

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Comprobación de la actividad antioxidante y evaluación de la actividad antiureasa
de mangle botoncillo (*Conocarpus erectus L.*)

Karla Maricela Toj Paiz

Química Farmacéutica

Guatemala, julio de 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Comprobación de la actividad antioxidante y evaluación de la actividad antiureasa
de mangle botoncillo (*Conocarpus erectus L.*)

Informe de Tesis

Presentado por

Karla Maricela Toj Paiz

Para optar al título de

Química Farmacéutica

Guatemala, julio de 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	4
4. Justificación.....	12
5. Objetivos.....	14
6. Hipótesis.....	15
7. Materiales y Métodos.....	16
8. Resultados.....	28
9. Discusión de Resultados.....	32
10. Conclusiones.....	38
11. Recomendaciones.....	39
12. Referencias Bibliográficas.....	40
13. Anexos.....	44

AGRADECIMIENTOS

- A Dios** Por darme la oportunidad de realizar este proyecto y permitirme culminarlo exitosamente.
- A la Universidad de San Carlos de Guatemala** Por brindarme el conocimiento y las herramientas necesarias para desarrollar esta investigación.
- Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-** Por brindarme los materiales y equipos necesarios para realizar mi tesis. Le agradezco a cada uno de los investigadores con los que tuve la bendición de compartir no solamente conocimientos, sino también una amistad.
- Al Departamento de Farmacognosia Fitoquímica de la Escuela de Química Farmacéutica.** Por brindarme los materiales y equipos necesarios para realizar este proyecto de investigación.
- A mi asesora** Dra. Sully Cruz por guiarme, compartir su conocimiento, brindarme su confianza y abrirme las puertas a la investigación de productos naturales.
- A mis revisoras** Licenciada Beatriz Medinilla y Licenciada Carolina Valdez por su apoyo y guía durante la realización de mi tesis.
- Al Centro Conservacionista de la Universidad de San Carlos de Guatemala -CECON-** Por su colaboración para la recolección de muestra vegetal utilizada en esta investigación.
- A** Licda. Nereida Marroquín, Licda. Sofía Marroquín, Licda. Alejandra Morales y Br. Libny Pernillo por brindarme su ayuda durante la realización de mi fase experimental.

DEDICATORIA

- A Dios** Por permitirme alcanzar esta meta y bendecir enormemente mi vida. Gracias por nunca dejarme caer ante las dificultades y siempre mostrarme que con tu ayuda soy capaz de alcanzar lo que me proponga. A ti sea la gloria y honra.
- A mi papá** Juan Carlos Toj Solis, sé que hoy en día estarías orgulloso de todo lo bueno que he logrado en mi vida. A pesar que no estuviste presente físicamente durante mi carrera, siempre estuviste en mi corazón. Te amo y te extraño.
- A mi mamá** Sara Paiz Olorozo, por enseñarme a ser como tú, una mujer responsable, honesta y capaz de salir adelante. Todo lo bueno que soy y tengo es gracias a ti. Gracias por tu apoyo, por tu comprensión, por tu amor y porque siempre estás ahí para mí, te amo.
- A mis hermanos** Sara Roxana y Oscar Daniel, gracias por su apoyo incondicional, sin duda ustedes son los mejores compañeros de vida que Dios pudo concederme, los amo.
- A mi sobrino** Carlos David Mendoza Toj, gracias por ser ese rayo de luz que ilumina mi vida, eres mi persona favorita de todo el mundo. Te amo.
- A mi familia** En especial a Carolina Cuesi y Ottoniel Toj por su apoyo brindado a lo largo y después de mi carrera, a mis tíos, a primos y a mis abuelos.
- A mis amigos** En especial a Libny Pernillo, gracias por ayudarme culminar esta etapa de mi vida, eres de las mejores amigas que se pueden pedir; a Anita Ovando, gracias tu amistad tan especial y brindar alegría a mi vida; a Isabel Herrera, por no solo ser una amiga incondicional sino también porque tengo la bendición de tenerte como compañera de trabajo. A Endy Ajtun, Pamela Cifuentes, Helen Cruz, Jennifer Pineda, Eduardo Mérida, Wesner Coro, Yairo Arreaga y todas aquellas personas a las que tengo la bendición de llamar amigos. Gracias por brindarme su amistad.

**Al Departamento de
Farmacología de la
Escuela de Química
Farmacéutica**

Especialmente a la Licda. Gloria Navas y Licda. Lucia Arriaga por permitirme trabajar junto a ustedes y abrirme las puertas a la docencia. Tuve la oportunidad de compartir con excelentes catedráticas y maravillosas personas, como son ustedes. Las llevare siempre en mi corazón.

**A mi familia
jalapaneca**

A Flor Palma, Olga Estrada, Sandra Bonilla, David Garza y a los turnistas de la Farmacia Interna del Hospital Nicolasa Cruz de Jalapa, gracias por ser mi familia durante seis meses. El EPS fue una experiencia que cambio mi vida.

**A la Universidad de
San Carlos de
Guatemala**

Mi *alma mater* y mi segundo hogar. Gracias por brindarme el conocimiento y las herramientas necesarias para desenvolverme en mi carrera y por brindarme tantos momentos inolvidables, te llevare siempre con cariño en mi corazón.

1. RESUMEN

La investigación para el desarrollo de medicamentos y cosméticos a partir de plantas naturales se ha intensificado en los últimos años, es por tal motivo que la presente investigación tuvo como principal objetivo comprobar la actividad antioxidante y evaluar la antiureasa en extractos de hojas y corteza de *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) procedente de la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Santa Rosa, para su posible aplicación medicinal o cosmética.

La ureasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de la urea para la producción de amoníaco, que cambia el pH del sitio en donde actúa; en el sistema gastrointestinal se ha relacionado con el desarrollo de úlceras gástricas y en el sistema urinario ha demostrado estar implicado en la formación de cálculos renales, por la precipitación de algunos compuesto al enfrentarse al cambio de pH, por lo que los inhibidores de esta enzima podrían combatir el apareamiento de úlceras gástricas y la formación de cálculos. El sistema antioxidante se encarga de proteger los tejidos atrapando los radicales libres, interviniendo en los pasos de iniciación, propagación o finalización de procesos oxidativos (Almeda, 2014).

Se pudo comprobar la actividad antioxidante de hojas y corteza del mangle botoncillo por la reducción del radical libre DPPH, por la oxidación del radical ABTS y por reducción del hierro (FRAP). Se comprobó cualitativamente que todos los extractos de las hojas presentan actividad antioxidante y que todos los extractos de la corteza presentaron actividad con excepción del extracto hexánico. A partir de estos datos se evaluó cuantitativamente la actividad. Por el método del radical libre de DPPH se determinó que el extracto etanólico de las hojas presentó mejor actividad antioxidante con un CI_{50} 0.4942 ± 0.0105 mg/mL y el que menor actividad presentó fue el extracto hexánico con un CI_{50} 20.7472 ± 1.8027 mg/mL. Así mismo en la corteza, también el extracto etanólico, presentó mejor actividad con un CI_{50} 0.2636 ± 0.0084 mg/mL. A partir de estos datos se estableció que la corteza presenta mayor actividad antioxidante que las hojas, ya que comparando ambos órganos de la planta en los extractos de diclorometano, acetato de etilo y etanol al 70% los extractos de la corteza presentaron menor CI_{50} lo que evidencia

una mayor actividad antioxidante. Por el método de la oxidación del radical ABTS se comprobó los resultados anteriores, ya que en ambos órganos fueron los extractos etanólicos los que presentaron una mejor actividad antioxidante siendo el CI_{50} del extracto etanólico de la corteza 0.3767 ± 0.0076 mg/mL y en las hojas 0.4885 ± 0.0076 mg/mL, se estableció que la corteza presento mejor actividad antioxidante al comparar el CI_{50} de los extractos de ambos órganos.

En el método de la reducción del hierro (FRAP) fueron los extractos polares, etanólico y acetato de etilo los que presentaron mayor actividad para reducir el Fe^{3+} y Fe^{2+} . Los resultados de esta prueba se presentan como los moles de cuatro estándares conocidos y comercializados por su capacidad antioxidante, presentes en extractos analizados a partir de una solución madre de 20 mg/mL. Fue extracto etanólico el que demostró mayor capacidad para realizar el poder reductor ya que presenta mayor concentración del estándar en los extractos, aumentando su actividad, y esa concentración disminuye a medida que la polaridad también disminuye.

En este estudio también se evaluó la actividad antiureasa. Esta actividad fue evaluada por medio de cromatografía en capa fina, evidenciando cualitativamente que los extractos hexánico, diclorometano y acetato de etilo de las hojas y corteza de mangle botoncillo poseen actividad antiureasa. Los extractos etanólicos no presentaron ninguna actividad inhibidora de la enzima ureasa.

2. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país que cuenta con una gran diversidad de especies vegetales. Ha sido identificada como parte de uno de los puntos del planeta más ricos en diversidad biológica y que a la vez se consideran altamente amenazados.

Los manglares son sistemas altamente productivos, son cuerpos receptores de aguas continentales que reciben y procesan nutrientes, capturan y precipitan sólidos en suspensión, permiten el control de contaminación, actúan como filtro biológico, mejoran la calidad del agua, controlan la erosión y proveen un hábitat natural para especies marinas, aves y mamíferos, por lo que proveen mayor beneficio por los servicios ambientales que brindan, comparados con los bienes comerciales y el uso directo que se obtiene de ellos (Moreno, Peresbarbosa, Travieso; 2006)..

Se realizó una investigación en hojas y corteza de mangle botoncillo (*Conocarpus erectus* L.) proveniente de la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Santa Rosa, Guatemala, donde se comprobó la actividad antioxidante de la especie por el método de radical libre de DPPH. Así mismo se evaluó dicha actividad por el método de oxidación del radical ABTS y por el método de reducción de hierro (FRAP). También se realizó la evaluación de la actividad antiureasa por medio de cromatografía en capa fina con la finalidad de determinar su potencial medicinal. La presente investigación pretende ser de utilidad para el desarrollo de nuevos productos fitoterapéuticos, además del gran interés que representa investigar una planta que actualmente se encuentra en peligro de extinción en nuestro país.

3. ANTECEDENTES

3.1 Manglar

Los manglares son denominados “bosques de mangle”, presentes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Son un grupo de halófitas altamente evolucionadas, que crecen en la franja localizada en la frontera entre las aguas marinas y la tierra firme, generalmente en la zona entre mareas de estuarios, lagunas y pantanos costaneros. Los manglares son ecosistemas altamente complejos y productivos, que cumplen una amplia serie de funciones ecológicas; entre las que se incluyen; prevención de la erosión costanera al facilitar la deposición del suelo, proveen comida y protección a mamíferos y aves, constituyen el ambiente adecuado para la nidación, cría y alimentación de una amplia gama de animales y organismos acuáticos. El manglar, también es una “fabrica orgánica” de producción de compuestos primarios, integralmente, los manglares sirven como una importante fuente de diversidad de especies (Mera, 1999).

Los diferentes componentes bióticos del manglar interaccionan entre sí, a través de la cadena de alimentos; mientras que las interacciones tróficas ocurren por medio de procesos biogeoquímicos, flujo de nutrientes, materia orgánica y detritos vegetales. La complejidad de la cadena de alimentos en los manglares y ecosistemas adyacentes, implican relaciones distantes de interdependencia entre las comunidades naturales, por ejemplo: grandes cantidades de peces y aves dependen de la producción de las hojas del manglar, ya que el producto de descomposición de estas, es fuente primaria de alimentos de la base de la pirámide trófica del ecosistema. Los manglares no son ecosistemas cerrados, por el contrario, los manglares deben ser vistos como uno de los componentes de un ecosistema extenso, llamado el ecosistema costanero, que no solamente incluye a los bosques de mangle, sino también pantanos inundados de aguas salobres y semi-dulces, salinas, ríos y vertientes, áreas de transición y ambientes pelágicos. Las interacciones entre los manglares y dichos ecosistemas adyacentes, influyen en el funcionamiento del manglar mismo (Mera, 1999).

Algunos autores han descrito una zonificación dentro del manglar, iniciando con el mangle rojo en el borde, en contacto directo con los aportes de agua; luego el

mangle negro y el blanco; y por último el mangle botoncillo. Esta zonación no se cumple en muchos sitios debido a que tanto la ubicación como la composición, la estructura y el funcionamiento del manglar dependen de la combinación de un conjunto de factores físicos, químicos y biológicos que actúan a diferentes escalas espaciales y temporales. Estos factores son la radiación solar, la temperatura, la precipitación, las fluctuaciones de la marea, el aporte de los ríos, la inundación, la salinidad, la forma del terreno, el tipo de sustrato, los vientos, las tormentas, así como los huracanes, la capacidad de dispersión de los propágulos en función de su peso, y las interacciones vegetación-fauna (Moreno, Peresbarbosa, Travieso; 2006).

Las raíces aéreas en forma de zancos (presentes sólo en el mangle rojo), le ayudan a la planta a sostenerse en el sustrato lodoso y generalmente inundado. Al estar en contacto directo con la atmósfera, permiten oxigenar el sistema vascular de la planta, al menos en marea baja. Además, éstas presentan estructuras llamadas lenticelas que facilitan el intercambio gaseoso. Dichas estructuras también se encuentran en los neumatóforos (raíces adventicias, aéreas), característicos de los mangles negro y blanco. Además, las semillas de estas tres especies presentan cierto grado de viviparidad, es decir, sus propágulos (semillas) germinan antes de desprenderse de la planta progenitora, aumentando la probabilidad de establecimiento una vez que llegan al suelo, el cual muchas veces se encuentra inundado. Algunos autores consideran al mangle botoncillo como un pseudomangle o falso mangle, debido a que carece de raíces especializadas y de semillas vivíparas (Moreno, Peresbarbosa, Travieso; 2006).

El sustrato del manglar puede estar compuesto por fracciones finas (limo-arcillosas) y fracciones gruesas (arenosas) en diferentes proporciones, así como turbas orgánicas (material orgánico en descomposición) en función de los aportes de sedimentos que existan en el lugar. Por lo general estos suelos son ácidos, carentes de oxígeno y sufren variaciones importantes en el contenido de sales. Por tanto, cuando se modifica la hidrología y no llegan los aportes de agua con la cantidad y frecuencia característica de este sistema, las sales pueden acumularse en el suelo, produciéndose la salinización del mismo. Los vientos y las tormentas destruyen parte de las ramas de los mangles, desprenden las flores y los propágulos. Los huracanes pueden llegar a eliminar parte de la cobertura arbórea, por ello en las zonas donde con frecuencia se

presentan vientos y tormentas fuertes, el manglar no logra recuperarse completamente, manteniéndose achaparrado (Moreno, Peresbarbosa, Travieso; 2006).

Los manglares son fuente de agua para uso doméstico, agropecuario e industrial, así como para otros ecosistemas con los que están interconectados. Controlan la calidad del agua, purificándola, ya que sus sedimentos anaerobios tienen la capacidad de atrapar nutrientes inorgánicos, metales pesados y plaguicidas, sin afectar a los árboles, por ello se consideran como plantas de tratamiento de agua". También ayudan a estabilizar las condiciones climáticas locales, principalmente la temperatura y la precipitación, y tienen un papel relevante en la captura de carbono, acción que permite purificar la atmósfera (Moreno, Peresbarbosa, Travieso; 2006).

Los manglares son altamente productivos en términos de madera, biomasa, producción de hojarasca y exportación de carbono orgánico. Son capaces de exportar energía, materiales y organismos a ecosistemas adyacentes. Mantienen una cadena alimenticia heterótrofa diversa, que incluye peces, crustáceos (ejemplo: camarón), aves, reptiles (ejemplo: cocodrilos, tortugas), pequeños mamíferos y numerosos invertebrados (ejemplo: mejillones, ostiones). Brindan refugio y alimento a los juveniles de muchas especies que habitan en su fase adulta en el estuario y el mar y sirven de sustrato a algas e invertebrados (Moreno, Peresbarbosa, Travieso; 2006).

Según el Instituto Nacional de Bosques, para el año 2011, en Guatemala se cuenta con cuatro especies de la Clasificación del Sistema de Humedal Estuarino:

- Mangle Rojo (*Rhizophora mangle* L.)
- Mangle Blanco (*Laguncularia racemosa* L.)
- Mangle Negro (*Avicennia germinans* L.)
- Mangle Botoncillo (*Conocarpus erectus* L.)

Y los departamentos con mangle son:

- San Marcos
- Retalhuleu
- Escuintla

·Santa Rosa

·Jutiapa

·Izabal

3.2 *Conocarpus erectus*

3.2.1 Nombre científico: *Conocarpus erectus* L.

3.2.2 Nombre común: mangle botoncillo, Okom.

3.2.3 Familia: Combretaceae.

3.2.4 Descripción de la especie

Árbol o arbusto de hasta 13 mts. de altura, de tronco derecho y muy ramificado de color amarillento y de follaje denso; corteza oscura fisurada; las hojas alternas, lanceoladas o elípticas de 3-8 cm de largo por 1.5-3 cm de ancho, coriáceas y levemente carnudas, puntiagudo en ambos extremos, de color verde amarillo en ambas superficies; las flores se dan en los extremos de ramas y en axilas de la hoja y son de color verde-amarillento de pequeñas cabezas, cerca de 5 mm de diámetro en tallos delgados; los frutos son múltiples y redondeados de 10-12 cm de diámetro. Florece todo el año (Zamora, 1999).

3.2.5 Hábitat:

Costero o el componente más externo en áreas de manglar. Es común en los bancos de arena, en la línea de marea alta o sitios con inundaciones periódicas (Zamora, 1999).

3.2.6 Usos

La madera de *Conocarpus erectus* L. es parda, muy dura, fuerte y de grano fino, utilizada en algunas regiones para construcción o para hacer carbón. La corteza y hojas tienen gran cantidad de taninos. Medicinalmente se ha empleado como tónico astringente y en casos de orquitis (Zamora, 1999).

Es usado en algunos países como remedio tradicional para enfermedades como la anemia, el catarro, la conjuntivitis, diabetes, diarrea o fiebre (Abdel- Hameed *et al.*, 2012).

3.2.7 Composición química

La corteza y hojas tienen gran cantidad de taninos. (Zamora, 1999).

En el estudio “Efecto protector de extractos de *Conocarpus erectus* sobre la lesión hepática en ratones”, realizado por el Laboratorio de Análisis de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias, Universidad de Taif, Arabia Saudí, se determinó la presencia de taninos, flavonoides y fenoles (Al-Hameed, 2013).

Por medio de análisis HPLC con extractos de acetato de etilo y n-butanol, de hojas, flores, raíz y frutos se reveló presencia de ácido gálico, catequinas, apigenina, quercetina, quercetina-3-O- glucósido, kaemferol-3-O-glucosido, rutina y quercetina-3-O-glucosido-ácido gálico. La madera de *Conocarpus erectus* L. contiene conocarpol y 2-metoxiconocarpol, 1-4 diarilbutano tipo lignanos y conocarpano. Los extractos metanólicos de fruto, analizados por análisis de espectrometría por cromatografía líquida de alta resolución-ultra violeta- ionización de electro spray reveló la presencia de ácido elágico, vescalagina, castalagina (Bashir, 2015).

3.2.8 Estudios Relacionados

En el artículo “Estudio fitoquímico y evaluación de las propiedades antioxidante, anticáncer y antimicrobiana de *Conocarpus erectus* L. crecido en Taif, Arabia Saudita”, se da a conocer la actividad antioxidante en cuatro extractos metanólicos obtenidos de diferentes partes de *Conocarpus erectus* (hojas, tallos, frutas y flores). Estos extractos mostraron altos niveles inhibición del radical libre, que establecen la actividad del radical DPPH con una Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) entre 6.47-9.4 µg/ml. Las fracciones de n-butanol obtenidas del fraccionamiento sucesivo de los cuatro extractos de metanol poseen una CI₅₀ entre 4.43-5.89 µg/mL más alto que las fracciones de acetato de etilo (EtOAc) (7.04-10.71 µg/mL. Debido a la alta actividad antioxidante en las fracciones de acetato de etilo y fracciones de n-butanol, dichos

extractos fueron probados *in vitro* contra dos líneas de células de cáncer humanas; HepG2 y MCF-7; utilización de método de ensayo de sulforodamina-B. Los resultados mostraron que la mayor parte de fracciones tenían una actividad citotóxica con Concentración Inhibitoria Media (IC50) $<20\mu\text{g/ml}$, la cual se encuentra dentro de los criterios de Instituto de Cáncer Americano. El estudio también determina y cuantifica tres metabolitos secundarios: fenoles, flavonoides y taninos en fracciones de acetato de etilo y n-butanol de hojas, tallos, flores y frutos (ver Anexo 6), que están implicados en las actividades evaluadas, ya que están involucradas en el poder reductor que participa activamente en la capacidad antioxidante de la planta (Abdel-Hameed *et al.*, 2012).

3.3 Actividad Antioxidante de los Flavonoides

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes del hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas como 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 A_2 ; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa. 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 (Almeda, 2014).

3.4 Métodos de detección de la Capacidad Antioxidante de una droga

3.4.1 Métodos ABTS

En este método, el producto de oxidación del ABTS, el catión-radical de larga vida ABTS^+ , se presenta como una excelente herramienta para determinar la actividad antioxidante de antioxidantes donadores de hidrógeno (capturadores de radicales en fase acuosa) y antioxidantes rompedores de cadena (capturadores de radicales peróxido lipídicos). El radical ABTS^+ se genera mediante la interacción del ABTS con la

especie radical ariaferrilmioglobina, generada por la activación de la metmioglobina en presencia de peróxido de hidrógeno. En este método, se mide el tiempo que tarda el radical ABTS en ser oxidado hasta el radical libre estable $ABTS^+$ en presencia de compuestos antioxidantes como los polifenoles, que retarden dicha oxidación o bien disminuyan la absorbancia de la disolución por captura del radical. La absorbancia se mide a 734 nm, longitud de onda en la que el radical coloreado presenta un máximo. El resultado final se expresa como equivalentes del compuesto de referencia ácido 6-hydroxi- 2, 5, 7, 8-tetrametilcloroman-2-carboxílico. (Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E) que generarían la misma respuesta (Félix, 2008).

3.4.2 Método FRAP

El método FRAP (reducción del hierro/poder antioxidante), está basado en la capacidad reductora (transferencia de un electrón desde la molécula antioxidante a la oxidante), es decir determina la capacidad de reducción férrica que tiene una muestra. A pH bajo y en presencia de un reductor (antioxidante), el complejo de tripiridiltriaquina (TPTZ) con Fe (III) se reduce a la forma ferrosa, desarrollando un intenso color azul con una absorción máxima a 595 nm, que permite ser cuantificado espectrofotométricamente por interpolación en una recta de calibrado de un patrón. Se mide el incremento de absorbancia a los 30 minutos de comenzar la reacción (Félix, 2008).

3.4.3 Método DPPH

Se basa en la capacidad del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo para reaccionar con donadores de H^+ . El radical DPPH tiene un máximo de absorbancia a 517 nm y genera un producto incoloro cuando captura un antioxidante. De esta forma, se mide la disminución de la absorbancia de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidantes con grupos OH^- activos donadores de H^+ capaces de capturar los radicales libres (Félix, 2008).

3.5 Actividad Antiureasa

Cada organismo descompone los ácidos nucleicos y proteínas, generando así residuos nitrogenados, ya que los ácidos nucleicos y proteínas contienen nitrógeno. Mamíferos,

anfibios y algunos invertebrados excretan residuos nitrogenados como la urea, que se produce en el hígado y poca cantidad en los riñones. La urea es un compuesto especialmente bueno para la eliminación de nitrógeno debido a que es soluble en agua y menos toxico (Vincent, 1981).

La urea es un compuesto de desecho que se forma a partir del amoníaco, que es el principal catabólito en el metabolismo de las proteínas. Las proteínas se simplifican en aminoácidos, los que no son utilizados en el organismo pasarán por un proceso de desanimación que conduce a la formación del amoníaco, el cual al combinarse con compuestos presentes en el medio (CO_2 y H_2O) forma urea, esto se conoce como urogénesis (Vincent, 1981).

La ureasa (urea amidohidrolasa) es una enzima que se encuentra distribuida en algas, bacterias, hongos y plantas. Esta cataliza la hidrólisis de la urea para la producción de amoníaco, que cambia el pH del sitio donde actúa; en el sistema gastrointestinal, se ha relacionado con el desarrollo de úlceras gástricas y en el sistema urinario se ha demostrado estar implicado en la formación de cálculos renales, por la precipitación de algunos compuestos al enfrentarse al cambio de pH. La estructura, tipo de subunidades, peso molecular y secuencia de aminoácidos depende de su origen. Aparte de estas diferencias, las secuencias de aminoácidos en los sitios activos y el mecanismo de la actividad enzimática son los mismos (Paulo *et al*, 2011).

