niños. Además es utilizado como repelente de insectos, y para las picaduras de insectos. La hoja es astringente, cicatrizante y para el tratamiento de las úlceras.

Partes aéreas: Se usa para mordedura de serpiente e insectos, limpiador de piel, matar piojos, dolores generales, dolor de estómago y úlceras, fiebre, regular la menstruación, fuego bucal, fiebre por malaria, amigdalitis, paperas, blanquear dientes, favorece la digestión (digestivo). Se utiliza también en el veneno de flechas (Cáceres, 2011).

Hojas, tallos y raíces: Tradicionalmente se utilizan en afecciones respiratorias, contusiones, luxaciones, conjuntivitis, trastornos digestivos, hemostáticos, como carminativo, antidiabético, sedante, antihemorroidal en insomnio, eccemas, malaria, antiinflamatorio ocular y bucal, piel y mucosas, cicatrizante, antiulceroso, hemorragias, diarreas sanguinolentas, antitusígeno y expectorante. Se usa en el tratamiento de diabetes, diarrea, puerperio, parásitos, anginas, paperas y empacho (Cáceres, 2011).

3.11.2.6 Usos populares:

La decocción se usa en lavados locales, como desinflamante de afecciones de la piel, favorece la cicatrización de heridas; administrado por vía oral es útil en el tratamiento de úlceras y gastritis. La infusión se usa en gargarismos como antiinflamatorio

bucal; tomado, se utiliza para afecciones urinarias, úlceras gástricas y diarreas infantiles (Cáceres, 2011).

3.11.2.7 Composición Química:

En una investigación fitoquímica preliminar, en toda la planta se identificaron alcaloides, flavonoides, taninos, antocianinas, saponinas, esteroides, sesquiterpenlactonas, cumarinas y glicósidos cardiotónicos; aceites esenciales (germacreno D, β -cariofileno y α -farneseno) (Cáceres, 2011).

Hojas: Contiene alcaloides, saponinas, esteroides, taninos flavónicos, flavonoides (kaempferol), flavanonas (6-hidroxi-5,7-dimetoxiflavona, 5-hidroxi-5,7-dimetoxiflavona, pinostrobin, 5,7,8-trimetoxiflavona), aceites esenciales, fenoles, esteroides, diterpenos, triterpenos (friedilenol, friedelina, *d*-amirenona, dammaradienilo), azúcares reductores y glicósidos, guayanólidos, eupatorina, eupatilina, cumarinas, emodina, antracenos, ácidos y vitamina K y compuestos reductores, vaticina, éter matérico, cínelo, ácido tartárico, chalconas (2',3'-dihidroxi-4',6'-dimetoxichalcona y 2'-hidroxi-3'4'6'-trimetoxichalcona). El aceite esencial contiene ácido benzoico, acetato de borneol, γ -cadineno, canfeno, β -cariofileno, α -guaiano, mirceno, α -felandreno, β -felandreno, α - y β -pinenos, pinostrobin, 3,7-metil-1,3,6-octatrieno, linalool, biciclo-heptan-2-canfor, β -selineno, 2-5-6-trimetil-1,3,6-heptatrieno, 2,4-diisopropenil-1-metil-1-vinilo, benzociclo-heptano, biciclogermacrano, α -copaeno, 1,6,10-dodecatrien-3-ol, (-)-espatulenol, α -guaiano, β -sesquifelandreno (Cáceres, 2011).

Tallos y raíces: Contiene aceites esenciales y un principio semejante al ácido tartárico; fenoles, esteroides, monoterpénos (α - y β -pineno), hidrocarburos sesquiterpénicos (β - y δ -elemeno, α -cubeneno, isobornil isobutirato, nerilacetona, (Z)- β -farneseno, (E)-murolo-4-(14),5-diene, γ -gurjunena, germacreno A, B y D, (E,E)- α -

farneseno, δ -cadieno, (E)-nerolidol, oxido cariofileno, globulol, humuleno epóxido II, (1,10-di-epi)-cubenol, cubenol) terpenos (α -felandreno, P-cimeno, limoneno, α -muroлено, elemicina, dilapiol, apiol), azúcares reductores y glicósidos, alcaloides, saponinas, esteroides, taninos flavónicos, flavonoides y fenilpropanoides (Cáceres, 2011).

A partir del extracto etanólico de las inflorescencias fueron aislados tres flavonoides: 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona y 2',4',6'-trimetoxidihidrochalcona. De las flavanonas aisladas fueron obtenidos los derivados acetilados 5-acetoxi-7-metoxiflavanona y 5-acetoxi-4',7-dimetoxiflavanona (Cáceres, 2011).

3.11.2.8 Toxicología:

En pruebas de gastroprotección en ratones albinos, al aplicar dosis excesivas del extracto (5 g/kg) no se observaron señales de toxicidad en los animales. En el estudio preliminar de la toxicidad del extracto liofilizado de hojas se determinó que la administración de 3.91, 1.95 y 0.98 g de extracto por kg de peso corporal, provoca muertes en el 100% de los especímenes y con 0.49 g/kg se observa 66% de muertes a las 24 horas. Para la fase definitiva se utilizaron 39 especímenes de *Mus musculus* cepa Balb/c, en siete grupos a los que se les administró extracto liofilizado de hojas a dosis de 0.75 y 0.125 g de extracto por kg de peso corporal máxima y mínima respectivamente; observándose: 100% de muertes, a las 24 horas, con la dosis máxima y 16.67% de muertes, a las 72 horas, con la dosis mínima. La DL₅₀ a las 72 horas fue 0.2654 g de extracto liofilizado de hojas por kg de peso corporal. Los análisis realizados a través de bioensayos de toxicidad de los extractos metabólicos, diclorometánicos e infusiones arrojaron resultados positivos (Cáceres, 2011).

3.11.2.9 Datos farmacológicos:

Se le atribuye actividad antiinflamatoria y repelente. Tiene propiedad antifúngica y antilevadura. El extracto etanólico total (5000ppm) presenta actividad antibacteriana del 100% sobre *B. subtilis*, y del 50% sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhi* y *P. vulgaris*. Presenta actividad contra *M. canis*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, y del 25% sobre *T. rubrum*. Presenta una actividad antiherpética sobre *Herpes simplex* tipo 1 del 14.2% a una MCNC de 0.25 µg/mL.

Las amidas pirrolidínicas: N-[3'4'-metilendioxfenil)-2-(Z),4(Z).heptadienoil] pirrolidina, (3Z, 5Z)-N-isobutil-8-(3'4'-metilendioxfenil)-heptadienamida, N-[3-(6'-metioxi-3',4'-metilendioxfenil)-2-(Z)-profenolil]pirrolidina, N-[2-(3'-4'-metilendil-oxi-6-metoxi-fenil)-prop-cis-2-enoil]pirrolidina, N-[5-(3'-4'-metilendil-oxi-fenil)-penta-trans-2-dienoil] pirrolidina y piperamina aisladas de hojas tienen actividad contra *C. sphaeropermium* (Cáceres, 2011).

Por fraccionamiento bioguiado se aisló la aseborgenina como componente activo contra *P. falciparum* (Cáceres, 2011).

Farmacología experimental preclínica: Un estudio determinó que tiene actividad antiinflamatoria por una disminución del edema en ratones albinos raza Swiss al administrar vía tópica la decocción (en Cloruro de Sodio (NaCl)) del polvo-cernido (100 mg/kg), se comparó con un grupo control que recibió diclofenaco y hubo una diferencia significativa entre la dosis vegetal y el diclofenaco. En un ensayo en conejos con grupo problema y control, se determinó que los extractos acuoso y crudo (250 mg/kg) p.c. pueden ser utilizados para detener la sangría anormal. Ensayos *in vitro* han demostrado que posee actividad contra bacterias Gram-positivo. Otro estudio demostró que el infuso al 10%, luego de filtrado y liofilizado, resultó ser efectivo en un 67.5% de los casos luego de la

administración a la dosis de 1 g/kg por vía oral, a ratones con lesiones gástricas necrosantes inducidas por etanol.

Su aceite esencial presentó actividad contra *A. aegypti* y *A. albimanus* a una concentración de 0.5 mg/mL en su primer y segundo estadio y actividad citotóxica a 0.5 mg/mL contra nauplios de *A. salina* (Cáceres, 2011).

En extractos de hojas se aisló 9,10-methylenedioxy-5,6-Z-fadyenolide, al cual se le determinó actividad agonista de 5-HT7, así como los compuestos 5,6-Z-fadyenolide y piperolide con un efecto agonista estrogénico. (Cáceres, 2011)

Farmacología clínica: Un estudio realizado en 20 pacientes con el diagnóstico de úlcera péptica, sometidos a tratamiento con el micronizado de hojas en forma de cápsula de 300 mg administrados por vía oral durante 15 días para úlcera duodenal y 28 días para úlcera gástrica. Los resultados indican que en dosis de 900 mg cada 8 horas, cicatrizaron a 2 y 4 semanas de tratamiento, la úlcera duodenal y gástrica respectivamente (Cáceres, 2011).

4 JUSTIFICACIÓN

Dentro de Guatemala, a pesar de una serie de estudios desarrollados sobre plantas medicinales, existe poca información al respecto de algunos géneros con potencial, entre ellos el género *Piper*. Si bien la mayoría de especies vegetales han sido estudiadas con la finalidad de evaluar diversas actividades biológicas tales como cicatrizante, antiespasmódico, y antiinflamatorio. Estudios previos indican que *P. oradendron* y *P. hispidum* poseen actividad antioxidante, sin embargo es necesario cuantificar la cantidad de flavonoides que puedan estar relacionados con su efecto antioxidante.

El efecto antioxidante de los polifenoles es esencial para el ser humano, y los flavonoides encontrados en estas dos especies de la familia *Piperaceae* llega a proveer una nueva base para una futura formulación de medicamentos que sean utilizados en la salud preventiva, sabiendo con anterioridad que los flavonoides pueden ser utilizados dependiendo de su tipo de estructura en protección, es decir, evitando la formación de diversas enfermedades, desde cáncer, problemas cardiacos, fragilidad capilar, formación de trombos, hipercolesterolemia, enfermedad hepática, estomacal, microbiano, etc., esto debido a su mecanismo de acción la cual yace en la captura de los radicales libres que forman las células. Por todo lo anterior, son necesarios mayores estudios en estas dos especies endémicas de Guatemala, para validar el uso popular y aprovechar su potencial.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

5.1.1 Cuantificar la concentración de flavonoides presentes en *Piper hispidum* y *Piper oradendron*, y evaluar la actividad antioxidante para validar su uso medicinal.

5.2 Objetivos específicos:

5.2.1 Cuantificar los flavonoides presentes en las dos especies *Piper hispidum* y *Piper oradendron* expresados como hiperósido, por espectrofotometría ultravioleta visible.

5.2.2 Evaluar la actividad antioxidante de los extractos polares y apolares mediante el método de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y Ácido 2,2'-azin-obis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).

5.2.3 Determinar la Concentración inhibitoria al 50%(CI₅₀) de los extractos que presentan actividad antioxidante mediante 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y Ácido 2,2'-azin-obis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).

5.2.4. Determinar la cantidad de fenoles totales en ambas especies de *Piper*.

6. HIPOTESIS

Al menos una de las especies de *Piper* presentará una cantidad total de flavonoides mayor o igual al 1 % y a la vez presentará actividad antioxidante.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Población:

Dos especies del género *Piper*.

7.2 Muestra:

Hojas de *Piper hispidium* y *Piper oradendron*

7.3 Materiales y Equipos:

- Horno
- Percolador de acero inoxidable
- Evaporador rotatorio
- Balanza semianalitica y balanza analítica
- Campana de extracción de gases
- Cámaras cromatográficas
- Gradillas para tubo de ensayo
- Estufa eléctrica
- Asperjador de vidrio
- Lámpara de UV/VIS
- Cromatoplaça de Sílicagel 60F₂₅₄
- Espectrofotómetro AGILENT 8543
- Ampolla de decantación
- Papel filtro algodón
- Marcador permanente
- Cinta adhesiva
- Capilares de 5 µL
- Balón para evaporador rotatorio de 1000 ml
- Campana de extracción de gases
- Reflujo
- Manguera de vacío
- Embudos

- Balones aforados de 100 ml, 50 ml, 25 ml y 5 ml
- Ampolla de separación
- Sonicador
- Tubos de vidrio capacidad de 10 ml
- Agitador tipo vortex
- Refrigeradora

7.3.1 Reactivos y solventes:

- Diclorometano
- Etanol
- Hexano
- Acetato de etilo
- n-butanol
- solución acuosa de metenamina solución reactiva (SR) (0.5% en agua)
- acetona
- Ácido clorhídrico
- Acetato de etilo
- Agua
- Cloruro de aluminio al 2% en solución de ácido acético en metanol
- Solución metanólica de ácido acético solución reactiva (SR) (5%)
- Metanol absoluto
- 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)
- Buffer de acetato
- Estándares antioxidante de terc-butyl-hidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, vitamina C, vitamina E y Trolox.
- Acido 2,2'-azin-obis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)
- Solución persulfato de sodio
- Trolox
- Ácido gálico

7.4 Métodos

7.4.1 Obtención y colecta del material:

El material se recolectó en Samayac, Suchitepéquez en la época de invierno. Se obtuvo una cantidad de hojas representativa de 1000 g; de los cuales 500 g fueron identificados y guardados como muestra de referencia, y los 500 g restantes fueron utilizados para los análisis en el laboratorio. El almacenamiento, embalaje y transporte se realizó conforme a los principios aceptados de buenas prácticas de cultivo y post-cosecha (World Health Organization, 1998).

7.4.2 Herborización e identificación botánica:

La herborización e identificación del material se realizó en Farmaya, S.A. con su respectiva numeración de herbario: para *P. hispidum*, CFEH 1071; para *P. oradendron*, CFEH 1075.

7.4.3 Secado y molienda de la planta:

Las hojas de ambas especies se secaron, tamizaron y se les realizó la prueba de humedad residual. Las hojas que sobrepasaron el límite del 10% máximo, se secaron en horno a 40°C hasta cumplir con las especificaciones de humedad. La molienda se realizó empleando un tamiz No.5 para disminuir el tamaño de la partícula (Marroquín, 2011).

7.4.4 Obtención de extractos:

Llenado del percolador (Marroquín, 2011):

1. Colocar en la punta del percolador un pedazo de algodón adecuado, de manera que sirva de filtro de forma circular y colocarlos cubriendo el fondo del percolador.
2. Tapar la punta del percolador con un tapón plástico.
3. Agregar la tercera parte de la cantidad pesada de materia vegetal seca y cubrir con diclorometano.

4. Verificar que no queden burbujas y si las hay, hacer presión con una espátula para desaparecerlas.
5. Agregar el resto del material vegetal seco y cubrir nuevamente con diclorometano, repetir el paso anterior.
6. Identificar percolador con el nombre de la planta, fecha y peso. Dejar reposar por 12-24 horas.
7. Abrir la llave del percolador y dejar gotear hasta que salga todo el disolvente.
8. Agregar el disolvente recuperado a la materia en extracción en el percolador, repetir esta operación tres veces antes de comenzar a concentrar en evaporador rotatorio.
9. Pasar el disolvente recogido al balón del evaporador rotatorio para concentrar.
10. Terminado tres veces la rotavaporación del extracto de diclorometano, llenar el percolador, que tiene el material vegetal con etanol. Esto para obtener el extracto etanólico; lavar el material vegetal tres veces y concentrar el extracto.