Los compuestos que inhiben las enzimas son de suma importancia en el tratamiento de una serie de enfermedades. Ya que la ureasa se ha relacionado con el desarrollo de úlceras gástricas, la búsqueda de compuestos inhibitorios que actúen en el sitio activo de la enzima se ha intensificado (Chávez *et al*, 2011).

4. JUSTIFICACIÓN

El mangle botoncillo es una planta a la cual se le atribuyen principalmente el uso de la madera que se obtiene de su tallo y ramas para la construcción o hacer carbón, sin embargo, es importante evaluar su uso para la aplicación medicinal o cosmética. Presenta metabolitos secundarios como fenoles, polifenoles, flavonoides, taninos, entre otros, que intervienen en la actividad antioxidante las cual se aprovecharían para el desarrollo de productos naturales cosméticos y en el caso la actividad antiureasa para el desarrollo de productos naturales medicinales.

Los antioxidantes son compuestos que se encargan de neutralizar el exceso de radicales libres, liberando electrones en la sangre para que sean captados por los radicales libres y se vuelvan moléculas estables. La importancia del descubrimiento de nuevos compuestos que retarden el proceso de oxidación celular genera nuevas formas de contrarrestar los efectos oxidativos como es la aparición de arrugas, la resequedad y pérdida de elasticidad en la piel (Almeda, 2014).

Un estudio previo realizado en la Universidad de Taif, Arabia Saudita, reporta actividad antioxidante en extractos de dicha especie, sin embargo, en Guatemala no se han realizado estudios químicos, ni bioensayos que comprueben la actividad de la planta que crece en el país. Por lo que se determinó que esta especie es equiparable, empleando además otros métodos que validen su efectividad.

La actividad antiureasa no había sido evaluada en esta planta y con ella se puede brindar hallazgos que demuestren el valor que posee no solamente a manera de protección y conservación en una región sino también a nivel agroindustrial para su posible aplicación medicinal en el caso de la actividad antiureasa. Se ha comprobado que la ureasa se relaciona con el desarrollo de úlceras gástricas. Es sabido que los polifenoles están asociados a beneficios para la salud por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y particularmente si resultan inhibidores de ureasa puede ser una estrategia interesante mediante la cual se puede alterar la capacidad de

colonización de la bacteria *Helicobacter pylori*. Por lo que especies ricas en polifenoles constituyen un potencial ideal para la prevención y manejo de úlceras gástricas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Comprobar la actividad antioxidante y evaluar la actividad antiureasa en extractos de hojas y corteza de *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) procedente de la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Santa Rosa, para su posible aplicación medicinal o cosmética.

5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1 Determinar los extractos de *Conocarpus erectus* L. que presentan actividad antioxidante y antiureasa.
- 5.2.2 Comprobar la actividad antioxidante en extractos de hojas y corteza de mangle botoncillo mediante las técnicas del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP), el método de captación del radical 2,2 -difencil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y evaluar dicha actividad por medio de la técnica de la Capacidad Antioxidante en equivalentes de Trolox (ABTS).
- 5.2.3 Evaluar la actividad antiureasa en extractos hojas y corteza de la planta a través de cromatografía en capa fina.
- 5.2.4 Determinar la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de los extractos activos para establecer su eficacia como antioxidantes.

6. HIPOTESIS

Los extractos de *Conocarpus erectus* (mangle botoncillo) obtenidos en la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Guatemala, presentan actividad antioxidante equiparable con el de otras regiones y presentan actividad antiureasa.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 UNIVERSO

Árboles de *Conocarpus erectus* distribuidos en la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Guatemala.

7.2 MUESTRA

Extractos de hojas y corteza de árboles de *Conocarpus erectus* distribuidos en la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Guatemala.

7.3 RECURSOS HUMANOS

Autora: Br. Karla Maricela Toj Paiz, estudiante de la carrera de Química Farmacéutica

Asesora: Dra. Sully Margot Cruz V.

Revisora: Licda. Beatriz Medinilla

Licda. Carolina Valdez

7.4 RECURSOS INSTITUCIONALES

- ✓ Biblioteca Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- ✓ Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- ✓ Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- ✓ Laboratorio de Investigación de Productos Naturales- LIPRONAT-
- ✓ Centro de Estudios Conservacionistas de la USAC- CECON.

7.5 EQUIPO:

7.5.1 Horno

7.5.2 Molino

7.5.3 Balanza analítica RODWAG WAS 220/C/2

7.5.4 Estufa eléctrica

7.5.5 Percolador de acero inoxidable

7.5.6 Rotavapor

- 7.5.7 Campana extractora de gases
- 7.5.8 Cámaras cromatográficas
- 7.5.9 Espectrofotómetro Agilent 8453 G1103A
- 7.5.10 Lector de placas Agilent 8453G1103A
- 7.5.11 Incubadora VWR modelo 1525
- 7.5.12 Cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄
- 7.5.13 Asperjador de vidrio
- 7.5.14 Bomba de vacío
- 7.5.15 Lámpara UV
- 7.5.16 Balanza de humedad OHAUS MB35 HALOGEN
- 7.5.17 Horno de secado VWR 08043606

7.6 REACTIVOS:

- 7.6.1 Terc-butil-hidroquinona
- 7.6.2 Acetato de etilo
- 7.6.3 Ácido acético
- 7.6.4 Acido fórmico
- 7.6.5 Agua destilada
- 7.6.6 Agua desmineralizada
- 7.6.7 Metanol
- 7.6.8 2,2-difenil-1-picril- hidrazilo
- 7.6.9 Acetato de sodio anhidro
- 7.6.10 Hidróxido de sodio
- 7.6.11 Etanol 70%
- 7.6.12 Fosfato de sodio
- 7.6.13 Acido tricloroacetico
- 7.6.14 Cloruro férrico
- 7.6.15 Acetona
- 7.6.16 Buffer de fosfatos pH 6.5 50 mM
- 7.6.17 Hidroxiciclohexanona
- 7.6.18 Cloroformo
- 7.6.19 Rojo de fenol

7.6.20 Solución estándar de ureasa

7.6.21 Carbono de amonio

7.6.22 Diclorometano

7.6.23 Hexano

7.6.24 Acetato de etilo

7.6.25 Dimetilsulfóxido

7.7 MÉTODOS

7.7.1 Selección de la planta

7.7.2 Recopilación Bibliográfica: se realizó una revisión bibliográfica en las diferentes fuentes y bases de datos sobre *Conocarpus erectus* L.

7.7.3 Obtención del material seco: La planta se recolectó en la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Guatemala, 13° 46' 18" N y 90° 06' 39" O. La recolección se hizo en 15 árboles de Mangle Botoncillo de los cuales se cortaron las hojas y corteza. Las muestras se lavaron, escurrieron y se secaron en el horno a una temperatura de 40-45°C hasta alcanzar una humedad menor al 10%. La muestra vegetal de la especie se encuentra en el Herbario BIGU de la Escuela de Biología, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con el número de voucher 73884.

7.7.4 Molienda de la planta.

7.7.5 Obtención del extracto hexánico, diclorometánico, acetato de etilo y etanólico por percolación y concentración en rotavapor.

7.7.6 Comprobación de la Actividad Antioxidante

7.7.6.1 Método DPPH por cromatografía en capa fina (TLC)

- Aplicar 10 μ L de muestra y 5 μ L de los estándares en una placa cromatográfica de silica gel 60_{F254}.

- Colocar la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua (100:11:11:26).
- Secar y aspejar la cromatoplaquea con 2,2 difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (1mg/mL en metanol).
- Detección: Si los extractos presentan actividad antioxidante se observa la decoloración de DPPH en las bandas respectivas (Wagner; Zhiyong, 1969; Suhaj, 2006).

7.7.6.2 Método DPPH por espectrofotometría UV-Visible

A) Preparación de solución madre: Pesar 20mg de extracto seco y agregar 1mL de metanol absoluto luego introducirlo en el sonificador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre preparar una serie de diluciones:

No.	Muestra (μL)	Metanol (μL)	Dilución	Concentración (mg/mL)
D-1	50	200	0.2	4
D-2	100	150	0.4	8
D-3	150	100	0.6	12
D-4	200	50	0.8	16
D-5	250	----	1	20

B) Solución de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) 150μM en metanol: Pesar 1.7mg de reactivo de DPPH y disolver con metanol hasta un volumen de 25mL en un balón aforado. Agitar la solución y conservar en un recipiente ámbar. Por ser una solución inestable, se recomienda preparar la solución en mismo día que se va a emplear, preparando únicamente lo necesario.

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

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

Reactivo Pozo	Muestra	Metanol	Solución de DPPH (150µM)
Blanco Control	---	220 µL	---
Control	---	20 µL	200 µL
Blanco de Ensayo	20 µL	200 µL	---
Ensayo	20 µL	---	200 µL

Se preparan los pozos de reacción según como se indica en el inciso “C”, la microplaca se agita en un vortex para placas durante 30 segundos y luego se incuba a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Se lee en lector de microplacas de 96 pozos a una longitud de onda de 490 nm.

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

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

Absorbancia del control = Absorbancia del Control - Absorbancia del Blanco Control

Absorbancia del ensayo = Absorbancia del Ensayo - Absorbancia del Blanco respectivo

Luego con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de cada dilución se elabora una gráfica lineal; esperando que valores de porcentaje de inhibición se encuentren entre el 60-70%. La ecuación de la recta debe tener un r^2 entre 0.97-0.99, para que la corrida sea aceptada. Si no se cumple con un porcentaje de inhibición ente 60-70% y un r^2 entre 0.97-0.99, repetir el ensayo

preparando otras diluciones (si la muestra está muy concentrada) y controlando el pipeteo para mejorar el r^2 .

Ya con una buena ecuación de regresión lineal determinar la concentración inhibitoria media, según la siguiente formula:

$$IC50 = \frac{50 \% - \text{pendiente}}{\text{Intersección}}$$

7.7.6.3 Método FRAP por espectrofotometría UV-Visible

- A) Preparación de la solución madre del extracto: pesar 20 mg de extracto seco y agregar 1mL de metanol luego introducirlo en el sonificador por 30 minutos. De esta solución madre preparar una serie de diluciones:

No.	Muestra (μ L)	Metanol (μ L)	Dilución	Concentración (mg/mL)
D-1	50	200	0.2	4
D-2	100	150	0.4	8
D-3	150	100	0.6	12
D-4	200	50	0.8	16
D-5	250	----	1	20

- B) Preparación de la solución madre de los estándares y diluciones, esto depende de cada uno de los estándares. Preparar solución madre y diluciones según se indica en el cuadro siguiente:

Estándar	Solución madre	No.	Dilución	Concentración (mg/mL)
Vitamina C	20mg/1mL MetOH	D-1	5 μ L/5mL MetOH	0.02
		D-2	15 μ L/5mL MetOH	0.06
		D-3	25 μ L/5mL MetOH	0.10
		D-4	35 μ L/5mL MetOH	0.14
		D-5	45 μ L/5mL MetOH	0.18
Quercetina	2mg/1mL MetOH	D-1	20 μ L/5mL MetOH	0.008
		D-2	60 μ L/5mL MetOH	0.024
		D-3	100 μ L/5mL MetOH	0.040
		D-4	140 μ L/5mL MetOH	0.056
		D-5	180 μ L/5mL MetOH	0.072

Rutina	20 mg/1mL MetOH	D-1	20µl/5mL MetOH	0.08
		D-2	40µl/5mL MetOH	0.16
		D-3	60µl/5mL MetOH	0.24
		D-4	80µl/5mL MetOH	0.32
		D-5	100µl/5mL MetOH	0.40
Trolox	10mg/5mL MetOH	D-1	100µl/5mL MetOH	0.04
		D-2	250µl/5mL MetOH	0.10
		D-3	400µl/5mL MetOH	0.16
		D-4	550µl/5mL MetOH	0.22
		D-5	700µl/5mL MetOH	0.28

C) Preparación de las soluciones para solución FRAP:

- Cloruro férrico (FeCl_3) 1%: pesar 1 g de cloruro férrico y disolver con agua desmineralizada en un balón aforado de 100 mL.
- Ferrocianuro de potasio 1%: pesar 1 g de ferrocianuro de potasio y disolver con agua desmineralizada en un balón aforado de 100 mL.
- Buffer de acetato pH 3.6: Tomar 5.78 mL de ácido acético y disolverlo con agua desmineralizada en un balón de 500 mL. Pesar 2.72 g acetato de sodio y disolver con agua desmineralizada en un balón aforado de 100 mL. En un balón aforado de 500 mL disolver las soluciones de la siguiente manera:

Solución de ácido acético	231.5 mL
Solución de acetato de sodio	18.5 mL
Agua desmineralizada	250 mL

D) Solución FRAP: mezclar 1.5 mL de FeCl_3 1%, 1 mL de ferrocianuro de potasio 1% y 15 mL de buffer de acetato pH 3.6. Agitar e incubar a 37°C durante 20 minutos.

E) Preparación de los estándares y muestras para ser analizados: mezclar 1 mL de cada estándar/muestra con 1 mL de ácido tricloroacético al 10% (10 g de ácido tricloroacético disuelto con agua desmineralizada en un balón aforado de 100 mL). Mezclar 10 segundos en el vortex y luego centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.

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

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

Pozo \ Reactivo	Estándar	Agua	Solución FRAP
Blanco de Ensayo	-----	50 μ L	100 μ L
Estándar	50 μ L	-----	100 μ L
Muestra	50 μ L	-----	100 μ L

Dejar reposar durante 60 minutos. Luego leer en el lector de placas ELISA a 630 nm. Si hubiera formación de precipitado, agitar en el vortex cuidadosamente.

7.7.6.4 Método ABTS por espectrofotometría UV-Visible:

- A) Preparación de la solución madre: pesar 0.1 g de extracto seco y agregar 5 mL de metanol absoluto, luego introducirlo en el sonificador durante 30 minutos para obtener la solución madre. De esta solución madre preparar las diluciones que en el método de DPPH por espectrofotometría UV-visible presentaron un porcentaje de inhibición entre 60-70% con un r^2 0.97-0.99.
- B) Preparación de la solución 2,2'azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolin 6-ásulfónico) (ABTS⁺) 7 mM en agua: pesar 38.41 mg y disolver en 10 mL de agua desmineralizada.
- C) Preparación de persulfato de potasio 2.45 mM en agua: Pesar 3.31 mg y disolver en 5 mL de agua desmineralizada.
- D) Preparación del catión ABTS⁺: se produce por la reacción de la solución stock de ABTS con el persulfato de potasio en una proporción 2:1. Dejar la mezcla en un

lugar oscuro al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso. Se prepara un día antes de realizar la prueba.

- E) Preparación de la solución de uso: la solución ABTS⁺ es diluida con etanol hasta lograr una absorbancia 0.70 ± 0.02 a 734 nm y equilibrado a 30°C. Se emplea una solución 1/30 a 1/35 para obtener dicha absorbancia.
- F) Preparación de los tubos de reacción: utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 mL. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger de la luz la reacción. Preparar una serie de tubos que contengan los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Control	Ensayo
Solución ABTS ⁺	3 mL	3 mL
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 ABTS como la muestra deben haber estado en la incubadora a 30°C mínimo 30 minutos antes de mezclarlos.

- G) La lectura de la absorbancia se toma a 30°C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis.

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

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

Luego con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de cada dilución se elabora una gráfica lineal; esperando que valores de porcentaje de inhibición se encuentren entre el 60-70%. La ecuación de la recta debe tener un r^2 entre 0.97-0.99, para que la corrida sea aceptada. Si no se cumple con un porcentaje de inhibición ente 60-70% y un r^2 entre 0.97-0.99, repetir el ensayo preparando otras diluciones (si la muestra está muy concentrada) y controlando el pipeteo para mejorar el r^2 .

Ya con una buena ecuación de regresión lineal determinar la concentración inhibitoria media, según la siguiente formula:

$$IC50 = \frac{50 \% - \text{pendiente}}{\text{Intersecto}}$$

7.7.7 Evaluación de la actividad inhibidora de ureasa por CCF con rojo de fenol

- A) Preparación de muestra y control: Disolver 20mg de extracto en 1mL de metanol. Preparar el control TBHQ 1%.
- B) Preparación de reactivos: Tampón fosfato de potasio se disuelve, 2.72 mg de KH_2PO_4 al 0.20M con agua desmineralizada, aforar a 100mL, luego tomar 62.50mL de esta solución y agregar 31mL de NaOH al 0.10M y aforar a 250mL con agua desmineralizada.
- C) Preparación de la enzima: pesar 120 mg de ureasa y disolver en 15 mL de agua desmineralizada.
- D) Preparación de la solución de urea: Disolver 0.19 g de urea en 50mL de tampón de fosfatos para obtención de concentración 75mM.
- E) Preparación de la solución Disolver 0.03 g de rojo de fenol en 30mL solución tampón de fosfatos para obtener una concentración de 0.10%
- F) Para la fase móvil utilizar cloroformo: hexano en proporciones (25:25).
- G) Evaluación de la actividad:
 - Saturar cámara cromatográfica con la fase móvil 20min antes de someter las placas.
 - En la placa de sílica gel colocar 10 μ L de muestras y 5 μ L de compuesto control.
 - Dejar secar al aire las placas.
 - Colocar la placa en la cámara y dejar eluir.
 - Remover la placa de la cámara, dejar secar.
 - Rociar con urea (75mM/mL).
 - Incubar a 25°C por 2h.
 - Rociar la placa con ureasa (40U/mL) e incubar a 25°C por 1h.

- Rociar con rojo de fenol al 0.10% y secar
- Observar la coloración roja en la placa y zonas claras en donde se dio la inhibición de la enzima, con luz UV.

7.7.8 Diseño de la investigación

La investigación se realizó en 4 extractos de mangle botoncillo (*Conocarpus erectus*): diclorometano, hexánico, de acetato de etilo y etanólico.

7.7.8.1 Actividad Antioxidante

La comprobación de la actividad antioxidante se realizó por medio de 3 métodos de reducción de DPPH, FRAP y ABTS, en los cuales para los métodos DPPH y ABTS se obtuvo la misma respuesta, la cual fue determinar la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) que reduce al 50% la absorbancia de los radicales ABTS y DPPH utilizando espectrofotometría UV-Visible. Para el método de FRAP se determinó los moles de diferentes estándares presentes en los extractos capaces de reducir el ion Fe³⁺ a Fe²⁺.

Previo a la realización de la evaluación se realizó un Ensayo- Error que consistió en evaluar una concentración crítica que permitirá determinar si hay o no actividad antioxidante.

El número de réplica de cada técnica con sus diluciones establecidas fue de triplicado por cada dilución.

El análisis de resultados se realizó por medio de un diagrama de dispersión para determinar el comportamiento de los datos, utilizando todos los datos, es decir que no se promediaran los resultados obtenidos.

Además, se realizó un análisis de regresión lineal para establecer el comportamiento de los datos, con el fin de establecer la ecuación que describa dicho comportamiento. Se evaluará la regresión por medio del coeficiente de determinación (r^2), el cual debe ser preferiblemente lo más cercano a 1 para tomar como válida la curva realizada, de lo contrario se deberá realizar nuevamente el ensayo, hasta obtener un valor de r^2 adecuado y además se realizará una prueba de hipótesis o significancia (análisis de

varianza para regresión). Las ecuaciones que dan regresiones significativas servirán para calcular la CI_{50} . Se debe poseer un intervalo de confianza del 95%.

7.7.8.2 Actividad Antiureasa

La evaluación cualitativa de la actividad antiureasa se realizó determinando en los extractos 1) si hay actividad y 2) no hay actividad.

Se realizaron tres réplicas por cada extracto. Se evaluaron por medio de la prueba de hipótesis binomial a un nivel de significancia de 0.05 (alfa).

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

Ho: $p=0.50$ que significa NO HAY ACTIVIDAD

Ha: $p>0.50$ que significa SI HAY ACTIVIDAD

Para rechazar Ho se requería que las tres réplicas de cada ensayo demostraran actividad antiureasa.

8. RESULTADOS

8.1 Tabla No. 1 Porcentajes de rendimiento de los extractos corteza y hojas: En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de rendimiento de los extractos obtenidos, observando que el extracto etanólico presento el mayor porcentaje de rendimiento.

Extracto	1ra repetición		2da repetición	
	CORTEZA	HOJAS	CORTEZA	HOJAS
Hexano	0.7 %	1.3 %	0.6 %	1.1 %
Diclorometano	0.4 %	0.6 %	0.5 %	0.6 %
Acetato de etilo	0.2 %	0.3 %	0.2 %	0.2 %
Etanol 70%	21.8%	11.6 %	---	----

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

8.2 Tabla No. 2 Actividad antioxidante cualitativa por cromatografía en capa fina: En la siguiente tabla se muestran los extractos que presentan actividad antioxidante, observando que todos presentan dicha actividad. Se muestran también los resultados de los estándares comparados.

Extracto/estándar	Corteza	Hojas
Hexano	±	+
Diclorometano	+	+
Acetato de etilo	+	+
Etanol 70%	+	+
Ácido clorgénico	+	+
Trolox	+	+
Vitamina c	+	+
Rutina	+	+
TBHQ	+	+

Fase móvil: Cloroformo: Acetato de Etilo (30:20). Revelador: Solución DPPH (1mg/mL)

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC. Interpretación: (- no presenta actividad), (± presenta moderada actividad), (+ presenta actividad).

8.3 Tabla No. 3 Actividad antioxidante cuantitativa por el método micrométrico DPPH y el método macrométrico ABTS: En la siguiente tabla se muestra la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de los extractos por el método DPPH y ABTS, observándose que el extracto etanólico el que presenta mayor actividad y el extracto hexánico el que menor actividad presenta.

Extracto	Método DPPH CI_{50} (mg/ml)		Método ABTS CI_{50} (mg/ml)	
	Corteza	Hojas	Corteza	Hojas
Hexano	>20	20.75 ± 1.80	>20	36.27 ± 2.15
Diclorometano	2.96 ± 0.04	8.96 ± 0.12	4.56 ± 0.13	11.35 ± 0.21
Acetato de etilo	0.52 ± 0.01	1.88 ± 0.02	1.13 ± 0.01	3.95 ± 0.21
Etanol 70%	0.26 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.49 ± 0.01

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

8.4 Tabla No. 4 Actividad antioxidante cuantitativa de los estándares por el método DPPH micrométrico y el método ABTS macrométrico: En la siguiente tabla se muestra la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de los estándares utilizados para la comparación con los extractos analizados.

Estándar	Método DPPH CI_{50} (mg/mL)	Método ABTS CI_{50} (mg/mL)
Vitamina c	0.09 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Trolox	0.12 ± 0.00	0.30 ± 0.00
TBHQ	0.12 ± 0.00	0.19 ± 0.01
Rutina	0.17 ± 0.01	0.85 ± 0.04
Quercetina	0.07 ± 0.00	0.10 ± 0.00

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

8.5 Tabla No. 5 Actividad antioxidante cuantitativa por el método FRAP micrométrico: En la siguiente tabla se muestran los moles de estándar presentes en cada extracto que son capaces de reducir el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} , observándose que el extracto etanólico es el que presenta mayor actividad.

Extracto	MOLES VITAMINA C		MOLES RUTINA		MOLES QUERCETINA		MOLES TROLOX	
	Corteza	Hoja	Corteza	Hoja	Corteza	Hoja	Corteza	Hoja
Hexano	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Diclorometano	0.13 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.21 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.03 ± 0.00
Acetato de etilo	0.44 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.72 ± 0.02	0.15 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.51 ± 0.03	0.10 ± 0.01
Etanol	1.09 ± 0.02	0.53 ± 0.00	1.80 ± 0.05	0.87 ± 0.02	0.31 ± 0.00	0.14 ± 0.00	1.27 ± 0.07	0.62 ± 0.03

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

8.6 Tabla No. 6 Actividad antiureasa cualitativa por cromatografía en capa fina: En la siguiente tabla se muestran los extractos que presentan actividad antiureasa, observándose que solamente los extractos etanólicos no presentan dicha actividad.

Extracto	Corteza	Hojas
Hexano	+	+
Diclorometano	+	+
Acetato de etilo	+	+
Etanol 70%	-	-
TBHQ	+	+

Fase móvil: Cloroformo: Hexano (25:25). Revelador: Solución Rojo de Fenol. Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales - LIPRONAT-, USAC. Interpretación: (- no presenta actividad), (\pm presenta moderada actividad), (+ presenta actividad).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se realizó la extracción fraccionada de hojas y corteza de mangle botoncillo, esto para determinar que fracción es la que presenta mayor actividad de las pruebas que se realizaron en este estudio. Se determinó el porcentaje de rendimiento de cada uno de los extractos. Se utilizaron cuatro solventes para la extracción los cuales fueron hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol. Para determinar la concentración del alcohol que se iba a utilizar fue necesario realizar la prueba del mejor solvente, en donde se experimentó con concentraciones al 30%, 50%, 70%, 90% y 95% de alcohol etílico, donde el alcohol al 70% fue el que mayor porcentaje de rendimiento obtuvo por lo que consideró la concentración que mayor cantidad de metabolitos secundarios es capaz de extraer, por lo que es el ideal para la extracción.

En la tabla No.1 de los resultados se puede observar que el extracto etanólico es el que mayor porcentaje de rendimiento presentó, mientras que el extracto de acetato de etilo fue el menor. Ambos resultados se observan en los dos órganos de la planta que se estudiaron, es decir en las hojas y la corteza. El mayor porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos evidencia que los órganos estudiados presentan mayor cantidad de metabolitos polares, en comparación con los otros extractos en los que se utilizó solventes de menor polaridad que no rindieron de la misma manera, por lo que se puede considerar que presentan menor cantidad de metabolitos apolares. Esto se relaciona con la característica de que los metabolitos polares son afines a solventes polares, y los metabolitos apolares son afines a solventes apolares. También se puede observar en la tabla No. 1 que fue necesario una segunda extracción debido a que el porcentaje de rendimiento de los extractos hexánico, diclorometano y acetato de etilo no pasaba del 1% de rendimiento, lo que podía causar que no se contaran con suficiente extracto para realizar las diferentes pruebas del estudio.

La primera prueba que se realizó a los extractos fue la comprobación de la actividad antioxidante. Cualitativamente se determinó por cromatografía en capa fina, utilizando como revelador una solución del radical DPPH. La molécula 1,1-difenil-2-picril- hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza,

como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. En esta prueba se espera que al momento de rociar la solución de DPPH los extractos sembrados en la cromatoplaquea sean capaces de reducir al radical produciendo la decoloración del fondo morado a manchas de un color amarillo, si estos presentan actividad antioxidante. Es necesario contar para dicha prueba con estándares que ya sean reconocidos por ser compuestos que poseen una buena actividad antioxidante, esto para poder respaldar que los extractos si poseen dicha actividad. Como se puede observar en el anexo No. 2, la cromatoplaquea presenta un fondo de color morado y manchas amarillas en los estándares y extractos que poseen actividad antioxidante. En la tabla No. 2 se muestran los resultados de dicha cromatoplaquea en donde se puede observar que todos los extractos de las hojas poseen actividad antioxidante, siendo el extracto etanólico quien presenta mayor decoloración por que se presume que posee mayor actividad antioxidante y el extracto hexánico el que menos logró reducir al radical, siendo el que menor actividad antioxidante posee. Así mismo, en los extractos de la corteza, es el extracto etanólico el que presenta mayor actividad y el extracto hexánico posee muy poca. Los estándares utilizados en dicha prueba presentan manchas muy evidentes y características de cada uno.

De acuerdo a los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina se procedió a determinar cuantitativamente la actividad antioxidante de los extractos que presentaron actividad de forma cualitativa. El resultado se presenta como la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}), es decir la concentración que debe poseer el extracto para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. En la tabla No. 3 se pueden observar los resultados obtenidos, esta determinación se realizó por medio de espectrofotometría UV visible, cuantificando en un lector de placa ELISA la absorbancia que genera cada extracto a diferentes concentraciones al interactuar con el radical. Se puede observar que en ambos órganos de la planta es el extracto etanólico el que presenta un menor CI_{50} , lo que significa que posee mayor capacidad antioxidante ya que necesita una concentración menor para lograr disminuir la actividad del radical. Se estableció que a medida que aumenta la polaridad del solvente así mismo va decreciendo la actividad antioxidante de

los extractos, por lo que se puede concluir que son los metabolitos secundarios con características polares los que se encargan en su mayoría de la actividad antioxidante de la planta. Dichos resultados se observan tanto en el método del radical DPPH como en el radical ABTS, respaldando los resultados obtenidos. En el método del radical ABTS también se cuantificó la decoloración del radical $ABTS^+$, debido a la interacción con compuestos presentes en los extractos donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico $ABTS^+$ es un cromóforo que se generó por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. También se logró determinar que comparando los CI_{50} entre ambos órganos, son los extractos de la corteza los que presenta una mejor actividad antioxidante en comparación con extractos de las hojas, ya que su CI_{50} es menor. No se pudo determinar cuantitativamente la actividad antioxidante del extracto hexánico de la corteza, ya que al momento de realizar el ensayo con la solución madre de 20 mg/mL no se obtuvo resultados que presentaran linealidad, por lo que se puede concluir que es necesario realizar el ensayo con una concentración mayor, lo cual demuestra que no hay actividad significativa.

Como se mencionó anteriormente es necesario comparar los resultados obtenidos con estándares establecidos para poder respaldar los resultados. De forma cuantitativa se analizaron los estándares de la tabla No. 4, observando que los valores de CI_{50} son mucho menores que los obtenidos en los extractos de mangle botoncillo analizados, por lo tanto, se puede concluir que los extractos no podrían sustituir a los estándares comerciales ya que estos poseen mejor capacidad antioxidante. La cuantificación de la actividad antioxidante de los estándares se realizó tanto por el método del radical DPPH como por el radical ABTS obteniendo la misma conclusión.

En estudios realizados en Taif, Arabia Saudita, se había establecido la actividad antioxidante de esta especie por medio del método del radical libre DPPH, siendo el extracto de acetato de etilo de las hojas el único resultado que puede ser comparable con esta investigación. Se logró determinar que la especie proveniente de la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Santa Rosa, también poseen actividad antioxidante, aunque

esta es menor a la determinada en Taif, Arabia Saudita, ya que esa especie presentó menor CI_{50} expresada en $\mu\text{g/mL}$, como se puede observar en el anexo No. 26.

Para complementar los resultados de actividad antioxidante se implementó el método del poder reductor del hierro (FRAP). El análisis de FRAP se utiliza para medir la actividad antioxidante total y se basa en la capacidad principalmente de los polifenoles, para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Este método modificado para su uso en microplacas de 96 pozos da una reproducibilidad mejor y un rendimiento de procesamiento más alto de muestras. El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}); formando un complejo azul. Una absorción a una longitud de onda cercana a 700 nm indica un poder de reducción alto del fitoquímico, es decir una actividad antioxidante alta (Roginsky y Lissi, 2005). De acuerdo a los resultados de la prueba FRAP realizada a los extractos de *Conocarpus erectus* que se observan en la tabla 5, podemos establecer que los extractos más activos son el etanólico y de acetato de etilo, el extracto menos activo fue el de hexano. El resultado se presenta como los moles de cuatro estándares conocidos y comercializados por su capacidad antioxidante, presentes en extractos analizados a partir de una solución madre de 20 mg/mL, y que son capaces de reducir el hierro de Fe^{3+} a Fe^{2+} . El extracto etanólico demostró mayor capacidad para realizar el poder reductor ya que presenta mayor concentración del estándar en los extractos, aumentando su actividad, y esa concentración disminuye a medida que la polaridad también disminuye. Esto, posiblemente se puede atribuir, entre otras cosas, a que el método implica la determinación del poder reductor del extracto bajo condiciones hidrofílicas, consecuentemente, se presentó una solubilización limitada de los metabolitos presentes en los extractos menos polares, además que los extractos polares contienen los polifenoles que contribuyen a que estos posean mayor poder reductor. Todos extractos de *Conocarpus erectus*, presentan poder reductor, ya que todos formaron un complejo azul, el cual se puede observar en el anexo No. 32, lo conlleva finalmente a decir que los extractos tienen actividad antioxidante.

Como se mencionó en los antecedentes de esta investigación, el *Conocarpus erectus* posee taninos como ácido elágico, vescalagina y castalagina. También posee flavonoides y fenoles como ácido gálico, catequinas, apigenina, quercetina, quercetina-3-O- glucósido,

kaemferol-3-O-glucosido, rutina y quercetina-3-O-glucosido-ácido gálico y lignanos. Se puede observar en el anexo No. 27 la clasificación los metabolitos secundarios de acuerdo al solvente utilizado para su extracción. Los flavonoides, taninos y fenoles son metabolitos secundarios afines a solventes polares, probablemente esta es la razón por la cual los extractos etanólicos presentan mayor actividad antioxidante, ya que esta actividad se les atribuye debido a la combinación de sus propiedades quelantes del hierro y secuestradoras de radicales libres.

Como parte del estudio también se evaluó la actividad antiureasa. Como se puede observar en la tabla No. 6 los extractos que presentaron actividad contra la enzima ureasa fueron el extracto hexánico, diclorometano y acetato de etilo. Esta prueba se realizó únicamente de forma cualitativa por medio de cromatografía en capa fina. La cromatografía en capa fina para la determinación de la inhibición de la enzima ureasa, se fundamenta en la separación de compuestos, estos se hicieron reaccionar con el uso del sustrato (urea) y enzima (ureasa), utilizando como contraste rojo de fenol, que le dio un color naranja a la cromatoplaque, evidenciando las zonas claras con luz UV, en los puntos en donde se presentan compuestos activos del extracto en estudio, como se observa en el anexo No.25. En los sitios claros se evidencia la inhibición de la enzima ureasa, por la presencia de compuestos capaces de unirse a los átomos de níquel presentes en el sitio activo de la enzima, formando un complejo, evitando así la hidrólisis de la urea. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos determinar que son principalmente los metabolitos secundarios con características apolares quienes se encargan de la actividad antiureasa, ya que fueron los extractos apolares los que presentaron zonas más claras y de mayor tamaño en la cromatoplaque que los observados en extractos con características polares como es el extracto de acetato de etilo. Se determinó que el extracto etanólico no presentó actividad contra esta enzima. Dentro de los posibles metabolitos secundarios responsables de esta actividad pueden mencionarse cumarinas, esteroides, ácidos grasos o alcaloides, sin embargo, es necesario realizar un tamizaje fitoquímico de esta especie para determinar si posee dichos metabolitos secundarios. Para la prueba se utilizó como control una solución de terc-butil hidroxiquinona (TBHQ) al 1%, esto debido a que en investigaciones realizadas previamente se ha determinado que los inhibidores de ureasa se clasifican ampliamente en dos clases que son los compuestos metal-orgánicos y

compuestos orgánicos, tales como ácido acetohidroxámico, ácido húmico y benzoquinona. Los estudios cinéticos de las quinonas han demostrado que son inhibidores no competitivos de la ureasa (Pearson, 1997; Zaborska, 2004).

10. CONCLUSIONES

- 10.1** Se comprobó la actividad antioxidante en todos los extractos de hojas y corteza de *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) procedente de la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Santa Rosa.
- 10.2** Se evidencio la actividad antiureasa en los extractos hexánico, diclorometano y acetato de etilo de hojas y corteza de *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) procedente de la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Santa Rosa.
- 10.3** Se determinó que los extractos etanólicos de hojas y corteza de *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) presentan un Cl_{50} menor al resto de los otros extractos por lo que se considera que poseen mayor capacidad antioxidante debido a sus metabolitos polares, mientras que los extractos hexánicos de hojas y corteza presentan mayor Cl_{50} por lo que poseen menor capacidad antioxidante.
- 10.4** Se estableció que los extractos de corteza de *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) presentan un Cl_{50} menor en comparación a los extractos de las hojas por lo que se considera que la corteza posee mayor capacidad antioxidante.
- 10.5** El extracto etanólico presento mayor capacidad de poder reducir el hierro de Fe^{3+} a Fe^{2+} , ya que se determinó mayor concentración de los estándares en los extractos, aumentando su actividad antioxidante, y esa concentración y actividad disminuye a medida que la polaridad también disminuye.
- 10.6** Todos los extractos de *Conocarpus erectus* L. presentan poder reductor ya que lograron formar un complejo azul que evidencia la reducción el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}) característico del poder reductor de un antioxidante.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Se recomienda evaluar la actividad antiureasa cuantitativamente para determinar el CI_{50} de cada extracto.
- 11.2 Se recomienda continuar con estudios de actividad inhibitoria de tirosinasa, inhibitoria de ureasa y antioxidante en otras especies de mangle para comparar los resultados obtenidos.
- 11.3 Se recomienda evaluar otras partes de la planta para determinar si presentan actividad inhibitoria de tirosinasa, inhibitoria de ureasa y antioxidante y si existe diferencia en cuanto a su actividad.
- 11.4 Se recomienda realizar un tamizaje fitoquímico de la especie de *Conocarpus erectus* L. para establecer los metabolitos secundarios presentes en la especie proveniente de la Reserva de Usos Múltiples de Monterrico, Santa Rosa, a los que se les atribuye sus actividades biológicas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Hameed, E. *et al.* (2012). *Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of Conocarpus erectus L. growing in Talf, Saudi Arabia.* European Journal of Medicinal Plants. 2(2): 93-112, 2012.

Abdel-Hameed, E. *et al.* (2013). *Protective Effect of Conocarpus erectus Extracts on CCl₄-Induced Chronic Liver Injury in Mice.* Global Journal of Pharmacology 7 (1): 52-60, 2013.

Almeda, H. *et al.* (2014). *Actividad antiureasa, antitirosinasa y antioxidante de especies nativas del género Piper con potencial aplicación en medicina, cosmética y conservación de alimentos.* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala.

Bashir, M. Usair, M. Chaundhry, B. (2015). *A review of phytochemical and biological studies on Conocarpus erectus (Combretaceae).* Pakistan Journal of Pharmaceutical Research. 1(1).

Baurin, N. *et al.* (2002). *Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity.* Journal of Ethnopharmacology, 82 (1), 155- 158.

Casañola, G. *et al.* (2007). *Dragon method for finding novel tyrosinase inhibitors: Biosilico identification an experimental in vitro assays.* European Journal of Medicinal Chemistry, 42 (1), 1370-1381.

Chávez, F. *et al.* (2011). *Los polifenoles antioxidantes extraídos de epicarpio del palta (Persea americana var, Hass) inhiben la ureasa de Helicobacter pylori.* Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 10(3), 265- 280.

Chiari, M. *et al.* (2010). *Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: isolation of an active principle from Lithrea molleoides.* Food Chemistry, 120 (1). 10- 14

Curto, E., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glantt, H., Santis, C., Virador, V. & Dooley, T. (1999). *Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors*. *Biochemical Pharmacology*, 57(1), 663-672.

Díaz, N. *et al.* (2012). *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Universidad de Córdoba. España. Pág. 1.

Félix, Y. (2008). *Asociación del consumo de fruta con la capacidad antioxidante en estudiantes universitarios*. Tesis para optar al título de Licenciado en Nutrición. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. Págs. 22-24

Fürst, P. (1998). *The role of antioxidants in nutritional support*. *Clinical Nutrition*. Págs. 4, 5.

García, A.; Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de las plantas*. España Universidad Complutense de Madrid. Págs. 119-145.

Instituto Nacional de Bosques. (2011). *Boletín informativo: Manglares de Guatemala*. Guatemala.

Kim, Y. *et al.* (2002). *Oxyresveratrol and hidroxystilbene compounds, inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (18), 16340- 16344

Kuklinski, C. (2000). *Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega. Págs. 114-119

Lin, Y. *et al.* (2007). *Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes*. *Phytochemistry*, 68 (1), 1189-1199.

Little, E. (2001). *Árboles comunes de Puerto Rico e Islas Vírgenes*. Puerto Rico: Editorial de la Universidad de Puerto Rico. Págs. 481, 482.

Lock, O. (1988). *Investigación Fitoquímica*. (2da Edición). Perú: Universidad Pontificia Católica. Pág. 33.

- Martínez, J. (2007). "Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *heliocarpus terebinthinaceus*". Tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad tecnológica de la mixteca. México. Págs. 23-24
- Mera, V. (1999). *Género, manglar y subsistencia*. Editorial Abya Yala. Ecuador. Págs. 47,48.
- Momtaz, S., Mapunya, B., Houghton, P., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S. & Lall, N. (2008). *Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of Sideroxylon inerme L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. Journal of Ethnopharmacology, 119*, 507-512.
- Moreno, P.; Peresbarbosa, E.; Travieso, A. (2006). *Estrategias para el manejo integral de la zona costera: un enfoque municipal*. Instituto de Ecología A.C. - Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, SEMARNAT. México. Volumen I. Sección III.
- Paulo, L. et al. (2011). *Anti-Helicobacter pylori and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine*. Food Research International, 44(1). 964- 969
- Pearson, M.A., Michel, L.O., Hausinger, R.P., Karplus, P.A. (1997). *Structures of Cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited Klebsiella aerogenes urease*. Biochemistry, Vol 36, pp 8164-8172.
- Rodríguez, M.; Vázquez, A. (2007). *Los manglares: conocimiento e importancia. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad*. México. Págs. 19, 25-28.
- Roginsky, V.; Lissi, E. (2005). *Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food*. Food Chemistry 92, pp. 235-254.
- Santa C, L. (1986). *Manual Selección Fitoquímica: Guía práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica*. Guatemala: USAC. Págs. 13-16, 27-29.
- Santizo, I. (2004). *Identificación de familias de metabolitos secundarios en Myrica cerífera*. Tesis de Pregrado. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Sharapin, N. (2000) *Fundamentos de la tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá: Cooperación Iberoamericana, Santa Fe de Bogotá. Págs. 205-208, 247.

Soares, J. *et al.* (1997). *Antioxidants activities of some extracts of thymus Zygis*. Free Rad. Págs. 469-478

Suhaj, M. (2006). *Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review*. Slovakia: Journal of food composition an analysis. Págs. 531-537.

Vila, R.; Reig, M. (2003). *Métodos de Control de Calidad*. Manaus: UB virtual Imicromat. Pág. 39

Vincent, P. (1981). *El cuerpo Humano. Excreción: Hígado y riñones*. Madrid: Editorial Reverte. Págs. 250- 294.

Wagner, H.; Blandt, S.; Zgainski E. (1984). *Plant Drug Analysis a thin layer chromatography atlas*. Berlin Heidelberg New York Tokyo. Págs. 299-301.

WHO. (1998). *Quality control methods for medical plant materials*. Geneva: WHO. Pág. 115

Zamora, N.; González J.; Poveda, L. J. (1999). *Árboles y Arbustos del Bosque Seco de Costa Rica*. Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica.

Zaborska, W., Krajewska, B., Olech, Z., (2004). *Heavy metal ions inhibition of jack vean urease: potential for rapid contaminant probing*, J. Enzym. Inhib. Med. Chem. Vol 19, No. 1, pp 65-69.

Zhiyong L. *et al.* (1969). *Seasonal variation of vitamin C and rutin contents in Lycium chinese leaves*. Págs. 18, 27-30.

13. ANEXOS

13.1 Anexo No.1: Imágenes de los principales órganos del *Conocarpus erectus* L.

CORTEZA

(Vásquez, L...; 2007)



HOJAS

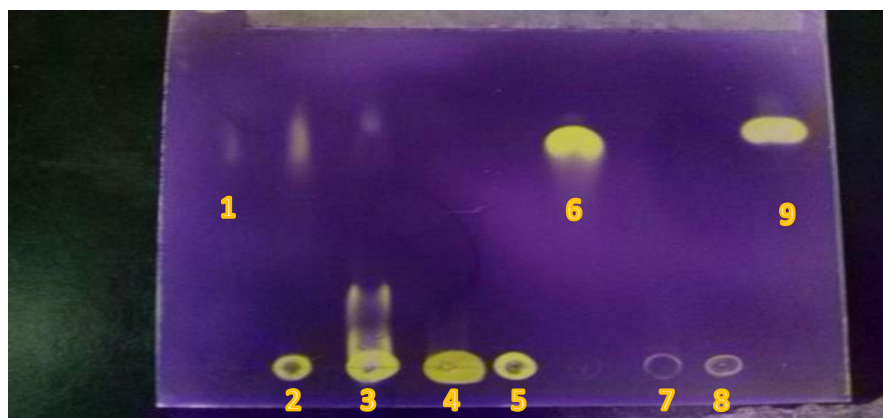
(Vásquez, L...; 2007)



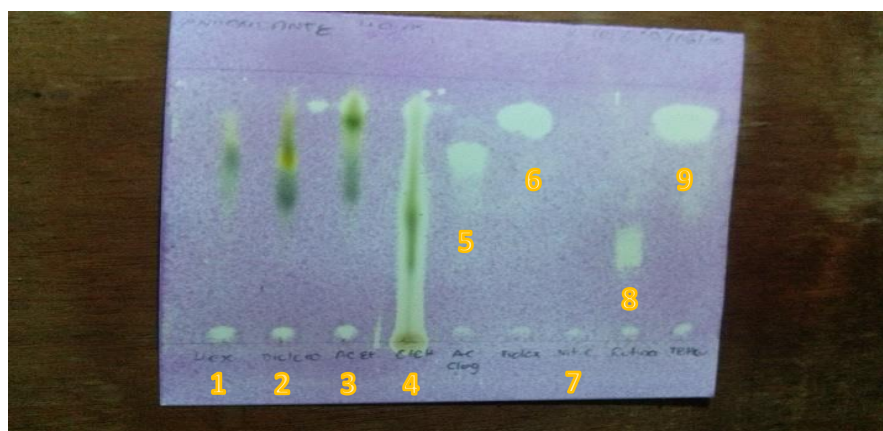
FRUTO

(Vásquez, L...; 2007)

- 13.2 Anexo No. 2: Cromatoplasmas que demuestran la actividad antioxidante cualitativa por cromatografía en capa fina: En las siguientes imágenes se observa los extractos de mangle botoncillo (corteza y hoja), y los estándares que presentaron actividad antioxidante. Se observa una coloración amarilla/blanca sobre un fondo morado que demuestra la actividad de todos, siendo observado en visible.