7.4.5 Concentración en evaporador rotatorio (Marroquín, 2011):

1. Encender el baño María y llevar la temperatura a $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
2. Engrasar todas las partes esmeriladas y armar el evaporador rotatorio según el instructivo específico.
3. Succionar la solución obtenida del percolador.
4. Conectar la bomba de vacío y el evaporador rotatorio, e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a la consistencia semisólida. Para el extracto de diclorometano no se trabaja con vacío, mientras que el extracto de etanol se trabaja con vacío aproximadamente 337 mmHg.
5. Verter el extracto concentrado en un cristalizador de vidrio debidamente tarado y rotulado.
6. Colocar en una desecadora durante 7-15 días.
7. Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales debidamente tarados y rotulados.

8. Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a 4°C.

7.4.6 Aislamiento

El extracto obtenido se evapora con calentamiento no superior a los 50°C y se le hacen particiones sucesivas con hexano, acetato de etilo y n-butanol. Los flavonoides apolares quedan en la fase hexánica, los medianamente polares en la fase acetato de etilo y los más polares en el n-butanol (Martínez, 2005).

7.4.7 Determinación de flavonoides por cromatografía en capa fina (Marroquín, 2011):

- Solución estándar: 10 µl de rutina, quercetina, hiperósido, ácido clorogénico.
- Fase móvil: n-butanol-ácido acético glacial-agua (40:10:50 ó 20:2:25)
- Fase estacionaria: placa de sílica gel 60F₂₅₄

Procedimiento:

- Concentrar 1 ml de extracto vegetal y aplicar en la cromatoplaca.
- Sembrar 5 µl de muestra y 10 µl de cada estándar.
- Detección: Spray revelador: NP/PEG (NP: solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina. PEG: solución etanólica al 5% de propilenglicol 4000).
- Resultado: Se produce un color fluorescente intenso en UV 365 nm inmediatamente al agregar el revelador, o después de 15 minutos. La adición de propilenglicol disminuye el límite de detección de 10 µg a 0.5 µg.

7.4.8 Cuantificación de flavonoides expresados como hiperósido (García, 2008):

Solución madre:

- En un balón de fondo redondo de 100 ml (A) colocar: 0.4 g de droga pulverizada (800 µg) + 1 ml de solución acuosa de metenamina solución reactiva (SR) (0.5% en agua) + 20 ml de acetona + 2 ml de HCl.
- Calentar la mezcla en baño de maría, bajo reflujo por 30 min.
- Filtrar la mezcla a través de un algodón hacia un balón volumétrico de 100 ml (B).

- Regresar el residuo de la droga al balón de fondo redondo (A) y añadir 20 ml de acetona.
- Calentar nuevamente a ebullición bajo reflujo durante 10 min.
- Filtrar nuevamente con algodón hacia el balón volumétrico de 100 ml (B)
- Repetir nuevamente la operación colocando el residuo de la droga y el algodón en el balón de fondo redondo (A) y adicionar: 20 ml de acetona y calentar bajo reflujo por 10 min.
- Filtrar de nuevo hacia el mismo balón volumétrico de 100 ml (B)
- Enfriar a temperatura ambiente y ajustar a un volumen de 100 ml con acetona.
- En una ampolla de separación tratar 20 ml de solución anterior con 20 ml de agua y dar la extracción con 15 ml de acetato de etilo. Repetir este procedimiento tres veces, con porciones de 10 ml de acetato de etilo.
- Reunir las fases de acetato de etilo y lavar pasando por un embudo de separación 2 porciones de 50 ml de agua. Filtrar las fases de acetato de etilo colocando en el embudo de papel filtro una porción de sulfato de sodio anhidro. Transferir las fases de acetato de etilo hacia un balón volumétrico de 50 ml y aforó con acetato de etilo.

Solución Muestra:

- Transferir 10 ml de solución madre a un balón volumétrico de 25 ml.
- Añadir 1 ml de reactivo de cloruro de aluminio al 2% en solución de ácido acético en metanol y completar el volumen con solución metanólica de ácido acético solución reactiva (SR) (5%).

Solución Blanco:

- Transferir 10 ml de solución madre a un balón volumétrico de 25 ml y aforar con una solución metanólica de ácido acético solución reactiva (SR).

Análisis Espectrofotométrico:

- Medir las absorbancias de la muestra a 425 nm después de 30 min de su preparación, utilizando el blanco para ajuste de cero.

- Calcular contenido de flavonoides expresados en hiperósido mediante la formula $A*1,25/P$, donde A es la diferencia de absorbancia de las soluciones y P el peso en g del material vegetal analizado.

7.4.9 Evaluación de la actividad antioxidante

7.4.9.1 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina (Marroquín, 2011):

- Sembrar 10 μ L de muestra y 5 μ L de cada estándar.
- Colocar la placa en la cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo-acido acético-acido fórmico-agua. (100:11:11:26)
- Dejar correr la fase móvil. Secar y asperjar con 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (1 mg/ml en metanol).
- Detección: si los extractos presentan actividad antioxidante se observa la decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

7.4.9.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picri-hidrazilo) mediante espectrofotometría UV-VIS (Marroquín, 2011):

- Solución madre:
Pesar 0.1 g de extracto seco y agregar 5ml de metanol absoluto luego introducirlo en el sonificador por 30 minutos, para obtener la solución madre.

- Diluciones:

Solución madre + Metanol = Dilución

- Tubo 1: 1 ml + 4 ml = 0.2
- Tubo 2: 2 ml + 3 ml = 0.4
- Tubo 3: 3 ml + 2 ml = 0.6
- Tubo 4: 4 ml + 1 ml = 0.8

- Tubo 5: 5 ml + 0 ml = 1.0

De estas disoluciones se encontrará el porcentaje de inhibición que esté entre (60-70%)

- Solución de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) 500 μ M en metanol:
Pesar 0.0219 g de reactivo de DPPH y disolver con metanol hasta un volumen de 100 ml en un balón aforado. Agitar la solución y conservar en un recipiente ámbar (por ser una solución inestable).
- Buffer de acetato:
Para un litro pesar 5.98 g de acetato de sodio disolverlo con agua destilada y trasvasar a un balón de 1000 ml; antes de aforar adicionar 3ml de ácido acético glacial. Aforar con agua destilada y agitar. El buffer tendrá un pH de 5.5.
- Preparación de los tubos de reacción:
Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 ml. De preferencia nuevos, o lavados correctamente agregando agua desmineralizada después de su lavado. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C.
Se prepara una serie de tubos con los siguientes reactivos:

	Buffer de acetatos	Metanol	Solución de DPPH	Dilución de cada muestra
Blanco control	1 ml	2 ml	0 ml	0 ml
Control	1 ml	1.5 ml	0.5 ml	0 ml
Blanco de ensayo	1 ml	1.9 ml	0 ml	0.1 ml
Ensayo*	1 ml	1.4 ml	0.5 ml	0.1 ml

*cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se prepara por triplicado.

Agitar los tubos preparados de esta forma en un vortex durante 30 segundos y luego incubar a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Leer a una longitud de onda de 517 nm. Siempre

debe leerse la absorbancia del control y del ensayo versus el blanco respectivo.

- Resultados:

Cálculo del porcentaje de inhibición de la absorbancia:

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

Graficar la concentración del extracto (eje X) vrs porcentaje de absorbancia (eje Y). Determinar la ecuación de la recta y el r^2 el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.

Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (CI_{50}), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de DPPH. Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la formula de la siguiente manera:

$$CI_{50} = (50 - \text{pendiente}) / \text{intercepto}$$

7.4.9.3 Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotizolina-6-sulfónico) (ABTS) (Marroquín, 2011):

- Solución madre:

Pesar 0.1 g de extracto seco y agregar 5ml de metanol absoluto luego introducirlo en el sonicador por 30 minutos.

De la solución madre preparar las siguientes diluciones:

Solución madre + Metanol = Dilución

- Tubo 1: 1 ml + 4 ml = 0.2
 - Tubo 2: 2 ml + 3 ml = 0.4
 - Tubo 3: 3 ml + 2 ml = 0.6
 - Tubo 4: 4 ml + 1 ml = 0.8
 - Tubo 5: 5 ml + 0 ml = 1.0
-
- Estándares:
 - Trolox 2.5 mM, en etanol, emplear diluciones de 0-15 μ M
 - Vitamina C: pesar 0.1 g y diluir con 5ml de metanol, preparar diluciones de 0.003-0.04-0.05-0.07/5 ml
 - Vitamina E: pesar 10 mg y diluir con 5 ml de metanol, preparar diluciones de 0.8-0.9-1.1-1.2/5 ml
 - Rutina: pesar 40 mg y diluir en 20 ml de metanol, preparar diluciones de 2-2.5-3-3.5-4/5 ml
 - Quercetina: pesar 10 mg y diluir con 5 ml de etanol, preparar diluciones de 0.2-0.25-0.3-0.35-0.4/5 ml
 - Ter-butilhidroxiquinona (TBHQ): pesar 10 mg y diluir con 5 ml de etanol, preparar diluciones de 0.4-0.5-0.6-0.7-0.8/5 ml.
 - Solución de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS⁺) 7 mM en agua:
 - Para 10 ml pesar 38.41 mg y diluir con agua hasta 10 ml.
 - Solución de persulfato de potasio 2.45 mM en agua:
 - Para 5ml pesar 3.31 mg y diluir con agua hasta 5 ml.

- **Formación del catión (ABTS⁺):**
Es diluida con etanol hasta lograr una absorbancia de 0.70+/-0.02 a 734 nm y equilibrado a 30°C. Se emplea una dilución de 1/30 a 1/35 para obtener dicha absorbancia.
- **Tubos de reacción:**
Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 ml. De preferencia nuevos, o lavados correctamente agregando agua desmineralizada después de su lavado. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C.

Preparar una serie de tubos con los siguientes reactivos:

Reactivo	Control	Ensayo*
Solución de ABTS ⁺	3 ml	3 ml
Dilución de cada muestra	-----	30 µl

*cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se prepara por triplicado.

El blanco de la corrida es etanol al 95 %. Tanto la solución de ABTS⁺ como la muestra deben haber estado en la incubadora a 30°C mínimo 30 minutos antes de mezclarlos

- **Lectura de la absorbancia:**
La lectura de la absorbancia se tomó a 30°C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis.
- **Porcentaje de inhibición:**

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

Se grafica la concentración del extracto (eje X) vs. porcentaje de absorbancia (eje Y). Determinar la ecuación de la recta y el r^2 el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.

Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (IC_{50}), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de DPPH. Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la formula de la siguiente manera:

$$IC_{50} = (50 - \text{pendiente}) / \text{intercepto}$$

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de un extracto representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto. Los valores de TEAC se determinan con la siguiente formula:

$$\Delta A_{\text{trolox}} = (A_{T=0 \text{ trolox}} - A_{T=6 \text{ trolox}}) - \Delta A_{\text{solvente}(0-6)}$$

$$\Delta A_{\text{trolox}} = m * [\text{Trolox}]$$

$$TEAC_{\text{extracto}} = (\Delta A_{\text{extracto}} / m) * d$$

Donde:

- ΔA = reducción de la absorbancia
- A = absorbancia al tiempo dado
- m = pendiente de la curva estándar
- $[\text{Trolox}]$ = concentración del trolox,
- d = factor de dilución

7.4.10 Cuantificación de fenoles totales (Marroquín, 2011):

- Preparación de tubos y curva de lectura:

Tubos de capacidad de 10 ml nuevos o lavados correctamente con agua desmineralizada.

Preparar una serie de tubos con los siguientes reactivos:

	H ₂ O (ml)	Ácido gálico (μl) solución 1μg/10μL	Reactivo de Folin-ciocalteu (ml)	Na ₂ CO ₃ 10% (ml)
Blanco	4.000	0	0.4	0.8
Patrón 1	3.975	25	0.4	0.8
Patrón 2	3.950	50	0.4	0.8
Patrón 3	3.900	100	0.4	0.8
Patrón 4	3.850	150	0.4	0.8
Patrón 5	3.800	200	0.4	0.8
Patrón 6	3.750	250	0.4	0.8
Muestra 1*	3.950	50	0.4	0.8
Muestra 2*	3.900	100	0.4	0.8

*Las muestras 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.

- Cálculos:

Obtener la media de las absorbancias de la muestra.

Determinar la concentración de la muestra utilizando la ecuación de recta y despejar "X".

El resultado se utiliza para calcular los μg equivalentes de ácido gálico/mg peso seco.

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

- Donde:
$$\mu\text{g equivalentes de ácido gálico/g de extracto} = \left[\left(\frac{\text{concentración obtenida en base a la curva}}{0.05} \right) \cdot \left(\frac{\text{peso alícuota}}{\text{volumen reconstitución}} \right) \cdot 1000 \right] \cdot \text{Dilución}$$

Concentración en base a la curva = $\frac{\text{Absorbancia-Intersecto}}{\text{pendiente}}$

7.5 Diseño Estadístico:

Debido al origen de las plantas y al proceso de extracción, no fue posible contar con réplicas de extractos para hacer una estimación estadística de las variables. Por conveniencia se realizó una cromatografía en capa fina como prueba cualitativa para la determinación de flavonoides y una cromatografía en capa fina para la determinación de actividad antioxidante. En cuanto a los ensayos cuantitativos se hicieron 5 réplicas del método para la cuantificación de flavonoides y 3 réplicas de cada partición para los siguientes ensayos: determinación de fenoles totales, determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS. Para el análisis de resultados se calcularon las medidas de tendencia central (media, mediana) y medidas de dispersión (rango, desviación estándar y coeficiente de variación). Además se hizo un análisis descriptivo comparando los valores de concentración de Inhibición al 50% (CI_{50}) de cada extracto en su actividad antioxidante por DPPH y ABTS; y a la vez una comparación de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox de cada extracto. Todos los resultados fueron analizados descriptivamente.

8. RESULTADOS

8.1 Rendimiento de extractos fraccionados de diclorometano y etanol. Se presentan los resultados de la obtención de las fracciones realizadas por percolación a 200.8 g de material vegetal tamizado (hojas) de *Piper oradendron*, y a 200.1 g de material vegetal tamizado (hojas) de *Piper hispidum*.

Cuadro 1. Rendimiento de extractos fraccionados de diclorometano y etanol.

Especie	Disolvente	Fracción obtenida (g)	% de rendimiento
<i>Piper oradendron</i> 200.8 g	Diclorometano	8.30	4.12
	Etanol	38.05	18.85
<i>Piper hispidum</i> 200.1 g	Diclorometano	7.80	3.90
	Etanol	33.65	16.81

Fuente: Datos experimentales

8.2 Rendimiento de las particiones hexánicas, de acetato de etilo y butanólica del extracto fraccionado etanólico según polaridad. Se presenta el porcentaje de rendimiento de los tres tipos de particiones tanto en *P. oradendron* como en *P. hispidum*, los cuales se obtuvieron a partir de la fracción etanólica por percolación. Esto con la finalidad de obtener flavonoides apolares, medianamente polares y polares.

Cuadro 2. Rendimiento de las particiones del extracto fraccionado etanólico según polaridad.