CORTEZA



HOJAS

Fase Móvil: Cloroformo: Acetato de Etilo (30:20). Para ambas cromatoplasmas (extractos de corteza y hojas) se sembró de la siguiente manera:

Muestra 1: Extracto de Hexano

Muestra 6: Estándar de TROLOX

Muestra 2: Extracto de Diclorometano

Muestra 7: Estándar de Vitamina C

Muestra 3: Extracto de Acetato de Etilo

Muestra 8: Estándar de Rutina

Muestra 4: Extracto de Etanol 70%

Muestra 9: Estándar de TBHQ

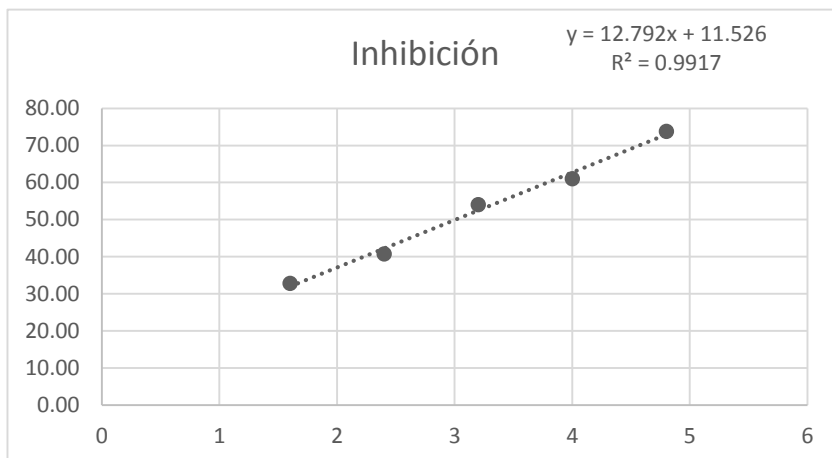
Muestra 5: Estándar de Ácido Clorgénico

13.3 Anexo No.3: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método DPPH micrométrico en corteza, del extracto de diclorometano: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de diclorometano que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en lector de placas ELISA, a una longitud de onda de 490 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

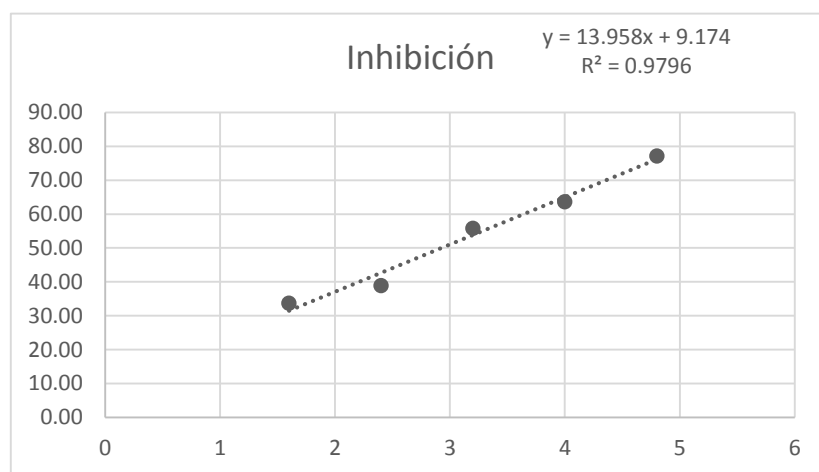
Muestra	Abs. Blanco	Absorbancia	Diferencia	% Inhibición	CI ₅₀	Promedio	Des. Est.	Conc (mg/ml)
Control	0.039	1.068	1.029					
D1	0.063	0.755	0.692	32.75				1.6
20µL/250µL		0.745	0.682	33.72				
		0.751	0.688	33.14				
D2	0.069	0.679	0.610	40.72				2.4
30µL/250µL		0.698	0.629	38.87				
		0.709	0.640	37.80				
D3	0.091	0.564	0.473	54.03				3.2
40µL/250µL		0.546	0.455	55.78				
		0.57	0.479	53.45				
D4	0.101	0.502	0.401	61.03				4.0
50µL/250µL		0.475	0.374	63.65				
		0.422	0.321	68.80				
D5	0.134	0.404	0.270	73.76	3.0081			4.8
60µL/250µL		0.369	0.235	77.16	2.9249	2.9572	0.0446	
		0.383	0.249	75.80	2.9386			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

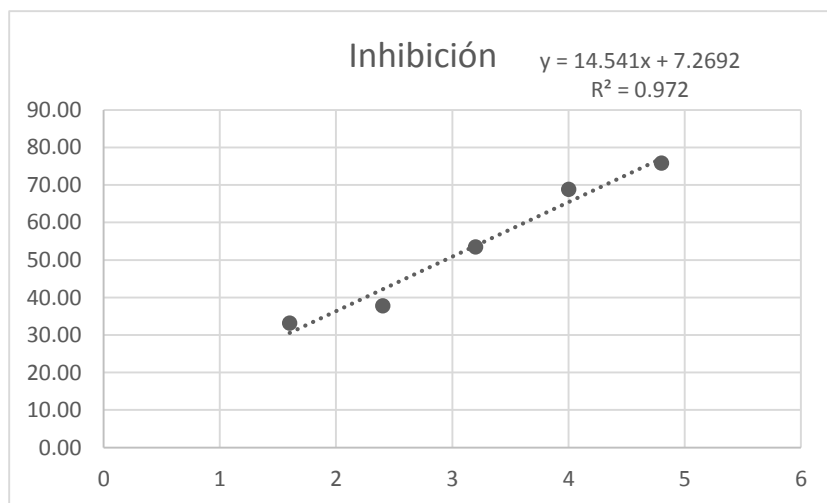
Concentración	Inhibición
1.6	32.75
2.4	40.72
3.2	54.03
4	61.03
4.8	73.76



Concentración	Inhibición
1.6	33.72
2.4	38.87
3.2	55.78
4	63.65
4.8	77.16



Concentración	Inhibición
1.6	33.14
2.4	37.80
3.2	53.45
4	68.80
4.8	75.80



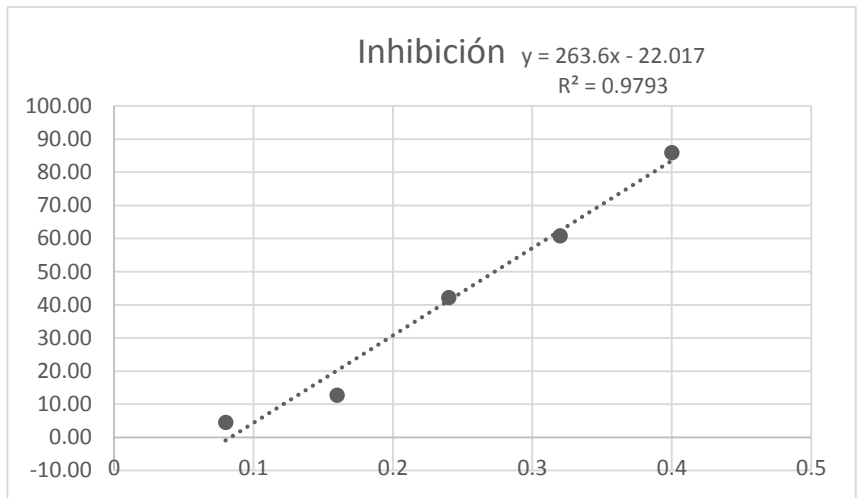
13.4 Anexo No.4: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método DPPH micrométrico en corteza, del extracto de etanol al 70%: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de etanol al 70% que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en lector de placas ELISA, a una longitud de onda de 490 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

Muestra	Abs. Blanco	Absorbancia	Diferencia	% Inhibición	CI ₅₀	Promedio	Des. Est.	Conc. (mg/ml)
Control	0.038	0.985	0.947					
D1	0.041	0.945	0.904	4.54				0.08
2μL/500μL		0.933	0.892	5.81				
		0.913	0.872	7.92				
D2	0.045	0.871	0.826	12.78				0.16
4μL/500μL		0.834	0.789	16.68				
		0.848	0.803	15.21				
D3	0.046	0.594	0.548	42.13				0.24
6μL/500μL		0.527	0.481	49.21				
		0.526	0.48	49.31				
D4	0.053	0.424	0.371	60.82				0.32
8μL/500μL		0.38	0.327	65.47				
		0.351	0.298	68.53				
D5	0.043	0.176	0.133	85.96	0.2732			0.40
10μL/500μL		0.173	0.13	86.27	0.2602	0.2636	0.0084	
		0.174	0.131	86.17	0.2574			

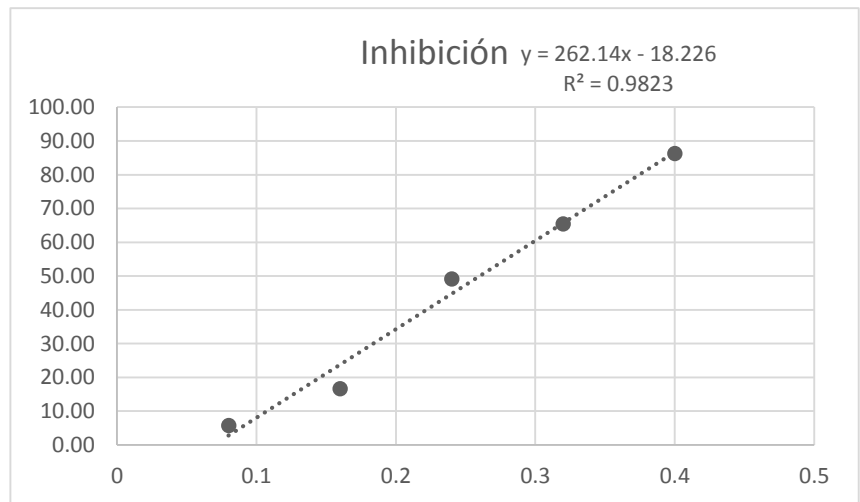
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos

Naturales -LIPRONAT-, USAC

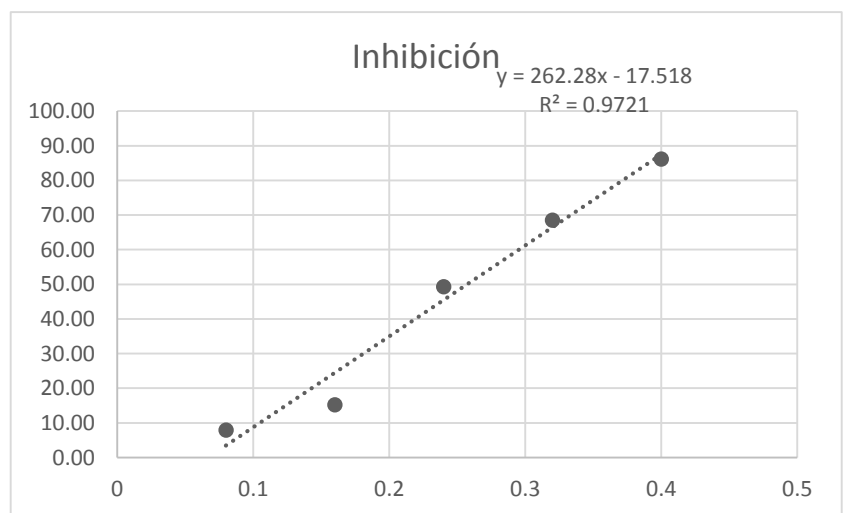
Concentración	Inhibición
0.08	4.54
0.16	12.78
0.24	42.13
0.32	60.82
0.4	85.96



Concentración	Inhibición
0.08	5.81
0.16	16.68
0.24	49.21
0.32	65.47
0.4	86.27



Concentración	Inhibición
0.08	7.92
0.16	15.21
0.24	49.31
0.32	68.53
0.4	86.17

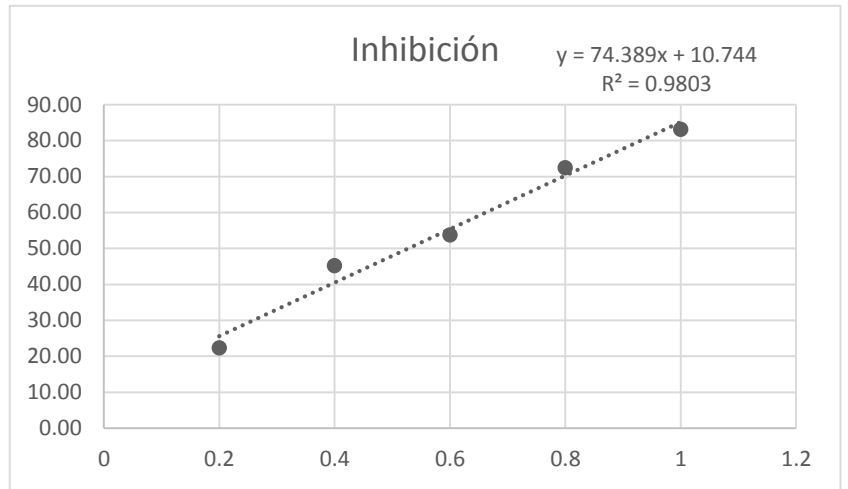


13.5 Anexo No.5: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método DPPH micrométrico en corteza, del extracto de acetato de etilo: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de acetato de etilo que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en lector de placas ELISA, a una longitud de onda de 490 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

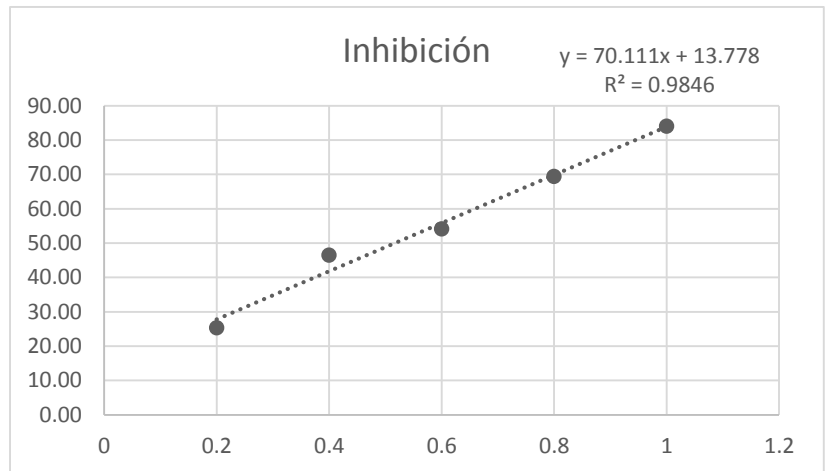
Muestra	Abs. Blanco	Absorbancia	Diferencia	% Inhibición	Cl ₅₀	Promedio	Desv. Est.	Conc (mg/ml)
Control	0.038	0.938	0.9					
D1	0.038	0.737	0.699	22.33				0.2
5μL/500μL		0.71	0.672	25.33				
		0.721	0.683	24.11				
D2	0.043	0.536	0.493	45.22				0.4
10μL/500μL		0.525	0.482	46.44				
		0.547	0.504	44.00				
D3	0.045	0.461	0.416	53.78				0.6
15μL/500μL		0.458	0.413	54.11				
		0.437	0.392	56.44				
D4	0.048	0.296	0.248	72.44				0.8
20μL/500μL		0.324	0.276	69.33				
		0.295	0.247	72.56				
D5	0.053	0.205	0.152	83.11	0.5277			1.0
25μL/500μL		0.197	0.144	84.00	0.5166	0.5203	0.0064	
		0.199	0.146	83.78	0.5165			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

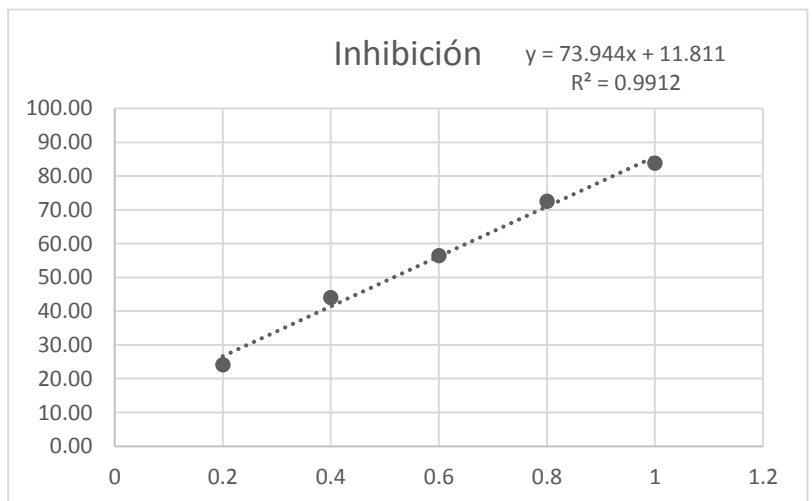
Concentración	Inhibición
0.2	22.33
0.4	45.22
0.6	53.78
0.8	72.44
1	83.11



Concentración	Inhibición
0.2	25.33
0.4	46.44
0.6	54.11
0.8	69.33
1	84



Concentración	Inhibición
0.2	24.11
0.4	44
0.6	56.44
0.8	72.56
1	83.78

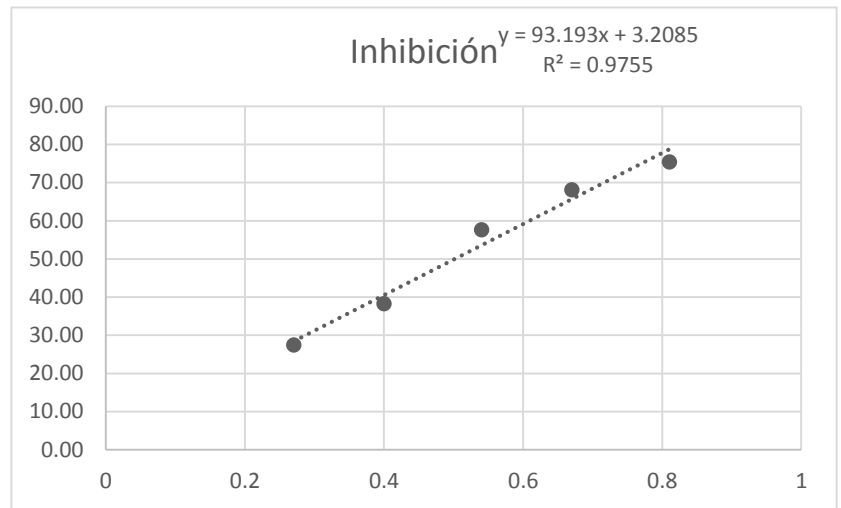


13.6 Anexo No.6: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método DPPH micrométrico en hoja, del extracto de etanol al 70%: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de etanol al 70% que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en lector de placas ELISA, a una longitud de onda de 490 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

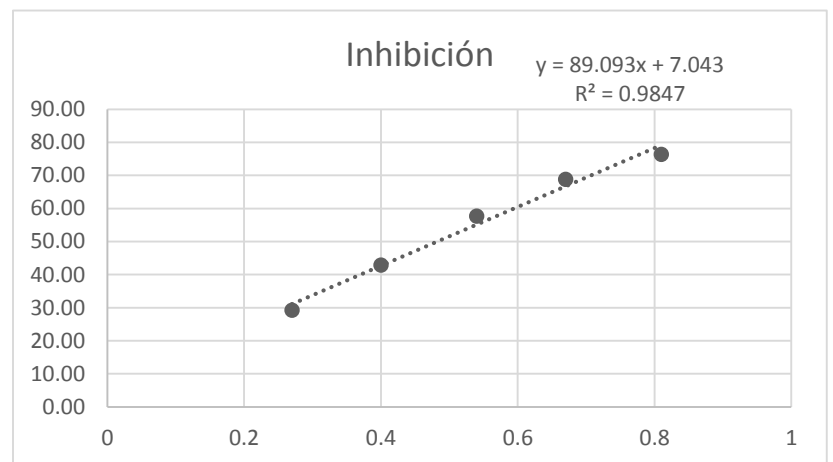
Muestra	Abs. Blanco	Absorbancia	Diferencia	% Inhibición	Cl ₅₀	Promedio	Des. Est.	Conc (mg/ml)
Control	0.04	1.047	1.007					
D1	0.043	0.774	0.731	27.41				0.27
20μL/1500μL		0.756	0.713	29.20				
		0.733	0.69	31.48				
D2	0.049	0.671	0.622	38.23				0.40
30μL/1500μL		0.625	0.576	42.80				
		0.633	0.584	42.01				
D3	0.045	0.472	0.427	57.60				0.54
40μL/1500μL		0.471	0.426	57.70				
		0.5	0.455	54.82				
D4	0.047	0.368	0.321	68.12				0.67
50μL/1500μL		0.361	0.314	68.82				
		0.395	0.348	65.44				
D5	0.048	0.296	0.248	75.37	0.5021		0.0105	0.81
60μL/1500μL		0.286	0.238	76.37	0.4822	0.4942		
		0.335	0.287	71.50	0.4982			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

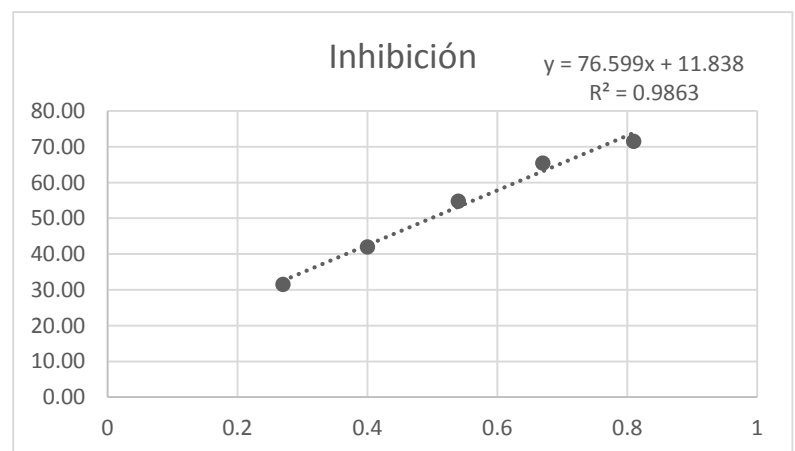
Concentración	Inhibición
0.27	27.41
0.4	38.23
0.54	57.6
0.67	68.12
0.81	75.37



Concentración	Inhibición
0.27	29.2
0.4	42.8
0.54	57.7
0.67	68.82
0.81	76.37



Concentración	Inhibición
0.27	31.48
0.4	42.01
0.54	54.82
0.67	65.44
0.81	71.5

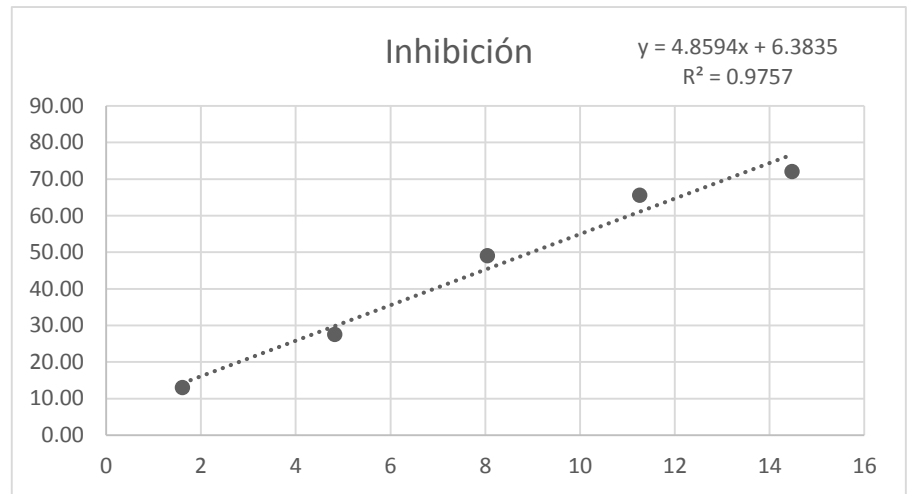


13.7 Anexo No.7: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método DPPH micrométrico en hoja, del extracto de diclorometano: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de diclorometano que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en lector de placas ELISA, a una longitud de onda de 490 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

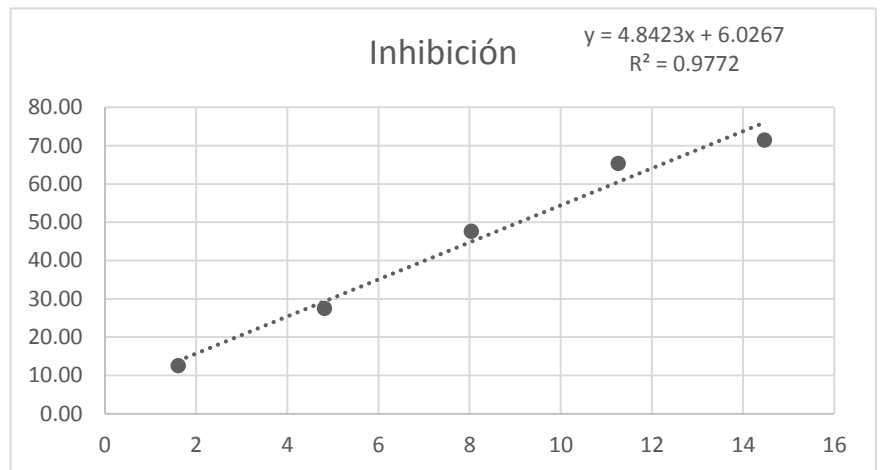
Muestra	Abs. Blanco	Absorbancia	Diferencia	% Inhibición	CI ₅₀	Promedio	Des. Est.	Conc (mg/ml)
Control	0.041	1.134	1.093					
D1	0.165	1.116	0.951	12.99				1.61
20µL/250µL		1.12	0.955	12.63				
		1.11	0.945	13.54				
D2	0.352	1.144	0.792	27.54				4.82
60µL/250µL		1.144	0.792	27.54				
		1.149	0.797	27.08				
D3	0.591	1.148	0.557	49.04				8.04
100µL/250µL		1.163	0.572	47.67				
		1.143	0.552	49.50				
D4	0.837	1.213	0.376	65.60				11.26
140µL/250µL		1.215	0.378	65.42				
		1.205	0.368	66.33				
D5	0.918	1.223	0.305	72.10	8.9757		0.1220	72.1
180µL/250µL		1.229	0.311	71.55	9.0811	8.9649		
		1.205	0.287	73.74	8.8379			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

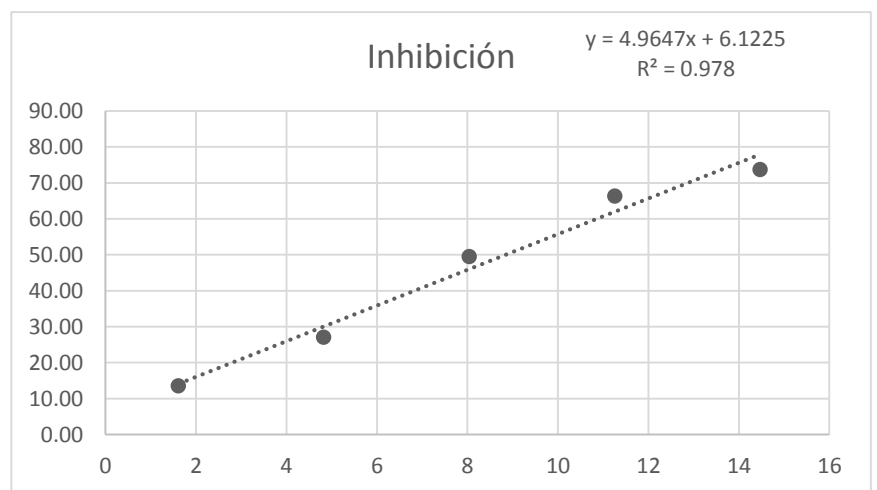
Concentración	Inhibición
1.61	12.99
4.82	27.54
8.04	49.04
11.26	65.6
14.47	72.1



Concentración	Inhibición
1.61	12.63
4.82	27.54
8.04	47.67
11.26	65.42
14.47	71.55



Concentración	Inhibición
1.61	13.54
4.82	27.08
8.04	49.5
11.26	66.33
14.47	73.74

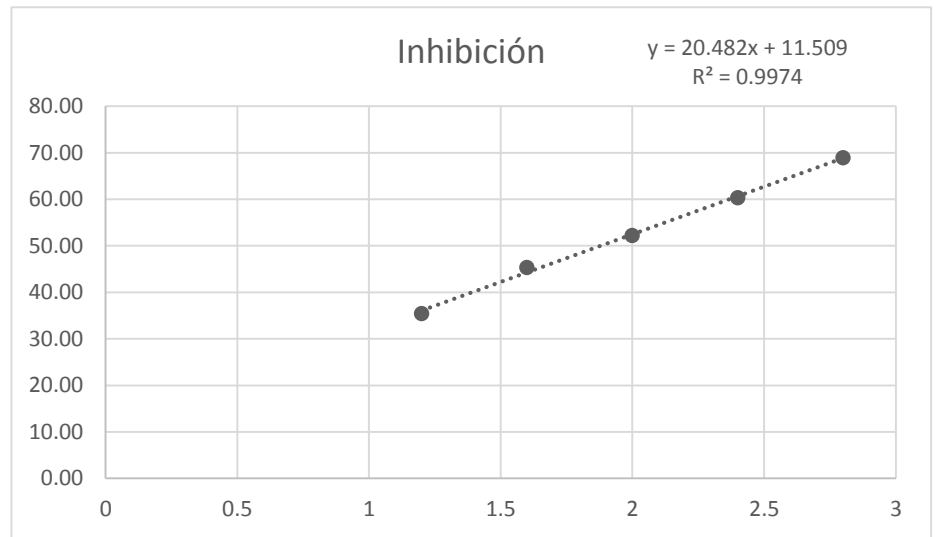


13.8 Anexo No.8: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método DPPH micrométrico en hoja, del extracto de acetato de etilo: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de acetato de etilo que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en lector de placas ELISA, a una longitud de onda de 490 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

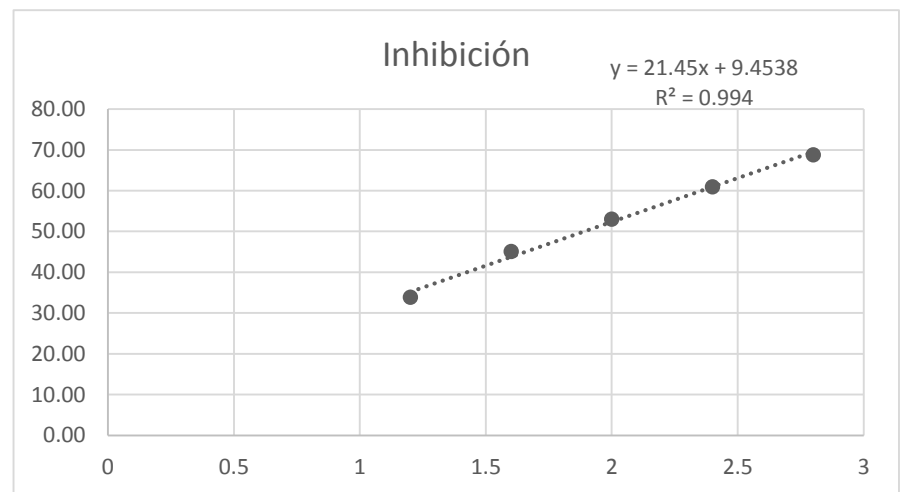
Muestra	Abs. Blanco	Absorbancia	Diferencia	% Inhibición	Cl ₅₀	Promedio	Des. Est.	Conc. (mg/ml)
Control	0.04	1.047	1.007					
D1	0.107	0.757	0.65	35.45				
30μL/500μL		0.773	0.666	33.86				1.2
		0.754	0.647	35.75				
D2	0.129	0.679	0.55	45.38				1.6
40μL/500μL		0.682	0.553	45.08				
		0.679	0.55	45.38				
D3	0.148	0.629	0.481	52.23				2.0
50μL/500μL		0.621	0.473	53.03				
		0.618	0.47	53.33				
D4	0.167	0.566	0.399	60.38				2.4
60μL/500μL		0.56	0.393	60.97				
		0.558	0.391	61.17				
D5	0.195	0.508	0.313	68.92	1.8793		0.0243	2.8
70μL/500μL		0.509	0.314	68.82	1.8903	1.8766		
		0.496	0.301	70.11	1.8510			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

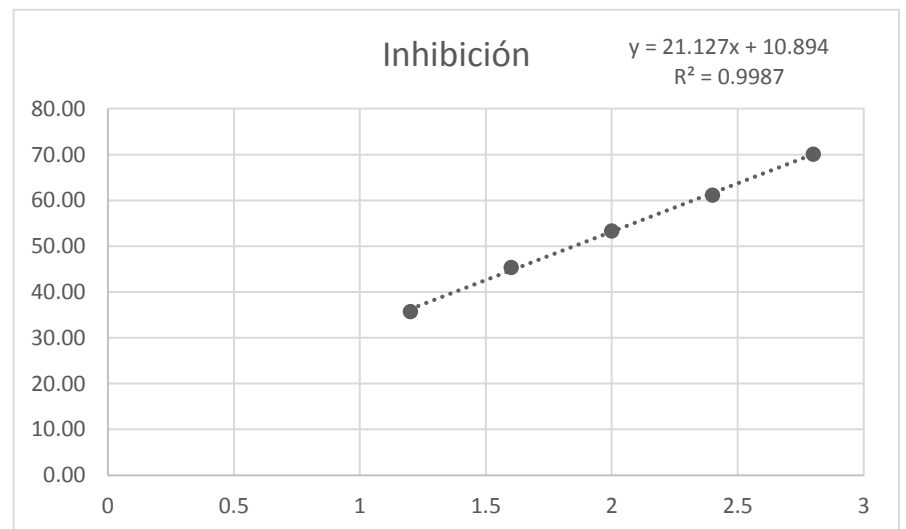
Concentración	Inhibición
1.2	35.45
1.6	45.38
2	52.23
2.4	60.38
2.8	68.92



Concentración	Inhibición
1.2	33.86
1.6	45.08
2	53.03
2.4	60.97
2.8	68.82



Concentración	Inhibición
1.2	35.75
1.6	45.38
2	53.33
2.4	61.17
2.8	70.11

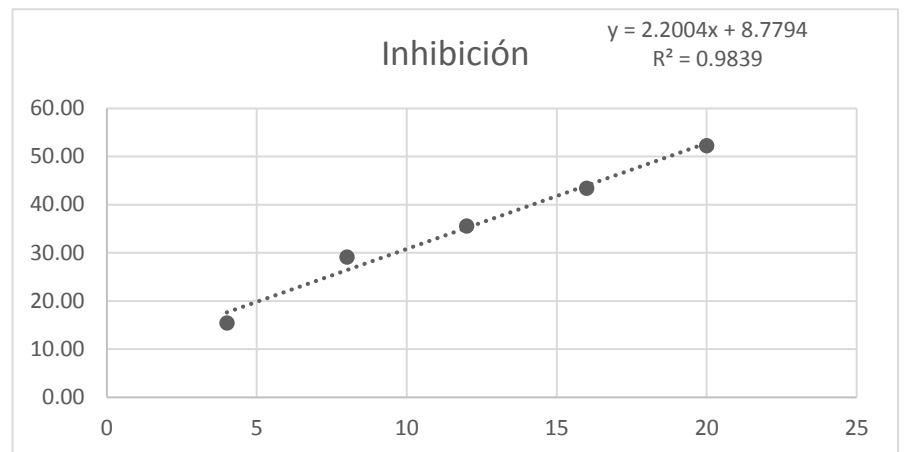


13.9 Anexo No.9: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método DPPH micrométrico en hoja, del extracto de hexano: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de hexano que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en lector de placas ELISA, a una longitud de onda de 490 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

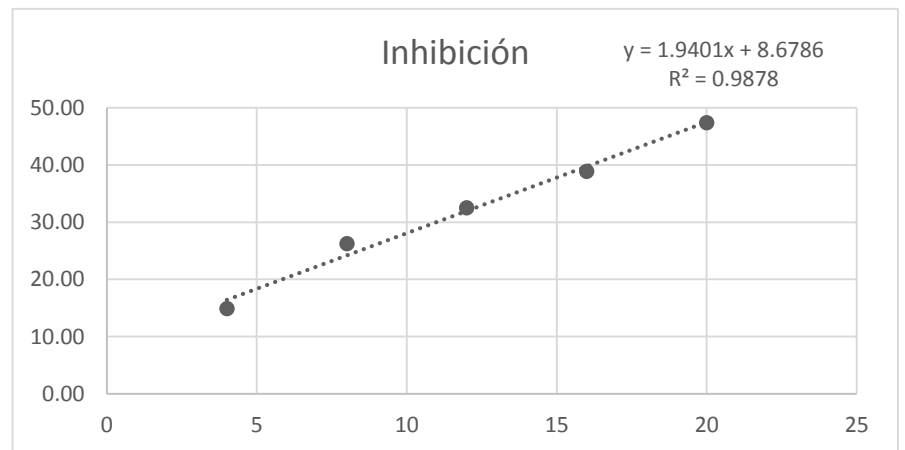
Muestra	Abs. Blanco	Absorbancia	Diferencia	% Inhibición	Cl_{50}	Promedio	Desv. Est.	Conc (mg/ml)
Control	0.037	0.93	0.893					
D1	0.083	0.838	0.755	15.45				4.0
50 μ L/250 μ L		0.843	0.76	14.89				
		0.832	0.749	16.13				
D2	0.148	0.781	0.633	29.12				8.0
100 μ L/250 μ L		0.807	0.659	26.20				
		0.799	0.651	27.10				
D3	0.192	0.767	0.575	35.61				12.0
150 μ L/250 μ L		0.795	0.603	32.47				
		0.809	0.617	30.91				
D4	0.248	0.753	0.505	43.45				16.0
200 μ L/250 μ L		0.794	0.546	38.86				
		0.8	0.552	38.19				
D5	0.31	0.736	0.426	52.30	18.7332			20.0
250 μ L/250 μ L		0.78	0.47	47.37	21.2986	20.7472	1.8027	
		0.789	0.479	46.36	22.2097			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

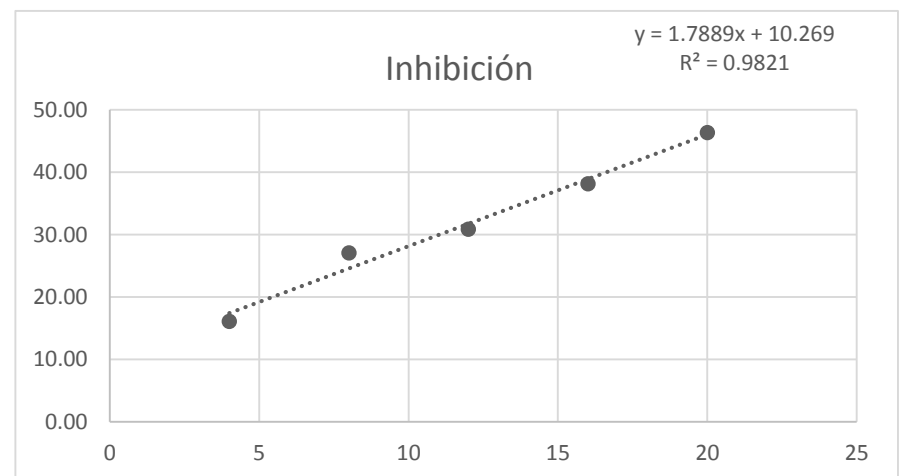
Concentración	Inhibición
4	15.45
8	29.12
12	35.61
16	43.45
20	52.3



Concentración	Inhibición
4	14.89
8	26.2
12	32.47
16	38.86
20	47.37



Concentración	Inhibición
4	16.13
8	27.1
12	30.91
16	38.19
20	46.36

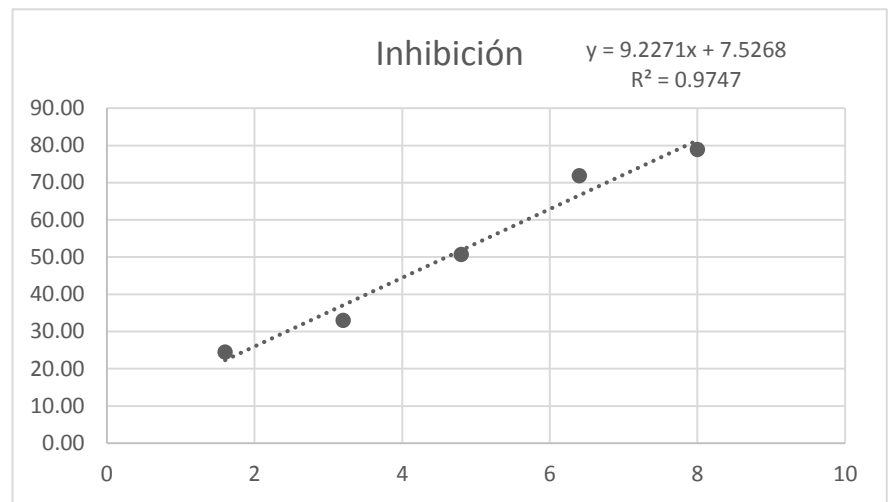


13.10 Anexo No.10: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método ABTS macrométrico en corteza, del extracto de diclorometano: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de diclorometano que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 734 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

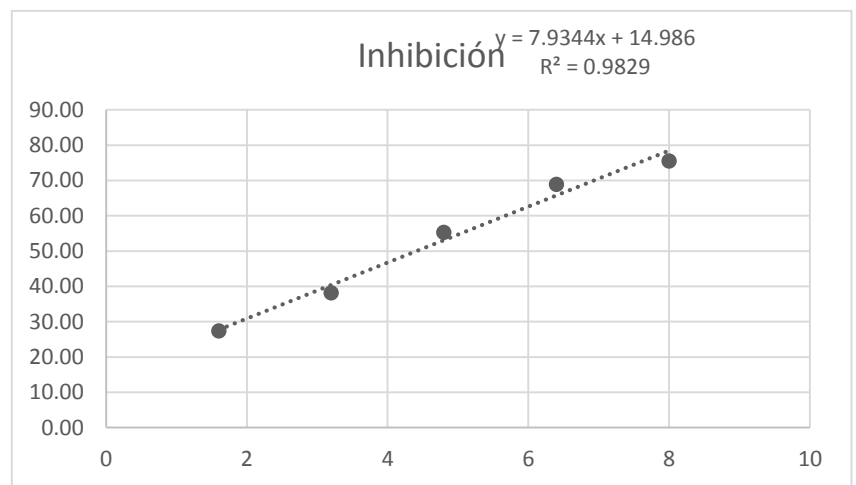
MUESTRA	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN	CI ₅₀	PROMEDIO	DESV.EST	CONC (MG/ML)
Control	0.68337					
D1	0.51577	24.53				1.6
20µL/250µL	0.49586	27.44				
	0.52383	23.35				
D2	0.45777	33.01				3.2
40µL/250µL	0.42255	38.17				
	0.44443	34.96				
D3	0.33655	50.75				4.8
60µL/250µL	0.30535	55.32				
	0.29576	56.72				
D4	0.19209	71.89				6.4
80µL/250µL	0.21271	68.87				
	0.2426	64.50				
D5	0.14417	78.90	4.6031			8.0
100µL/250µL	0.16701	75.56	4.4129	4.5560	0.1263	
	0.15867	76.78	4.6519			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

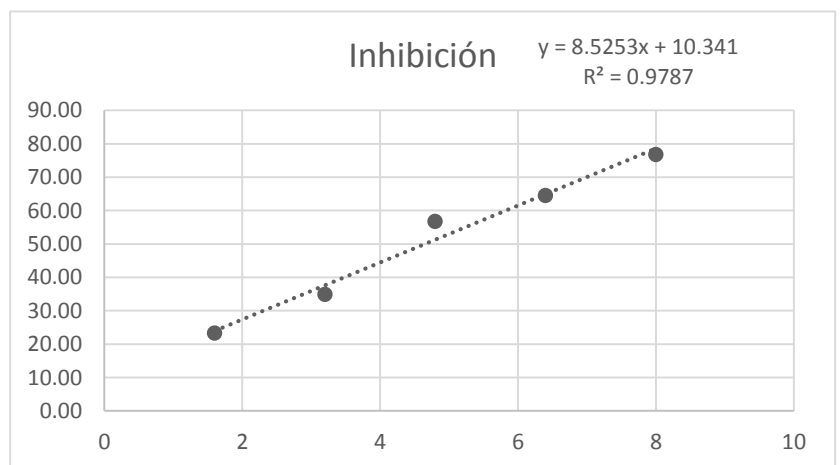
Concentración	Inhibición
1.6	24.53
3.2	33.01
4.8	50.75
6.4	71.89
8	78.90



Concentración	Inhibición
1.6	27.44
3.2	38.17
4.8	55.32
6.4	68.87
8	75.56



Concentración	Inhibición
1.6	23.35
3.2	34.96
4.8	56.72
6.4	64.50
8	76.78

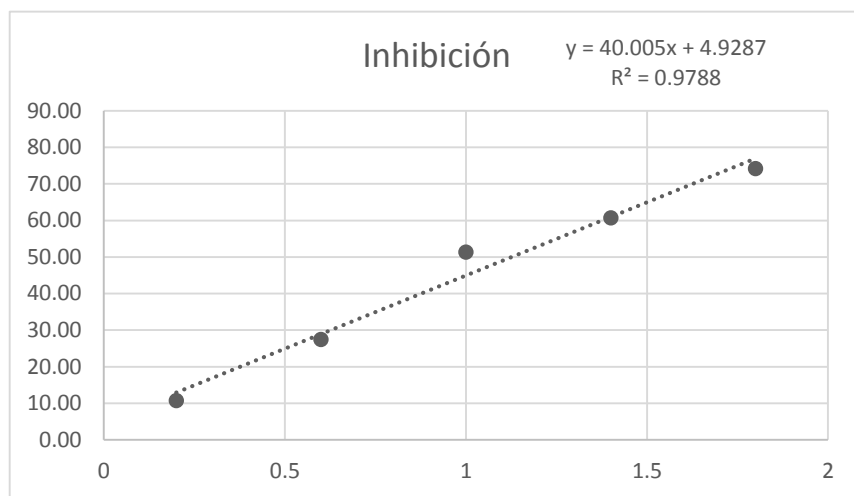


13.11 Anexo No.11: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método ABTS macrométrico en corteza, del extracto de acetato de etilo: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de acetato de etilo que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 734 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

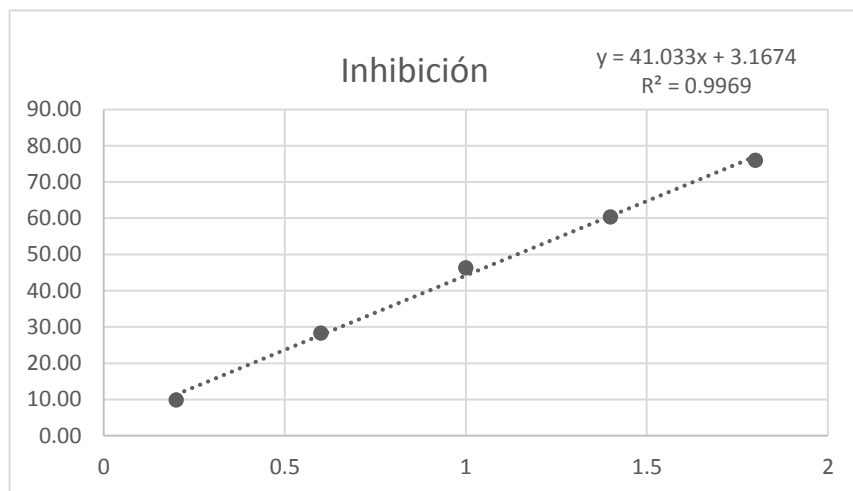
MUESTRA	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN	CI ₅₀	PROMEDIO	DESV. EST	CONC (MG/ML)
Control	0.70297					
D1	0.62708	10.80				0.2
10µL/1000µL	0.63315	9.93				
	0.61672	12.27				
D2	0.50938	27.54				0.6
30µL/1000µL	0.50373	28.34				
	0.49475	29.62				
D3	0.34187	51.37				1.0
50µL/1000µL	0.37689	46.39				
	0.38115	45.78				
D4	0.27568	60.78				1.4
70µL/1000µL	0.27877	60.34				
	0.28777	59.06				
D5	0.18148	74.18	1.1266		0.0076	1.8
90µL/1000µL	0.16873	76.00	1.1413	1.1328		
	0.15968	77.28	1.1303			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

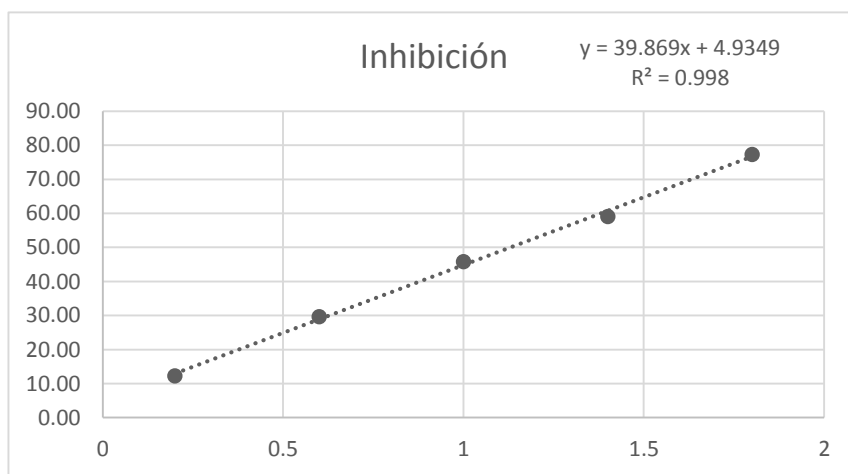
Concentración	Inhibición
0.2	10.80
0.6	27.54
1	51.37
1.4	60.78
1.8	74.18



Concentración	Inhibición
0.2	9.93
0.6	28.34
1	46.39
1.4	60.34
1.8	76.00



Concentración	Inhibición
0.2	12.27
0.6	29.62
1	45.78
1.4	59.06
1.8	77.28

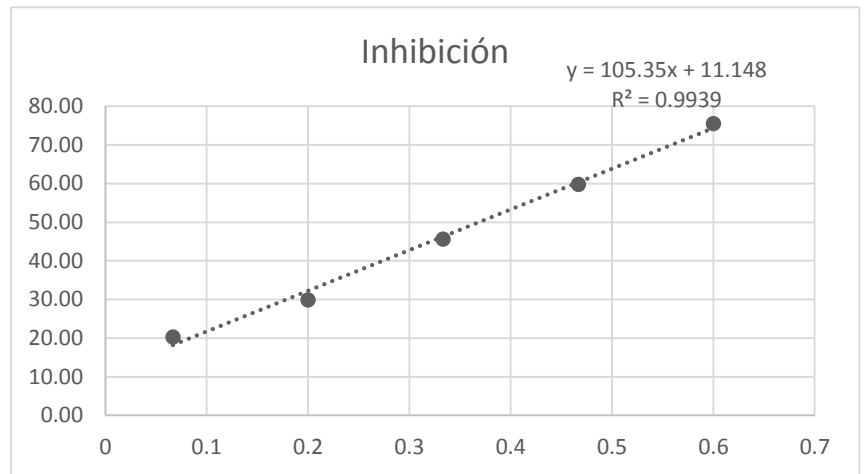


13.12 Anexo No.12: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método ABTS macrométrico en corteza, del extracto de etanol al 70%: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de etanol al 70% que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 734 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

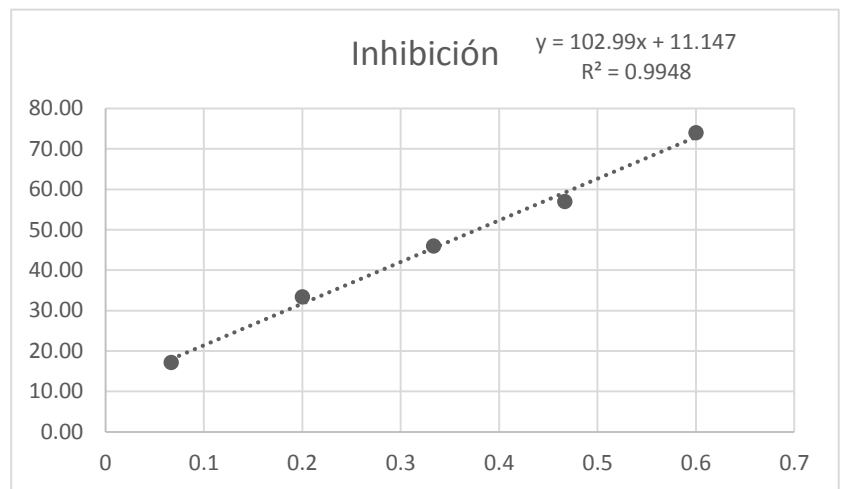
MUESTRA	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN	CI ₅₀	PROMEDIO	DESV. EST.	CONC. (MG/ML)
Control	0.75					
D1	0.59755	20.33				0.0667
5µL/1500µL	0.62152	17.13				
	0.637	15.07				
D2	0.52571	29.91				0.2000
15µL/1500µL	0.49971	33.37				
	0.51884	30.82				
D3	0.40748	45.67				0.3333
25µL/1500µL	0.40551	45.93				
	0.39877	46.83				
D4	0.30128	59.83				0.4667
35µL/1500µL	0.32283	56.96				
	0.31808	57.59				
D5	0.18304	75.59	0.3688			0.6000
45µL/1500µL	0.19502	74.00	0.3773	0.3767	0.0076	
	0.20462	72.72	0.3840			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