Especie	Disolvente	Partición obtenida (g)	% de rendimiento
<i>P. oradendron</i> 20.5012 g	Hexano	1.11	5.44
	Acetato de etilo	1.03	5.05
	Butanol	2.86	2.68
<i>P. hispidum</i> 20.1494 g	Hexano	1.50	7.55
	Acetato de etilo	8.27	41.03
	Butanol	2.88	14.29

Fuente: Datos experimentales

8.3 Determinación de Flavonoides en extracto de *P. oradendron* y *P. hispidum* por CCF. Se presentan las bandas que indican la presencia de flavonoides en particular. Asimismo se presentan los estándares de flavonoides más comunes en las especies vegetales los cuales sirvieron para comparar, de forma cualitativa, si alguna banda de las muestras se asemeja en su Rf y color, determinando de esta manera que el flavonoide de muestra x es por ende el del patrón al que se parezca.

Cuadro 3. Determinación de Flavonoides en extractos de *P. oradendron* y *P. hispidum* por CCF en UV 365 nm.

Especie	Parte vegetal	Banda	Color de la banda (365nm)	Rf
<i>P. oradendron</i> Extracto etanólico 70%	Hoja	1	Anaranjada	0.05
		1	Amarilla	0.12
		1	Verde	0.25
		1	Anaranjada	0.30
		1	Anaranjada	0.54
<i>P. hispidum</i> Extracto etanólico 70%	Hoja	1	Anaranjada	0.14
		1	Morada	0.25
		1	Anaranjada	0.52
		1	Morada	0.82
Estándar 1: Hiperósido		1	Anaranjada	0.52
Estándar 2: Ácido clorogénico		1	Verde	0.47
Estándar 3: Quercetina		1	Anaranjada	0.74
Estándar 4: Rutina		1	Anaranjada	0.30

Fase móvil: n-butanol-ácido acético glacial-agua (40:10:50). Revelador: NP/PEG (NP: solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina. PEG: solución etanólica al 5% de propilenglicol 4000). Fuente: Datos experimentales

8.4. Cuantificación de flavonoides. Porcentajes promedio y desviación estándar promedio de los flavonoides obtenidos de los extractos de *P. oradendron* y *P. hispidum*.

Cuadro 4. Cuantificación de flavonoides.

Especie	Parte	% promedio de flavonoides expresados como mg de hiperósido
<i>Piper oradendron</i>	Hoja	1.56±0.14
<i>Piper hispidum</i>	Hoja	1.34±0.09

Número de réplicas: 5.

Fuente: Datos experimentales

8.5 Actividad antioxidante por CCF de los extractos en acetato de etilo, butanol y hexano de *P. oradendron* y *P. hispidum* con revelador DPPH. Resultados cualitativos de la capacidad antioxidante que poseen los tres tipos de particiones provenientes de las dos especies mencionadas, comparados con cuatro estándares antioxidantes. Los resultados se muestran en diferentes intensidades de blanco en donde la máxima intensidad se expresa con 5 cruces, buena intensidad con 4, intensidad regular con 3, baja intensidad 2, mínima intensidad 1 y donde es casi imperceptible con “No presenta actividad”.

Cuadro 5. Actividad antioxidante por CCF de los extractos en acetato de etilo, butanol y hexano de *P. oradendron* y *P. hispidum* con revelador DPPH.

Especie vegetal	Partición	Parte	Actividad
<i>P. oradendron</i>	Acetato de etilo	Hoja	++
	Butanol		+++
	Hexano		+
<i>P. hispidum</i>	Acetato de etilo	Hoja	+
	Butanol		++
	Hexano		No presenta actividad
Rutina	Estándares		++++
Quercetina			++++
Ácido clorogénico			+++++
TBHQ			+++++
Mezcla Rutina/Quercetina			++++
TROLOX			+++++
Vitamina C			+++++

Fase móvil: acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26). Fuente: Datos experimentales.

8.6 Actividad antioxidante determinada macrométricamente por DPPH. Se presenta la actividad antioxidante de manera cuantitativa. Las diluciones a utilizar están determinadas por un factor de dilución. La Cl_{50} es la concentración mínima requerida para inhibir los radicales libres en un 50%. Se presenta asimismo la desviación estándar promedio. En este caso el radical libre es el DPPH.

Cuadro 6. Actividad antioxidante determinada macrométricamente por DPPH.

Especie	Parte	Partición	Factor de Dilución	Promedio de Inhibición (%)	Cl_{50} (mg/mL)
<i>P. oradendron</i>	Hoja	Hexano	0.28	60.30	4.81±0.01
		Ac. Etilo	0.60	61.56	9.68±0.57
		Butanol	0.14	64.98	1.83±0.07
<i>P. hispidum</i>	Hoja	Hexano	0.50	70.47	6.66±0.02
		Ac. Etilo	1.00	51.26	18.77±0.26
		Butanol	0.22	66.26	1.63±0.05
Rutina	Estándares		0.012	76.48	0.16±0.001
Ter-butilhidroxiquinona			0.08	74.75	0.29±0.002
Vitamina E			0.18	62.23	0.72±0.01
Quercetina			0.10	64.14	1.62±0.01
Trolox			0.04	63.63	0.16±0.0004
Vitamina C			0.008	60.82	0.14±0.0003

Número de repeticiones: 3 (ver anexo 7 al 24).

Fuente: Datos experimentales.

8.7 Actividad antioxidante determinada macrométricamente por ABTS. Se presenta la actividad antioxidante de manera cuantitativa. Las diluciones a utilizar están determinadas por un factor de dilución. La Cl_{50} es la concentración mínima requerida para inhibir los radicales libres en un 50%; ésta presenta asimismo la desviación estándar promedio. En este caso el radical libre es el ABTS.

Cuadro 7. Actividad antioxidante determinada macrométricamente por ABTS.

Especie	Parte	Partición	Dilución	Inhibición (%)	Cl_{50} (mg/mL)
<i>P. oradendron</i>	Hoja	Hexano	0.8	65.95	10.74±0.21
		Ac. Etilo	0.6	63.27	9.24±0.01
		Butanol	0.3	69.57	1.96±0.01
<i>P. hispidum</i>	Hoja	Hexano	0.7	64.90	5.53±0.009
		Ac. Etilo	1.0	60.82	16.54±0.21
		Butanol	0.3	62.74	2.23±0.03
Rutina	Estándares		0,28	62.09	1.16±0.02
Vitamina C			0.014	66.32	0,05±0.0002

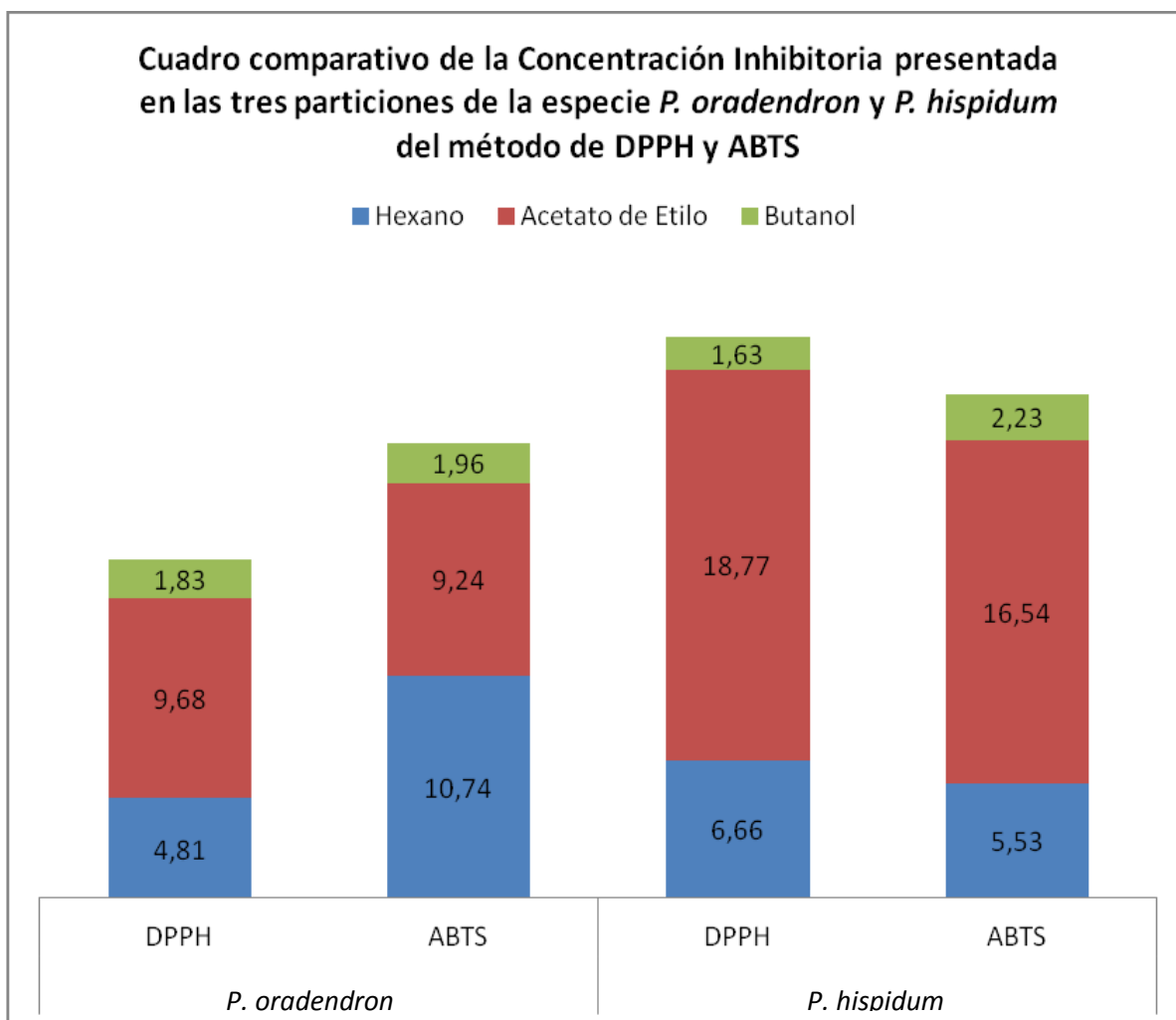
Número de repeticiones: 3 (ver anexo 25 al 42).

Fuente: Datos experimentales.

8.8 Comparación de las Concentraciones Inhibitorias (CI₅₀) de las particiones de hexano, acetato de etilo y butanol en las especies *P. oradendron* y *P. hispidum* por los métodos de DPPH y ABTS.

En la gráfica se presenta una comparación entre los datos obtenidos de las concentraciones, dadas en mg/ml, requeridas para inhibir los radicales libres en un 50%, con la finalidad de observar cuál de las especies analizadas, particiones realizadas, e incluso, método utilizado presentó los mejores resultados en cuanto a la actividad antioxidante.

Gráfica 1. Comparación de las Concentraciones Inhibitorias (CI₅₀), dadas en mg/ml, de las particiones de hexano, acetato de etilo y butanol en las especies *P. oradendron* y *P. hispidum* por los métodos de DPPH y ABTS.



Fuente: Datos experimentales.

8.9 Cuantificación de Fenoles Totales. Valores de la cantidad de compuestos fenólicos, encontrados en los tres tipos de particiones en ambas especies (*P. oradendron* y *P. hispidum*). Este valor es expresado como microgramos (μg) de ácido gálico por gramo de la respectiva partición con su desviación estándar promedio.

Cuadro 8. Cuantificación de Fenoles Totales.

Especie	Parte	Partición	Factor de Dilución	Fenoles Totales (μg de ácido gálico/g de partición)
<i>P. oradendron</i>	Hoja	Hexano	0.32	27.83 \pm 0.78
		Ac. Etilo	0.6	19.52 \pm 0.66
		Butanol	0.18	57.29 \pm 1.23
<i>P. hispidum</i>	Hoja	Hexano	0.6	28.30 \pm 0.21
		Ac. Etilo	1	14.85 \pm 0.48
		Butanol	0.26	62.13 \pm 2.71

Número de repeticiones: 3.

Fuente: Datos experimentales.

9. DISCUSIÓN

En investigaciones anteriores (ver antecedentes, inciso 3.10) se encontró que tanto *Piper oradendron* como *Piper hispidum* presentaban flavonoides, metabolitos a los cuales se les atribuyen propiedades antioxidantes por su estructura de anillo bencénico. Es por ello que en esta investigación se realizó una cuantificación de dichos metabolitos y a la vez se evaluó su actividad antioxidante.

La investigación se inició con la obtención del extracto rico en flavonoides, para lo cual se utilizaron dos tipos de solventes, siendo el primero diclorometano que sirvió principalmente para desengrasar y retirar impurezas de la materia vegetal seca; seguido a esto se empleó etanol al 70% para lograr la extracción de los flavonoides.

En el cuadro 1 se observan los porcentajes de rendimiento de cada extracto, en donde los mayores rendimientos se obtuvieron con el etanol en las dos especies, de lo que se puede inferir que la mayor cantidad de metabolitos presentes en las especies tienen características polares y por ello fueron arrastrados por el etanol, obteniendo así un extracto rico en flavonoides, ya que por su estructura definida poseen uno o varios anillos bencénicos, siendo afines mayormente a solventes altamente polares. Con el fin de analizar dicho planteamiento y evaluar la actividad antioxidante se procedió a realizar una partición líquido-líquido para separar los flavonoides según su polaridad.

Como se muestra en el cuadro 2, el mejor rendimiento se obtuvo con butanol en el caso de *P. oradendron*. La partición se efectuó con hexano (apolar), acetato de etilo (medianamente polar) y n-butanol (polar), confirmando nuevamente que la afinidad de los flavonoides es mayor a medida que aumenta la polaridad del solvente. Sin embargo, en el caso de *P. hispidum* el rendimiento fue mayor con acetato de etilo que es medianamente polar; esto puede deberse a que presentó cierta dificultad al realizar las particiones, ya que la densidad del acetato de etilo (0.894 g/ml) con la solución acuosa-etanólica (aproximadamente 0.90 g/ml) fue muy parecida, dificultando la separación de las dos fases, por lo que el aumento del rendimiento con dicho solvente puede ser una mezcla de extracto de acetato de etilo con extracto de la solución acuosa-etanólica.

Es importante mencionar que para la obtención de la solución madre empleada para las particiones, se utilizó agua como disolvente puesto que se intentó con varios solventes, iniciando con etanol al 70% y etanol al 50% sin embargo no se lograba una solución verdadera, la cual se obtuvo únicamente con agua. Esto nos dio un indicio de que la mayoría de los flavonoides

contenidos en el extracto eran de carácter polar, por lo que dificultaba su disolución en solventes medianamente polares.

Se realizó además la cromatografía en capa fina para poder identificar los posibles flavonoides presentes según estándares empleados. El cuadro 3 presenta los valores de Rf correspondientes a los extractos de *P. oradendron* y *P. hispidum* en etanol al 70%, conjuntamente con 4 estándares de flavonoides.

Se utilizó NP/PEG (NP: solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina. PEG: solución etanólica al 5% de propilenglicol 4000) como revelador y se observaron bajo luz ultravioleta-visible a 365 nm. La comparación se realizó en base a la coloración de cada banda y a los Rf presentados entre las muestras y los 4 estándares. Al observar los resultados de la muestra de *P. oradendron* se pudo visualizar bandas anaranjadas al igual que en *P. hispidum*, presentando ambas especies el color de las bandas que concuerdan con los estándares de hiperósido, quercetina y rutina. Sin embargo, al analizar los Rf de las bandas se encontró cercanía únicamente con dos de los estándares, siendo el de rutina (0.30) y el estándar de hiperósido (0.52) esto para *P. oradendron*.