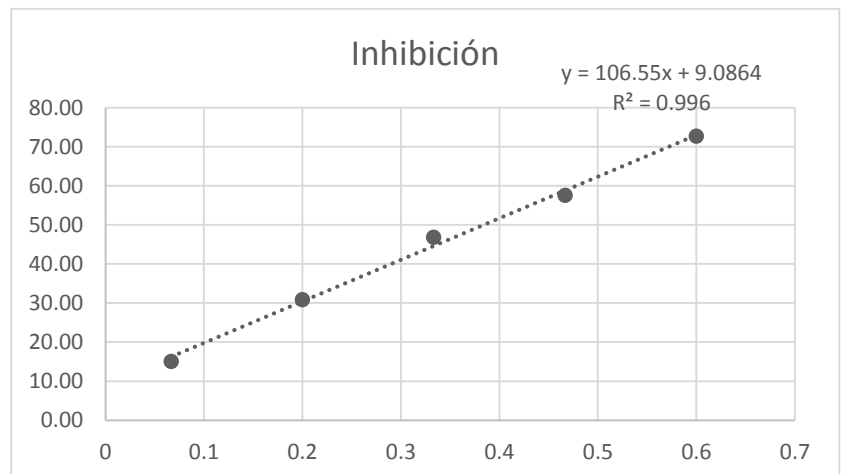
Concentración	Inhibición
0.0667	20.33
0.2	29.91
0.3333	45.67
0.4667	59.83
0.6	75.59



Concentración	Inhibición
0.0667	17.13
0.2	33.37
0.3333	45.93
0.4667	56.96
0.6	74.00



Concentración	Inhibición
0.0667	15.07
0.2	30.82
0.3333	46.83
0.4667	57.59
0.6	72.72

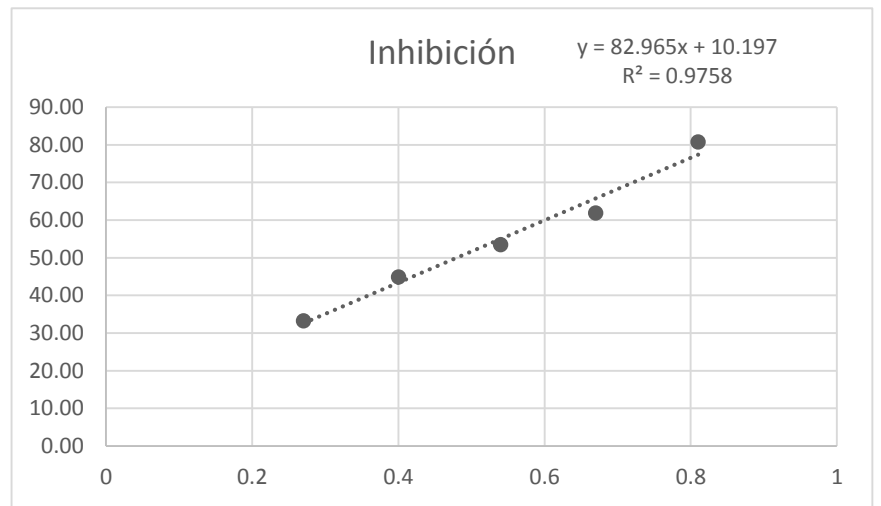


13.13 Anexo No.13: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método ABTS macrométrico en hoja, del extracto de etanol al 70%: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de etanol al 70% que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 734 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

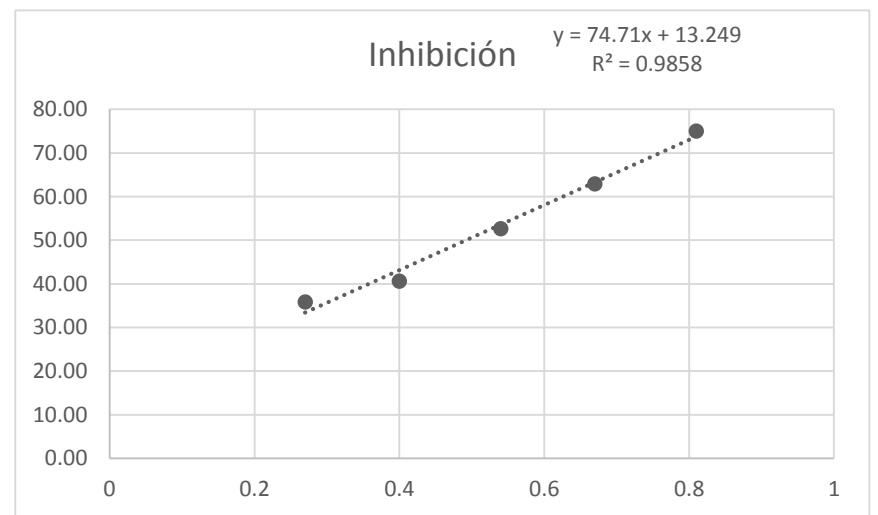
MUESTRA	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN	CI ₅₀	PROMEDIO	DESV. EST.	CONC (MG/ML)
Control	0.71917					
D1	0.48012	33.24				0.27
20µL/1500µL	0.4614	35.84				
	0.47424	34.06				
D2	0.39629	44.90				0.40
30µL/1500µL	0.42681	40.65				
	0.42191	41.33				
D3	0.33491	53.43				0.54
40µL/1500µL	0.34015	52.70				
	0.31531	56.16				
D4	0.27403	61.90				0.67
50µL/1500µL	0.26648	62.95				
	0.28691	60.11				
D5	0.13882	80.70	0.4798		0.0076	0.81
60µL/1500µL	0.17927	75.07	0.4919	0.4885		
	0.18156	74.75	0.4938			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

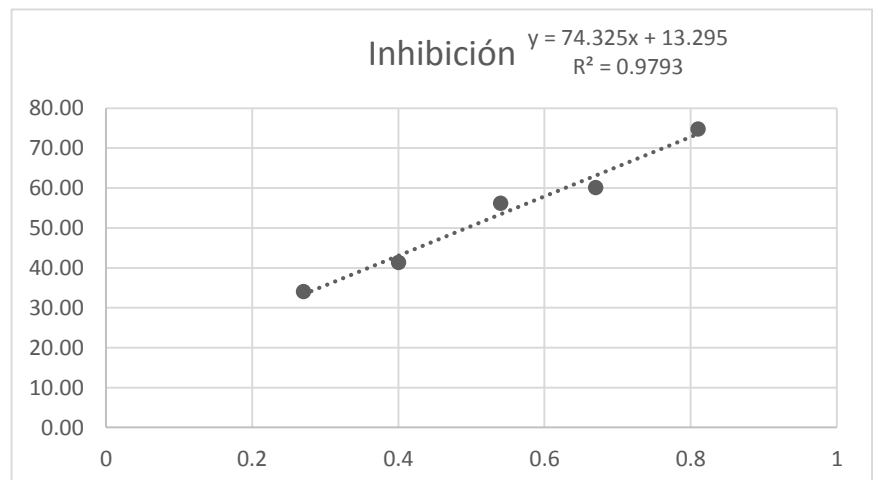
Concentración	Inhibición
0.27	33.24
0.4	44.90
0.54	53.43
0.67	61.90
0.81	80.70



Concentración	Inhibición
0.27	35.84
0.4	40.65
0.54	52.70
0.67	62.95
0.81	75.07



Concentración	Inhibición
0.27	34.06
0.4	41.33
0.54	56.16
0.67	60.11
0.81	74.75

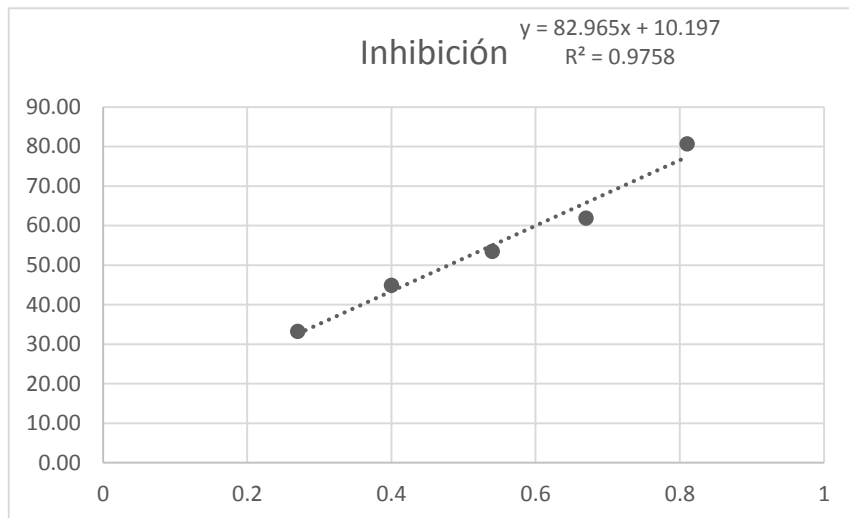


13.14 Anexo No.14: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método ABTS macrométrico en hoja, del extracto de acetato de etilo: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de acetato de etilo que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 734 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

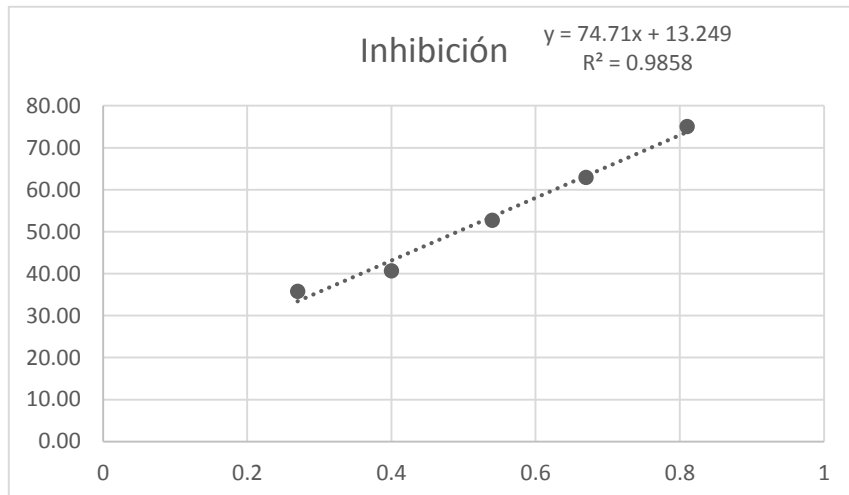
MUESTRA	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN	CI ₅₀	PROMEDIO	DESV. EST	CONC (MG/ML)
Control	0.69908					
D1	0.57062	18.38				1.2
30µL/500µL	0.60694	13.18				
	0.6008	14.06				
D2	0.47062	32.68				2.4
30µL/500µL	0.4797	31.38				
	0.45483	34.94				
D3	0.40947	41.43				3.6
30µL/500µL	0.38574	44.82				
	0.35948	48.58				
D4	0.2371	66.08				4.8
30µL/500µL	0.28431	59.33				
	0.23952	65.74				
D5	0.16567	76.30	3.8433			6.0
30µL/500µL	0.22751	67.46	4.1948	3.9495	0.2130	
	0.18489	73.55	3.8105			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

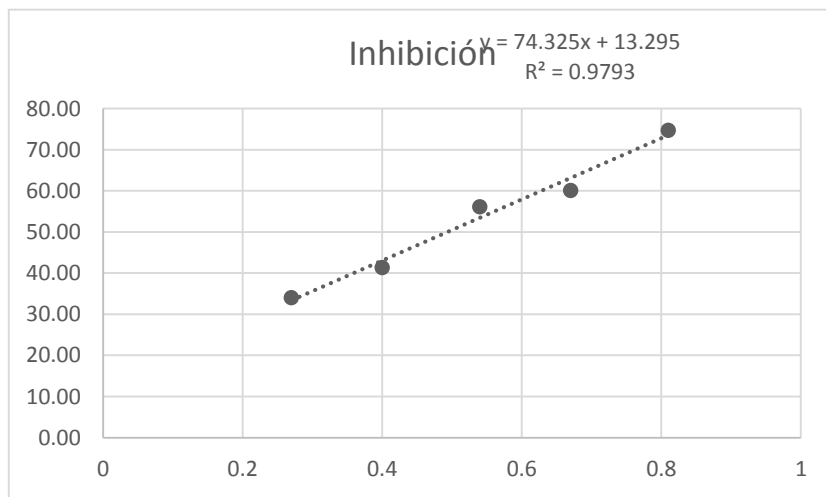
Concentración	Inhibición
1.2	18.38
2.4	32.68
3.6	41.43
4.8	66.08
6	76.30



Concentración	Inhibición
1.2	13.18
2.4	31.38
3.6	44.82
4.8	59.33
6	67.46



Concentración	Inhibición
1.2	14.06
2.4	34.94
3.6	48.58
4.8	65.74
6	73.55

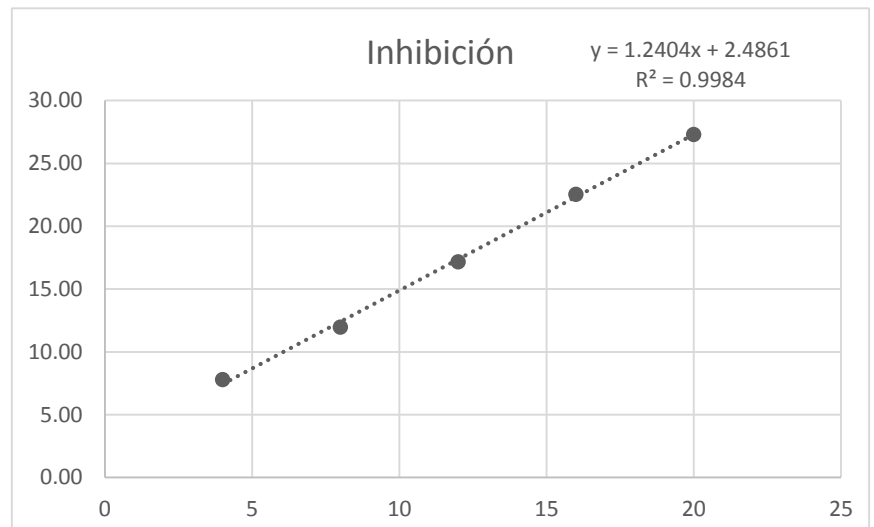


13.15 Anexo No.15: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método ABTS macométrico en hoja, del extracto de hexano: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de hexano que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 734 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

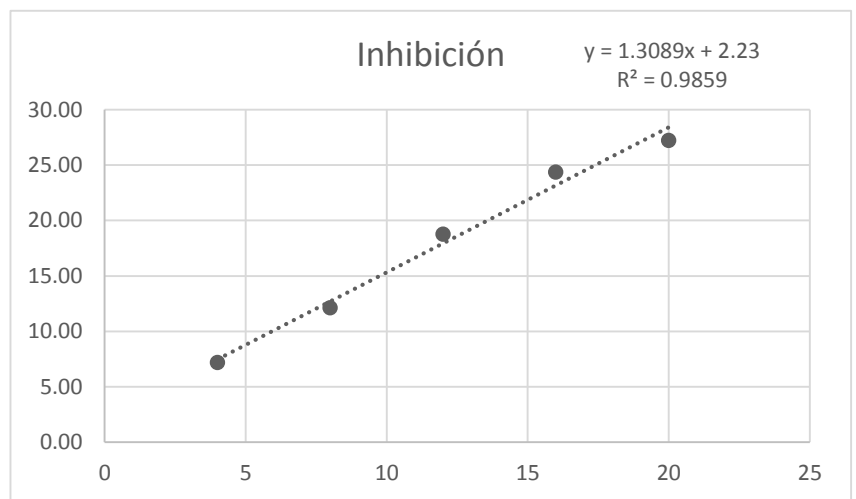
MUESTRA	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN	CI ₅₀	PROMEDIO	DESV. EST.	CONC (MG/ML)
Control	0.68759					
D1	0.63397	7.80				4
50µL/250µL	0.63816	7.19				
	0.63482	7.67				
D2	0.60513	11.99				8
100µL/250µL	0.60428	12.12				
	0.60005	12.73				
D3	0.56945	17.18				12
150µL/250µL	0.55855	18.77				
	0.55487	19.30				
D4	0.53247	22.56				16
200µL/250µL	0.52001	24.37				
	0.52066	24.28				
D5	0.49972	27.32	38.3053		2.1506	20
250µL/250µL	0.5003	27.24	36.4963	36.2718		
	0.47986	30.21	34.0137			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

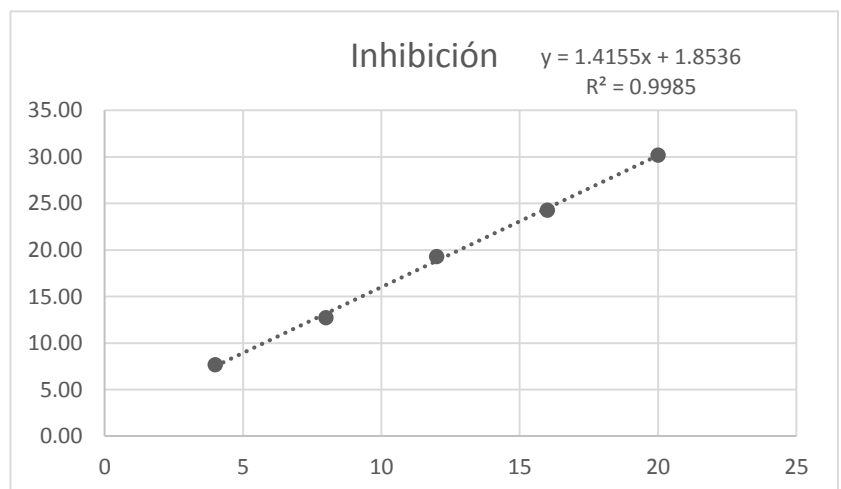
Concentración	Inhibición
4	7.80
8	11.99
12	17.18
16	22.56
20	27.32



Concentración	Inhibición
4	7.19
8	12.12
12	18.77
16	24.37
20	27.24



Concentración	Inhibición
4	7.67
8	12.73
12	19.30
16	24.28
20	30.21

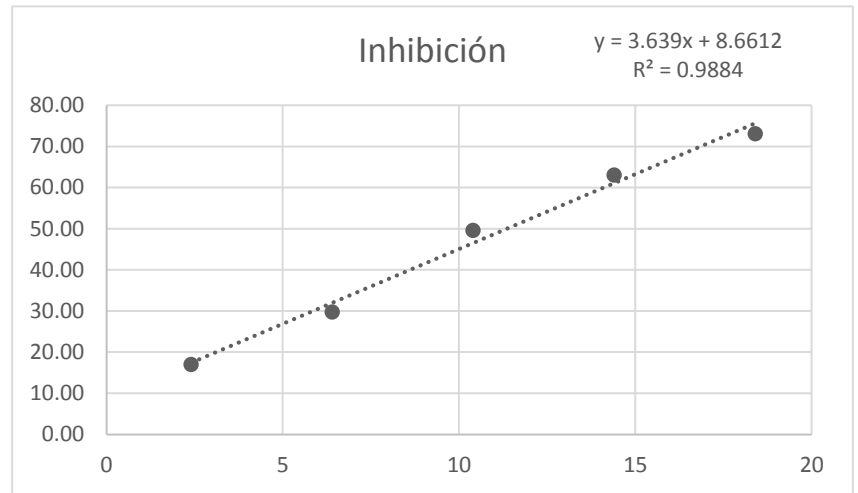


13.16 Anexo No.16: Resultados de la actividad antioxidante cuantitativa por el método ABTS macométrico en hoja, del extracto de diclorometano: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del extracto de diclorometano que sirvieron para determinar la Concentración Inhibitoria Media de este extracto. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 734 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

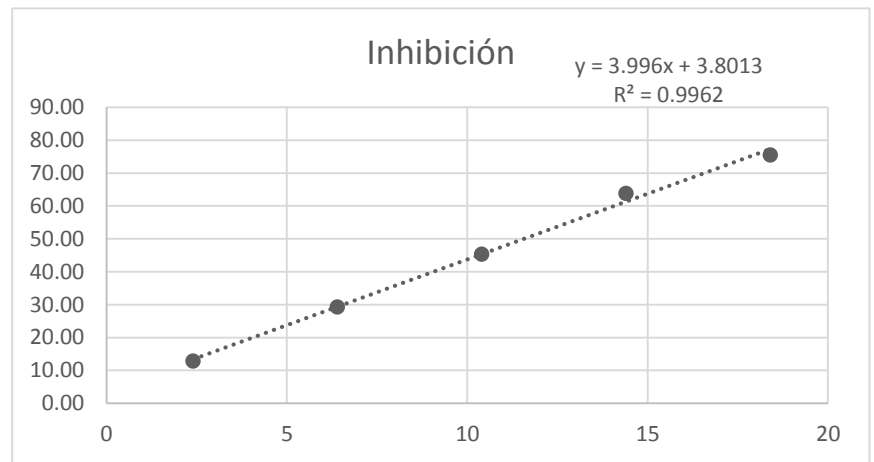
MUESTRA	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN	Cl ₅₀	PROMEDIO	DESV. EST.	CONC (MG/ML)
Control	0.68586					
D1	0.56943	16.98				2.4
50µL/250µL	0.59765	12.86				
	0.57659	15.93				
D2	0.48165	29.77				6.4
80µL/250µL	0.48522	29.25				
	0.4667	31.95				
D3	0.34569	49.60				10.4
130µL/250µL	0.37476	45.36				
	0.34374	49.88				
D4	0.25317	63.09				14.4
180µL/250µL	0.24807	63.83				
	0.25012	63.53				
D5	0.1845	73.10	11.3599			18.4
230µL/250µL	0.16809	75.49	11.5612	11.3527	0.2122	
	0.17201	74.92	11.1370			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

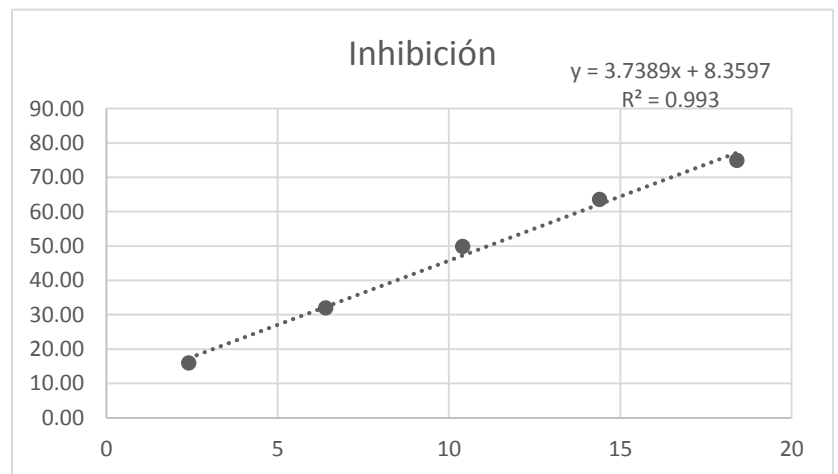
Concentración	Inhibición
2.4	16.98
6.4	29.77
10.4	49.60
14.4	63.09
18.4	73.10



Concentración	Inhibición
2.4	12.86
6.4	29.25
10.4	45.36
14.4	63.83
18.4	75.49



Concentración	Inhibición
2.4	15.93
6.4	31.95
10.4	49.88
14.4	63.53
18.4	74.92

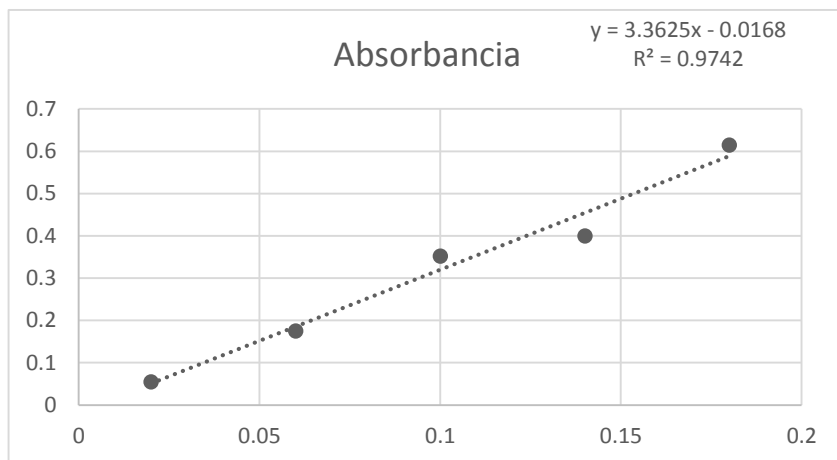


13.17 Anexo No.17: Resultados de la actividad antioxidante del estándar de vitamina C por el método FRAP micrométrico: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del estándar de vitamina C que sirvieron para determinar los moles presentes del estándar en cada extracto, que reducen el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} . Las lecturas se realizaron en lector ELISA, a una longitud de onda de 630 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

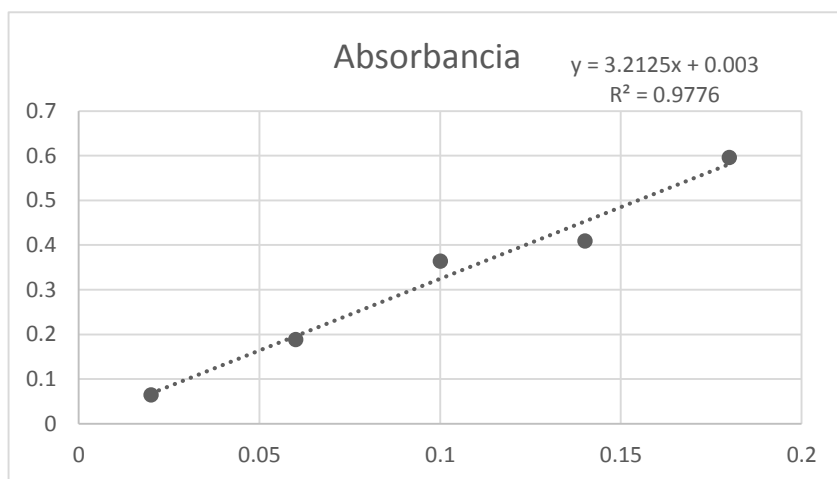
Muestra	Absorbancia	Diferencia	Concentración (mg/mL)
Blanco	0.102		
D1	0.158	0.056	0.02
5 μ L/5mL	0.157	0.055	
	0.166	0.064	
D2	0.28	0.178	0.06
15 μ L/5mL	0.277	0.175	
	0.29	0.188	
D3	0.437	0.335	0.1
25 μ L/5mL	0.454	0.352	
	0.466	0.364	
D4	0.518	0.416	0.14
35 μ L/5mL	0.502	0.4	
	0.511	0.409	
D5	0.695	0.593	0.18
45 μ L/5mL	0.717	0.615	
	0.698	0.596	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-

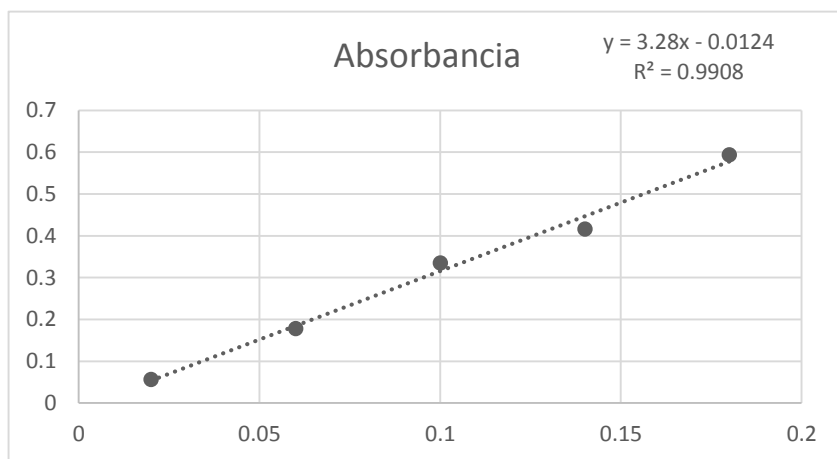
Concentración	Absorbancia
0.02	0.056
0.06	0.178
0.1	0.335
0.14	0.416
0.18	0.593



Concentración	Absorbancia
0.02	0.055
0.06	0.175
0.1	0.352
0.14	0.4
0.18	0.615



Concentración	Absorbancia
0.02	0.064
0.06	0.188
0.1	0.364
0.14	0.409
0.18	0.596

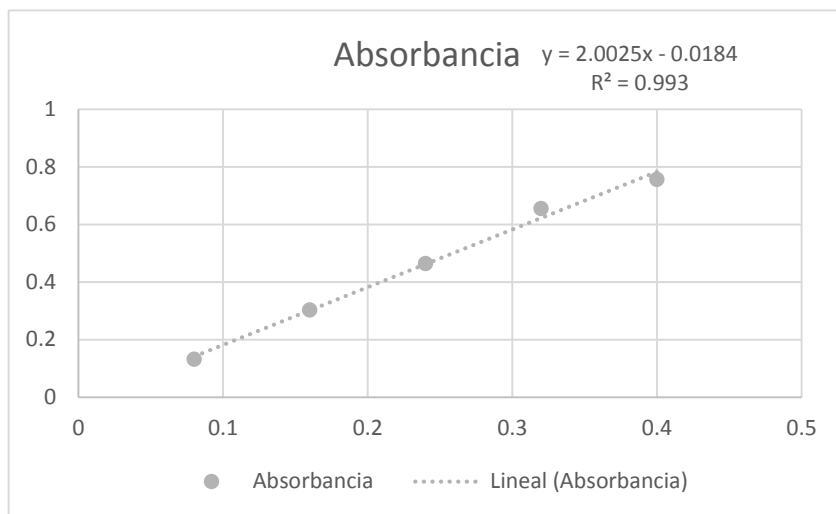


13.18 Anexo No.18: Resultados de la actividad antioxidante del estándar rutina por el método FRAP micrométrico: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del estándar de rutina que sirvieron para determinar los moles presentes del estándar en cada extracto, que reducen el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} . Las lecturas se realizaron en lector ELISA, a una longitud de onda de 630 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

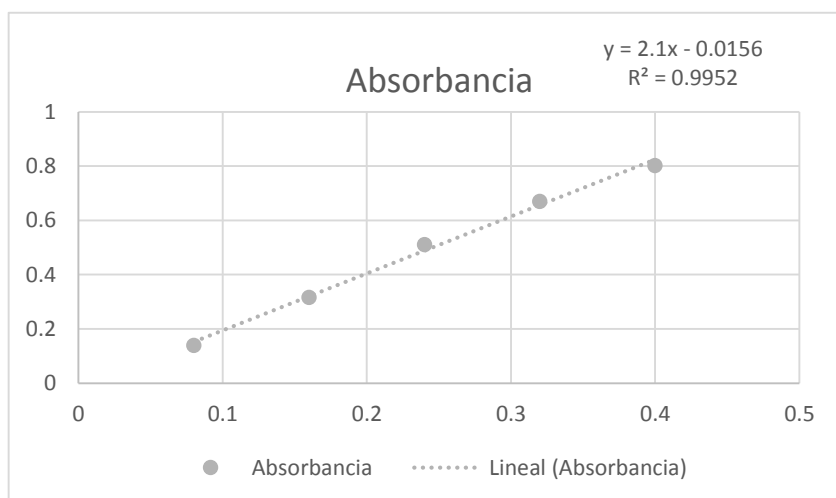
Muestra	Absorbancia	Diferencia	Concentracion (mg/mL)
Blanco	0.069		
D1	0.201	0.132	0.08
20 μ L/5mL	0.209	0.14	
	0.207	0.138	
D2	0.372	0.303	0.16
40 μ L/5mL	0.386	0.317	
	0.394	0.325	
D3	0.533	0.464	0.24
60 μ L/5mL	0.58	0.511	
	0.555	0.486	
D4	0.724	0.655	0.32
80 μ L/5mL	0.74	0.671	
	0.709	0.64	
D5	0.826	0.757	0.40
100 μ L/5mL	0.872	0.803	
	0.852	0.783	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

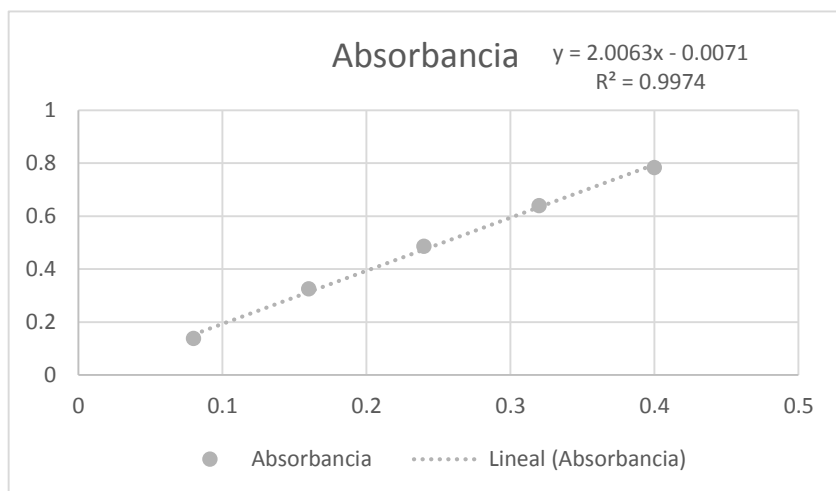
Concentración	Absorbancia
0.08	0.132
0.16	0.303
0.24	0.464
0.32	0.655
0.4	0.757



Concentración	Absorbancia
0.08	0.14
0.16	0.317
0.24	0.511
0.32	0.671
0.4	0.803



Concentración	Absorbancia
0.08	0.138
0.16	0.325
0.24	0.486
0.32	0.64
0.4	0.783

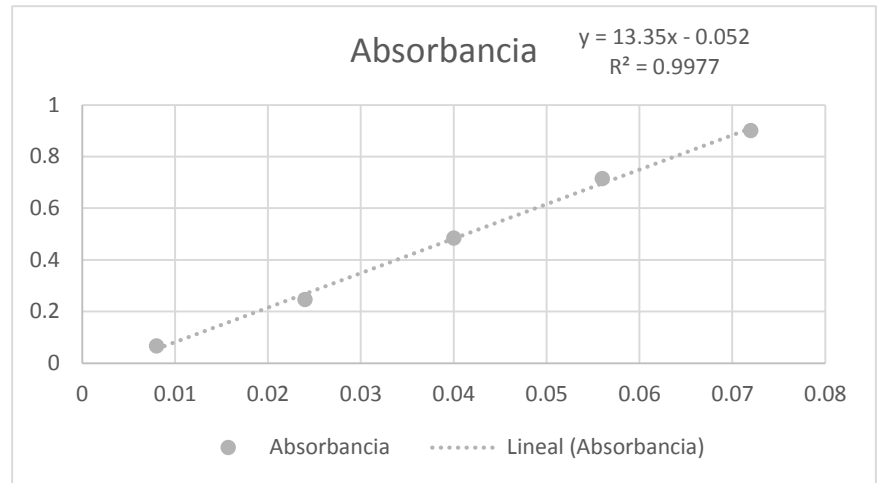


13.19 Anexo No.19: Resultados de la actividad antioxidante del estándar quercetina por el método FRAP micrométrico: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del estándar de quercetina que sirvieron para determinar los moles presentes del estándar en cada extracto, que reducen el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} . Las lecturas se realizaron en lector ELISA, a una longitud de onda de 630 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

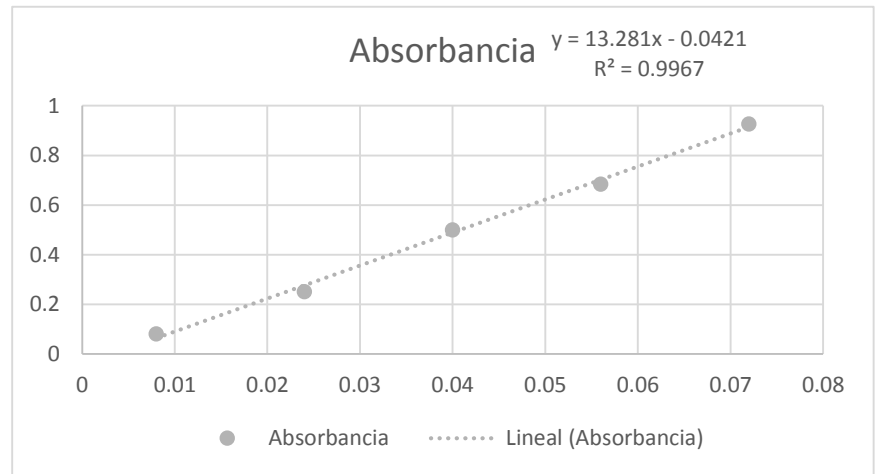
Muestra	Absorbancia	Diferencia	Concentración (mg/mL)
Blanco	0.072		
D1	0.138	0.066	0.008
20 μ L/5mL	0.153	0.081	
	0.143	0.071	
D2	0.318	0.246	0.024
60 μ L/5mL	0.324	0.252	
	0.318	0.246	
D3	0.556	0.484	0.040
100 μ L/5mL	0.573	0.501	
	0.571	0.499	
D4	0.786	0.714	0.056
140 μ L/5mL	0.757	0.685	
	0.752	0.68	
D5	0.972	0.9	0.072
180 μ L/5mL	0.999	0.927	
	1.012	0.94	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

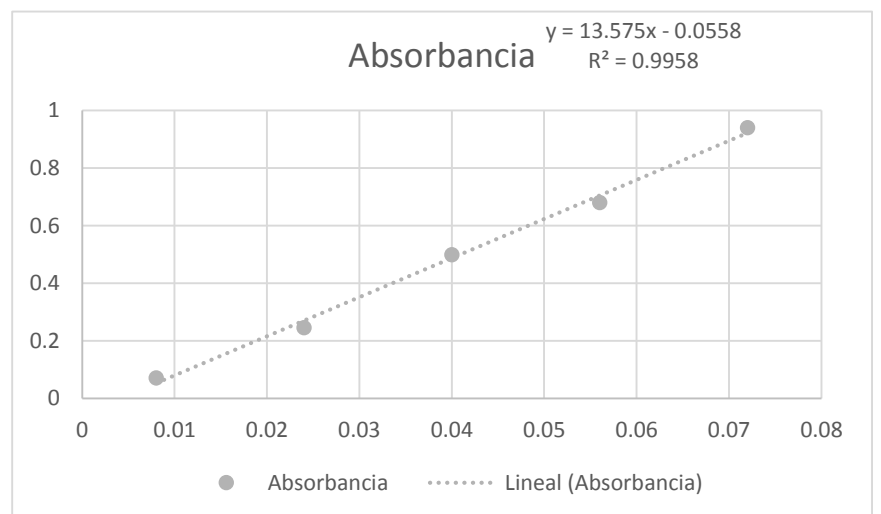
Concentración	Absorbancia
0.008	0.066
0.024	0.246
0.04	0.484
0.056	0.714
0.072	0.9



Concentración	Absorbancia
0.008	0.081
0.024	0.252
0.04	0.501
0.056	0.685
0.072	0.927



Concentración	Absorbancia
0.008	0.071
0.024	0.246
0.04	0.499
0.056	0.68
0.072	0.94

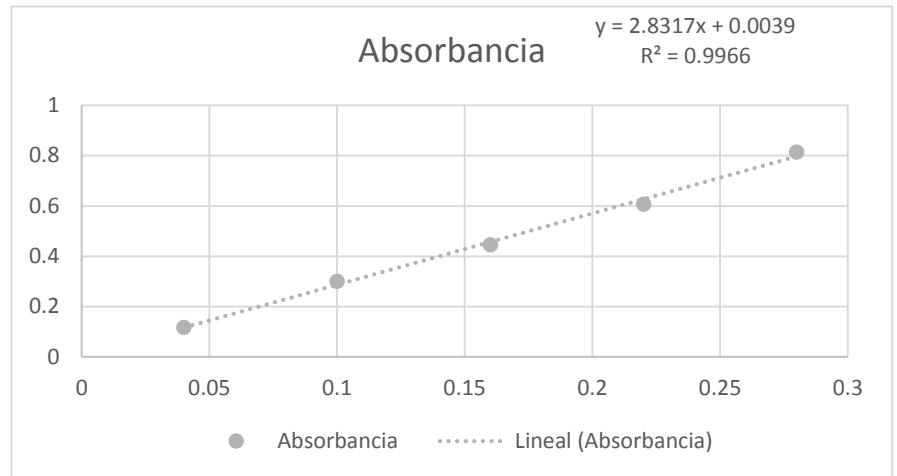


13.20 Anexo No.20: Resultados de la actividad antioxidante del estándar TROLOX por el método FRAP micrométrico: En la siguiente tabla se observan las absorbancias obtenidas de las lecturas de cinco concentraciones del estándar de TROLOX que sirvieron para determinar los moles presentes del estándar en cada extracto, que reducen el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} . Las lecturas se realizaron en lector ELISA, a una longitud de onda de 630 nm. Se anexan las lecturas y graficas de las tres repeticiones realizadas, cada una con un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.97.

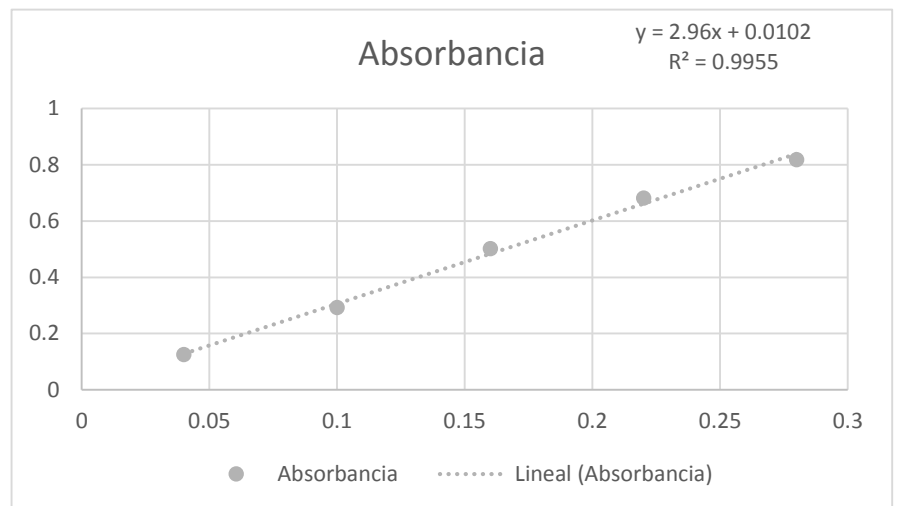
Muestra	Absorbancia	Diferencia
Blanco	0.069	
D1	0.187	0.118
100 μL /5mL	0.192	0.123
	0.194	0.125
D2	0.369	0.3
250 μL /5mL	0.352	0.283
	0.361	0.292
D3	0.515	0.446
400 μL /5mL	0.55	0.481
	0.571	0.502
D4	0.676	0.607
550 μL /5mL	0.715	0.646
	0.751	0.682
D5	0.883	0.814
700 μL /5mL	0.838	0.769
	0.887	0.818

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

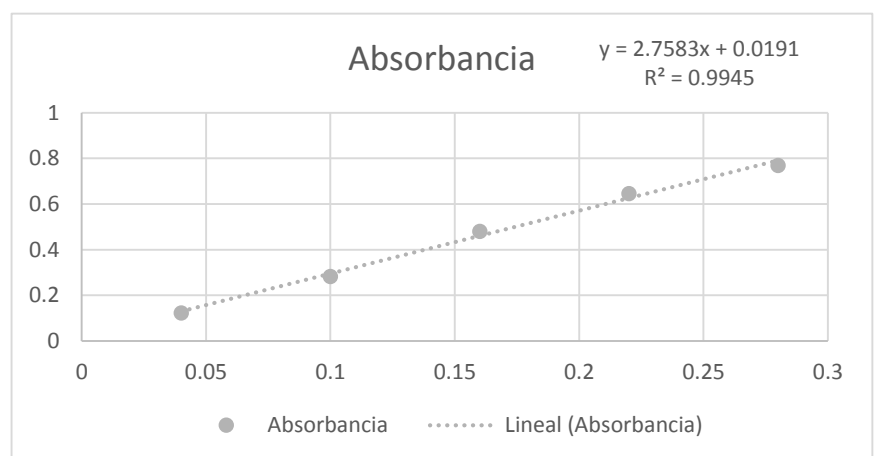
Concentración	Absorbancia
0.04	0.118
0.1	0.3
0.16	0.446
0.22	0.607
0.28	0.814



Concentración	Absorbancia
0.04	0.123
0.1	0.283
0.16	0.481
0.22	0.646
0.28	0.769



Concentración	Absorbancia
0.04	0.125
0.1	0.292
0.16	0.502
0.22	0.682
0.28	0.818



13.21 Anexo No. 21: Resultados de la actividad antioxidante de los extractos de mangle botoncillo (corteza y hojas) por el método FRAP micrométrico: En la siguiente tabla se observan los cálculos necesarios para determinar los moles del estándar de vitamina C presentes en cada extracto de ambos órganos de la planta, necesarios para reducir el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} . El cálculo procede a partir de las lecturas de las absorbancias del estándar por el método de FRAP micrométrico en el lector ELISA a 630 nm.

Absorbancia	Diferencia	Promedio	Concentración	Factor de Dilución	Peso Alícuota	mM Estándar	Promedio	Desviación Estándar	M Estándar	Promedio	Desviación Estándar
BLANCO											
0.09											
HEXANO- CORTEZA											
0.346	0.256		0.0860			21.4990			0.0215		
0.372	0.282		0.0851			21.2986			0.0213		
0.361	0.271	0.269	0.0830	5	0.020	20.7523	21.183297	0.3865	0.0207	0.0212	0.0004
HEXANO- HOJA											
0.231	0.141		0.0507			12.6829			0.0127		
0.254	0.164		0.0508			12.6989			0.0127		
0.247	0.157	0.154	0.0470	5	0.020	11.7510	12.3776	0.5427	0.0118	0.0124	0.0005
DICLOROMETANO-CORTEZA											
0.815	0.725		0.2060			128.7602			0.1288		
0.721	0.631		0.2023			126.4188			0.1264		
0.724	0.634	0.663	0.2056	12.5	0.020	128.4695	127.8828	1.2762	0.1285	0.1279	0.0013
DICLOROMETANO- HOJA											
0.204	0.114		0.0398			24.8476			0.0248		
0.208	0.118		0.0401			25.0558			0.0251		
0.212	0.122	0.118	0.0358	12.5	0.020	22.3735	24.0923	1.4921	0.0224	0.0241	0.0015

ACETATO DE ETILO- CORTEZA											
0.372	0.282		0.0890			445.2236			0.4452		
0.365	0.275		0.0882			440.8426			0.4408		
0.372	0.282	0.280	0.0861	100	0.020	430.6096	438.8919	7.4997	0.4306	0.4389	0.0075
ACETATO DE ETILO- HOJA											
0.422	0.332		0.1087			90.5669			0.0906		
0.439	0.349		0.1073			89.4355			0.0894		
0.441	0.351	0.344	0.1061	16.67	0.020	88.4742	89.4922	1.0475	0.0885	0.0895	0.0010
ETANOL 70%- CORTEZA											
0.358	0.268		0.0888			1110.5183			1.1105		
0.376	0.286		0.0880			1099.6283			1.0996		
0.373	0.283	0.279	0.0859	250	0.020	1073.9300	1094.6922	18.7870	1.0739	1.0947	0.0188
ETANOL 70%- HOJA											
0.523	0.433		0.1428			535.5183			0.5355		
0.567	0.477		0.1406			527.2862			0.5273		
0.548	0.458	0.456	0.1410	75	0.020	528.7938	530.5328	4.3829	0.5288	0.5305	0.0044

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

13.22 Anexo No. 22: Resultados de la actividad antioxidante de los extractos de mangle botoncillo (corteza y hojas) por el método FRAP micrométrico: En la siguiente tabla se observan los cálculos necesarios para determinar los moles del estándar de rutina presentes en cada extracto de ambos órganos de la planta, necesarios para reducir el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} . El cálculo procede a partir de las lecturas de las absorbancias del estándar por el método de FRAP micrométrico en el lector ELISA a 630 nm.