De igual manera se observó una banda anaranjada con un Rf de 0.52 en *P. hispidum* correspondiente con el Rf del estándar de hiperósido, lo que indicó la presencia de este flavonoide en ambas especies. Otra banda observada en *P. oradendron* fue una banda de color verde parecida en color a la banda del estándar de ácido clorogénico, sin embargo con Rf diferente; también se visualizaron bandas moradas en *P. hispidum* que no pudieron ser identificadas con ninguno de los estándares. La discrepancia entre los diferentes colores de bandas y los Rf presentados es resultado de la presencia de diferentes flavonoides dentro de cada especie, y posiblemente el único flavonoide común sea el hiperósido.

A partir de los resultados anteriores se procedió a cuantificar los flavonoides presentes, en base al flavonoide identificado en ambas especies (hiperósido). Es importante resaltar que la cuantificación que se efectuó fue a partir de las hojas ya que en estudios anteriores fue allí donde se encontró una cantidad importante de flavonoides siendo para *P. oradendron* 1.57% y para *P. hispidum* 0.87%. En los nuevos resultados generados (Cuadro 4) el porcentaje de flavonoides encontrado fue para *Piper oradendron* 1.56% y para *Piper hispidum* 1.34%. Haciendo la comparación, se puede observar que la cantidad de flavonoides presentes en ambas especies es significativa y en *P. hispidum* se obtuvo un aumento favorable de 0.47%. Sin embargo, *Piper*

oradendron posee un porcentaje mayor indicando que por cada 100 g de planta hay 1.56 g de hiperósido presente.

Se estableció la bioautografía para determinar la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina (CCF) usando DPPH como revelador (ver Cuadro 5). Se determinó que ninguna de las particiones de *P. oradendron* y de *P. hispidum* tiene actividad antioxidante mejor que ninguno de los estándares obtenidos.

Como se puede apreciar también en la fotografía (ver anexo 3), los estándares con actividad antioxidante utilizados fueron: rutina, quercetina, ácido clorogénico, *ter*-butilhidroquinona, mezcla de rutina y quercetina, trolox (análogo de alfa-tocoferol) y vitamina C, donde la intensidad de actividad cercana a cualquiera de los estándares anteriormente mencionados puede ser el extracto butanólico de *P. oradendron* con respecto a quercetina, comparando la decoloración de las banda, pero no supera la intensidad de esta última (ver anexo 3).

Sin embargo, puede deducirse que las particiones butanólicas tanto de *P. oradendron* como *P. hispidum* son las que mayor actividad presentan en comparación con el resto de sus particiones. Seguido a éstos se encuentran las particiones de acetato de etilo, y por último las particiones hexánicas presentan la menor intensidad de actividad antioxidante. A partir de ella puede inferirse que los flavonoides obtenidos aparentemente no son los responsables de la mayor actividad antioxidante, sin embargo contribuye en una pequeña medida.

Para la actividad antioxidante por el método de DPPH de las particiones de *Piper oradendron* se determinó que los tres tipos de particiones mostraron la actividad antioxidante mínima requerida representado en porcentaje de inhibición (ver Cuadro 6), siendo en promedio para la partición hexánica de 60.30%, para el de acetato de etilo de 61.56%, y para la partición butanólica de 64.98%, lo que muestra que de las tres particiones la butanólica, que aporta los flavonoides polares, tiene la mejor actividad antioxidante, seguido de la partición de acetato de etilo, con flavonoides medianamente polares, y por último la hexánica con flavonoides apolares.

Comparado frente a los resultados mostrados por los estándares, reflejan que tienen un porcentaje de inhibición similar a la quercetina, vitamina E, trolox y vitamina C. Sin embargo, la CI_{50} de los estándares está muy por debajo de las particiones de *P. oradendron*, ya que los estándares empleados ejercen su actividad antioxidante a una concentración menor a 1 mg/ml,

mientras que ninguno de las particiones de *P. oradendron* se ubica por debajo de 1 mg/ml de concentración, por lo tanto ninguna partición es mejor que los estándares.

Se evaluó asimismo la actividad antioxidante de la partición hexánica de *Piper hispidum* (ver Cuadro 6) por el mismo método (DPPH), la cual presentó un porcentaje de inhibición de 70.47% en promedio, con una CI_{50} de 6.66 mg/ml del extracto con el cual presenta su actividad antioxidante sobre radicales libres. Ésta fue la segunda partición con buena actividad antioxidante para esta planta.

Para la actividad antioxidante de la partición butanólica de *P. hispidum* se determinó que el porcentaje de inhibición mínima fue de 66.26 % frente a una CI_{50} de 1.63 mg/ml de la partición, la cual es la más eficiente y con mayor rendimiento de los tres tipos de particiones de *P. hispidum*, puesto que teniendo menor concentración de la partición alcanza el porcentaje mínimo requerido para inhibir a los radicales libres.

En cuanto a la actividad antioxidante de la partición de acetato de etilo de *P. hispidum* por el método de DPPH, se pudo determinar que frente a este radical (DPPH) la actividad antioxidante no alcanza el porcentaje mínimo para ser funcional como antioxidante en sí, ya que se trabajó con la dilución más alta permitida (con factor de dilución de 1.0) y el porcentaje obtenido en las tres repeticiones fue de 50% aproximadamente (51.26% en promedio). Por lo tanto puede que tenga una actividad antioxidante que alcance el 60%, pero eso implicaría una mayor concentración, lo cual elevaría los costos y sería poco factible y asequible poder desarrollar su investigación y su comercio.

Con respecto a los estándares antioxidantes, las particiones hexánicas y butanólicas sobrepasan el porcentaje de inhibición de la vitamina E, C, trolox y quercetina. Sin embargo no logra ninguno de los dos tener una CI_{50} por debajo de 1 mg/ml. Por lo tanto se deduce que ninguno de las particiones es mejor en cuanto a CI_{50} que los estándares.

Para la evaluación de la planta *P. oradendron* por el método de ABTS (ver Cuadro 7), se encontró que los tres tipos de particiones (hexánico, acetato de etilo y butanólico) poseen actividad antioxidante mínima ($\geq 60\%$) de igual manera que con el método DPPH; siendo la más eficiente la partición butanólica, la cual presentó actividad de 69.57% en promedio a una CI_{50} de 1.96 mg/ml de partición; seguido por la partición de acetato de etilo, y por último el hexánico;

aunque cabe destacar que existe una pequeña diferencia entre estas últimas dos, tanto en el porcentaje de inhibición como en la CI_{50} . Comparado con los estándares evaluados por el mismo método, se pudo determinar que ninguno de los extractos de *P. oradendron* son mejores que la rutina y la vitamina C, ya que en caso de poseer valores iguales o mayores en porcentaje de inhibición, éstos requieren mucho más concentración de la partición para lograrlo.

En cuanto a *P. hispidum*, en la cual se empleó el mismo método (ABTS), se encontró que al igual que con *P. oradendron* los tres tipos de particiones (hexánico, acetato de etilo y butanólico) poseen actividad antioxidante, no así como sucedió con el método de DPPH, donde la partición de acetato de etilo carecía de la actividad mencionada. Así pues, la partición más eficiente de las tres sigue siendo la butanólica, ya que presenta su porcentaje de inhibición mínima a 2.23 mg/ml de CI_{50} , seguido de la partición hexánica con actividad antioxidante a 5.53 mg/ml de la partición. Por último, la partición de acetato de etilo presentó la actividad mencionada a 16.54 mg/ml. Ninguna de las particiones mencionadas presentó mejores resultados que los estándares en cuanto a CI_{50} , ya que éstos últimos se encuentran con un valor de concentración menor a 2 mg/ml.

En la Gráfica 1 se puede apreciar los distintos valores presentados del CI_{50} obtenidos a partir de las lecturas espectrofotométricas del método DPPH y ABTS para cada una de las particiones en ambas especies de *Piper*. Tal y como se puede observar en la Gráfica 1, los valores más bajos de CI_{50} se presentaron en las particiones de butanol, tanto para las dos especies como para los dos métodos, mostrando que son más eficientes, con valores debajo de 3 mg/ml de concentración, para realizar una actividad antioxidante mínima.

Para las dos especies, las particiones de acetato de etilo presentaron resultados similares para los dos métodos, pero sólo en su misma especie, ya que para *P. oradendron* los resultados son aproximados a 9 mg/ml, mientras que para *P. hispidum* se mostraron en un valor cercano a 17 mg/ml. Para la partición de hexano los valores fueron similares para las dos especies y para los dos métodos, exceptuando al método de ABTS para *P. oradendron*, donde sus valores pasaron más allá de 7 mg/ml, siendo estos valores los segundos más eficientes en producir una actividad antioxidante a una baja concentración de su partición de hexano. Con todo lo anterior, los resultados más eficientes siguen siendo los presentados por *P. oradendron* en los dos métodos y en sus particiones.

Por último, se procedió a determinar la cuantificación de fenoles totales presentes en los tres tipos de particiones de las dos plantas evaluadas. Se encontró que las particiones con mayor cantidad de fenoles correspondían a las particiones butanólicas, tanto de *P. oradendron* como de *P. hispidum*. Seguido a éstas particiones se encontraron las hexánicas de ambas especies, cayendo casi a la mitad de lo presentado en las particiones butanólicas; y las de acetato de etilo descienden casi a la mitad del valor mostrado por las hexánicas (ver Cuadro 8). Así es como se pudo observar que la mejor a CI_{50} fue la partición butanólica, tanto para el método DPPH así como para ABTS (ver Cuadro 6 y 7).

De todo lo anterior se puede deducir que los resultados fueron los esperados respecto a la hipótesis planteada, obteniendo que ambas especies presentaron flavonoides con un porcentaje mayor o igual a 1% y a la vez actividad antioxidante, siendo evaluado de manera cualitativa (cromatografía en capa fina) y cuantitativa (método de DPPH y ABTS).

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El porcentaje de flavonoides para *Piper oradendron* fue de 1.56% y *Piper hispidum* 1.34%, expresados como hiperósido.
- 10.2 Los tres tipos de particiones de *P. oradendron* mostraron actividad antioxidante por el método DPPH, mostrando que de las tres particiones, la butanólica, tiene la mejor actividad antioxidante con una CI_{50} de 1.83 mg/ml.
- 10.3 La partición butanólica y hexánica de *P. hispidum* presentaron actividad antioxidante por el método de DPPH, no así la partición de acetato de etilo, siendo la mejor de las particiones en cuanto a la concentración inhibitoria media, la butanólica con una CI_{50} de 2.23 mg/ml.
- 10.4 Las particiones de *P. oradendron* (utilizando como solvente hexano, acetato de etilo y butanol) presentaron actividad antioxidante mínima mayor de 60% por el método de 2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotizolina-6 sulfónico) (ABTS), siendo la más activa la butanólica con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 1.96 mg/ml.
- 10.5 Los tres tipos de particiones de *P. hispidum* presentaron actividad antioxidante mínima por el método de 2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotizolina-6 sulfónico) (ABTS), siendo para la de hexano 5.53 mg/ml, para la de acetato de etilo 16.54 mg/ml y para la de butanol 2.23 mg/ml. Ninguna de las particiones mencionadas presentó mejores resultados que los estándares en cuanto a su CI_{50} .
- 10.6 Para la cuantificación de Fenoles Totales se encontró en las particiones butanólicas mayor cantidad de fenoles, siendo para *P. oradendron* 57.29 μg de ácido gálico/g de partición, y para *P. hispidum* 62.13 μg de ácido gálico/g de partición.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Se obtuvieron muy buenos resultados en cuanto al contenido de flavonoides de ambas especies, sin embargo sólo se analizaron las hojas por lo que se sugiere analizar otras partes de la planta y determinar si la distribución de metabolitos es uniforme en toda la planta.
- 11.2 Extender las investigaciones del género *Piper*, y realizar diferentes estudios de actividad biológica.
- 11.3 Fraccionar las particiones más activas y aislar los compuestos químicos presentes en las especies de *Piper*.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

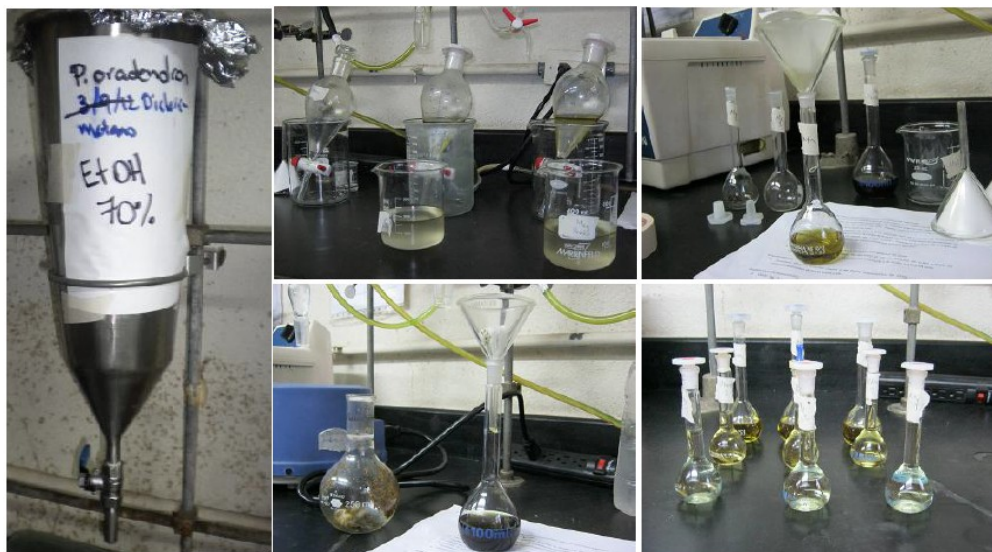
- Agostini, L. et al. (2004). Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. ALAN. 54 (1).
- Aguilar, E. y Bonilla P. (2009). Actividad antioxidante e inmunológica de flavonoides aislados de hojas de *Smallanthus sonchifolius* (YACÓN). Ciencia e Investigación 12(1): 15-23.
- Albiero, A., et al. (2006). Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. 16(3):379-391.
- Arévalo, M. (2008). Caracterización morfológica, ecológica, genética y química de tres especies de *Piper* (*Piper jacquemontianum*, *Piper donnell smithii* y *Piper oradendron*) con fines de conservación y mejoramiento para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales en Guatemala. Proyecto FODECYT No. 114-2006. Guatemala.
- Avello, M. y Suwalsky, M. (2002). Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. Universidad de Concepción. Chile. Fecha de acceso 22 de febrero de 2012, de <http://www.ciencia-ahora.cl/Revista17/03RadicalesLibres.pdf>.
- Cáceres, A. (2011). "Caracterización de la actividad antioxidante de extractos de especies nativas del género *Piper* y Cuantificación de metabolitos secundarios con potencial de desarrollo". Proyecto FODECYT 17-2009. Guatemala.
- Chen, Y., et al. (2010). Estrogenic and serotonergic butenolides from the leaves of *Piper hispidum* Swingle (Piperaceae). Journal of Ethnopharmacology. 129 (2010): 220-226.
- Escamilla C., et al. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista Facultad de Medicina UNAM 52(2):73-75.
- Flores, E., et al. (2000). Estudio Fitoquímico de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida in vitro. BIOFARBO. Vol. VIII. 9-16.
- García, E. (2008). Caracterización fitoquímica y cuantificación por espectrofotometría UV de saponinas y flavonoides en extractos de rizomas y frondas de *Phlebodium pseudoaureum*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 54p.
- Gracia, M. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos Naturales. Universidad de Querétaro. México. Fecha de acceso el 22 de febrero de 2012, de http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias2007/56_1UAQGarciaNava.pdf.

- Haaften, R., et al. (2003). Effect of Vitamin E on Glutathione-Dependent Enzymes. *Drug Metabolism Reviews* 35(2 y 3):215-253.
- Halliwell, B., Rafter, J. and Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. *The American Journal of Clinical Nutrition*.81 (1): 2685-765.
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 96(2002):67-202.
- Herrera E. and Barbas C. (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry*.57 (1): 43-56.
- Marroquín, M. Comparación de la actividad antioxidante, detección y cuantificación de flavonoides y compuestos fenólicos en tres especies de la familia *Passifloraceae* (*Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora ligularis*)". Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala julio de 2011.
- Martínez, A. (2005). FLAVONOIDES. Universidad de Antioquia. Medellín, España. Fecha de acceso 22 de febrero de 2012, de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>
- Martínez, S., et al. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Revista de Nutrición Hospitalaria*. 17 (6):271-278.
- Medina, A. (2007). Relación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles y flavonoides de extractos etanólicos de polen de distinto origen floral. Fecha de acceso 22 de febrero de 2012, de <http://www.fcai.uncu.edu.ar/upload/47atc-medina-unse.pdf>
- Ortiz H., et al. (2009) Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad. *Revista Académica Colombiana de Ciencia*.33 (127): 183-191
- Palacios, Z., et al. (2009). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de *Piper tuberculatum*. *SciELO*.16 (2): 209-214.
- Pérez, G. (2003). Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. *Revista Cubana Invest Biomed* 22(1):48-57.
- Plazas, E., Cuca, L., & Delgado, W. (2008). Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum* kunth (piperaceae) y derivados acetilados. *Revista Colombiana de Química*. 37 (2): 135-144.

- Portet, B., et al. (2008). Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. *berbicense* using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry *Journal of Chromatography*. 1210: 45–54.
- Primo, E. (2007). *Química Orgánica Básica y aplicada. De la molécula a la industria*. Tomo II. Editorial REVERTÉ, S.A. Barcelona, España. 1199p.
- Ruiz, C., et al. (2011). Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *Piper hispidum*. *Phytochemistry Letters*. 4 (2011): 363-366.
- Soto, M. (2007). Actividad antioxidante de Flavonoides del tallo de Orégano mexicano (*Lippia Graveolens* HBK var. *Berlandieri schauer*). *Revista Fitotécnica Mexicana*. 30(1): 43-49.
- World Health Organization. (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: WHO. 115.

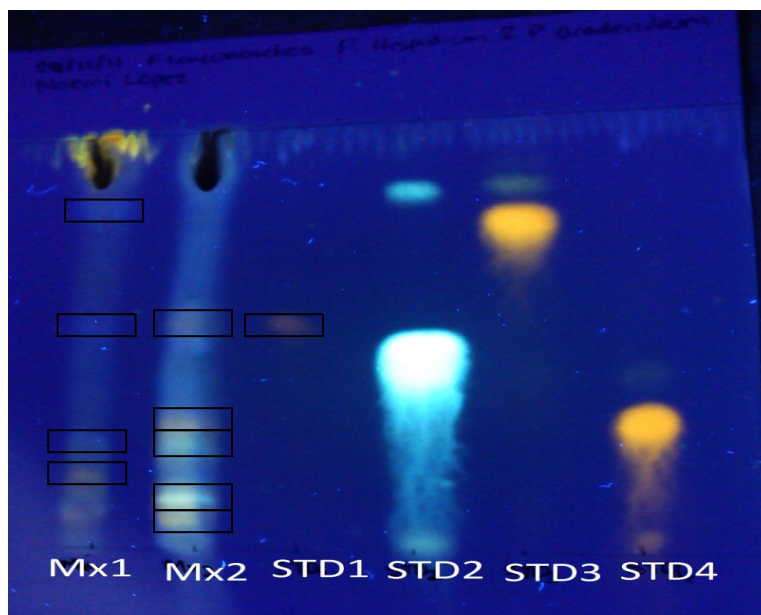
13. ANEXOS

13.1 Imágenes



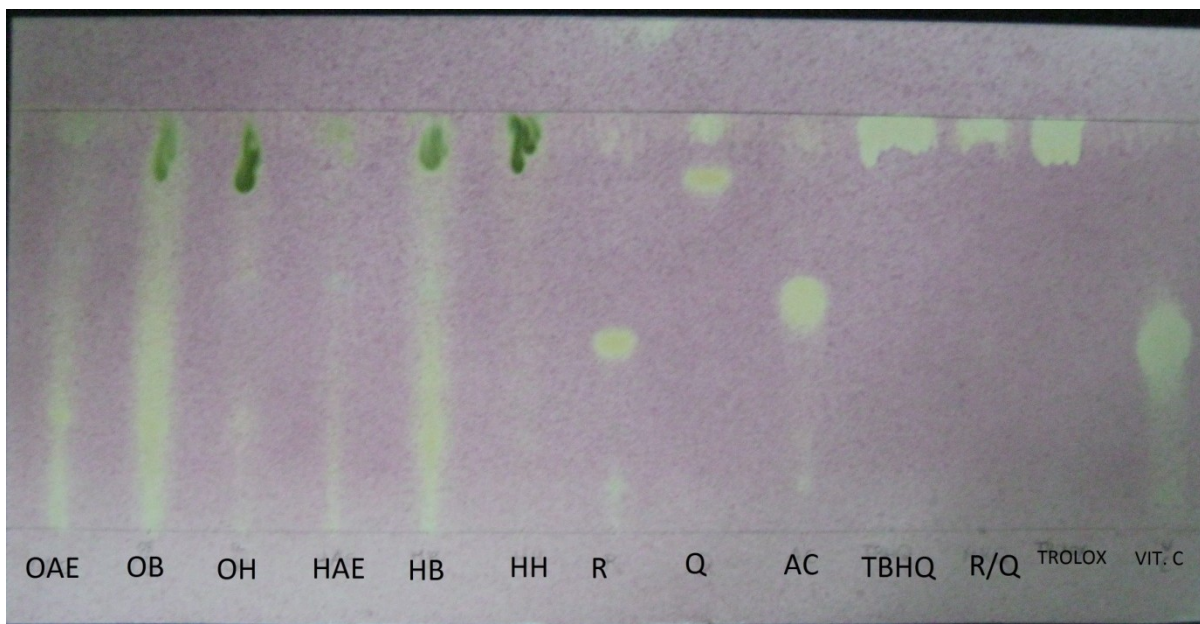
Fuente: Datos experimentales.

Anexo 1. Procedimiento de extracción de flavonoides por percolación; B-E. Fracción líquida: líquido, filtración y preparación de muestras para cuantificación



Fuente: Datos experimentales.

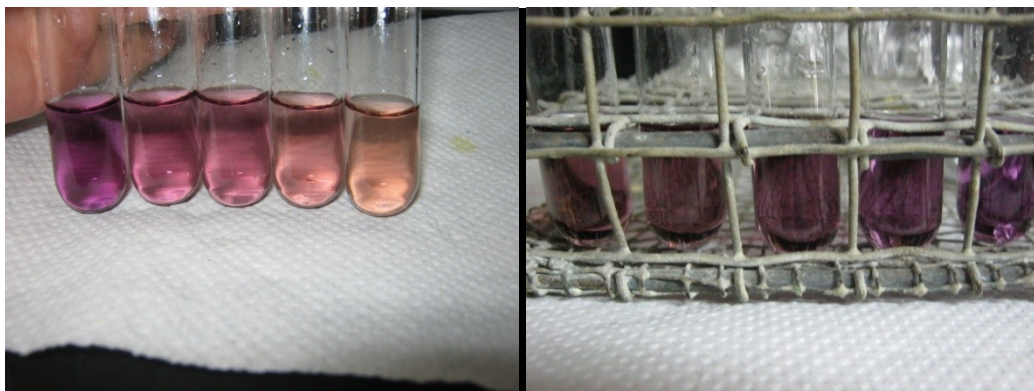
Anexo 2. Determinación de flavonoides presentes por medio de Cromatografía en capa fina vista bajo luz ultravioleta. Fase móvil: n-butanol-ácido acético glacial-agua (40:10:50). Revelador NP/PEG. Mx1=*P. hispidum*; Mx2= *P. oradendron*; STD1= Hiperósido; STD2=Ácido clorogénico; STD3=Quercetina; STD4=Rutina



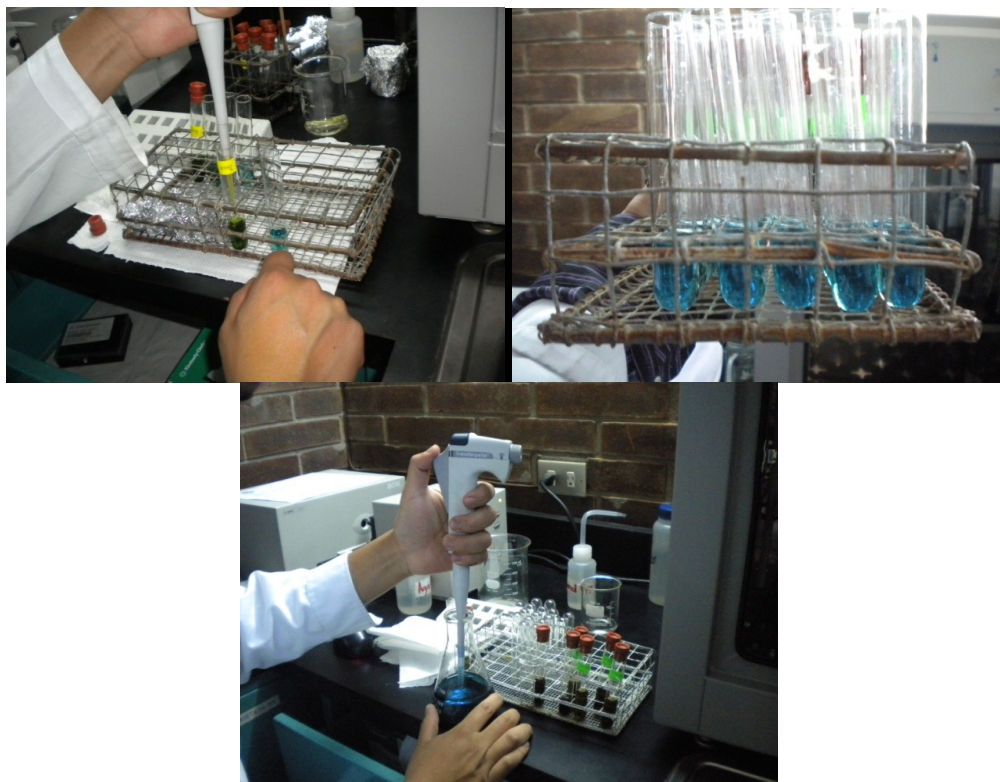
Fuente: Datos experimentales

Anexo 3. CCF de la actividad antioxidante.

OAE=Acetato de Etilo *P. oradendron*; OB= Butanólico *P. oradendron*; OH= Hexánico *P. oradendron*; HAE=Acetato de Etilo *P. hispidum*; HB=Butanólico *P. hispidum*; HH=Hexánico *P. hispidum*; R=rutina; Q=quercetina; AC=Ácido Clorogénico; TBHQ= *tert*-butilhidroquinona; R/Q= Mezcla de Rutina y Quercetina; VIT. C= Vitamina C. Fase móvil: acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26). Revelador: DPPH.



Anexo 4. Ejemplo de actividad antioxidante determinada macrométricamente por DPPH, donde la concentración del antioxidante a evaluar va en aumento de izquierda a derecha (imagen izquierda) y viceversa (imagen derecha).



Fuente: Datos experimentales

Anexo 5. Actividad antioxidante determinada macrométricamente por ABTS

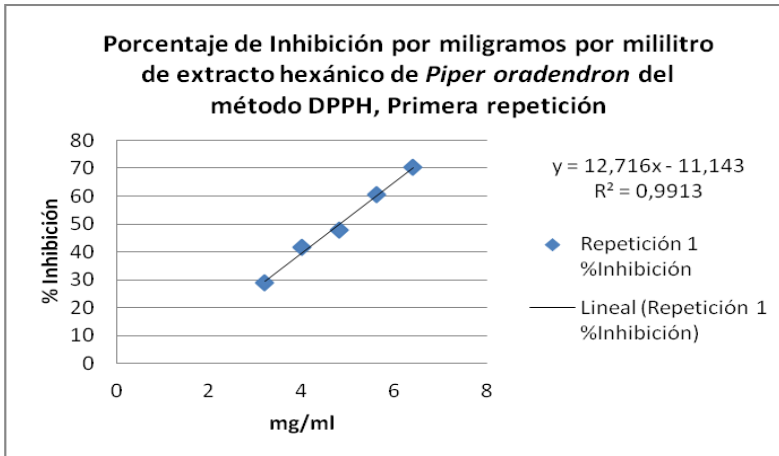


Fuente: Datos experimentales.

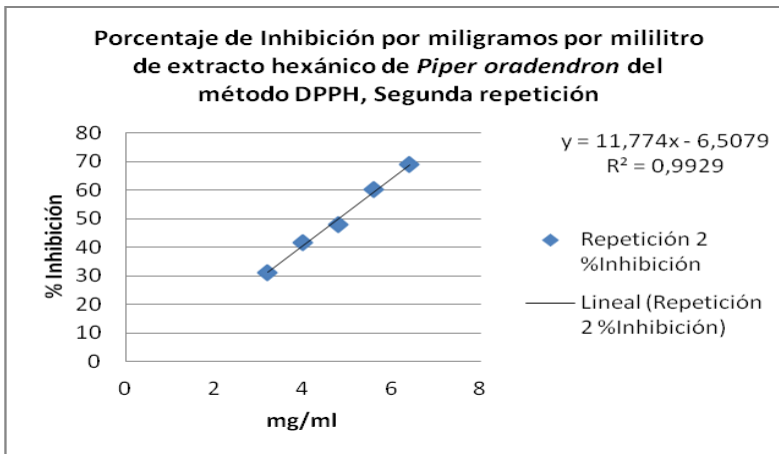
Anexo 6. Cuantificación de Fenoles Totales

13.2 Gráficas

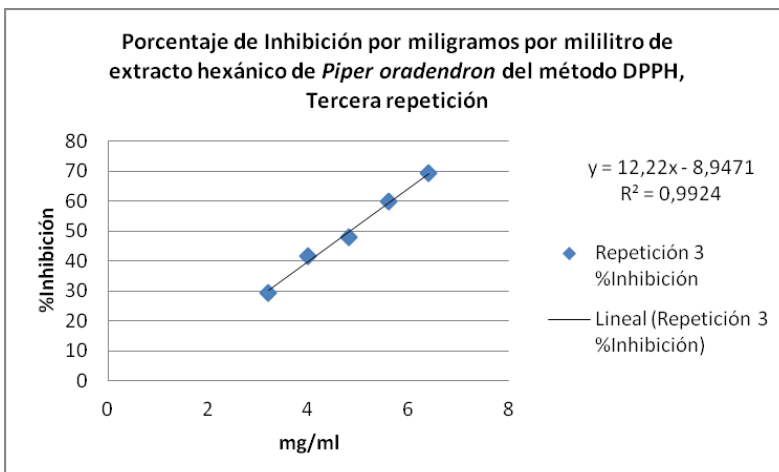
Anexo 7



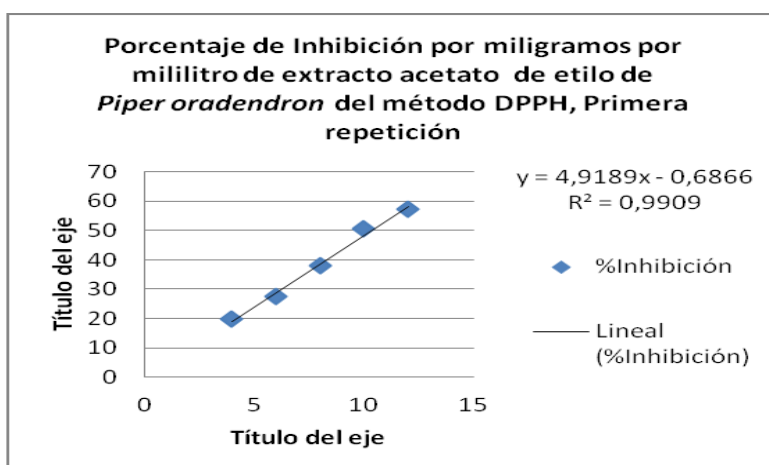
Anexo 8



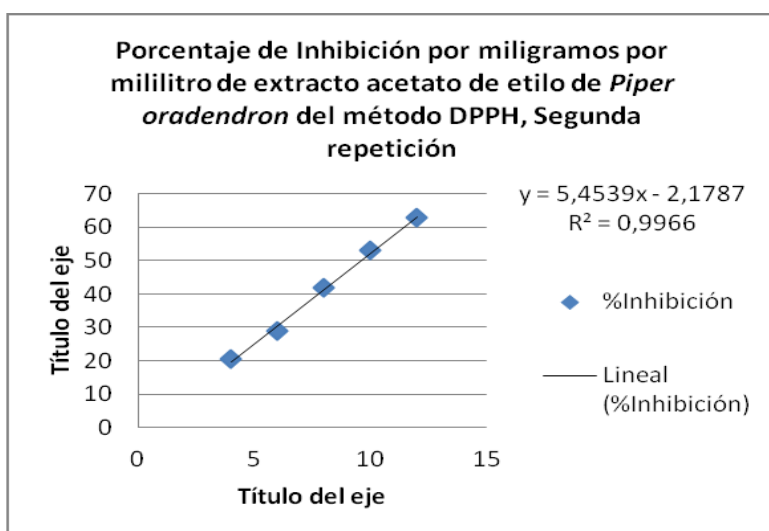
Anexo 9



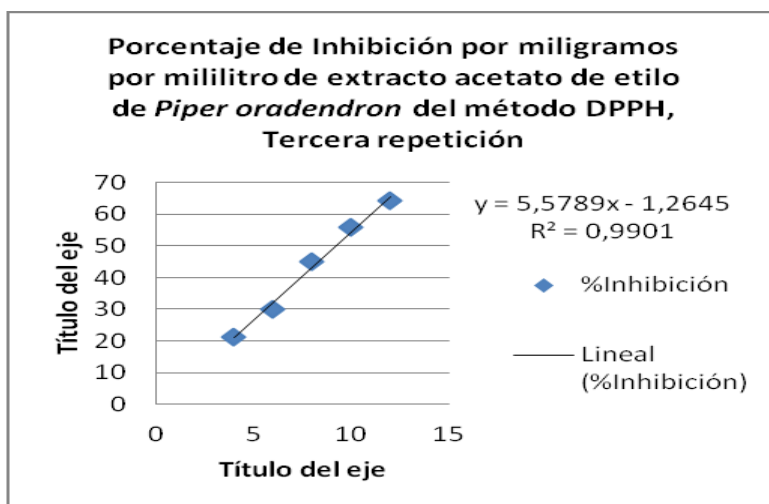
Anexo 10



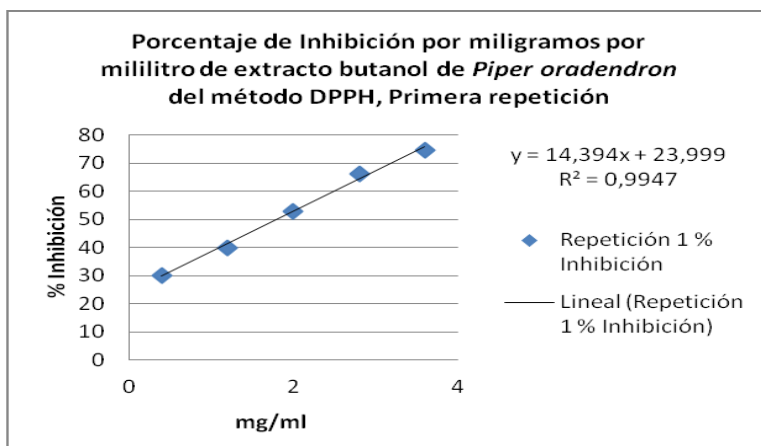
Anexo 11



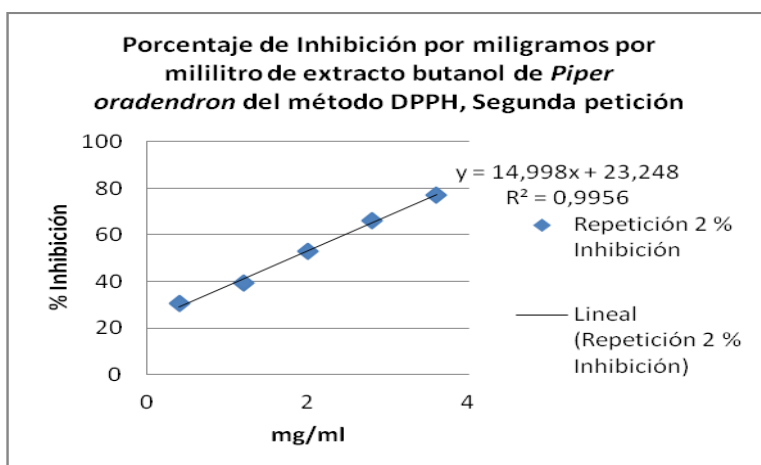
Anexo 12



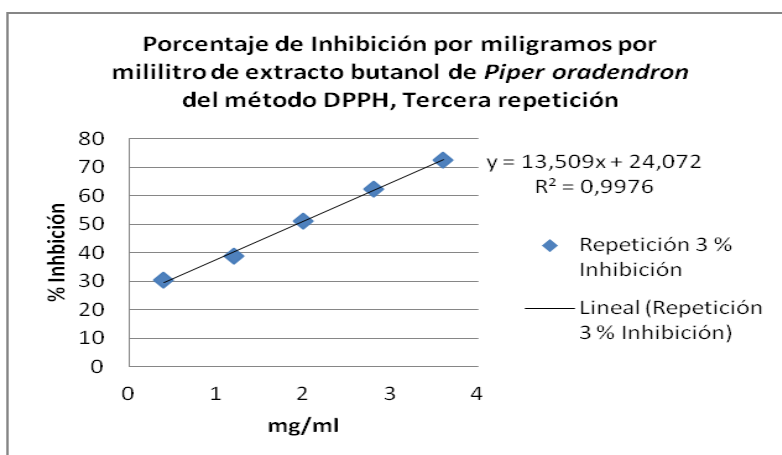
Anexo 13



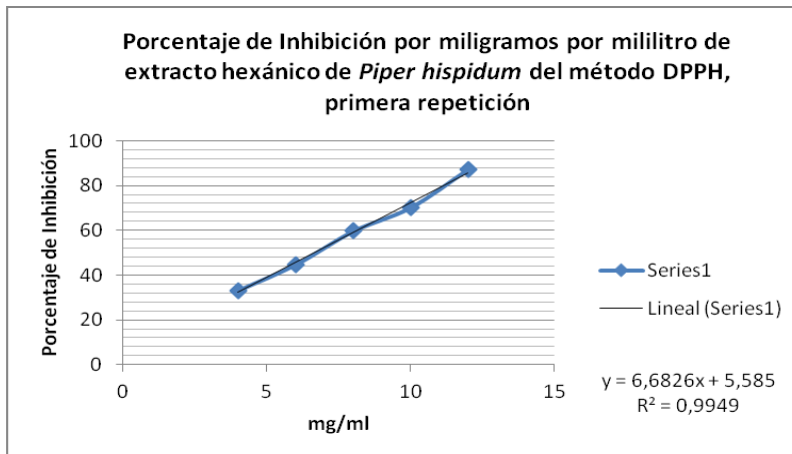
Anexo 14



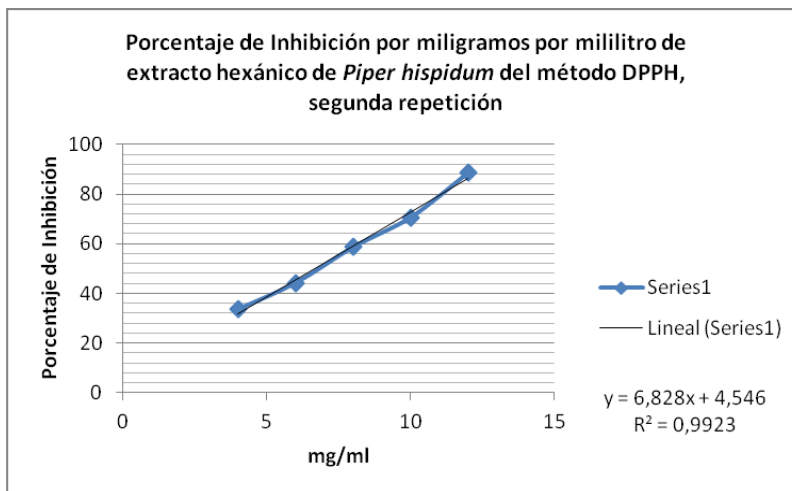
Anexo 15



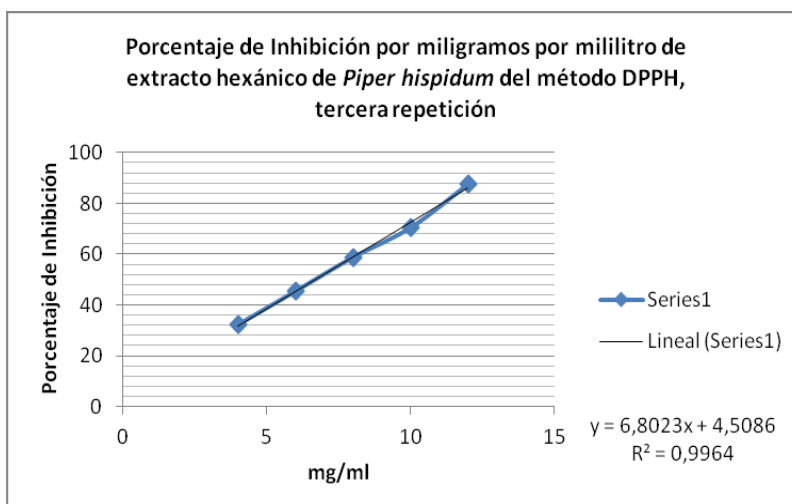
Anexo 16



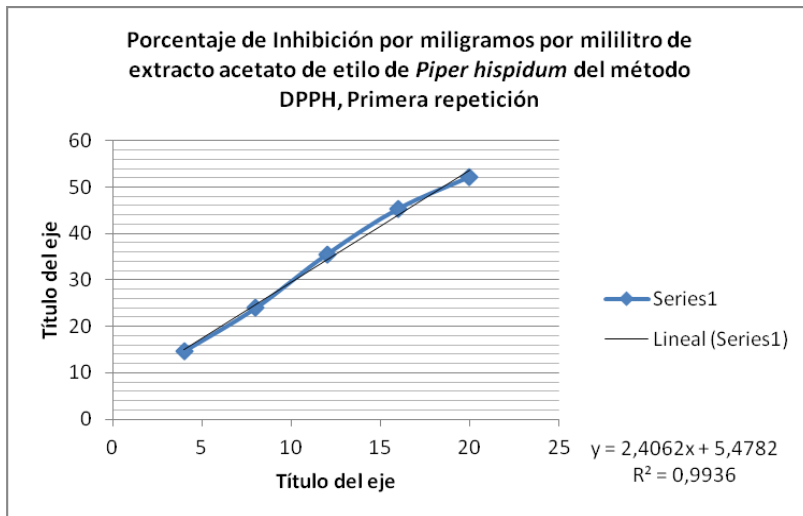
Anexo 17



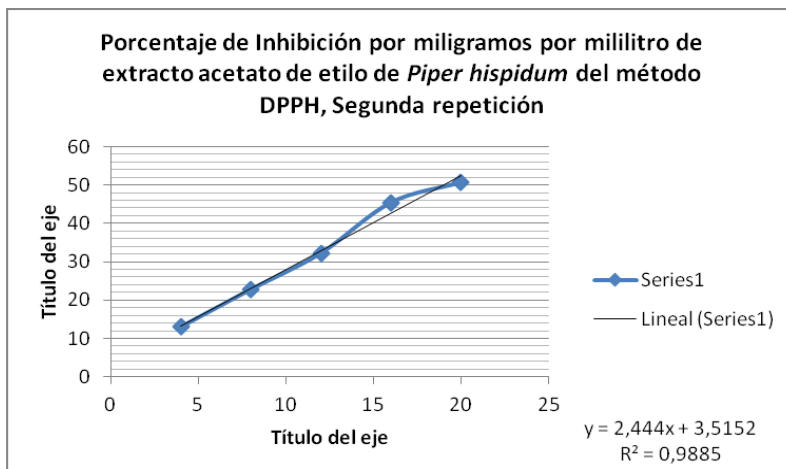
Anexo 18



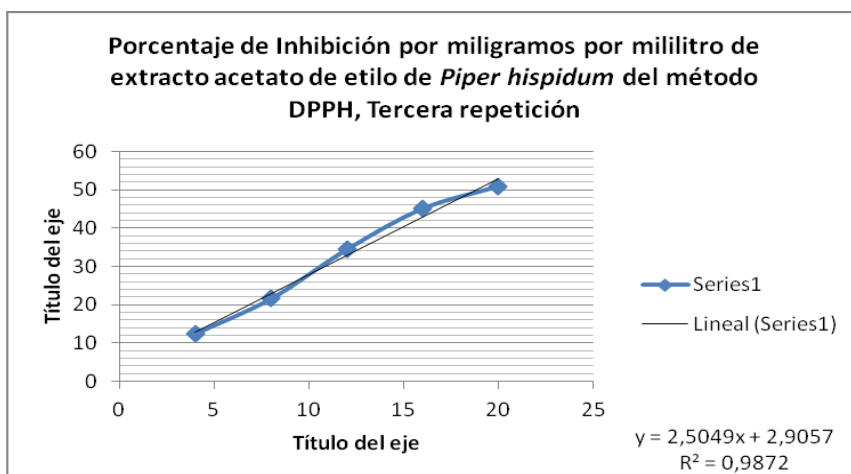
Anexo 19



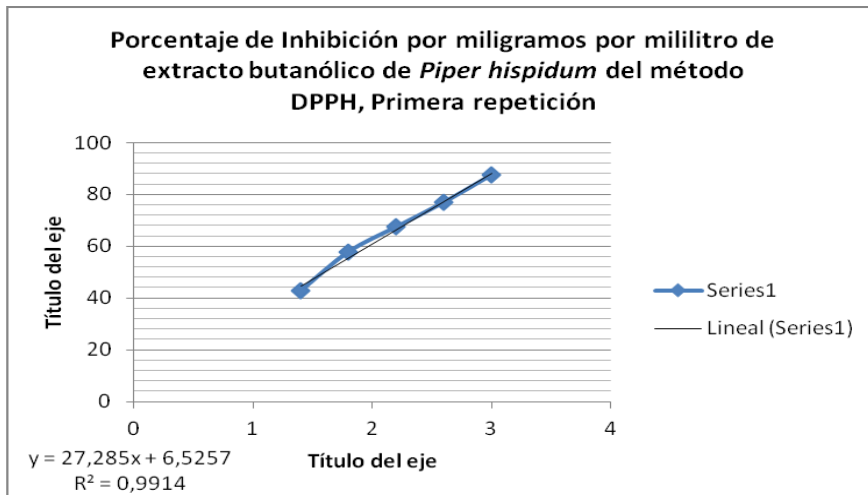
Anexo 20



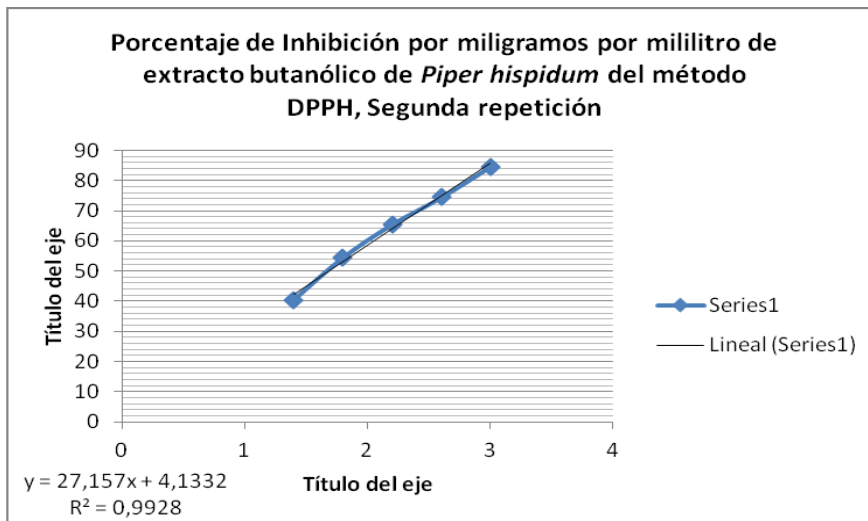
Anexo 21



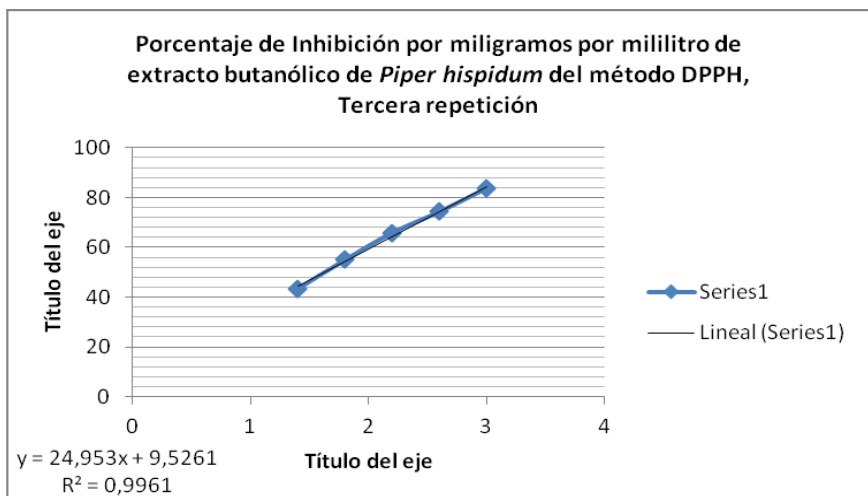
Anexo 22



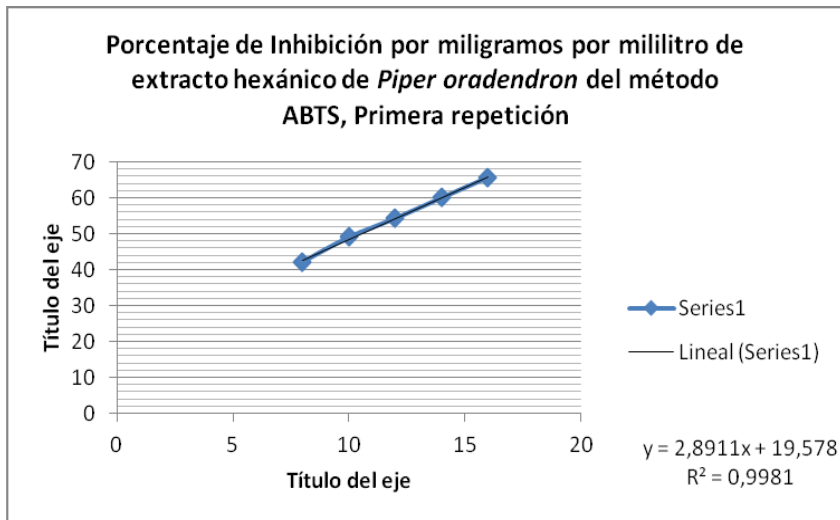
Anexo 23



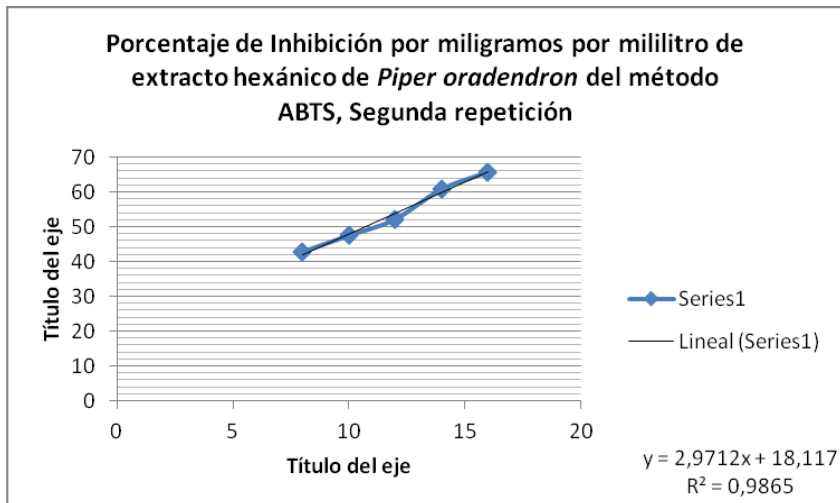
Anexo 24



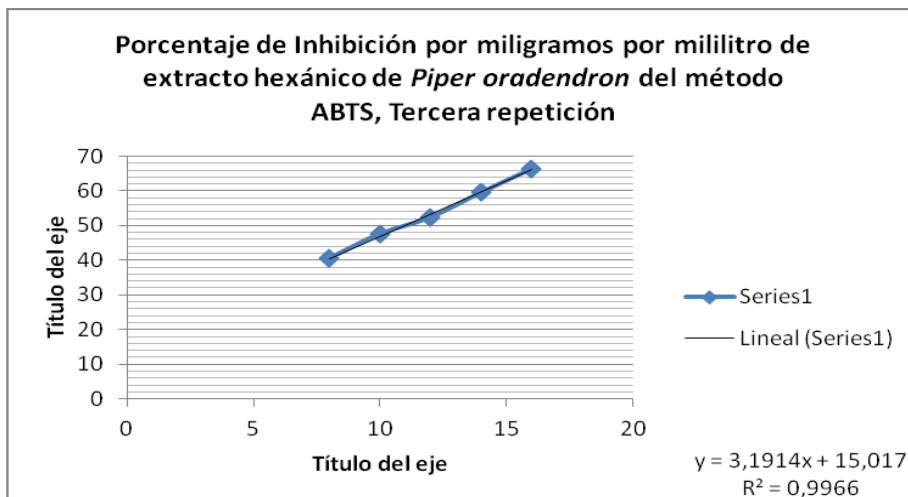
Anexo 25



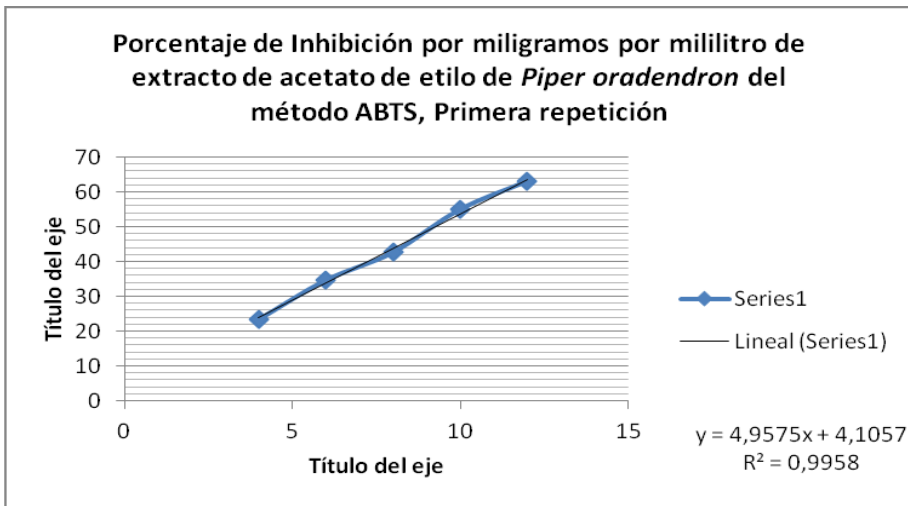
Anexo 26



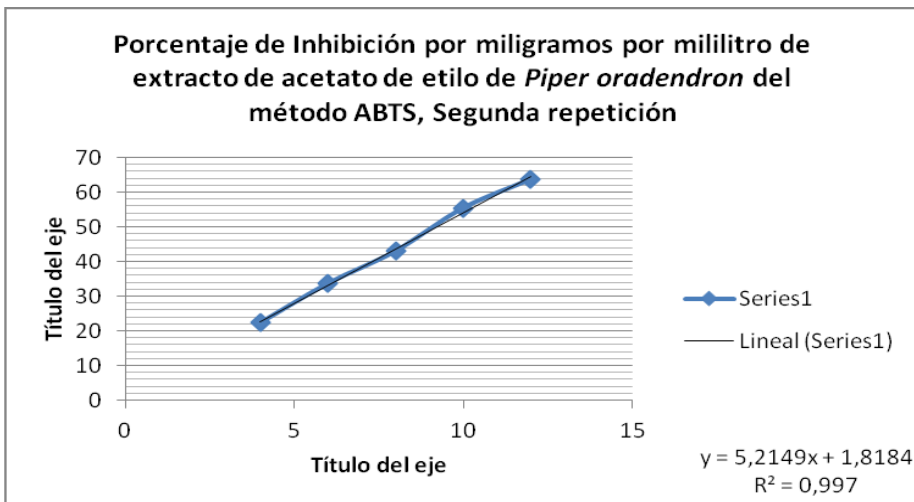
Anexo 27



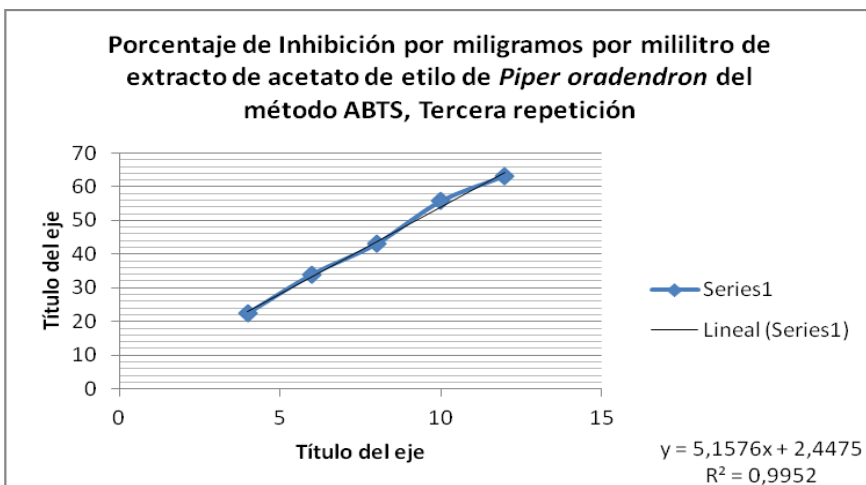
Anexo 28



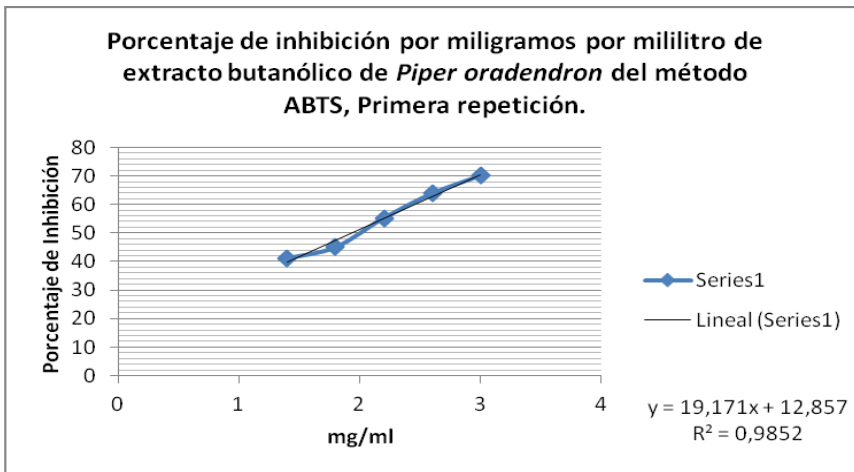
Anexo 29



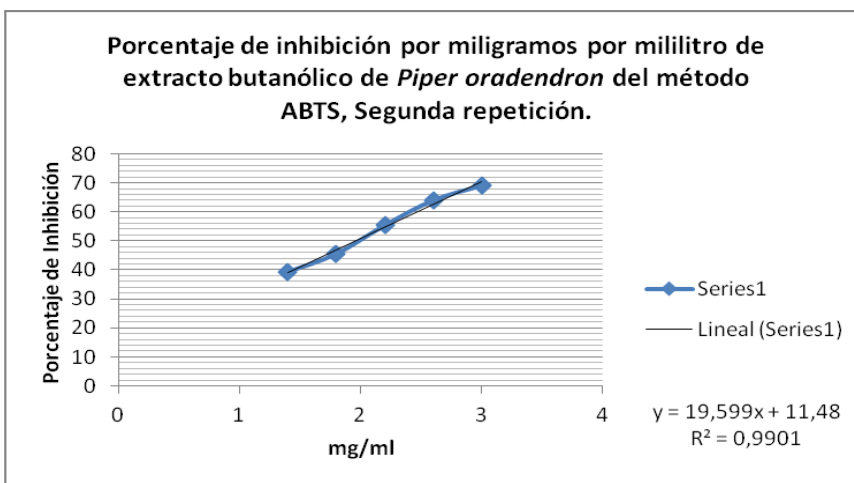
Anexo 30



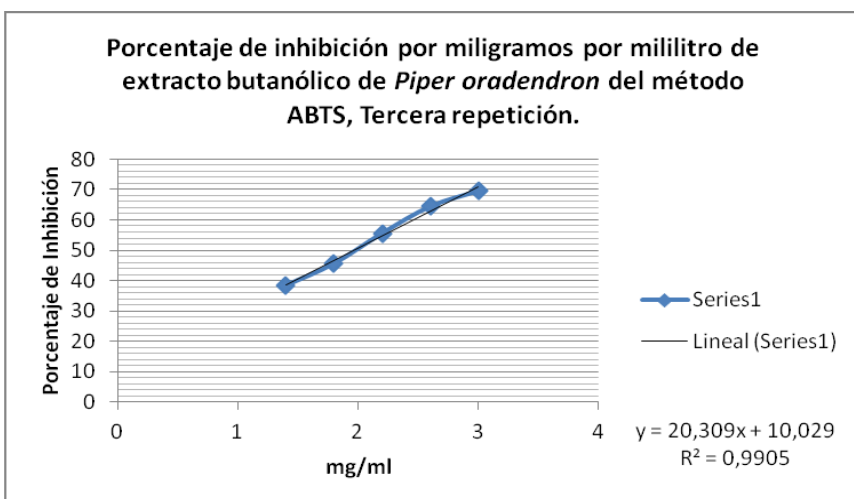
Anexo 31



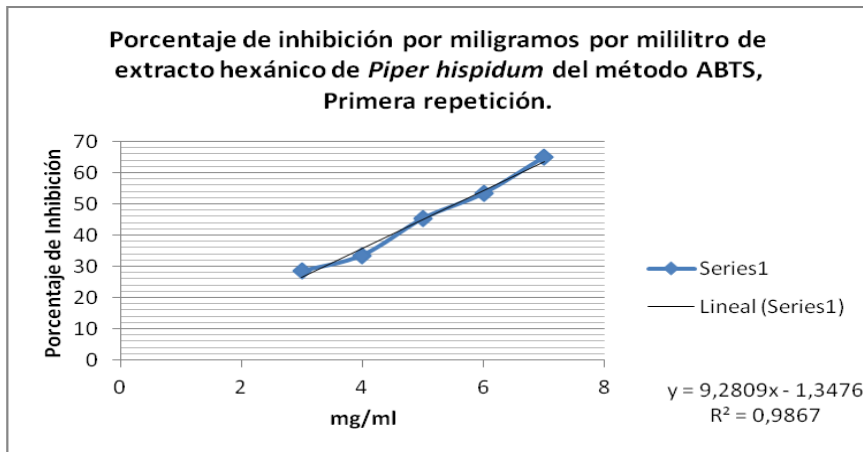
Anexo 32



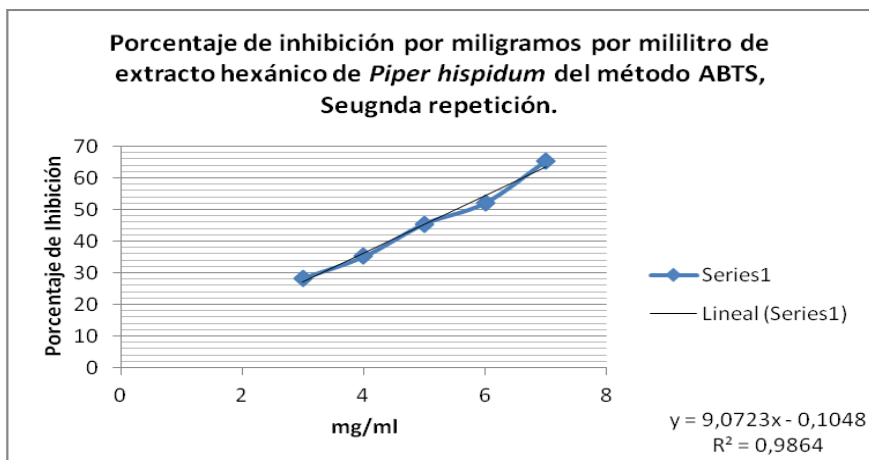
Anexo 33



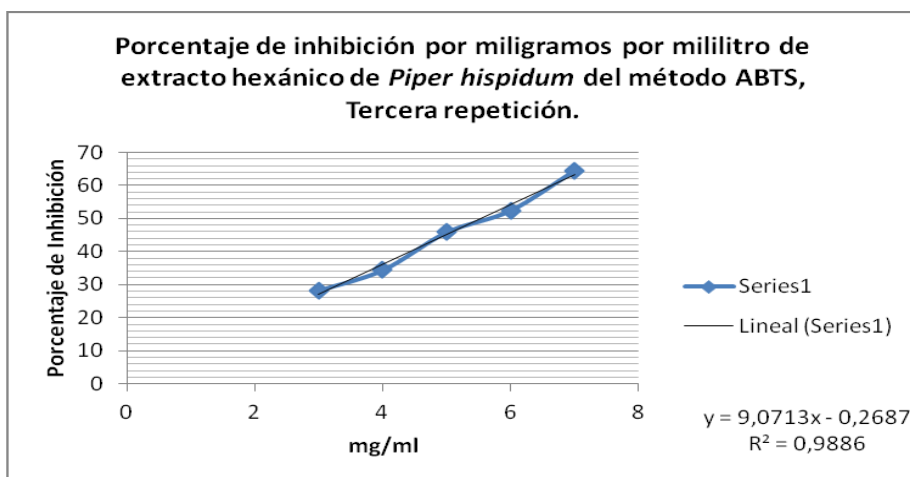
Anexo 34



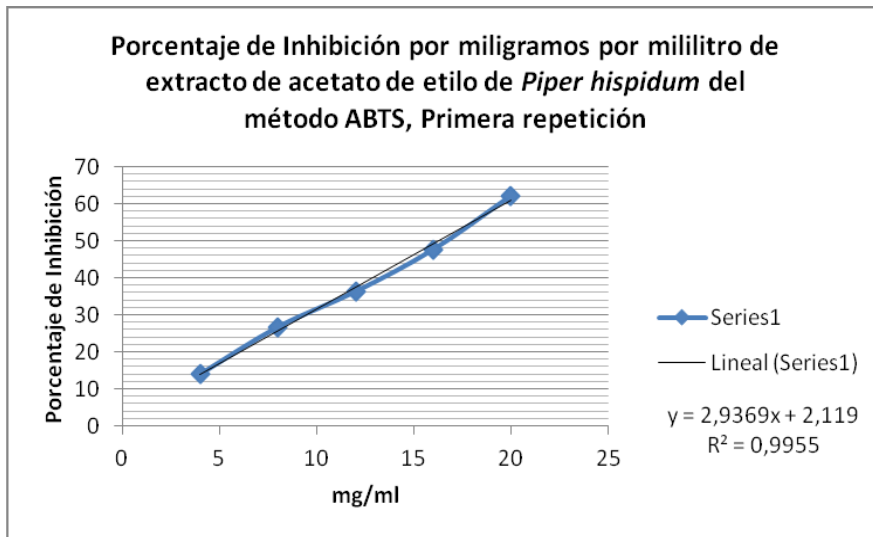
Anexo 35



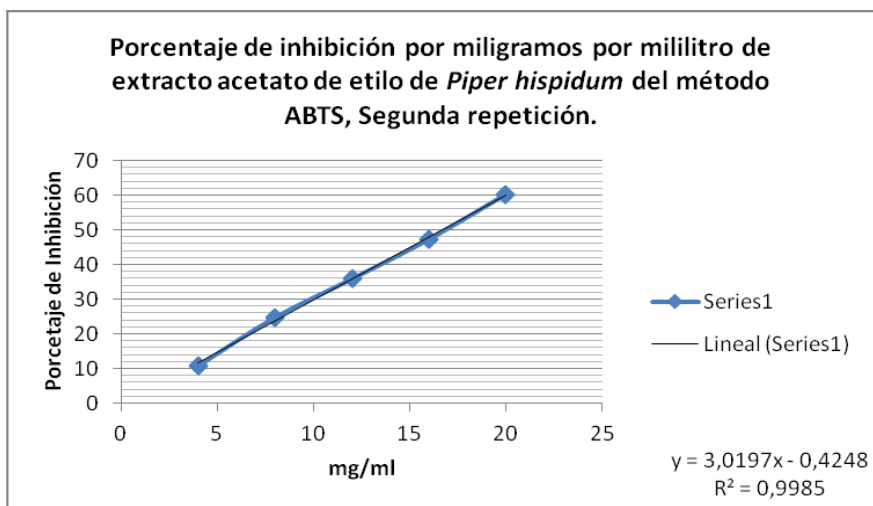
Anexo 36



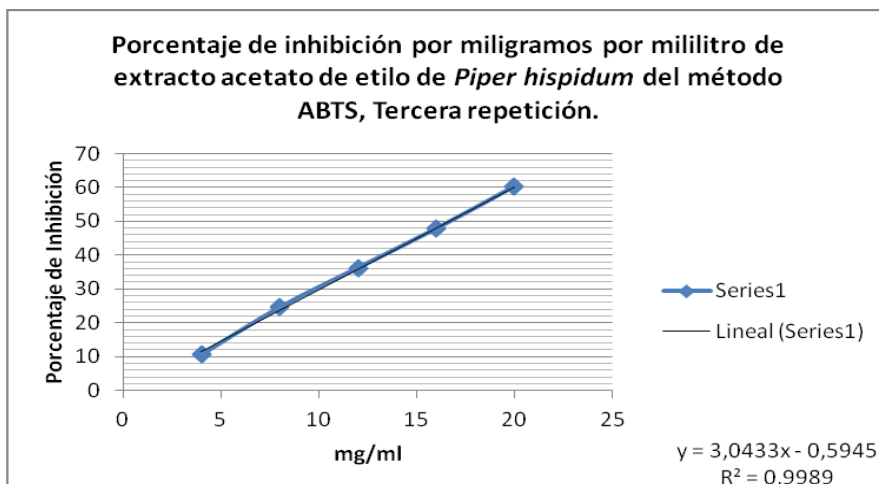
Anexo 37



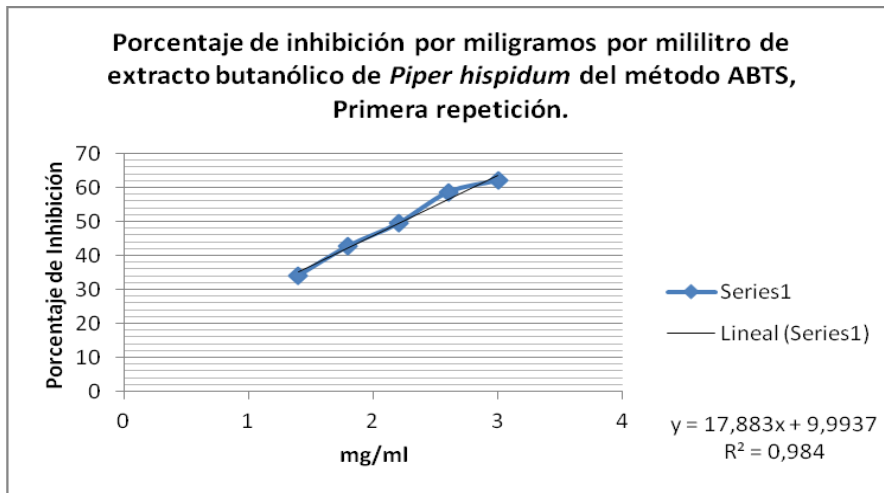
Anexo 38



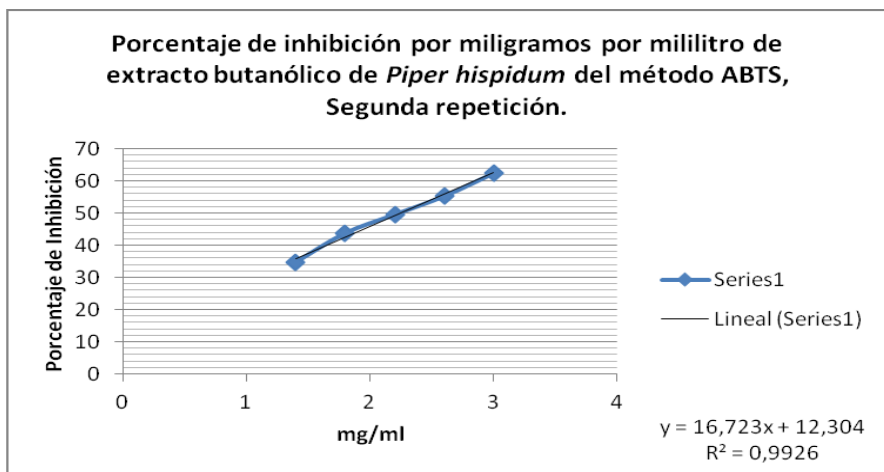
Anexo 39



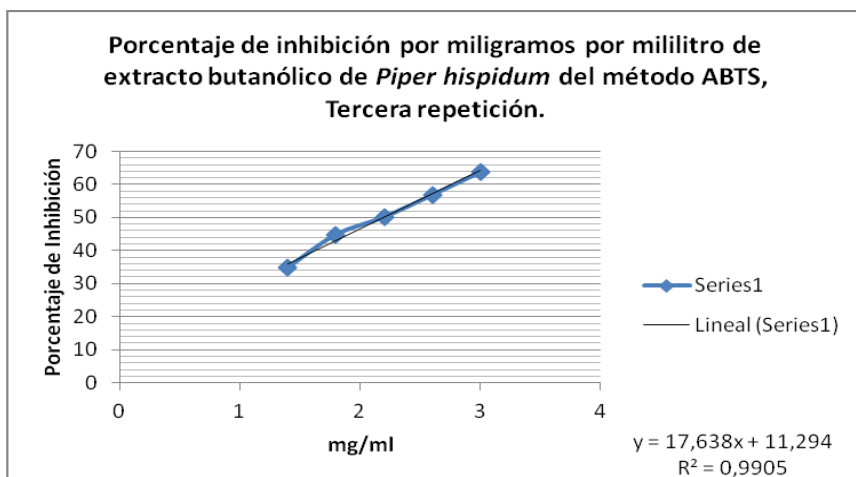
Anexo 40



Anexo 41

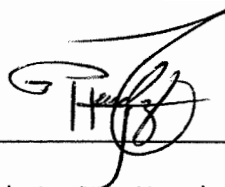


Anexo 42

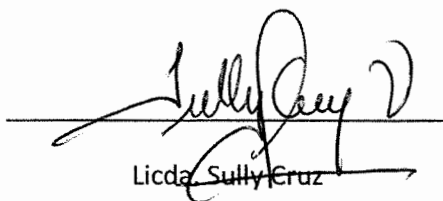




Ruth Noemí López Morales

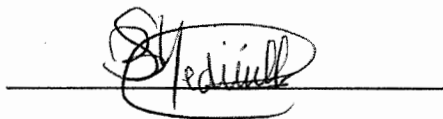


Pablo Jonātan Hernández Galindo



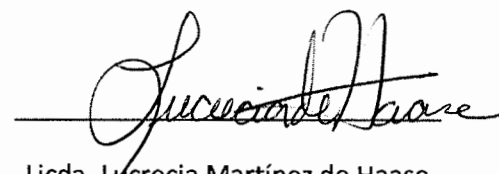
Licda. Sully Cruz

Asesora




Licda. Beatriz Medinilla

Revisora



Licda. Lucrecia Martínez de Haase

Directora de Escuela



Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto

Decano