Absorbancia	Diferencia	Promedio	Concentración	Factor de Dilución	Peso Alícuota	mM Estándar	Promedio	Desviación Estándar	M Estándar	Promedio	Desviación Estándar
BLANCO											
0.09											
HEXANO- CORTEZA											
0.346	0.256		0.1439			35.9634			0.0360		
0.372	0.282		0.1358			33.9603			0.0340		
0.361	0.271	0.269	0.1379	5	0.020	34.4872	34.8036	1.0383	0.0345	0.0348	0.0010
HEXANO- HOJA											
0.231	0.141		0.0861			21.5231			0.0215		
0.254	0.164		0.0808			20.1905			0.0202		
0.247	0.157	0.154	0.0803	5	0.020	20.0743	20.5959	0.8050	0.0201	0.0206	0.0008
DICLOROMETANO- CORTEZA											
0.815	0.725		0.3404			212.7757			0.2128		
0.721	0.631		0.3233			202.0635			0.2021		
0.724	0.634	0.663	0.3342	12.5	0.020	208.8525	207.8972	5.4196	0.2089	0.2079	0.0054
DICLOROMETANO- HOJA											
0.204	0.114		0.0681			42.5718			0.0426		
0.208	0.118		0.0636			39.7619			0.0398		
0.212	0.122	0.118	0.0624	12.5	0.020	38.9710	40.4349	1.8924	0.0390	0.0404	0.0019

ACETATO DE ETILO- CORTEZA											
0.372	0.282		0.1488			744.2364			0.7442		
0.365	0.275		0.1406			703.0159			0.7030		
0.372	0.282	0.280	0.1429	100	0.020	714.6655	720.6392	21.2496	0.7147	0.7206	0.0212
ACETATO DE ETILO- HOJA											
0.422	0.332		0.1810			150.8416			0.1508		
0.439	0.349		0.1712			142.7270			0.1427		
0.441	0.351	0.344	0.1750	16.67	0.020	145.8615	146.4767	4.0922	0.1459	0.1465	0.0041
ETANOL 70%- CORTEZA											
0.358	0.268		0.1485			1856.4295			1.8564		
0.376	0.286		0.1403			1753.5714			1.7536		
0.373	0.283	0.279	0.1426	250	0.020	1782.5101	1797.5037	53.0429	1.7825	1.7975	0.0530
ETANOL 70%- HOJA											
0.523	0.433		0.2369			888.3895			0.8884		
0.567	0.477		0.2246			842.1429			0.8421		
0.548	0.458	0.456	0.2308	75	0.020	865.5859	865.3728	23.1241	0.8656	0.8654	0.0231

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

13.23 Anexo No. 23: Resultados de la actividad antioxidante de los extractos de mangle botoncillo (corteza y hojas) por el método FRAP micrométrico: En la siguiente tabla se observan los cálculos necesarios para determinar los moles del estándar de quercetina presentes en cada extracto de ambos órganos de la planta, necesarios para reducir el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} . El cálculo procede a partir de las lecturas de las absorbancias del estándar por el método de FRAP micrométrico en el lector ELISA a 630 nm.

Absorbancia	Diferencia	Promedio	Concentración	Factor de Dilución	Peso Alícuota	mM Estándar	Promedio	Desviación Estándar	M Estándar	Promedio	Desviación Estándar
BLANCO											
0.09											
HEXANO- CORTEZA											
0.346	0.256		0.02409488			6.0237			0.0060		
0.372	0.282		0.02347464			5.8687			0.0059		
0.361	0.271	0.270	0.02397545	5	0.020	5.9939	5.9621	0.0823	0.0060	0.0060	0.0001
HEXANO- HOJA											
0.231	0.141		0.0154			3.8577			0.0039		
0.254	0.164		0.0148			3.6914			0.0037		
0.247	0.157	0.154	0.0155	5	0.020	3.8637	3.8043	0.0978	0.0039	0.0038	0.0001
DICLOROMETANO-CORTEZA											
0.815	0.725		0.0536			33.4894			0.0335		
0.721	0.631		0.0531			33.1975			0.0332		
0.724	0.634	0.663	0.0530	12.5	0.020	33.1093	33.2654	0.1989	0.0331	0.0333	0.0002
DICLOROMETANO- HOJA											
0.204	0.114		0.0127			7.9588			0.0080		
0.208	0.118		0.0121			7.5343			0.0075		
0.212	0.122	0.118	0.0128	12.5	0.020	8.0018	7.8316	0.2584	0.0080	0.0078	0.0003

ACETATO DE ETILO- CORTEZA											
0.372	0.282		0.0248			124.2197			0.1242		
0.365	0.275		0.0242			121.1380			0.1211		
0.372	0.282	0.280	0.0247	100	0.020	123.5605	122.9727	1.6228	0.1236	0.1230	0.0016
ACETATO DE ETILO- HOJA											
0.422	0.332		0.0297			24.7240			0.0247		
0.439	0.349		0.0291			24.2312			0.0242		
0.441	0.351	0.344	0.0295	16.67	0.020	24.5476	24.5009	0.2497	0.0245	0.0245	0.0002
ETANOL 70%- CORTEZA											
0.358	0.268		0.0250			312.2642			0.3123		
0.376	0.286		0.0242			302.2175			0.3022		
0.373	0.283	0,279	0.0247	250	0.020	308.2873	307.5896	5.0596	0.3083	0.3076	0.0051
ETANOL 70%- HOJA											
0.523	0.433		0.0381			142.6966			0.1427		
0.567	0.477		0.0375			140.6426			0.1406		
0.548	0.458	0.456	0.0377	75	0.020	141.3812	141.5735	1.0404	0.1414	0.1416	0.0010

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

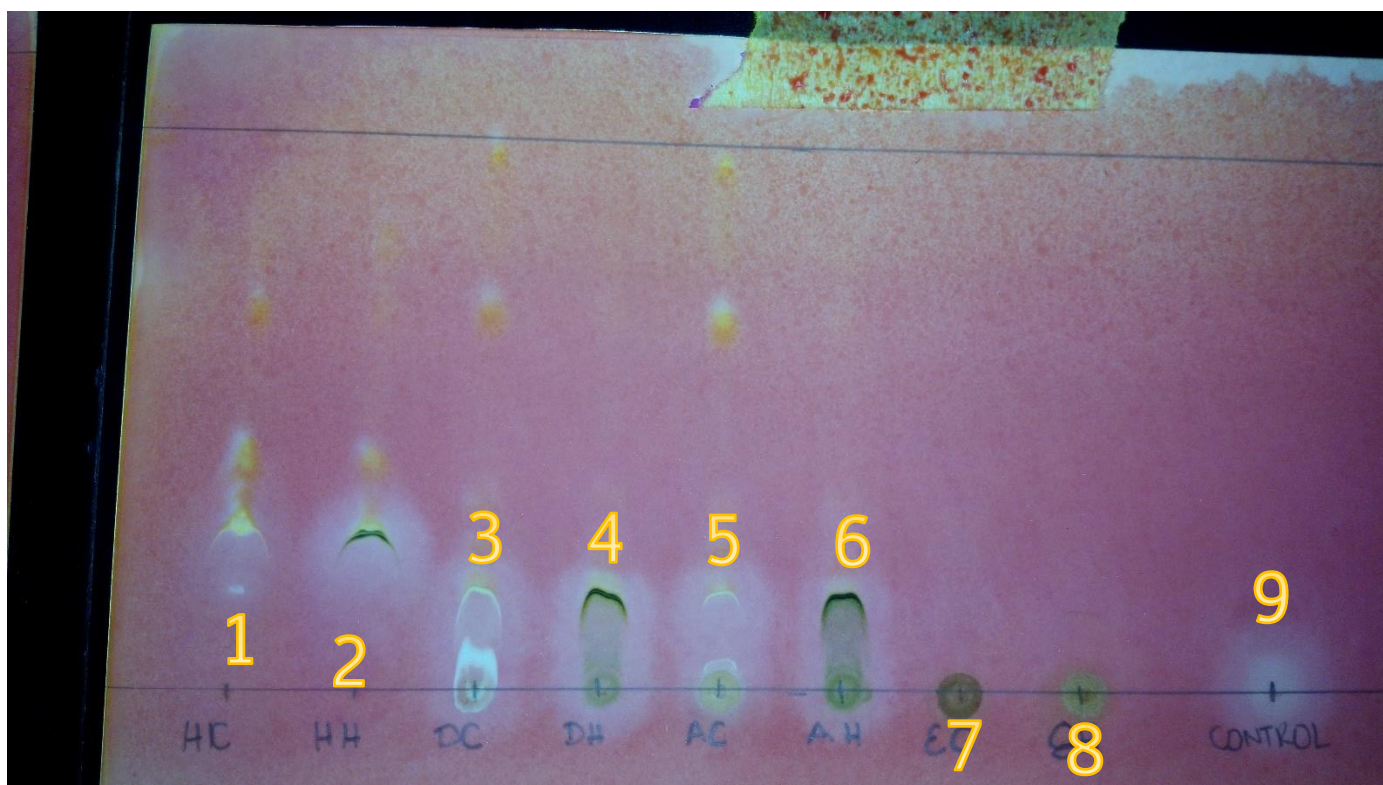
13.24 Anexo No. 24: Resultados de la actividad antioxidante de los extractos de mangle botoncillo (corteza y hojas) por el método FRAP micrométrico: En la siguiente tabla se observan los cálculos necesarios para determinar los moles del estándar de TROLOX presentes en cada extracto de ambos órganos de la planta, necesarios para reducir el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} . El cálculo procede a partir de las lecturas de las absorbancias del estándar por el método de FRAP micrométrico en el lector ELISA a 630 nm.

Absorbancia	Diferencia	Promedio	Concentración	Factor de Dilución	Peso Alícuota	mM Estándar	Promedio	Desviación Estándar	M Estándar	Promedio	Desviación Estándar
BLANCO											
0.09											
HEXANO- CORTEZA											
0.346	0.256		0.0966			24.1522			0.0242		
0.372	0.282		0.1047			26.1725			0.0262		
0.361	0.271	0.270	0.0945	5	0.20	23.6374	24.6540	1.3400	0.0236	0.0247	0.0013
HEXANO-HOJA											
0.231	0.141		0.0558			13.9404			0.0139		
0.254	0.164		0.0628			15.6890			0.0157		
0.247	0.157	0.154	0.0555	5	0.020	13.8682	14.4992	1.0310	0.0139	0.0145	0.0010
DICLOROMETANO- CORTEZA											
0.815	0.725		0.2356			147.2687			0.1473		
0.721	0.631		0.2474			154.6318			0.1546		
0.724	0.634	0.663	0.2275	12.5	0.020	142.2157	148.0387	6.2438	0.1422	0.1480	0.0062
DICLOROMETANO- HOJA											
0.204	0.114		0.0430			26.9052			0.0269		
0.208	0.118		0.0497			31.0653			0.0311		
0.212	0.122	0.118	0.0433	12.5	0.20	27.0693	28.3466	2.3559	0.0271	0.0283	0.0024

ACETATO DE ETILO- CORTEZA											
0.372	0.282		0.1001			500.7004			0.5007		
0.365	0.275		0.1083			541.5775			0.5416		
0.372	0.282	0.280	0.0979	100	0.020	489.6396	510.6392	27.3582	0.4896	0.5106	0.0274
ACETATO DE ETILO- HOJA											
0.422	0.332		0.1229			102.4030			0.1024		
0.439	0.349		0.1316			109.7212			0.1097		
0.441	0.351	0.344	0.1197	16.67	0.20	99.7384	103.9542	5.1690	0.0997	0.1040	0.0052
ETANOL 70%- CORTEZA											
0.358	0.268		0.0999			1248.8081			1.2488		
0.376	0.286		0.1081			1350.9227			1.3509		
0.373	0.283	0.279	0.0977	250	0.020	1221.2838	1273.6715	68.3023	1.2213	1.2737	0.0683
ETANOL 70%- HOJA											
0.523	0.433		0.1624			609.0423			0.6090		
0.567	0.477		0.1722			645.9142			0.6459		
0.548	0.458	0.456	0.1575	75	0.020	590.6250	615.1938	28.1532	0.5906	0.6152	0.0282

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

13.25 Anexo No.25: Actividad antiureasa cualitativa: cromatografía en capa fina- revelador: rojo de fenol: En la siguiente imagen se observa los extractos de mangle botoncillo (corteza y hoja), y el control que presentaron actividad antiureasa. Se observa una coloración blanca sobre un fondo rojo que demuestra la actividad de los extractos de hexano, diclorometano y acetato de etilo de ambos órganos, siendo observado en visible.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

Fase Móvil: Cloroformo: Hexano (25:25); se sembró de la siguiente manera:

Muestra 1: Extracto de Hexano Corteza

Muestra 6: Extracto de Acetato de Etilo Hojas

Muestra 2: Extracto de Hexano Hojas

Muestra 7: Extracto de Etanol 70% Corteza

Muestra 3: Extracto de Diclorometano Corteza

Muestra 8: Extracto de Etanol 70% Hojas

Muestra 4: Extracto de Diclorometano Hojas

Muestra 9 CONTROL: Estándar TBHQ

Muestra 5: Extracto de Acetato de Etilo Corteza

13.26 Anexo No.26: Resultados obtenidos en investigaciones de *Conocarpus erectus L.* realizadas en Taif, Arabia Saudita: En la siguiente tabla se observan los resultados obtenidos en la investigación realizada en Taif, Arabia Saudita, en donde se reportan los resultados obtenidos de actividad antioxidante por el método de DPPH en 4 órganos de la planta, hoja, tallo, fruto y flores.

Table 1. Yield, DPPH free radical scavenging activity, total antioxidant capacity and reducing power activity of ethyl acetate and *n*-butanol fractions from successive fractionation of defatted methanol extract of *Conocarpus erectus* different parts

Plant part	Yield (% crude defatted MeOH) and DPPH free radical scavenging activity SC ₅₀ [µg/ml]				Total antioxidant capacity [mg equivalent to ascorbic acid /g extract] ^a		Reducing power activity [mg equivalent to ascorbic acid /g extract] ^b	
	Ethyl acetate		<i>n</i> -butanol		Ethyl acetate	<i>n</i> -butanol	Ethyl acetate	<i>n</i> -butanol
	Yield (%)	SC ₅₀ [µg/ml]	Yield (%)	SC ₅₀ [µg/ml]				
Leaves	8.0	10.71±0.06	8.2	5.89±0.04	326.8±4.30	423.85±4.87	410.0±2.84	715.9±3.41
Stems	2.9	8.96±0.08	7.3	4.87±0.03	333.9±8.18	575.1±6.57	437.8±1.97	888.3±3.41
Flowers	5.6	7.04±0.07	13.2	5.89±0.06	358.81±6.57	430.4±4.09	610.2±3.94	676.5±6.65
Fruits	4.9	7.12±0.07	12.2	4.43±0.06	334.96±5.86	542.0±2.48	546.4±6.21	893.6±1.45

Values of SC₅₀, total antioxidant capacity and reducing power activity are expressed as mean of triplicate determinations ± standard deviation

^aAntioxidant capacity monitored by the phosphomolybdenum method expressed by mg equivalent to ascorbic acid /g extract.

^bReducing power activity expressed by mg equivalent to ascorbic acid /g extract.

(Abdel-Hammed et al., 2012)

13.27 Anexo No. 27: Tabla de las familias de metabolitos secundarios presentes en extractos de diferente naturaleza según la polaridad del solvente: En la siguiente tabla se puede observar según el tipo de solvente utilizado para obtener los extractos, los metabolitos secundarios que son afines y pueden ser extraídos.

Extracto hexánico	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
- Aceites esenciales	- Taninos gálicos	- Polisacáridos
- Triterpenos	- Taninos catéquicos	- Amidas
- Esteroles	- Taninos rojos	- Saponinas
- Carotenoides	- Compuestos reductores	- Mucilagos
- Ácidos grasos	- Alcaloides	- Taninos gálicos
- Alcaloides	- Antocianinas	- Taninos catéquicos
- Agliconas	- Aminas Cuaternarias	- Compuestos reductores
- flavonoides	- Antocianinas	- Alcaloides
- Cumarinas	- Leucoantocianinas	- Glucósidos cianogénicos.
- Emoides	- Cumarinas	
	- Antracenooides	
	- Flavonoides	
	- Chalconas	
	- Esteroides	
	- Triterpenos	
	- Cardenolicos y bufadienolicos	
	- Esteroles insaturados	
	- Antraquinonas	
	- Principios amargos	

(Santizo, 2004)

13.28 Anexo No.28: Material vegetal previo a la extracción fraccionada: En las siguientes imágenes se observa el material vegetal pulverizado de ambos órganos utilizados en este estudio, previo a que se coloquen en el percolador con los diferentes solventes utilizados para la extracción fraccionada. Fue necesario que tuvieran menos del 10% de humedad para poder utilizarlos.



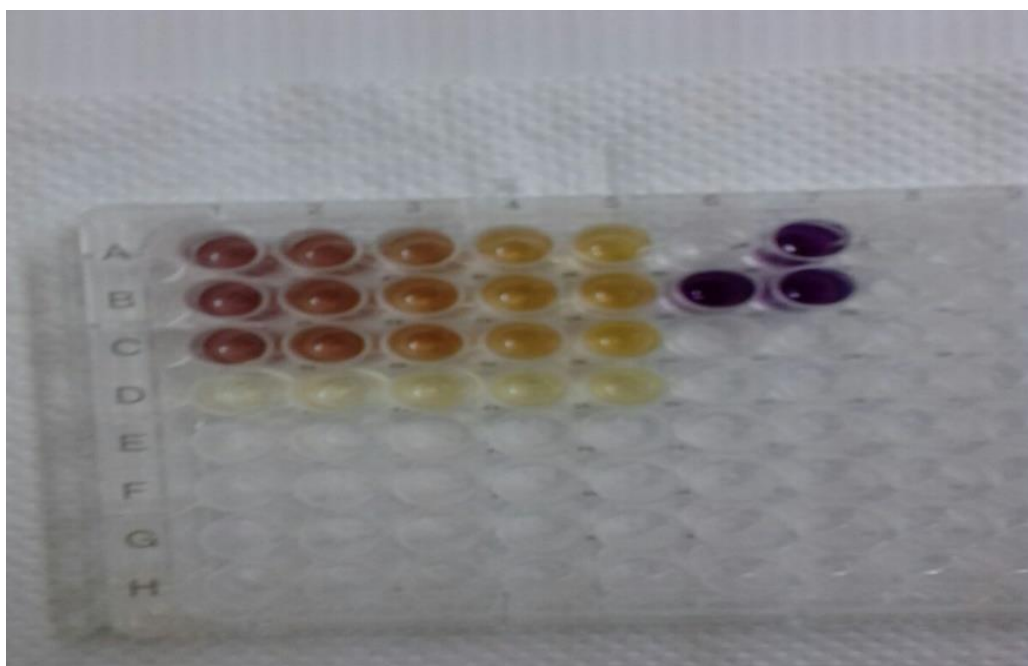
HOJA



CORTEZA

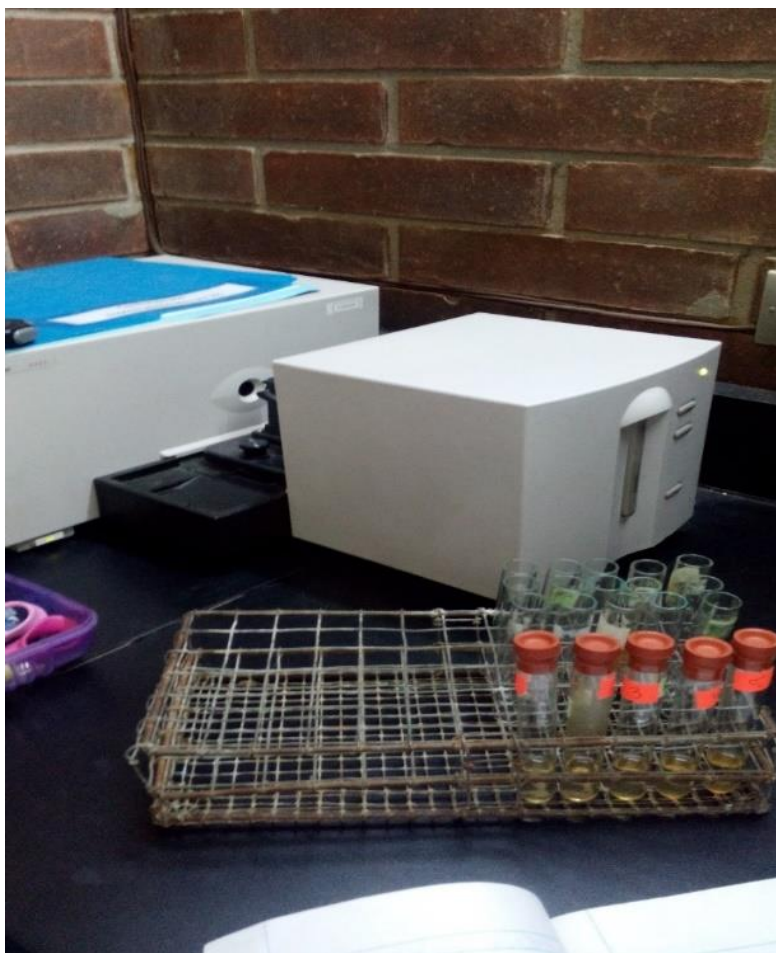
Fuente: fotografía obtenida durante la realización de la fase experimental en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

13.29 Anexo No.29: Visualización de la placa de 96 pozos para la determinación de la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH: En la siguiente imagen se observa la placa de 96 pozos con las muestras de un extracto sembrado. En el pozo A1, B1, C1 y D1 se sembró la dilución menos concentrada, sus tres repeticiones y un control de la muestra. Se sembró en los siguientes pozos diluciones más concentradas, sus tres repeticiones y sus respectivos controles de muestra. En el pozo A6 se sembró el blanco control y en el pozo A7 el control del radical DPPH. A medida que es más concentrada la dilución se pierde la coloración morada del radical DPPH.



Fuente: fotografía obtenida durante la realización de la fase experimental en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

13.30 Anexo No. 30: Preparación tubos de ensayo para realizar la determinación de la actividad antioxidante por el método del radical ABTS: En la siguiente imagen se observa la preparación de los tubos de ensayos necesarios para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS. Es necesario tener 3 tubos para cada una de las diluciones de un extracto, esto debido a las tres repeticiones que deben realizarse. En total fue necesario utilizar 20 tubos de ensayo por cada extracto que se leyó. Al fondo se puede observar el espectrofotómetro Agilent 8453 G1103A.



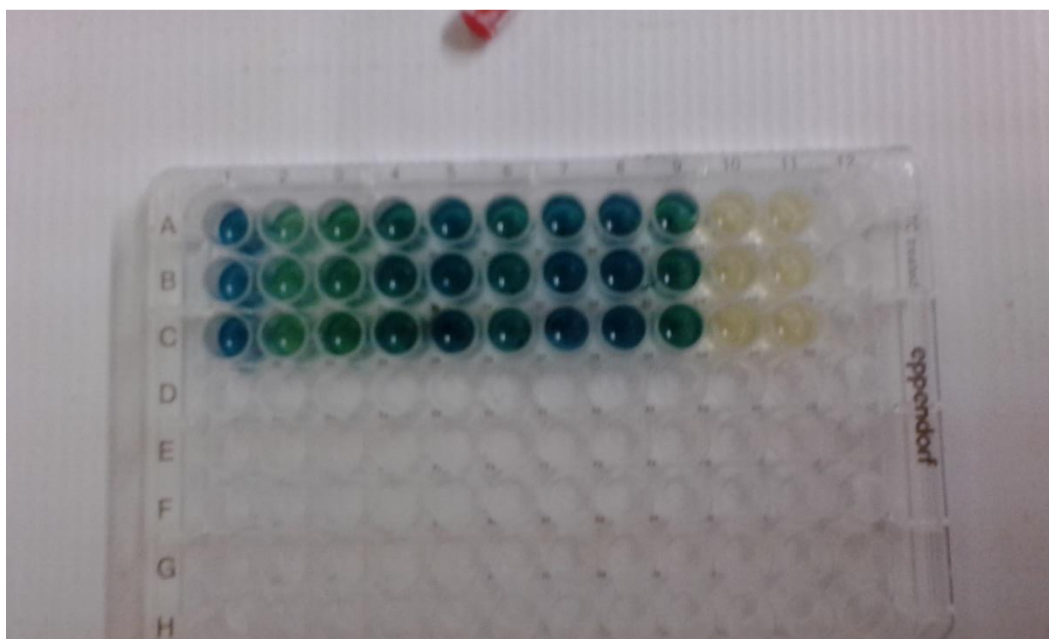
Fuente: fotografía obtenida durante la realización de la fase experimental en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

13.31 Anexo No. 31: Programa utilizado por espectrofotetría para la determinación de la actividad antioxidante por el método del radical ABTS: En la siguiente imagen se puede observar el programa que utiliza el espectrofotómetro Agilent 8453 G1103A. Posee todas las funciones necesarias para la lectura de las absorbancias de las muestras.



Fuente: fotografía obtenida durante la realización de la fase experimental en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC

13.32 Anexo No.32: Visualización de la placa de 96 pozos para la determinación de la actividad antioxidante por el método del poder reductor del hierro (FRAP): En la siguiente imagen se puede observar la placa de 96 pozos utilizada para la determinación del poder reductor del hierro de los extractos de mangle botoncillo. Del pozo 1 al 9 se sembraron los extractos de hoja y corteza, en el pozo A, B y C sus respectivas tres repeticiones. En el pozo 10 y 11 se sembró el control de la solución FRAP.



Fuente: fotografía obtenida durante la realización de la fase experimental en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC