

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA
DEL EXTRACTO DE HOJAS DE MATILISGUATE (*Tabebuia rosea*)**

Irene Beatriz Flores Castellanos

Química Farmacéutica

Guatemala, enero de 2017

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA
DEL EXTRACTO DE HOJAS DE MATILISGUATE (*Tabebuia rosea*)**

Informe de tesis

Presentado por

Irene Beatriz Flores Castellanos

Para optar al título de

Química Farmacéutica

Guatemala, enero de 2017

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	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

DEDICATORIA

Acto que dedico:

A Dios	Por ser mi padre y guía a lo largo de mi vida y ayudarme a no desfallecer.
A mi mamá Irene Castellanos	Por ser mi mejor amiga, mi compañera de desvelos, mi motivación y ejemplo de fortaleza, esperanza y amor.
A mi esposo Omar Lima	Por ser mí amigo del alma y acompañarme desde el primer día de universidad, por alentarme a siempre seguir adelante, por su apoyo y amor incondicional. Te amo mucho.
A mi hijo Santiago	Por ser el motorcito de mi vida, por llenar mis días de amor, ternura y alegría.
A mi hermano Diego Flores	Por cuidarme y apoyarme desde el cielo, como siempre lo hizo en vida, gracias canche, aunque no estés físicamente sé que tu cariño es infinito.
A mi familia	A mi papá Orlando Flores, mis hermanos; Andrés, Ayme, Javier y Ximena y a mi abuelita Betty, por apoyarme a lo largo de mi carrera y aguantar mis cambios de humor y estrés.
A mi segunda familia	La Familia Lima García; Don Adrián, doña Yasmyn, Adrianita y José, gracias por permitirme ser parte de su familia, por motivarme y apoyarme a lo largo de esta etapa.

A mis amigos de la infancia Ana Ilse y Jeser, gracias por regalarme tantos años de amistad y por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A mis amigas del colegio Anne, Majo y Stephanie, por todos esos recuerdos que compartimos, gracias por formar parte de mi vida.

A mis amigos de la Evelyn, Julio, Nancy y Vera, por su amistad tan sincera, por estar en los buenos y malos momentos, gracias por hacer mis días de Universidad inolvidables.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios Por haberme permitido culminar una etapa más en mi vida, por todas las bendiciones y oportunidades que recibí a lo largo de mi carrera, regalándome personas maravillosas que me acompañaron a lo largo de este camino.
- A la santísima Virgen María Por su intercesión en cada momento de mi vida.
- A mis padres y hermano Andrés Por apoyarme en todo momento y brindarme todas las herramientas para poder alcanzar esta meta.
- A la Universidad San Carlos de Guatemala y Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Por darme la oportunidad de estudiar y brindarme las herramientas para expandir mis conocimientos y así formarme profesionalmente.
- A la Dra. Sully Cruz Gracias por su asesoría, consejos, comprensión, paciencia y apoyo a lo largo de mi trabajo de tesis y por siempre alentarme a seguir adelante. Muchas gracias.
- Al Lic. Julio Chinchilla Por su tiempo y apoyo en la realización de esta investigación.
- A la Licda. Nereida Marroquín Por su amistad, paciencia y apoyo en esta investigación y por siempre motivarme a dar lo mejor de mí.
- Al laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT) Por permitirme el uso de sus instalaciones y materiales para la elaboración de esta investigación, pero sobre todo por ese cariño y amistad brindada por toda la familia LIPRONAT.

ÍNDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	3
3.	Antecedentes	5
4.	Justificación	16
5.	Objetivos	17
6.	Hipótesis	18
7.	Materiales y métodos	19
8.	Resultados	42
9.	Discusión de resultados	49
10.	Conclusiones	54
11.	Recomendaciones	55
12.	Referencias bibliográficas	56
13.	Anexos	61

1. RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la evaluación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de Matilisguate (*Tabebuia rosea*), por medio de 3 métodos micrométricos (Reactivo DPPH, Fenoles Totales y poder reductor de hierro (FRAP)) y 1 macrométrico (Reactivo ABTS), así como la realización del tamizaje fitoquímico por medio de cromatografía en capa fina de taninos, alcaloides, flavonoides, antocianinas, saponinas y cumarinas.

Se recolectaron hojas frescas de Matilisguate (*Tabebuia rosea*) en el municipio de Mixco, para luego someterlas al proceso de secado y molienda, posteriormente se realizó el proceso de extracción con etanol al 50% por medio de percolación. Ya obtenido el extracto etanólico de hojas de Matilisguate, se procedió a realizar de forma cualitativa el tamizaje fitoquímico el cual consiste en evaluar los metabolitos secundarios presentes en las plantas utilizando reveladores específicos para cada ensayo.

Se evaluó de forma cualitativa el extracto etanólico de Matilisguate por medio de cromatografía en capa fina, para posteriormente realizar la prueba cuantitativa de la capacidad antioxidante con el revelador DPPH, obteniendo un CI_{50} 1.16 mg/ml. Se realizó el método de fenoles totales por medio del reactivo de Folin Ciocalteu, donde presentó 1.50 mg de ácido gálico por cada gramo del extracto.

Se realizó el ensayo macrométrico de decoloración del radical ABTS, obteniendo un CI_{50} de 0.010 mg/ml, por último se realizó la determinación de la actividad antioxidante por medio de la reducción de hierro, obteniendo 0.053 mg del ion ferroso formado por cada gramo del extracto utilizado.

El extracto etanólico de Matilsguate presentó baja actividad antioxidante en comparación con los estándares utilizados, únicamente para la prueba de ABTS se presentó una actividad significativa la cual se relaciona con los compuestos apolares de la planta. A pesar de no obtener resultados completamente satisfactorios, se genera información valiosa para continuar con estudios que investiguen más a fondo la utilización del Matilsguate para futuras aplicaciones en alimentos/cosméticos.

2. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres presentes en el organismo, se forman a partir de la radiación ionizante, compuestos tóxicos, contaminación ambiental, exceso de ejercicio, humo de cigarrillo, interrupción de la cadena mitocondrial de electrones, disminución de la capacidad antioxidante enzimática, exceso de oxígeno en el organismo, envejecimiento, entre otros. Estos radicales libres pueden llegar a desencadenar diversas enfermedades como: Aterosclerosis, cáncer, catarata senil, insuficiencia renal, entre otros. Los cuales se desencadenan por el estrés oxidativo producido por los radicales libres (Guerra, 2001).

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante (Sellés, 2011).

Para contrarrestar la acción de los radicales libres existen los antioxidantes, los cuales abarcan todas aquellas sustancias que retrasan o previenen el deterioro, daño o destrucción provocados por la oxidación. Se clasifican en endógenos (Catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) y exógenos (Tocoferoles, vitamina E y C). En la actualidad se emplea la terapia antioxidante; que consiste en dietas ricas o enriquecidas con antioxidantes sintéticos, los cuales se añaden a los alimentos, aunque estos pueden presentar varios efectos adversos y contraindicaciones (Juárez, 2006).

Debido a los efectos adversos provocados por los antioxidantes sintéticos, es necesaria la investigación y desarrollo de antioxidantes naturales, no solo para mejorar la calidad de los productos, sino también para beneficiar la salud de la población. Guatemala es un país rico en especies naturales, en la cual se han investigado diferentes especies que han presentado actividad antioxidante, por lo que la investigación del Matilisguate como posible antioxidante, ayudaría a ampliar los estudios de plantas nativas de Guatemala.

En esta investigación se determinó la presencia antioxidante en el extracto de hojas de Matilsguate (*Tabebuia rosea*), ya que varias especies del mismo género (*Tabebuia ochracea*, *T. crysantha*, *T. impetiginosa*, entre otros.), han presentado actividad antioxidante, además en Guatemala se utiliza en su mayoría la corteza de Matilsguate para uso ornamental y en algunos departamentos se utiliza para tratar la diabetes y parasitosis y las hojas como aceleradores del parto (Conabio, 2012).

Se realizó el tamizaje fitoquímico por medio de cromatografía en capa fina al extracto etanólico de Matilsguate para identificar los metabolitos secundarios (Taninos, alcaloides, flavonoides, antocianinas, saponinas y cumarinas) presentes en las hojas, los cuales se relacionan con la actividad antioxidante.

Así mismo se evaluó la actividad antioxidante *in vitro*, por medio de Cromatografía en capa fina del reactivo DPPH el cual dio positivo a la prueba, por lo que se realizó la cuantificación por medio del reactivo DPPH, obteniendo un CI_{50} 1.16 mg/ml. También se determinó la cantidad de fenoles totales por medio del reactivo Folin Ciocalteu, el cual ayuda a determinar de manera indirecta la actividad antioxidante presente en el extracto, obteniendo 1.50 mg de ácido gálico por cada gramo del extracto.

El método macrométrico de ABTS permite cuantificar la actividad de compuestos con características más apolares, en el cual se obtuvo un CI_{50} de 0.010 mg/ml, por último se realizó el ensayo de poder antioxidante mediante la reducción del ion férrico que evalúa la capacidad reductora por transferencia de electrones, obteniendo 0.053 mg del ion ferroso formado por cada gramo del extracto utilizado.

3. ANTECEDENTES

3.1 ANTIOXIDANTES

3.1.1 RADICAL LIBRE:

Desde el punto de vista químico, es cualquier especie (átomo, molécula o ión) que contenga al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y que sea a su vez capaz de existir de forma independiente. Desde el punto de vista molecular, actúan como potentes agentes oxidantes y son causa de envejecimiento al combinarse con moléculas esenciales, como el ADN y proteínas, las cuales desactivan causando daños potencialmente graves.

Los radicales libres se forman a partir de moléculas estables por procesos de fisión hemolítica y reacciones de transferencia de electrones. Se producen en el organismo continuamente por medio de reacciones bioquímicas de oxidación-reducción con oxígeno (redox) (Youngson, 2003).

La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es la pérdida de oxígeno activado de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa. En las células aeróbicas existen diversas vías que conducen a la producción de radicales libres derivados del oxígeno. Las fuentes principales son las enzimas (asociadas al ácido Araquidónico), ciclooxigenasa, la lipoxigenasa y citocromo P-450.

3.1.1.1 Factores que favorecen su formación:

- Radiación ionizante (ultravioleta, térmica), excesiva disponibilidad de metales de transición
- Efectos adversos de compuestos químicos tóxicos
- Contaminación ambiental
- Exceso de ejercicio
- Humo de cigarrillo
- Interrupción de la cadena mitocondrial de electrones
- Disminución de la capacidad antioxidante enzimática
- Exceso de oxígeno o aumento de su concentración (Alomar, 2014).

3.1.1.2 Las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO):

Incluyen a los radicales libres y a moléculas derivadas del oxígeno de interés biológico con una elevada reactividad, que son capaces de producir radicales libres en el organismo humano.

Las ERO más comunes y de mayor importancia biológica son las siguientes: oxígeno singlete (O_2), radical hidroxilo ($HO\cdot$), radical alcoxilo ($RO\cdot$), radical-anión superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HClO$) y peroxinitrito ($ONOO^-$). Existe otro grupo de radicales libres; donde el electrón no apareado tiene como centro a átomos de carbono, nitrógeno o azufre (Sellés, 2011).

3.1.2 ESTRÉS OXIDATIVO:

El balance oxidativo del organismo humano; es decir, la producción endógena de ERO sin sobrepasar ciertos límites, resulta esencial para la regulación metabólica, la producción de energía metabólica, la activación o inactivación de biomoléculas, la transducción de señales, el recambio celular y el control del tono vascular, entre otros.

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

El exceso de ERO promueve el ataque de estas sobre compuestos químicos que se hallan en las células (lípidos, proteínas y ADN), dando lugar al inicio de una serie de reacciones químicas que pueden conducir a la aparición de graves desórdenes fisiológicos y la agudización de la enfermedad o incluso alterar el desempeño físico o psíquico de una persona sana (Alomar, 2014; Sellés, 2011).

Entre las enfermedades atribuidas al estrés oxidativo están: Aterosclerosis, cáncer, catarata senil, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, diabetes mellitus, hipertensión arterial, cirrosis, insuficiencia hepática, desmielinización, distrofia muscular, Alzheimer, insuficiencia cardiaca, entre otros (Guerra, 2001).

3.1.3 ANTIOXIDANTES

Durante muchos años, los químicos ha tenido el conocimiento de que la acción oxidante de los radicales libres puede ser controlada, o incluso prevenida, por una serie de sustancias antioxidantes.

Los antioxidantes son todas aquellas sustancias que retrasa o previene el deterioro, daño o destrucción provocados por una oxidación. Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan radicales libres, lo cual es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos celulares de defensa que los neutralice, a estas defensas se las denomina Antioxidantes, los niveles bajos de los mismos, o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células (Alomar, 2014; Youngson, 2003).

Clasificación de los antioxidantes:

3.1.3.1 Endógenos:

Son los sistemas enzimáticos producidos por el organismo humano, entre los principales se encuentran:

- Catalasa: Es una enzima tetramérica, esta no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, pero tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. La catalasa captura el H_2O_2 antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular.

- Glutación peroxidasa (GPX): Es una enzima intracelular que contiene Selenio, la cual remueve los radicales peróxidos al convertir el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. Es detoxificante y protege contra los efectos dañinos de metales pesados, tabaco y alcohol.
- Superóxido dismutasa (SOD): Se encuentra dentro de las células y su función es catalizar la reacción de destrucción de los radicales superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser destruido a su vez por las actividades catalasa o glutación peroxidasa.

(Calderón, 2007).

3.1.3.2 Exógenos:

Son sustancias no enzimáticas, es decir que no son producidas por el organismo, se encuentran en algunos alimentos identificados como fuente de antioxidantes como las verduras, las hierbas, los cereales y las frutas. Hay muchos antioxidantes en la naturaleza pero los principales son la vitamina C, la vitamina E y los tocoferoles, los principales efectos de las vitaminas antioxidantes son como secuestradores de radicales libres. La vitamina C y el β -caroteno actúan como eliminadores de singletes de oxígeno y la vitamina E y el β -caroteno actúan como antioxidantes rompe cadenas.

Además de las vitaminas, los oligoelementos como: El cobre, zinc, manganeso, selenio y el hierro son necesarios incorporarlos al organismo a través de la dieta, porque conforman la parte activa del núcleo de las enzimas antioxidantes (Alomar, 2014; Calderón, 2007).

3.1.4 TERAPIA ANTIOXIDANTE

Consiste en dietas ricas o enriquecidas con antioxidantes sintéticos, para prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo. Se han encontrado tanto resultados positivos como negativos, estos resultados no concluyentes o contradictorios se pueden deber a múltiples causas: Inicio precoz o tardío de la intervención, intervenciones poblacionales o en grupos reducidos con riesgo aumentado, mezcla de intervenciones profilácticas con curativas, así como prevención primaria y secundaria de diversas enfermedades, dosis insuficientes, utilización de un solo antioxidante o una combinación de dos o más, evaluación con parámetros concretos de laboratorio, con variables biológicas o clínicas, estudios experimentales sobre tejidos concretos, animales o humanos (Juárez, 2006).

En las plantas existen una gran variedad de metabolitos secundarios que pueden actuar como antioxidantes, los más abundantes en las plantas son:

3.1.4.1 Tocoferoles y tocotrienoles:

Los tocoferoles se denominan generalmente como Vitamina E, existen 8 tocoferoles con actividad de vitamina E siendo el α -tocoferol el más activo y ampliamente distribuido. La vitamina E aumenta la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación y a la incorporación por macrófagos que las haría más aterogénicas que las LDL nativas, de esta manera la vitamina E podría ser un factor potencialmente terapéutico en la formación espontánea de aterosclerosis. Diversos estudios han demostrado una correlación inversa entre niveles de vitamina E y eventos cardiovasculares negativos (Juárez, 2006).

3.1.4.2 Carotenoides:

Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales sintetizados por las plantas, algas y bacterias fotosintéticas, por su insaturación son sensibles al oxígeno, metales, ácidos, peróxidos, calor, luz y a las lipoxigenasas. Algunos de estos tienen la capacidad para actuar como provitamina A, dependiendo de la presencia de la β -ionona así como la conversión en retinol por los animales.

Aproximadamente 50 de ellos son precursores de vitamina A basándose en consideraciones estructurales. Virtualmente todas las muestras de alimentos carotenogénicos de plantas analizados hasta la fecha contienen β -caroteno como constituyente principal o menor (Jáurengui, Carrillo & Romo, 2011).

El betacaroteno, es uno de los 50 carotenoides con actividad de vitamina A (se transforma en 2 moléculas de ésta en el intestino) metabolizándose ambos a retinoides. Existen estudios sobre la relación entre el consumo de betacaroteno e infarto agudo al miocardio, donde los individuos que consumen mayor cantidad de betacaroteno tienen menor riesgo de IAM, asimismo a los consumidores de dietas con más carotenoides se les observó un riesgo menor de cáncer de pulmón (Juárez, 2006). Otros estudios han reportado que su relación es más eficiente en la protección del riesgo de cáncer en piel como consecuencia de la radiación UV, ya que el β -caroteno inhibe a las ERON y al oxígeno singlete producido por la peroxidación lipídica en los liposomas y en los sistemas biológicos, actuando como agente fotoprotector que bloquea las reacciones fotoquímicas en la epidermis las cuales involucran al oxígeno singlete y radicales de oxígeno generados por la exposición UV (Jáurengui, Carrillo & Romo, 2011).

3.1.4.3 Polifenoles:

Estos constituyen uno de los metabolitos secundarios de las plantas, más numerosos y distribuidos por toda la planta, con más de 800 estructuras conocidas en la actualidad. Los polifenoles naturales pueden ir desde moléculas simples (ácido fenólico, fenilpropanoides, flavonoides), hasta compuestos altamente polimerizados (ligninas, taninos). Los flavonoides representan el subgrupo más común y ampliamente distribuido y entre ellos los flavonoles son los más abundantes (Marroquín, 2011).

Desde el punto de vista químico se caracterizan por la presencia de uno o más anillos tipo benceno, estos se relacionan directamente con algunas características de los alimentos como son el sabor, color, palatabilidad y el valor nutricional.

Entre estos compuestos se encuentran: Los ácidos fenólicos y flavonoides como el ácido cumárico, la quercetina y los taninos, entre los cuales el más activo biológicamente es la epicatequina. Estos fenoles con peso molecular relativamente alto tienen un poder antioxidante 20 veces más fuerte que la vitamina E (Padilla, Rincón & Rached, 2008).

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. La actividad antioxidante de los polifenoles se debe a su facilidad para reducir la producción de radicales libres por inhibición de las enzimas que intervienen por quelación con los metales de transición responsables de la generación de los radicales libres.

Además, los flavonoides por su bajo potencial redox, son capaces de reducir las especies de oxígeno reactivo (ROS), altamente oxidadas. En general los compuestos polifenólicos como antioxidantes, son multifuncionales y actúan según la mayoría de los mecanismos mencionados. Los polifenoles de tipo flavonoide como; Flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianos, flavanonas, catequinas y proantocianidinas, son los antioxidantes más potentes presentes en los alimentos vegetales (Quiñonez, Miguel & Aleixandre, 2012).

3.2 EXTRACTOS BOTÁNICOS

En la práctica de extracción para materiales de origen botánico, los constituyentes de interés son completamente o parcialmente separados de otros componentes con la ayuda de agua, alcohol, mezclas de alcohol-agua, u otros solventes adecuados.

Este proceso de extracción incluye la extracción de los constituyentes deseados de la planta con una disolución adecuada, evaporación de todo o casi todo el solvente, y el ajuste de los fluidos residuales, masas, o polvos a los estándares prescritos.

Los extractos se deben sujetar a procesos que incrementen el contenido de los constituyentes caracterizados, disminuir el contenido de constituyentes indeseados, o ambos. Los extractos se pueden definir como preparaciones de consistencia líquida, sólida o semisólida. Los productos obtenidos son extractos fluidos, extractos en forma de polvo o extractos semisólidos (Juárez, 2006).

3.3 ESPECIE TABEBUIA

3.3.1 FAMILIA BIGNONIACEAE:

La familia Bignoniaceae comprende lianas, arbustos y árboles reunidos en 120 géneros y 800 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. El género *Tabebuia*, es el mayor y más importante de sus géneros, con aproximadamente 100 especies, el cual fue incluido en la tribu parafilética *Tecomeae* por poseer frutos con dehiscencia perpendicular al septo (Zapater, Califano, Castillo, Quiroga & Lozano, 2009).

En Guatemala se encuentran de la familia Bignoniaceae estas especies: *Tecoma stans*, *Podranea ricasoliana*, *Pyrostegia ígnea*, *Spathonea campanulata*, *Tabebuia rosea* y *Jacaranda mimosifolia* (UFM, 2007).

3.3.2 GÉNERO TABEBUIA:

El género *Tabebuia* ha sido dividido en tres clados, que se reconocen como géneros: *Roseodendron* Miranda, *Handroanthus* Mattos y *Tabebuia* Gomes ex DC. El primero se caracteriza por un cáliz espatáceo con textura similar a la de la corola. Los dos restantes se diferencian principalmente por el indumento de las hojas y el cáliz, además de particularidades de la madera. El género *Handroanthus* es caracterizado principalmente por poseer tricomas simples, bipentaramificados, estrellados, dendroides y barbados en hojas y cáliz (Zapater, et al, 2009).

El género *Tabebuia* es ampliamente estudiado, debido a su rica fuente de compuestos 1,4-naftoquinónicos sustituidos y antraquinonas con propiedades anticancerígenas demostradas clínicamente. Comprende una serie de plantas nativas de los sitios tropicales y subtropicales de centro y sur América, entre las especies más estudiadas están:

3.3.2.1 *Tabebuia Impetiginosa*:

Es un árbol que se caracteriza por tener 20 metros de altura, flores rosadas o violáceas, las cuales aparecen durante los meses de agosto-septiembre, se puede encontrar desde México hasta Argentina.

Entre sus usos medicinales se le atribuye a la parte interna de la corteza para tratar: Artrosis, fiebre, antimicrobiano, antiparasitaria, antimicótica, antianémico, hipoglucemiante, abortivo, úlceras dérmicas, disturbios intestinales, circulatorios y tumorales. Los principales constituyentes de la corteza son: Naftoquinonas, lapachol, deoxilapachol, lapachenol, α y β -lapachona.

En diversas partes del árbol se han encontrado anisaldehído, ácido anísico, antraquinonas, ácido trimetoxibenzóico, rutinósido, coenzima Q, ceras, taninos, quercitina, sustancias amargas, carnosol, vanillina y ácido vanílico (Alonso, 2000). Así mismo se determinó la actividad de la β -lapachona sobre la melanogénesis, donde se obtuvo una inhibición de la síntesis de la melanina y la actividad de la tirosinasa lo cual podría regular las proteínas principales melanógenas, considerándose útil como agente de despigmentación potencial en trastornos de hiperpigmentación (Kim et.al., 2015).

3.3.2.2 *Tabebuia aurea*:

Es un árbol caducifolio de ocho metros de altura, sus flores son de color amarillo brillante, las cuales florecen del mes de marzo a abril, nativa de Sudamérica. Se le atribuye al extracto etanólico: Actividad antiinflamatoria, antimiotóxica y antihemorrágica, la cual fue evaluada sobre el veneno de la serpiente *Bothrops neuwiedi* inducida en la cavidad peritoneal de ratones.

En otro estudio se determinó la actividad del lapachol producida por 5 endófitos presentes en varias partes de *T. aurea*. Para la evaluación *in vitro* de la citotoxicidad (antimitótico, antiproliferativo, determinación de la viabilidad celular y fragmentación del ADN), donde se reportaron que 3-4 fracciones pueden ser agentes potenciales anticancerígenos, para la producción a gran escala de lapachol (Reis, et.al. 2014).

3.3.2.3 *Tabebuia billbergii*:

Es un árbol caducifolio, mediano hasta 14 metros de alto, la corteza es fisurada color pardo oscuro y presenta flores de color amarillo-rojizo. Entre sus propiedades se puede encontrar en el extracto de corteza con diclorometano una furonanaftoquinona (7,8-dimetóxi-2-acetil-nafto) y triterpeno tetracíclico (beta-sitosterol) los cuales fueron identificados por primera vez por medio del espectrómetro de masas y resonancia magnética nuclear (Castillo et. al, 1996).

3.3.2.4 *Tabebuia chrysantha*:

Es un árbol de hasta 35 m de altura, la corteza es de color gris a café oscuro, y las flores son grandes de color amarillo, esta especie está distribuida en Centroamérica y en parte de Sudamérica. Se reportan diversos usos en medicina tradicional como antifúngico, antitumoral y anti-inflamatorio, estas actividades son similares a las encontradas en otras especies pertenecientes a la familia Bignoniaceae como *Tabebuia impetiginosa*, *Tabebuia rosea*, *Tabebuia aurea*, entre otras.

Entre su composición química se pueden encontrar; en los extractos de corteza con n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol y agua, la presencia de glucósidos cardiotónicos, quinonas y lactonas sesquiterpénicas, así mismo actividad antiinflamatoria *in vitro* (Gómez & Tabares, 2013).

3.3.3 ESPECIE *TABEBUIA ROSEA*

La especie *Tabebuia rosea* es nativa de Guatemala, crece comúnmente en lugares secos con bastante humedad, ya que su zona de vida es el bosque seco subtropical. A menudo se puede encontrar a lo largo de los caminos, se puede encontrar en los departamentos de: El progreso, Zacapa, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Sololá, Suchitepéquez, Retalhuleu, San Marcos y Huehuetenango.

En cuanto a su composición química contienen en flores: Sesquiterpenlactonas, flavonoides y glucósidos cardiotónicos, en hojas se pueden encontrar carbohidratos, fenoles, quinonas y flavonoides (Lira, 1996).

3.3.3.1 Estudios previos de la especie *Tabebuia rosea*:

En un estudio realizado por Arbelaenz, et.al. (2011), se determinó bajo la técnica de sonificación, ultrasonido y extracción en fase sólida los metabolitos secundarios de las flores de *Tabebuia rosea*, donde se identificaron sesquiterpenlactonas, flavonoides y glucósidos cardiotónicos.

Por otra parte Ramalakshmi, et.al. (2011), encontró la presencia de aldehídos (21.81%), carbohidratos (11.01%), compuestos aromáticos (7.28%), terpenoides (8.3%), quinonas (6.01%), alcanos (6.35%), fenoles (6.85%) y flavonoides (6.07%) por medio de cromatografía de gases y espectrometría de masa.

Referente a la actividad antioxidante, Ospina et.al. (2013). Encontraron en el extracto etanólico de la corteza de *Tabebuia rosea*, fuentes captadoras de radicales libres, mediante el método de método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Donde se obtuvo una potente actividad en las fracciones de diclorometano y acetato de etilo.

En un estudio presentado por García y López (2015), en el extracto acuoso de corteza interna de *Tabebuia rosea* mostró poseer actividad antiinflamatoria y en el extracto metanólico de hojas de *T. rosea* presentó actividad anticancerígena y antioxidante.

4. JUSTIFICACIÓN

Los antioxidantes sintéticos utilizados en la actualidad, poseen diversos efectos adversos como molestias digestivas, irritación, lesiones renales, cáncer gástrico, pulmonar, entre otros. Debido a la necesidad que se tiene actualmente de encontrar un antioxidante que sea efectivo, natural y de bajo costo, las industrias se han inclinado hacia alternativas naturales, fomentando la investigación de antioxidantes naturales y su incorporación en diversos productos.

Tabebuia rosea (Bertol.) DC. es un árbol perteneciente a la familia Bignoniaceae, se encuentra distribuida en Centroamérica y en parte de Sudamérica, a la fecha se han reportado diversas actividades biológicas entre ellas antifúngica, antitumoral, antiinflamatorio, antibacteriana, antioxidante en especies como *Tabebuia impetiginosa*, *Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia aurea*. Con base a estos estudios se realizó la investigación de las hojas de Matiliguate para determinar sus constituyentes y actividad biológica en este caso antioxidante, para brindar más información de esta especie sobre todo en Guatemala, donde ha sido poco estudiada y así aprovechar dichos resultados para futuras aplicaciones en alimentos y/o cosméticos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

5.1.1 Evaluar la actividad antioxidante en un extracto etanólico de hojas de Matilisguate (*Tabebuia rosea*).

5.2 Objetivo específico

- 5.2.1 Detectar los metabolitos secundarios presentes en el extracto de hojas de *Tabebuia rosea*, por medio de cromatografía en capa fina.
- 5.2.2 Determinar cualitativamente la presencia antioxidante por medio de cromatografía en capa fina, por decoloración de DPPH.
- 5.2.3 Evaluar la concentración inhibitoria de radicales libres de los extractos vegetales a través de espectrometría con DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil) y por medio de la decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).
- 5.2.4 Determinar cuantitativamente los fenoles totales en el extracto etanólico de Matilisguate, por medio del reactivo de Folin Ciocalteu.
- 5.2.5 Determinar cuantitativamente el poder antioxidante por medio de la reducción del ion férrico (FRAP).

6. HIPÓTESIS

La presente investigación no cuenta con una hipótesis, debido a que únicamente se trabajó con una parte del árbol de Matilisguate (hojas) y un solvente a determinada concentración para su extracción (etanol 50%), y dichos resultados se compararon solamente con los estándares respectivos para cada ensayo a evaluar.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo:

Población: Árbol de Matiliguatate (*Tabebuia rosea*) ubicado en el municipio de Mixco, Guatemala.

Muestra: Extracto etanólico de hojas de *Tabebuia rosea*.

7.2 Recursos:

Recursos humanos

- Autora: Br. Irene Beatriz Flores Castellanos
- Asesor: Sully Margot Cruz Velásquez Ph.D
- Revisor: Lic. Julio Chinchilla Vettorazzi

7.3 Materiales:

7.3.1 Cristalería

- Varilla de agitación
- Beacker
- Recipientes de color ámbar
- Tubos de ensayo
- Cubetas plásticas para lectura de espectrómetro
- Probetas
- Embudo
- Erlenmeyer
- Balón aforado
- Asperjador
- Cámara cromatográfica
- Capilares graduados
- Cristalizadores

7.3.2 Reactivos

- Terc-butil-hidroquinona (TBHQ)
- Rutina
- Quercetina
- Vitamina C y E
- Cloroformo
- Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
- Estándar de sulfato ferroso
- Reactivos para fase móvil de las cromatografías en capa fina
- Reactivos específicos para la determinación de metabolitos secundarios
- 2,2-defenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)
- Metanol absoluto
- Etanol
- Ácido 2,2'-azin-obis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)
- Persulfato de potasio
- Ácido gálico
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Hidróxido de amonio
- Ácido tricloroacético
- Buffer de acetato pH 3.6
- Cloruro férrico
- Ferrocianuro de potasio

7.3.3 Materiales y Equipo

- Percolador de acero inoxidable
- Desecador
- Rotavapor
- Bomba de vacío
- Sonicador

- Agitador tipo vortex
- Estufa eléctrica
- Horno de secado
- Espectrómetro CARY-50
- Incubadora
- Termómetro
- Refrigeradora
- Papel filtro Whatman #1
- Papel aluminio
- Papel Parafilm
- Balanza semianalítica y analítica
- Balanza de humedad
- Campana de extracción de gases
- Lámpara UV/VIS
- Cromatoplaca silicagel 60F254
- Gradilla para tubos de ensayo
- Espátula
- Baño de maría
- Microplacas de 96 pozos
- Pipetas automáticas

7.4 Métodos:

7.4.1 Recolección:

Se colectó el material vegetal en el municipio de Mixco, Guatemala, en la época de verano. Se tomó una muestra representativa de 1 kg: donde 250 g fueron identificados y guardados como ejemplar de herbario y 750 gramos restantes para el análisis fitoquímico tanto cualitativo como cuantitativo.

7.4.2 Secado y molienda de la planta:

Se secó y molió la parte de la planta a utilizar. Posteriormente se realizó la prueba de humedad residual, en donde se verificó que si era mayor a lo permitido (<10%) debía secarse en un horno a 40°C hasta que cumpliera con las especificaciones de humedad. La molienda de la planta se realizó utilizando un tamiz No. 5 para disminuir el tamaño de partícula, separando de 200-300 g de la planta molida, rotulándola con nombre, fecha y parte de la planta analizada (Marroquín, 2011).

7.4.3 Prueba del mejor solvente:

Una vez seca y tamizada la muestra, se prepararon las soluciones etanólicas al 30%, 50%, 70% y 95%, posteriormente se colocó en la punta de un pachón plástico en forma de embudo un pedazo de algodón y papel filtro, donde se colocó 1 gramo de la muestra y se añadió 25 mL de etanol, cubriéndolo completamente con aluminio y dejándolo reposar por 24 horas.

Luego de 24 horas se secaron en el horno las capsulas a 100°C por una hora, colocándolas en la desecadora por 15 min, apuntando el peso.

Se colocó en las capsulas 1 mL de cada solución y se pesaron, luego se colocaron en la estufa hasta que se evaporó totalmente el solvente, seguido de esto se metieron al horno por 1 hora y después a la desecadora por 15 min, para finalmente pesarlas y obtener el porcentaje de extracción.

% Rendimiento: $\frac{\text{Crisol con mx} - \text{crisol vacío}}{\text{Crisol vacío}} \times 100$

Peso mx

7.4.4 Obtención de extractos:

7.4.4.1 Llenado del percolador

- En la punta del percolador, se colocó un pedazo de algodón de forma circular, para que sirviera de filtro.
- Se tapó la punta del percolador con un tapón plástico.
- Se agregó la tercera parte de la cantidad pesada de materia vegetal seca y se cubrió con etanol.
- Se verificó que no quedaran burbujas, haciendo presión con una espátula para desaparecerlas.
- El resto del material vegetal seco fue agregado, cubriendo nuevamente con etanol.
- Se rotuló el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha y peso. Dejando reposar por 12-24 horas para que reaccionara.
- Se abrió la llave del percolador y se dejó gotear hasta que saliera todo el disolvente (Marroquín, 2011).

7.4.4.2 Concentración en rotavapor:

- Se procedió a encender el baño de María, llevando la temperatura a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Se engrasaron todas las partes esmeriladas y se armó el rotavapor según el instructivo específico.
- A continuación se succiono la solución obtenida del percolador.
- Se procedió a conectar la bomba de vacío y el rotavapor, para iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a una consistencia semisólida.

- Se vertió el extracto concentrado en un cristizador de vidrio debidamente tarado y rotulado.
- El cristizador se metió en la desecadora durante 7-15 días.
- Cuando el extracto obtuvo una consistencia sólida, se pasó a un vial debidamente tarado y rotulado.
- Se calculó el porcentaje de rendimiento del extracto y se guardó en un vial a 4°C (Marroquín, 2011).

7.4.5 Caracterización fitoquímica:

7.4.5.1 Determinación de alcaloides:

Cromatografía en capa fina:

- Se pesó 0.1 g del extracto, disolviéndolo en 5 mL de metanol.
- Se añadió 4 gotas de NH_4OH al 10%.
- Luego se calentó en baño de maría hasta llegar a un volumen de 1 mL, se filtró y aplicó 10 μl de la muestra y 5 μl del estándar de atropina y papaverina.

Fase Móvil: Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (35:10:5)

Detección: Sin tratamiento: UV 254 nm fluorescencia, UV 365 nm azul o amarillo fluorescente. Dragendorff: Zonas cafés o naranjas en visible, los colores no son estables (Tucux, Mata & Leiva, 2012).

7.4.5.2 Determinación de flavonoides y antocianinas:

Cromatografía en Capa Fina:

- Se pesó 0.1 g del extracto, donde fueron agregados 5 mL de etanol al 95%.
- Se calentó en baño de maría hasta concentrar a un volumen de 2 a 3 mL aproximadamente.
- Se filtró y aplicó 10 µl de la muestra, 5 µl del estándar quercetina-rutina y 5 µl del estándar de ácido clorogénico.

Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (50:5.5:5.5:13.5)

Detección: Sin tratamiento químico: UV 254 nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm: amarillo, azul o verde.

Reactivo de Productos Naturales (NP:PEG). Fluorescencia intensa en UV-365 nm (Tucux, Mata & Leiva, 2012).

7.4.5.3 Determinación de cumarinas:

Cromatografía en Capa Fina: Se concentró 1 mL de extracto vegetal y se aplicó 20 µL en la cromatoplaca.

Solución estándar: Se preparó una solución de canela en metanol al 1% umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina).

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7), tolueno-éter (1:1 saturado con 10% de ácido acético, 50 mL de tolueno y 50 mL de éter se mezclaron durante 5 minutos con 50 mL de ácido acético al 10%, se filtró y se descartó la fase de abajo, y la mezcla de tolueno-éter se utilizó).

Detección: Sin tratamiento químico; UV 245 nm fluorescencia, todas las cumarinas muestran una intensa fluorescencia azul o verde-azul a UV 365 nm. Spray revelador: Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%, a UV 365 nm fluorescencia azul o verde-azul (Mendizábal, 2011).

7.4.5.4 Determinación de saponinas:

Cromatografía en Capa Fina: Se concentró 1 mL de extracto vegetal y se aplicó 25-40 µL de esta solución en la cromatoplaca.

Solución estándar: Solución al 0.1% en metanol (10 µL).

Fase móvil: Cloroformo-metano/agua (64:50:10), n-butanol-acético-agua (50:10:40).

Detección: Spray revelador: Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo. Reactivo de Liebermann-Burchard: UV-365 o Vis zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides. Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas. Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillenta (Mendizábal, 2011).

7.4.5.5 Determinación de taninos

- Se disolvió 1 g de extracto seco vegetal con etanol al 50%.
- Se evaporó a sequedad y se añadió 25 mL de agua caliente al residuo.
- La solución se agitó con varilla de vidrio y se dejó enfriar.
- Se agregó 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10% y se filtró.
- Se adicionó 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

- Tubo 1: Testigo
- Tubo 2: Se agregó 4 a 5 gotas de gelatina al 1% (p/v).
- Tubo 3: Se agregó 4-5 gotas de gelatina-sal (1% de gelatina y cloruro de sodio al 10%).
- Tubo 4: Se agregó 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10% (p/v).

Se observó la formación de precipitado y/o cambio de coloración. Cloruro férrico: Grisáceo-negro: Catecol; negro-azulado: Pirogalo (Mendizábal, 2011).

7.4.6 Evaluación de la actividad antioxidante:

7.4.6.1 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina:

- Se aplicó 10 μ L de muestra y 5 μ L del estándar antioxidante terc-butilhidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, vitamina C, vitamina E y Trolox en la cromatoplaqueta de silicagel 60F₂₅₄
- Se colocó la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).
- Posteriormente se dejó secar la placa y se asperjó con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (1mg/ml en metanol).

Detección: Se observó una decoloración del reactivo DPPH de morado a incoloro en las bandas respectivas (Marroquín, 2011) (Marroquín, Cruz & Cáceres, 2013).

7.4.6.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) mediante espectrofotometría UV-VIS

Preparación de la solución madre:

- Se pesó 20 mg de extracto seco y se agregó 1 mL de metanol absoluto, luego se introdujo en el sonificador por 30 min, para obtener la solución madre, de esta solución madre se prepararon una serie de diluciones:

No.	Muestra (μL)	Metanol (μL)	Dilución (μL)	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

Solución de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) 150 μM en metanol:

- Se pesó 1.7 mg del reactivo DPPH, disolviéndolo con metanol en un balón aforado de 25 mL, se agitó la solución y se almacenó en un recipiente ámbar. Por ser una solución inestable, se preparó la solución el mismo día, preparando únicamente lo necesario.

Preparación de los pozos de reacción:

- Se utilizó una microplaca de 96 pozos nueva de fondo plano.
- La preparación de las placas se realizó bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar los estándares.
- Se prepararon una serie de pozos con los siguientes reactivos: utilizando pipetas automáticas:

Reactivo/ Pozo	Muestra (μL)	Metanol (μL)	Solución de DPPH (150 μM) (μL)
Blanco control	-	220	-
Control	-	20	200
Blanco de ensayo	20	200	-
Ensayo	20	0	200

Distribución en la placa:

Se realizó la distribución en la placa utilizando el siguiente esquema. En el cual si se cuenta con cuatro diferentes muestras se pueden distribuir de la siguiente manera: En la fila horizontal se colocan las repeticiones (A-C, F-H) y blanco de cada muestra (D-E); y en la fila vertical se colocan cada una de las diluciones de ensayo (1-5,8-12). En la fila 6A y 6H va el blanco de control; en la fila 7A y 7H va el control.

	H	G	F	E	D	C	B	A	
1	D1	D1	D1	B D1	B D1	D1	D1	D1	1
2	D2	D2	D2	B D2	B D2	D2	D2	D2	2
3	D3	D3	D3	B D3	B D3	D3	D3	D3	3
4	D4	D4	D4	B D4	B D4	D4	D4	D4	4
5	D5	D5	D5	B D5	B D5	D5	D5	D5	5
6	BC							BC	6
7	CC							CC	7
8	D1	D1	D1	B D1	B D1	D1	D1	D1	8
9	D2	D2	D2	B D2	B D2	D2	D2	D2	9
10	D3	D3	D3	B D3	B D3	D3	D3	D3	10
11	D4	D4	D4	B D4	B D4	D4	D4	D4	11
12	D5	D5	D5	B D5	B D5	D5	D5	D5	12
	H	G	F	E	D	C	B	A	

*Mx: muestra, D1: dilución 4 mg/mL, D2: dilución 8mg/mL, D3: dilución 12 mg/mL, D4: dilución 16 mg/mL, D5: dilución 20 mg/mL, BC: blanco control, CC: control; B: blanco.

Ya preparados los pozos de reacción, se agitó la microplaca en un vortex para placas durante 30 segundos y luego se incubó a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 min. Por último se colocó en un 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 utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del ensayo})}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

Nota:

Absorbancia del control= absorbancia del control – absorbancia del blanco de control.

Absorbancia del ensayo= absorbancia del ensayo – absorbancia del blanco respectivo.

Luego con los valores de porcentaje de inhibición de la curva de lectura (Y) y la concentración aproximada (X), se procedió a realizar la regresión lineal y calcular el valor de r^2 , el cual debe ser preferiblemente lo más cercano a 1 (0.97-0.99) para tomar como válida la curva realizada, de lo contrario se deberá realizar nuevamente el ensayo, hasta obtener un valor de r^2 adecuado.

Ya con una adecuada ecuación de regresión lineal se determinó la concentración inhibitoria media, según la siguiente formula:

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

(LIPRONAT, 2013).

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

Preparación de solución madre:

- Se pesó 0.1 g de extracto seco y se agregó 5 mL de metanol absoluto. La solución fue introducida en el sonicador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre se preparó una serie de diluciones:

No. tubo	Extracto	Etanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

Nota: De estas disoluciones se encontró el porcentaje de inhibición que presentará (60-70%), con un R^2 0.97-0.99 Fuente: Marroquín, 2011.

Preparación de estándares:

- Trolox 2.5 mM: Se disolvió en etanol, empleando diluciones de 0-15 μ M
- Vitamina C: Se pesó 0.1 g y se disolvió con 5 mL de metanol, preparando diluciones de 0.03-0.04-0.05-0.06-0.07/5 mL
- Vitamina E: Se pesó 10 mg y se disolvió con 5 mL de metanol, preparando diluciones de 0.8-0.9-1-1.1-1.2/5 mL

- Rutina: Se pesó 40 mg y se disolvió en 20 mL de metanol, preparando diluciones de 2-2.5-3-3.5-4/5 mL.
- Quercetina: Se pesó 10 mg y se disolvió en 5 mL de etanol, preparando diluciones de 0.2-0.25-0.3-0.35-0.4/5 mL.
- Ter-butilhidroquinona (TBHQ): Se pesó 10 mg y se disolvió en 5 mL de etanol, preparando diluciones de 0.4-0.5-0.6-0.7-0.8/5 mL.
- Solución de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS+) 7mM en agua: Para preparar 10 mL se pesó 38.41 mg añadiendo agua hasta 10 mL.
- Solución de persulfato de potasio 2.45 mM en agua: Para preparar 5 mL se pesó 3.31 mg añadiendo agua hasta 5 mL.
- Formación del catión (ABTS⁺): Se produce por la reacción de la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.45 mM, una proporción 2:1; dejando la mezcla en un lugar oscuro por al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso. Se preparó un día antes de realizar la prueba.
- Preparación de la solución de uso: La solución ABTS⁺ se diluyó con etanol hasta lograr una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm, equilibrado a 30°C. Se empleó una dilución 1/30 a 1/35 para obtener dicha absorbancia.
- Preparación de los tubos de reacción: Se utilizaron tubos de vidrio con capacidad de 10 mL, previamente lavados, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfirieran sustancias contenidas en el agua de chorro.

Al tener los tubos listos se recubrieron completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C.

- Se prepararon una serie de tubos con los siguientes reactivos:

Reactivo	Control	Ensayo*
Solución de ABTS+	3 mL	3 mL
Dilución de cada muestra	----	30 μ L

Nota: *Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se preparó por triplicado. El blanco de la corrida fue etanol al 95%. Tanto la solución de ABTS+ como la muestra se colocaron anteriormente en la incubadora a 30°C mínimo 30 minutos antes de mezclarlos Fuente: Marroquín, 2011.

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

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

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

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

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

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

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de un extracto representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto. Los valores de TEAC se determinaron por medio de esta fórmula:

$$\Delta A_{\text{trolox}} = (A_{T=0 \text{ Trolox}} - A_{T=6 \text{ Trolox}}) - \Delta A_{\text{solvent}}(0-6 \text{ min})$$

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

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

Donde ΔA = reducción de la absorbancia, A = absorbancia al tiempo dado, m = pendiente de la curva estándar, $[\text{Trolox}]$ = concentración de trolox, d = factor de dilución (Marroquín, 2011) (Marroquín, Cruz & Cáceres, 2013).

7.4.7 Cuantificación de fenoles totales (técnica micrométrica)

Preparación de las soluciones:

Solución de Carbonato de Sodio 2%:

- Se pesó en la balanza analítica 2 g de carbonato de sodio anhidro con una espátula plástica.
- Se disolvió en 60 mL de agua desmineralizada hasta disolver la sal; se empleó el sonificador para facilitar el proceso.
- Ya disuelta la sal se trasvasó cuantitativamente a un balón aforado de 100 mL y se aforó con agua desmineralizada.

Solución de ácido gálico anhidro (C₇H₆O₅):

- Se pesó 0.500 g de ácido gálico anhidro en una balanza analítica.
- Se disolvió en 10 mL de etanol; aforando con agua desmineralizada en un balón de 100 mL. Colocando la solución en un frasco color ámbar.
- Realizando la curva de ácido gálico con las siguientes concentraciones 50, 250, 450, 650, 850, 1050 y 1250 µM en etanol.

Extracto:

- Se pesó 0.1 g de extracto y se disolvió en 5 mL de metanol, de ser necesario emplear 20 µL de DMSO (dimetil-sulfoxido) para extractos apolares.
- De esta solución madre se preparó una dilución de prueba, la cual se espera que tenga una absorbancia que este dentro de la curva de ácido gálico, dicha solución puede ser la utilizada en la determinación de actividad antioxidante por DPPH, la cual dio un porcentaje de inhibición entre el 50-70%.

Preparación de los pozos de la placa de reacción y de la curva de lectura:

- Se utilizó una microplaca de 96 pozos nueva de fondo plano.
- La preparación de las placas se realizó bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar los estándares.
- Se prepararon una serie de pozos con los siguientes reactivos: utilizando pipetas automáticas:

Reactivo/pozo	Muestra/Std	H ₂ O	Reactivo de Folin	Na ₂ CO ₃ al 2%
Blanco control	-	25 µL	50 µL	200 µL
Ensayo	25 µL	-	50 µL	200 µL

Distribución en la placa:

En una misma placa se pueden leer la curva de ácido gálico y varias muestras. Siguiendo el siguiente esquema de distribución.

		Diferentes diluciones de estándar									
		H	G	F	E	D	C	B	A		
Curva Ac. Gálico	repeficiones	1									1
		2									2
		3									3
		4									4
		5									5
		6									6
Repeficiones de muestra	muestra	7	BC							BC	7
		8									8
		9									9
		10									10
		11									11
		12									12

Dilución de cada muestra a ensayar

Ya sembrada la muestra por triplicado y el blanco se agito la placa en un vortex durante 30 segundos, luego se incubó a temperatura ambiente protegiéndola de la luz durante 2 horas y se leyó en un lector de microplacas de 96 pozos a una longitud de onda de 630 nm.

- Cálculo de fenoles totales:

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

µg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto:

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

7.4.8 Determinación de la actividad antioxidante por el método micrométrico de la reducción de hierro (FRAP)

Preparación de la solución madre del extracto:

- Se pesaron 20 mg de extracto seco y se agregó 1 mL de metanol
- La solución fue introducida en el sonificador por 30 minutos, de esta solución madre se preparó 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

Preparación de la solución madre de los estándares y diluciones:

- Se prepararon las soluciones madre y diluciones de cada estándar, según el siguiente cuadro:

Estándar	Solución madre	No.	Dilución	Concentración (mg/mL)
Vitamina C	20 mg/1 mL MetOH	D-1	5 µl/5 mL MetOH	0.02
		D-2	15 µl/5 mL MetOH	0.06
		D-3	25 µl/5 mL MetOH	0.10
		D-4	35 µl/5 mL MetOH	0.14
		D-5	45 µl/5 mL MetOH	0.18
Quercetina	2 mg/1 mL MetOH	D-1	20 µl/5 mL MetOH	0.008
		D-2	60 µl/5 mL MetOH	0.024
		D-3	100 µl/5 mL MetOH	0.040
		D-4	140 µl/5 mL MetOH	0.056
		D-5	180 µl/5 mL MetOH	0.072
Rutina	20 mg/1 mL	D-1	20 µl/5 mL MetOH	0.08

	MetOH	D-2	40 μ l/5 mL MetOH	0.16
		D-3	60 μ l/5 mL MetOH	0.24
		D-4	80 μ l/5 mL MetOH	0.32
		D-5	100 μ l/5 mL MetOH	0.40
Trolox	10 mg/5 mL	D-1	100 μ l/5 mL MetOH	0.04
	MetOH	D-2	250 μ l/5 mL MetOH	0.10
		D-3	400 μ l/ 5 mL MetOH	0.16
		D-4	550 μ l/5 mL MetOH	0.22
		D-5	700 μ l/5 mL MetOH	0.28
Sulfato ferroso	190 mg/250 mL agua	D-1	500 μ l/10 mL agua	0.0380
		D-2	1700 μ l/10 mL agua	0.1292
		D-3	2900 μ l/10 mL agua	0.2204
		D-4	4100 μ l/10 mL agua	0.3116
		D-5	5300 μ l/10 mL agua	0.4028
		D-6	6500 μ l/10 mL agua	0.4940
		D-7	7700 μ l/10 mL agua	0.5852
		D-8	8900 μ l/10 mL agua	0.6764

Preparación de la soluciones para solución FRAP:

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

Solución de ácido acético	231.5 mL
Solución de acetato de sodio	18.5 mL
Agua desmineralizada	250.0 mL

- Solución FRAP: Se mezclaron 1.5 mL de FeCl_3 1%, 1 mL de ferrocianuro de potasio 1% y 15 mL de buffer de acetato pH 3.6. Agitando e incubando a 37°C durante 20 minutos.

Preparación de los estándares y muestras para ser analizados:

- Se mezcló 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). Mezclando 10 segundos en el vortex y luego centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos.

Preparación de los pozos de reacción:

- Se utilizó una microplaca de 96 pozos nueva de fondo plano.
- La preparación de las placas se realizó bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar los estándares.
- Se prepararon una serie de pozos con los siguientes reactivos: utilizando pipetas automáticas:

Pozo	Reactivo		
	Estándar	Agua	Solución FRAP
Blanco de Ensayo	-----	50 µL	100 µL
Estándar	50 µL	-----	100 µL
Muestra	50 µL	-----	100 µL

- La microplaca se dejó reposar durante 60 minutos.
- Luego se colocó en el lector de placas ELISA a 630 nm. Si hubiera formación de precipitado, agitar en el vortex cuidadosamente.

(LIPRONAT, 2013).

Cálculos:

Concentración en base a la curva: mg/mL

Absorbancia – intersección/ pendiente

mg del estándar/ g del extracto

(Concentración en base a la curva) (Factor de dilución)

(Peso de la alícuota)

7.5 Diseño de la investigación:

Se realizó un estudio cuantitativo de tipo exploratorio el cual finalizó como descriptivo.

7.6 Diseño estadístico:

Se elaboró un análisis descriptivo, realizando tres réplicas del extracto etanólico de Matilisguate (*Tabebuia rosea*) de los siguientes ensayos: Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH, ABTS, FRAP y la cuantificación de fenoles totales. Para los cuales se calculó las medidas de tendencia central (media) y medidas de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación). Donde se realizó una comparación descriptiva entre el extracto y los estándares. Comparando el valor de CI_{50} del extracto en la prueba de DPPH y ABTS. La cantidad de fenoles totales expresados como mg de ácido gálico y los mg del ion ferroso formados en la determinación de la actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP).

8. RESULTADOS

8.1 Recolección e identificación botánica:

Se recolectó 500 gramos de materia vegetal (Matilisguate) en el municipio de Mixco, Guatemala, el cual fue identificado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (BIGU), al cual se le asignó el número de registro 74778.

Tabla No.1 Recolección de la materia vegetal

Nombre científico	<i>Tabebuia rosea</i> (Bertol.)DC.
Nombre común	Matilisguate
Parte de la planta recolectada	Tallo, hojas y flores
Cantidad de materia vegetal recolectada	500 gramos
Estado	Fresco
Procedencia	Municipio de Mixco, Guatemala
Coordenadas geográficas	Latitud: 14°39'53.0"N Longitud: 90°34'51.2"O
Número de registro BIGU	74778

Fuente: Datos experimentales (Ver anexo no. 1).

8.2 Obtención de extractos por medio de percolación y concentración con rotavapor:

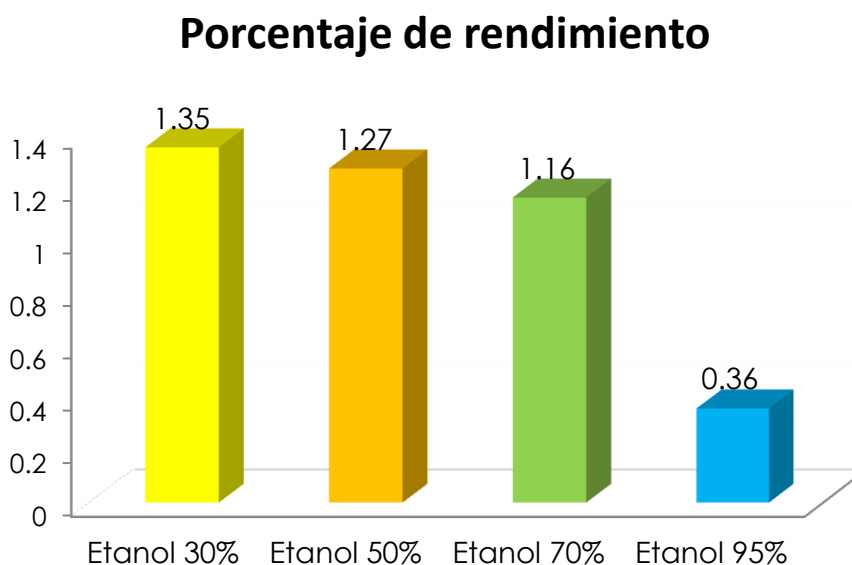
En la tabla No.2 se puede observar que se utilizaron 200 gramos de hojas de Matilisguate (*Tabebuia rosea*) previamente secadas y trituradas para su posterior extracción con 2 L de etanol al 50%, donde se obtuvo un buen porcentaje de rendimiento de 32.88%.

Tabla No.2 Proceso de extracción por percolador y rotavapor.

Nombre científico	<i>Tabebuia rosea</i> (Bertol.)DC.
Nombre común	Matilisguate
Material vegetal (g)	200
Porcentaje de humedad (%)	8.37
Cantidad de etanol al 50% (L)	2.0
Extracto seco (g)	31.96
Rendimiento de extracción	32.88

Fuente: Datos experimentales (Ver anexo No. 2, 3,4).

En la Grafica no.1 se muestran los porcentajes de extracción obtenidos en la prueba del mejor solvente con etanol a diferentes concentraciones (30, 50, 70 y 95%), en el cual se obtuvo un mayor porcentaje de rendimiento para etanol al 30% (1.35%), pero se optó por utilizar etanol al 50% (1.27%), ya que no hay una diferencia significativa en cuanto a la cantidad de solidos totales que pueda extraer.

Gráfica no.1 Porcentajes de rendimiento para la prueba de mejor solvente.

Fuente: Datos experimentales.

8.3 Tamizaje fitoquímico en el extracto etanólico de hojas de Matilisguate (*Tabebuia rosea*):

En la tabla no.3 se describen las pruebas cualitativas realizadas en el tamizaje fitoquímico, en primer lugar se realizó la determinación de taninos, donde se obtuvo un resultado negativo, ya que ninguno de los tubos presentó un cambio de coloración, formación de turbidez o precipitado. Para las demás pruebas se realizó por medio de cromatografía en capa fina, donde se comparó el Rf y la coloración de cada banda revelada.

Para la prueba de alcaloides el extracto de Matilisguate no presentó ninguna banda al ser revelada con el reactivo Dragendorff, al igual que en la prueba de cumarinas donde el extracto de *T. rosea* presentó 2 bandas de color anaranjado las cuales no corresponden a la coloración específica (verde-azul), por lo que se descartaron dichos metabolitos.

En la CCF de Flavonoides se identificó el metabolito rutina, además de otras 3 bandas que no fue posible identificar por no contar con los estándares correctos. También dio positivo para la CCF de saponinas y antocianinas.

Tabla no. 3 Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Tabebuia rosea*.

TAMIZAJE FITOQUIMICO	Estándares	Resultado	Características esperadas
Taninos	Testigo	NA	Sin cambio
	Gelatina 1%	-	Cambio de color con
	Gelatina 1%/NaCl 10%	-	presencia de turbidez o
	FeCl ₃ 10%	-	precipitado.
Alcaloides	Atropina	Rf 0.46	Color café
	Papaverina	Rf 0.75	Color anaranjado
	Extracto <i>T. rosea</i>	Rf 0	NA
Flavonoides	Quercitina	Rf 0.90	Amarillo
	Rutina	Rf 0.75	Café
	Ácido clorogénico	Rf 0.56	Celeste
	Extracto <i>T. rosea</i>	Rf 0.31	Celeste
		0.40	Celeste
		0.53	Celeste
	0.75	Café	
Antocianinas	Rojo sudan	Rf 0.94	Rojo
	Extracto <i>T. rosea</i>	Rf 0.63	Rojo
		0.75	Morado
Saponinas	Saponinas 0.2%	Rf 0.88	Amarillo
	Saponinas 0.5%	Rf 0.81	Amarillo
	Extracto <i>T. rosea</i>	Rf 0.81	Amarillo
Cumarinas	Cumarinas 0.1%	Rf 0.60	Verde
	Cumarinas 1%	Rf 0.60	Verde
	Extracto <i>T. rosea</i>	Rf 0.31	Anaranjado
		0.40	Anaranjado

Fuente: Datos experimentales (Ver anexo no. 5-10).

8.4 Determinación de la actividad antioxidante:

Se determinó la actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de hojas de Matiliguatle (*T. rosea*) por medio de una prueba macrométrica (ABTS) y tres pruebas micrométricas (DPHH, Fenoles totales y FRAP).

En la tabla No.4 se observan los resultados obtenidos para la determinación de la actividad antioxidante por medio de cromatografía en capa fina con revelador DPPH, debido a que los resultados fueron positivos, se procedió a la prueba micrométrica para determinar cuantitativamente su actividad, para la cuantificación de dicha actividad, se procedió a elaborar diferentes diluciones del extracto etanólico de *T. rosea* en las cuales se presentará un porcentaje de inhibición (50-60%).

Se comenzó a partir de 50, 100, 150, 200 y 250 μL de la muestra, en la cual se obtuvo un porcentaje de inhibición muy alto, ya que las diluciones estaban muy concentradas. Por lo que se diluyeron a (5, 10, 15, 20, 25 μL muestra/ 250 μL de solución). En las cuales se presentó un porcentaje de inhibición de 68.47% a una concentración de 1.16 ± 0.05 mg/ml (CI_{50}).

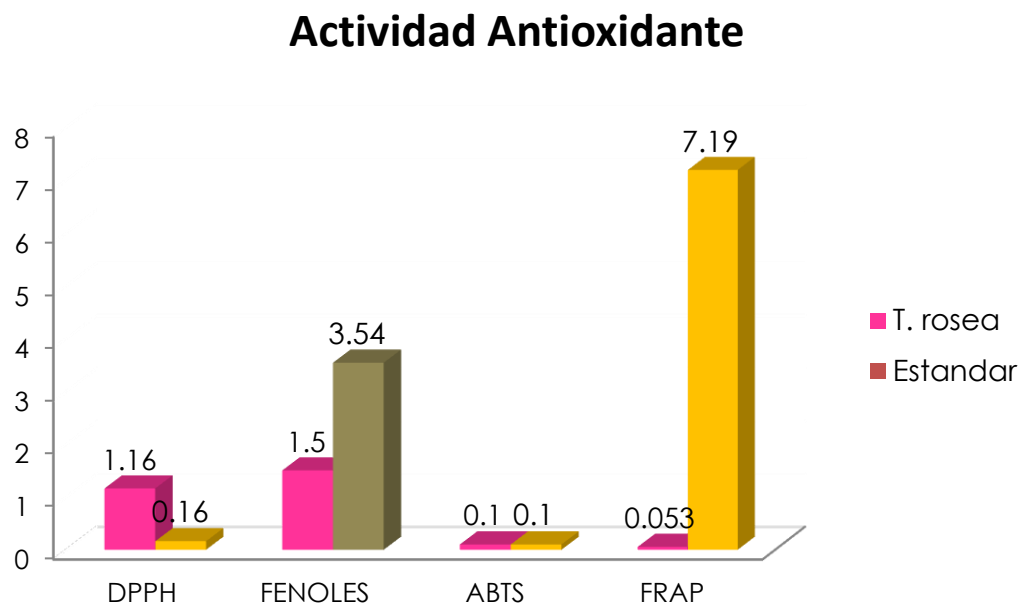
Se cuantificó la cantidad de fenoles totales presentes en el extracto de *Tabebuia rosea* partiendo de la dilución de DPPH (15/250 μL), donde se obtuvo 1.50 ± 0.04 μg Equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco. Así mismo se realizó la prueba macrométrica de ABTS partiendo de la misma dilución de DPPH, pero debido a que el porcentaje de inhibición fue muy bajo, se concentraron las diluciones (15, 21, 27, 33, 39 μL mx/250 μL), presentando un porcentaje de inhibición de 68.64% a una concentración de 0.10 mg/ml (CI_{50}). Por último se realizó el ensayo de reducción de hierro (FRAP), donde se determinó que a una concentración de 1.6 mg/ml del extracto, se forman 0.053 ± 0.05 miligramos del ion ferroso por cada gramo del extracto etanólico de *T. rosea*.

Tabla No.4 Determinación de la actividad antioxidante en el extracto etanólico de Matiliguatate (*Tabebuia rosea*).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE						
	Cromatografía en capa fina DPPH	DPPH Cl ₅₀ (mg/ml)	Fenoles totales µg de ácido gálico/g de extracto	ABTS (Cl ₅₀ (mg/ml)	FRAP (mg Fe ⁺² formado/g extracto)	
Extracto etanólico de <i>Tabebuia rosea</i>	+	1.16 ± 0.05	1.50 ± 0.04	0.10 ± 0.00	0.053 ± 0.05	
Estándar de Rutina	+	0.16 ± 0.01	4.98	0.84 ± 0.04	1.41 ± 0.27	
Estándar de Quercetina	+	0.07 ± 0.00	20.74	0.10 ± 0.00	7.73 ± 0.10	
Estándar de Trolox	+	0.11 ± 0.00	3.54	0.29 ± 0.00	0.36 ± 0.02	
Estándar de TBHQ	+	0.11 ± 0.00	5.63	0.19 ± 0.01	---	
Estándar de Vitamina C	---	0.08 ± 0.01	3.63	0.21 ± 0.01	1.62 ± 0.07	

Fuente: Datos experimentales (Ver anexo 11-19)

Grafica no.2 Comparación de la actividad antioxidante presentada en el extracto de *T. rosea* en los diferentes métodos empleados.



Fuente: Datos experimentales.

En la Grafica no. 2 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas para la determinación de la actividad antioxidante (DPPH, Fenoles totales, ABTS y FRAP), en el extracto de Matilisguate (*T. rosea*), en la cual únicamente para la prueba de ABTS se obtuvo un IC_{50} equivalente al estándar de quercetina con un CI_{50} de 0.10 mg/ml.

9. DISCUSIÓN

Se recolectó las hojas de Matiliguatate (*Tabebuia rosea*) en el municipio de Mixco, Guatemala, realizando la identificación botánica de la especie en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (BIGU). Las hojas de Matiliguatate se tamizaron y secaron en un horno a 40°C para obtener un porcentaje de humedad <10%, el cual se entiende como la cantidad de agua libre que contiene el material vegetal para su buena conservación, ya que si sobrepasa este límite, hay una mayor posibilidad de que los principios activos de la planta puedan sufrir degradación por medio de hidrólisis y el crecimiento de microorganismos (Tucux, Mata & Leiva, 2012). Obteniendo un porcentaje de humedad aceptable de 8.37%.

Para la presente investigación se utilizó como disolvente de extracción etanol al 50%, después de realizada la prueba del mejor solvente, debido a que la diferencia en la concentración del solvente delimita el tipo de metabolito secundario a extraer, dependiendo de la polaridad del mismo, ya que a una concentración de etanol al 95% se extraerán metabolitos con menor polaridad que los extraídos con etanol al 50%.

Los metabolitos secundarios presentes en las plantas, actúan por diferentes mecanismos de acción que de forma sinérgica ayudan a inhibir las reacciones oxidativas a nivel biológico. Es decir que a mayor cantidad de metabolitos secundarios, mayor actividad antioxidante presentará un extracto. Por lo que se realizó el tamizaje fitoquímico por medio de pruebas cualitativas del extracto etanólico de Matiliguatate para determinar Alcaloides; son el grupo de principios activos de gran actividad farmacológica para el estudio de plantas medicinales. Taninos; poseen actividad antibacteriana y anticancerígena. Flavonoides y Antocianinas; estos inhiben la agregación plaquetaria, funcionan como protectores hepáticos, diuréticos, espasmolíticos, antiinflamatorios y antimicrobianos. Saponinas; las cuales poseen propiedades hemolíticas y tensioactivas y Cumarinas; estas presentan acción antiespasmódica, vasodilatadora, antiinflamatoria y vasoprotectora (Tucux, et.al, 2012).

Se realizó el tamizaje fitoquímico al extracto etanólico de Matilisguate, en el cual se identificaron los metabolitos; flavonoides (rutina), antocianinas y saponinas, las cuales no fue posible identificar en la muestra por no contar con los estándares adecuados para la identificación del mismo. Según estudios previos realizados en la Universidad de Pereira, Colombia (García & López, 2015) se han determinado en el extracto etanólico de hojas de Matilisguate (alcaloides, flavonoides y taninos), en el extracto metanólico de hojas (alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides) y en el extracto clorofórmico de la corteza interna; cumarinas, flavonoides, alcaloides y saponinas.

Por lo que al comparar los resultados obtenidos con los de la investigación, se puede observar que para el extracto etanólico únicamente se obtuvieron los mismos resultados para flavonoides, así mismo se observa una mejor extracción de los metabolitos secundarios utilizando solventes más apolares, esto se puede deber a que las plantas obtienen diferentes características según el área de cultivo, época de colecta, propiedades del suelo, entre otros.

Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de Matilisguate (*T. rosea*) por medio de una prueba macrométrica (ABTS) y tres pruebas micrométricas (DPHH, Fenoles totales y FRAP). Donde las primeras dos miden la capacidad de un extracto de neutralizar los radicales libres formados, la prueba de fenoles totales nos ayuda a determinar indirectamente la actividad antioxidante al ser uno de los metabolitos más abundantes en las plantas, a los cuales se les atribuye dicha actividad y la prueba de FRAP que mide la capacidad de reducir el ion férrico a ferroso.

En la Tabla No.4 se describe los resultados obtenidos en las pruebas para la evaluación de la actividad antioxidante. En primer lugar se realizó la evaluación cualitativa de dicha actividad por medio de cromatografía en capa fina con revelador DPPH, debido a que los resultados para el extracto de Matilisguate fueron positivos respecto a los estándares utilizados (Quercetina, Rutina, Trolox y TBHQ)

Los cuales son en su mayoría metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas y presentan actividad antioxidante significativa, se procedió a la prueba micrométrica para determinar cuantitativamente su actividad.

El método cuantitativo para la determinación de la actividad antioxidante por el método micrométrico de DPPH; consiste en que este radical tiene un electrón desapareado, de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida en un lector de microplacas ELISA a 517 nm. Expresándose en base al valor de CI_{50} , el cual indica la cantidad de extracto seco que es capaz de disminuir el 50% de los radicales que forman la oxidación, donde un valor menor en esta concentración indica una mayor capacidad antioxidante presentada por el extracto.

Presentando el extracto de Matilisguate un porcentaje de inhibición de 68.47% a una concentración de 1.16 ± 0.05 mg/ml (CI_{50}), al ser comparado el CI_{50} del extracto respecto a los estándares (anexo no. 13). Se puede observar que el estándar de Quercetina es el que mejor porcentaje de inhibición tiene con un CI_{50} de 0.075 mg/ml, seguido de la Vitamina C (0.090 mg/ml), TBHQ (0.115 mg/ml), Trolox (0.118 mg/ml) y Rutina (0.167 mg/ml). Por lo que el extracto etanólico de *T. rosea* presenta una actividad menor respecto a los estándares, ya que se necesita más de 1 mg/ml del extracto para producir el 50% de inhibición del radical DPPH.

Según un estudio presentado por Ospina, et.al. (2013), se reporta que el extracto etanólico de la corteza interna de *T. rosea* presenta un CI_{50} de 1.504 mg/mL, el cual es bastante similar al obtenido en esta investigación (1.16 mg/mL).

La prueba micrométrica de fenoles totales; se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier fenol, formando complejos fosfomolibdicofosfotúngstico.

La transferencia de electrones a pH básico reduce estos compuestos en óxidos, los cuales son cromógenos de color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Córdova et.al, 2009). En esta investigación se obtuvo una cantidad de fenoles totales bastante baja 1.50 ± 0.04 μg Equivalentes de ácido gálico por miligramo de extracto seco, basándose en la curva de calibración de ácido gálico como referencia, ya que es un ácido fenólico que se encuentra presente en las especies vegetales, en su forma libre formando parte de la molécula de taninos.

Al ser comparados los μg Equivalentes de ácido gálico del extracto contra los estándares (anexo no. 15), se observa que el extracto etanólico de Matiliguatate presenta una menor cantidad de fenoles totales respecto a Trolox que es el estándar con menor cantidad de fenoles totales (3.54 $\mu\text{g/g}$) y mucho menor que quercetina con una cantidad mayor de fenoles totales por gramo de estándar (20.74 $\mu\text{g/g}$).

Así mismo se realizó la prueba macrométrica para la determinación de compuestos apolares por medio del método de ABTS; el cual es generado a partir de una reacción química (solución stock de ABTS con persulfato de potasio) con una coloración verde-azulado, el cual al reaccionar con el extracto se torna incolora si esta presenta actividad antioxidante capaz de oxidarlo, expresándose también en base al Cl_{50} .

Obteniendo un porcentaje de inhibición de 68.64% a una concentración de 0.1084 mg/ml (Cl_{50}). Comparando dicho resultado con los estándares (anexo No.17), se observa que el Cl_{50} del extracto es equivalente al estándar de Quercetina (0.1048 mg/ml) por lo que se le puede atribuir una actividad antioxidante significativa a las moléculas apolares del extracto de Matiliguatate.

Por último se determinó la actividad antioxidante por el método micrométrico de la reducción de hierro (FRAP); este es un método indirecto, ya que la presencia de radicales libres producen la pérdida o aparición de un reactivo y por lo tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal.

Este método no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones, evaluando la capacidad de un extracto de reducir el ion férrico (Fe^{+3}) al ion ferroso (Fe^{+2}), formando un complejo azul.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que a una concentración de 1.6 mg/ml del extracto, se forman 0.053 ± 0.05 miligramos del ion ferroso por cada gramo del extracto etanólico de Matiliguat, así mismo se realizaron las equivalencias del extracto en cuanto a los estándares, para cuantificar cuantos miligramos del extracto se necesitan para producir la misma potencia reductora de extracto de Matiliguat (0.053 mg Fe^{+2}). Dando como resultado que cada gramo de extracto equivale a 21.48 mg de vitamina C, 7.19 mg de quercetina, 20.54 mg de trolox y 29.61 mg de rutina (anexo No. 19).

El extracto etanólico de Matiliguat no presenta mayor formación de ion ferroso a la presentada por los estándares empleados, quienes si presentan una mayor actividad, ya que a menor reducción del ion ferroso, menor concentración habrá del mismo y por lo tanto menor actividad antioxidante presentara el extracto. Posiblemente se puede atribuir dicho resultado, a que el método implica la determinación del poder reductor del extracto bajo condiciones hidrofílicas.

Es importante mencionar que el extracto etanólico de Matiliguat (*T. rosea*), presentó mejor actividad antioxidante en sus componentes con características más apolares, debido a que en la prueba macrométrica del reactivo ABTS presentó una actividad significativa con un CI_{50} equivalente al estándar de Quercetina, lo cual genera valiosa información para futuras aplicaciones.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 La mayor cantidad de sólidos totales se obtuvo empleado etanol al 50%, el cual permitió obtener un porcentaje de extracción de 32.88%.
- 10.2 Se identificó por medio de tamizaje fitoquímico en el extracto etanólico de *T. rosea*; Flavonoides, antocianinas y saponinas.
- 10.3 El extracto etanólico de *T. rosea* presentó actividad antioxidante por medio del método de DPPH en cromatografía en capa fina.
- 10.4 Se determinó la actividad antioxidante por medio del reactivo DPPH, donde el extracto de *T. rosea* presentó un CI_{50} de 1.16 ± 0.05 mg/ml.
- 10.5 Se cuantificó la cantidad de fenoles totales presentes en la planta obteniendo 1.50 ± 0.04 μ g ácido gálico/g extracto.
- 10.6 Se determinó la actividad antioxidante de los compuestos apolares del extracto de *T. rosea*, por medio del reactivo ABTS, obteniendo un CI_{50} de 0.10 mg/ml.
- 10.7 Se determinó en la prueba de ABTS, que el extracto de *T. rosea* (0.1084 mg/ml) presenta una actividad equivalente al estándar de Quercetina (0.1048 mg/ml).
- 10.8 Se cuantificó el poder antioxidante por medio del ion férrico (FRAP) en el extracto de *T. rosea*, obteniendo una reducción de 0.053 mg Fe^{+2} /g.
- 10.9 Los compuestos apolares del extracto de *T. rosea* presentan una mejor actividad antioxidante que los compuestos más polares.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar fraccionamiento y aislamiento de compuestos químicos presentes en *T. rosea*.
- 11.2 Analizar otra parte del árbol de *T. rosea* como las flores y/o corteza. Para determinar si la distribución de metabolitos secundarios es la misma y presenta actividad antioxidante.
- 11.3 Evaluar el uso de *Tabebuia rosea* como preservante de productos cosméticos y alimenticios.

12. REFERENCIAS

Alomar, M. (2014). *Antioxidantes: captadores de radicales libres o sinónimo de salud?*. Recuperado de <http://www.soarme.com/archivos/1324143195.pdf>

Alonso, J. (2000). *El Lapachol*. Revista de fitoterapia. Argentina. 1(2). 08-112.

Arbeláez, J., Acevedo, J., Jaramillo, R. & Yepes, P. (2011). *Metabolitos secundarios en el guayacán amarillo y el guayacán rosado*. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. XVII (47), 299-301.

Castillo, F. Estrada, H. Rodríguez, E. Torrenegra, R. & Medina, J. (1996). *Estudio químico preliminar del extracto con diclorometano de la corteza del tallo de Tabebuia billbergii*. Revista Colombiana de Química, Bogotá. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Venezuela y Universidad Javeriana Santa Fe, Bogotá. Colombia. 25 (2). 37-38.

Córdova, D. Dardón, R. Gonzales, J. & Menéndez, M. (2009). *Determinación y cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutracéuticos*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Calderón, P. (2007). *Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Conabio. (s.f.). (2012). *Tabebuia rosea*. Recuperado de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/11-bigno7m.pdf

Chávez, F. Aranda, M. García, A. & Pastene, E. (2011). *Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (Persea americana var. Hass) inhiben la ureasa de Helicobacter pylori*. Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Departamento de Farmacia. Facultad de Farmacia. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 10 (3), 268.

García, L. & López, J. (2015). *Fraccionamiento del extracto en cloroformo obtenido a partir de la corteza interna de Tabebuia rosea (Bertol.) DC*. Facultad de Tecnología. Escuela de Química. Universidad tecnológica de Pereira. Venezuela. 27-32.

Gómez, S. & Tabares, V. (2013). *Actividad anti-inflamatoria in vitro de los extractos y fracciones obtenidas de la corteza interna de Tabebuia chrysantha (JACQ.) G.NICHOLSON*. Tesis de licenciatura. Facultad de tecnología, Escuela de Química. Universidad tecnológica de Pereira. Colombia.

Guerra, J. (2001). *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamiento antioxidantes*. Servicio de Medicina Interna del Hospital de Navarra. Madrid, España. 18 (6), 327-331.

Jáuregui, M., Carrillo, M. & Romo, F. (2011). *Carotenoides y su función antioxidante: Revisión*. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F. 61 (3), 233-236.

Juárez, K. (2006). *Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de romero (Rosmarinus officinalis) en aceite de girasol, maleato de aceite de soya, lanolina y manteca de cacao; utilizadas en fase oleosa de emulsiones cosméticas*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Kim, J. Lee, S. Myung, C. Lee, K. Hyun, S. Park, Y. Chang, S. & Hwang, J. (2015). *Melanogenesis inhibition of β -lapachone, a natural product from *Tabebuia avellanedae*, with effective in vivo lightening potency*. Department of Genetic Engineering and Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin, South Korea.

LIPRONAT. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por el método micrométrico del DPPH*. Laboratorio de investigación de productos naturales. Universidad San Carlos de Guatemala.

LIPRONAT. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por el método micrométrico de la reducción de hierro (FRAP)*. Laboratorio de investigación de productos naturales. Universidad San Carlos de Guatemala.

Lira, O. (1996). *Efecto inhibitorio del matilisguate (*Tabebuia rosea*), sobre el crecimiento de microorganismos carogénicos, *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, IN VITRO*. Tesis de licenciatura, Facultad de Odontología. Universidad San Carlos de Guatemala.

Marroquín, M. (2011). *Comparación de la Actividad Antioxidante, Detección y Cuantificación de Flavonoides y Compuestos Fenólicos en tres Especies de la Familia Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora ligularis*)*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Marroquín, M. Cruz, S & Cáceres, A. (2012). *Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Three Species of Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala*. Proc. IS on Medicinal and Aromatic Plants – IMAPS 2010 and “History of Mayan Ethnopharmacology” – IMAPS 2011. 93-95.

Mendizábal, C. (2011). *Caracterización fitoquímica y evaluación biológica de Solamun hartwegii (Nombre común lavaplatos)*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Mercado, G. Carrillo, L. Medrano, A. Días, J. & Parrilla, E. (2013). *Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México*. Nutrición Hospitalaria. Departamento en Ciencias Químico Biológicas. Departamento en Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Chihuahua. México. 28 (1), 38-40.

Ospina, L., Castro, J, Ocampo, Y., Pájaro, I. & Díaz, F. (2013). *Actividad Antiinflamatoria, Antioxidante y Antibacteriana de dos especies del género Tabebuia*. Revista cubana, Universidad de Cartagena. Colombia. 18 (1), 34-46.

Padilla, F., Rincón, A. & Rached, L. (2008). *Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces*. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Venezuela. 58 (3), 303-304.

Ramalakshmi, S & Muthuchelian, K. (2011). *Análisis de los componentes bioactivos del extracto etanólico de hojas maduras de Tabebuia rosea, por cromatografía de gases y espectrometría de masas*. Universidad de Madurai Kamaraj, India.

Reis, F. Bonfa, I. Cavalcante, R. Okoba, D. Vasconcelos, S. Candeloro, L. Filiu, W. Monreal, A. Silva, V. Rita, P. Carollo, C. & Kadri, M. (2014). *Tabebuia aurea decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of Bothrops neuwiedi*. Journal of Ethnopharmacology. 158. 352-354.

Roca, J. Pinzon, J. Racedo, S & Utria, G. (2015). *Milagro rosado*. Laboratorio de plantas medicinales. Universidad del Norte de Barranquilla. Colombia. 8-12.

Sellés, A. (2011). *Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades*. Revista Cubana Salud Pública. La Habana, cuba. 37 (5), 644-652.

Sinchi. (2012). Roble, *Tabebuia rosea*. Instituto amazónico de investigaciones científicas. Recuperado de <http://www.sinchi.org.co/images/pdf/dfpublicaciones/2012/fichas/Roble.pdf>

Tucux, V. Mata, M & Leiva, B. (2012). *Evaluación comparativa dl contenido fitoquímico y actividad biológica in vitro de Litsea guatemalensis colectada en dos regiones y épocas diferentes en Guatemala*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad San Carlos de Guatemala.

Quiñonez, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. 27 (1), 76-77.

UFM. (2007). *Plantas Bignoniaceae*. Universidad Francisco Marroquín. Recuperado de <http://arboretum.ufm.edu/familia-de-planta/bignoniaceae/>

Vásquez, J. (2007). *Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de Helioctopus terebinthinaceus*. Tesis de Ingeniería en alimentos. Universidad Tecnológica de la mixteca. México.

Youngson, R. (2003). *Antioxidantes y radicales libres*. España. Editorial vida natural. 15-20,113-114.

Zapater, A., Califano, L., Castillo, E., Quiroga, M. & Lozano, E. (2009). *Las especies nativas y exóticas de Tabebuia y Handroanthus (Tecomeae, Bignoniaceae) en Argentina*. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 47 (1), 2-3.

13. ANEXOS:

1. Fichas técnicas de las especies en estudio

Tabebuia rosea

Nombres comunes:

Flor morada, matilishuate, matiliguate, macuelizo, palo de rosa, falso roble, maculís (Sinchi, 2012. Conabio, 2012)

Esquema:



Descripción Botánica:

Árbol caducifolio, de 15 a 25 m (hasta 30 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 1 m. los frutos son cápsulas estrechas de 22 a 38 cm de largo por 0.9 a 1.5 cm de ancho, lisas, con 2 suturas laterales, péndulas, pardo oscuras, conteniendo numerosas semillas.

Hojas: decusadas, digitado compuestas, de 10 a 35 cm de largo, incluyendo el pecíolo. Con 5 folíolos, los dos inferiores más pequeños, el terminal más grande, lanceolados o elípticos, con el margen entero.

Corteza: Externa fisurada y suberificada, de aspecto compacto, con las fisuras longitudinales más o menos superficiales que se entrelazan formando un retículo; color café grisáceo oscuro a amarillento. Interna de color claro a crema rosado, fibrosa, con sabor amargo a agridulce. Grosor total: 16 a 30 mm.

Tronco: Eventualmente el árbol llega a formar un excelente fuste sobre todo si hay sombra lateral de la misma especie. Tronco derecho, a veces ligeramente acanalado.

Flores: Panículas cortas con las ramas cimosas, axilares, de hasta de 15 cm de largo, escamosas. Cáliz blanco verdoso, tubular, de 2 a 2.5 cm de largo; corola de 7 a 10 cm de largo, tubular en la base y expandida en la parte superior en un limbo bilabiado; tubo de la corola de color blanco; lóbulos color lila a rosado pálido o púrpura rojizo.

Semilla: Semillas aladas y delgadas, blanquecinas, de 2 a 3 cm de largo, las alas hialino-membranáceas, conspicuamente demarcadas del cuerpo de la semilla. La especie es de rápida germinación; se inicia a los 7 días y se completa a los 27 días, obteniéndose un 75 % de germinación a los 12 días. El Porcentaje de germinación: 80 % (sin pretratamiento). El Número de semillas por kilogramo: 35,000 a 50,000. El Tratamiento pregerminativo consiste en inmersión en agua por 24 horas. (Sinchi, 2012)

Hábitat:

Se extiende del sur de México al norte de Venezuela y el oeste de los Andes hasta las costas de Ecuador. Presente en las Antillas. Crece en especialmente en bosques pantanosos o inundables y sitios planos. Se presentan indiferentemente en suelos de origen calizo, ígneo o aluvial, pero en general con algunos problemas de drenaje.

Usos Medicinales Atribuidos:

La infusión de las hojas se utiliza como febrífuga, aceleradora del parto. La corteza cocida sirve para la diabetes, paludismo, tifoidea, parásitos. (Conabio, 2012)

Otros Usos Populares:

La madera es utilizada en decoración de interiores de muebles finos, pisos, gabinetes, chapas decorativas, construcción de botes, ebanistería, ruedas para carretas, artesanías, cajas y embalajes (3). Es utilizada como ornamental, en parques, jardines y linderos de propiedades. Asimismo es utilizada como planta de sombra de cultivos en las zonas bajas de la región tropical. (Conabio, 2012)

Composición Química:

Entre sus metabolitos secundarios se encuentran: flavonoides, glucósidos cardiotónicos y una gran cantidad de lactonas sesquiterpénicas (Arbelaenz, Acevedo, Jaramillo & Yepes, 2011)

2. Recolección y maceración de hojas de *T. rosea*



3. Prueba del mejor solvente

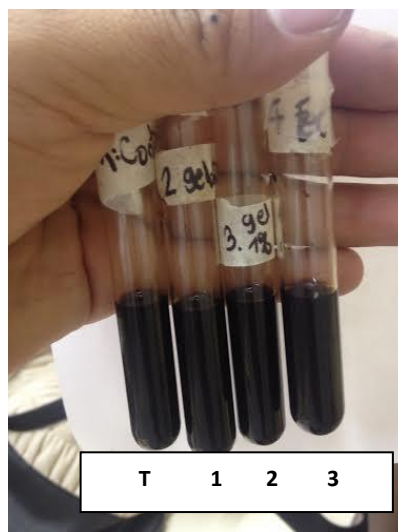


4. Percolación y rotavaporación para la obtención de extracto etanólico de *T. rosea*.



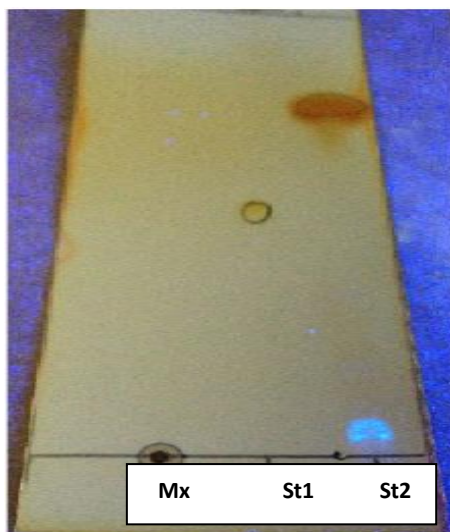


5. Prueba macrométrica para la detección de Taninos



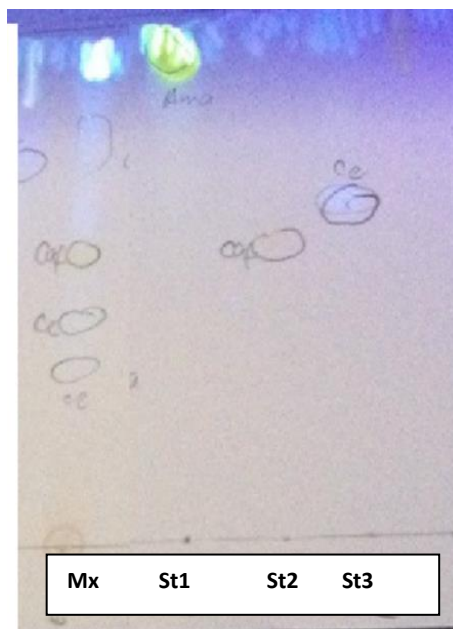
T: Testigo, tubo 1: gelatina 1%, tubo 2: gelatina 1%/NaCl, tubo 3: FeCl₃ 10%

6. Detección de Alcaloides por medio de cromatografía en capa fina



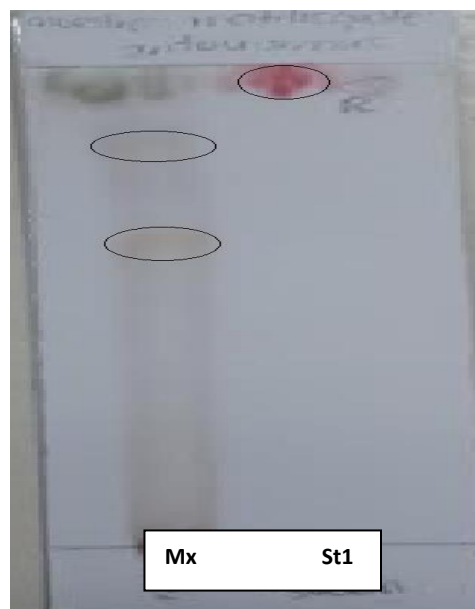
Mx: Extracto acuoso de *T. rosea*, St1: Atropina, St2: Papaverina.

7. Detección de Flavonoides por medio de cromatografía en capa fina.



Mx: Extracto acuoso de *T. rosea*, St1: Quercitina, St2: Rutina, St3: Ácido clorogénico.

8. Detección de Antocianinas por medio de cromatografía en capa fina.



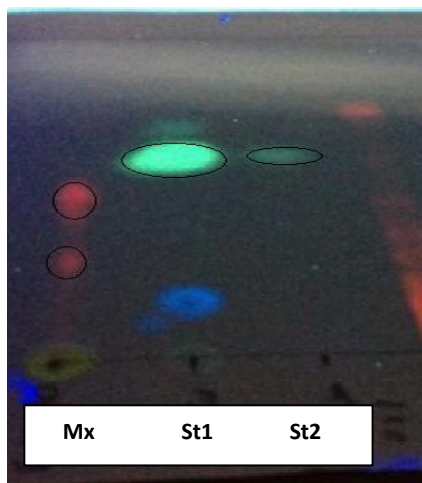
Mx: Extracto acuoso de *T. rosea*, St1: Rojo sudan

9. Detección de Saponinas por medio de cromatografía en capa fina.



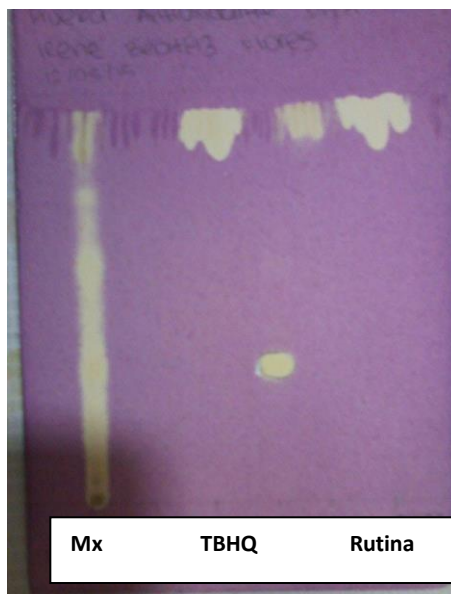
Mx: Extracto acuoso de *T. rosea*, St1: Saponinas 0.2%, St2: Saponinas 0.5%

10. Detección de Cumarinas por medio de cromatografía en capa fina.

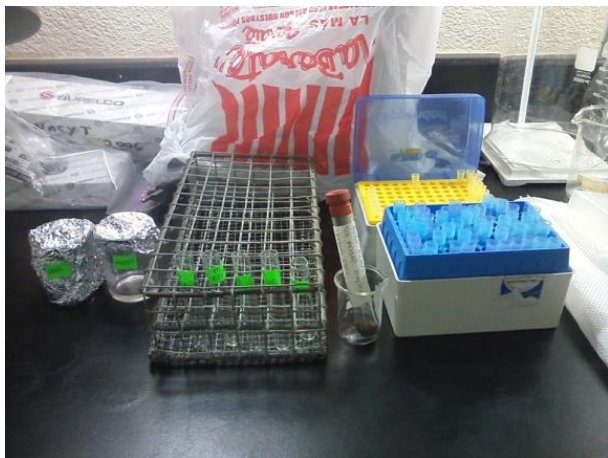


Mx: Extracto acuoso de *T. rosea*, St1: Cumarina 0.1%, St2: Cumarinas 1%

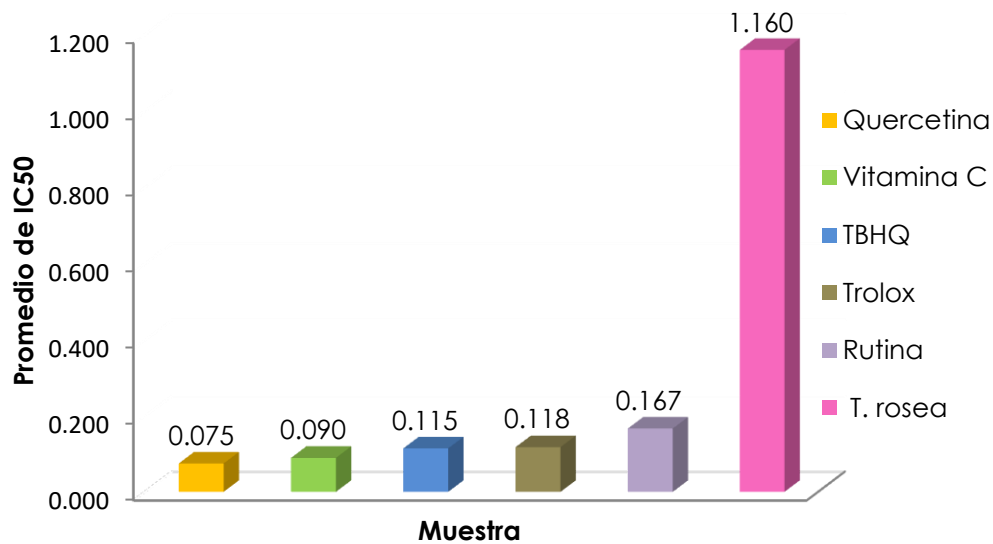
11. Cromatografía en capa fina para la detección cualitativa de la actividad antioxidante por medio del reactivo DPPH.



12. Procedimiento para la cuantificación de la actividad antioxidante por DPPH (técnica micrométrica)



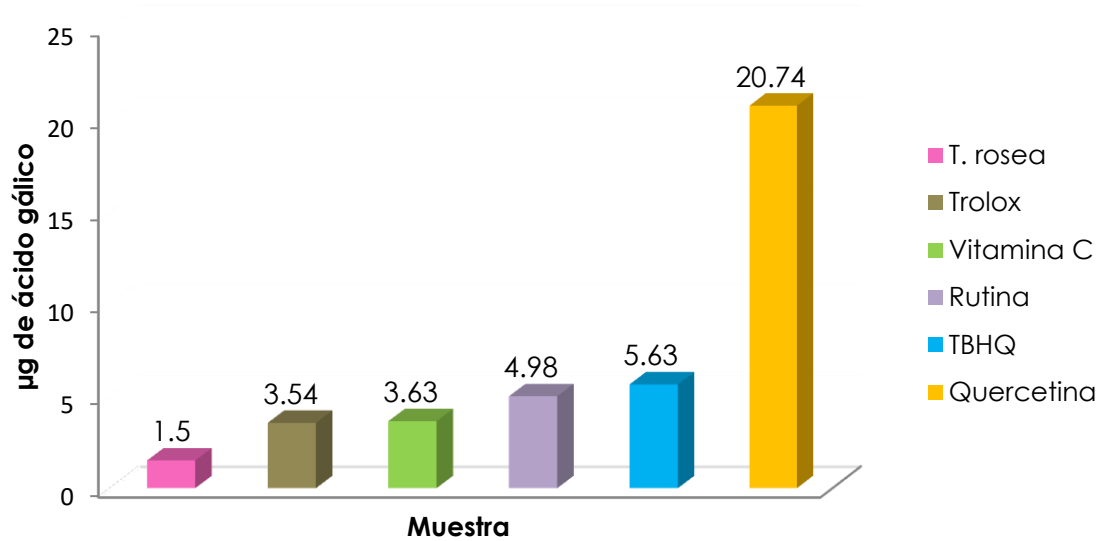
13. Actividad antioxidante total (método micrométrico) expresado como mg del extracto seco necesario para producir el 50% de inhibición del reactivo DPPH comparado con el CI_{50} de los estándares.



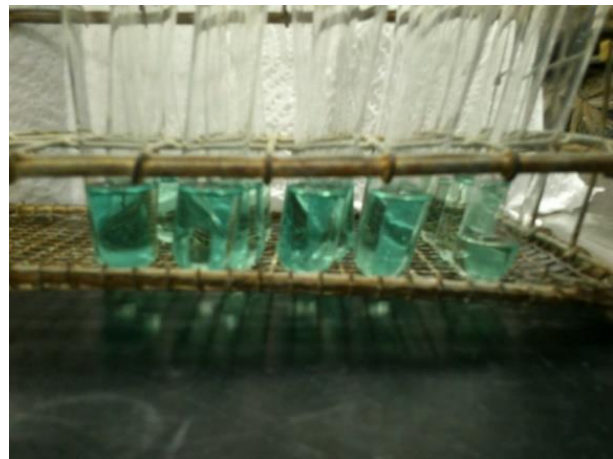
14. Cuantificación de fenoles totales (método micrométrico)



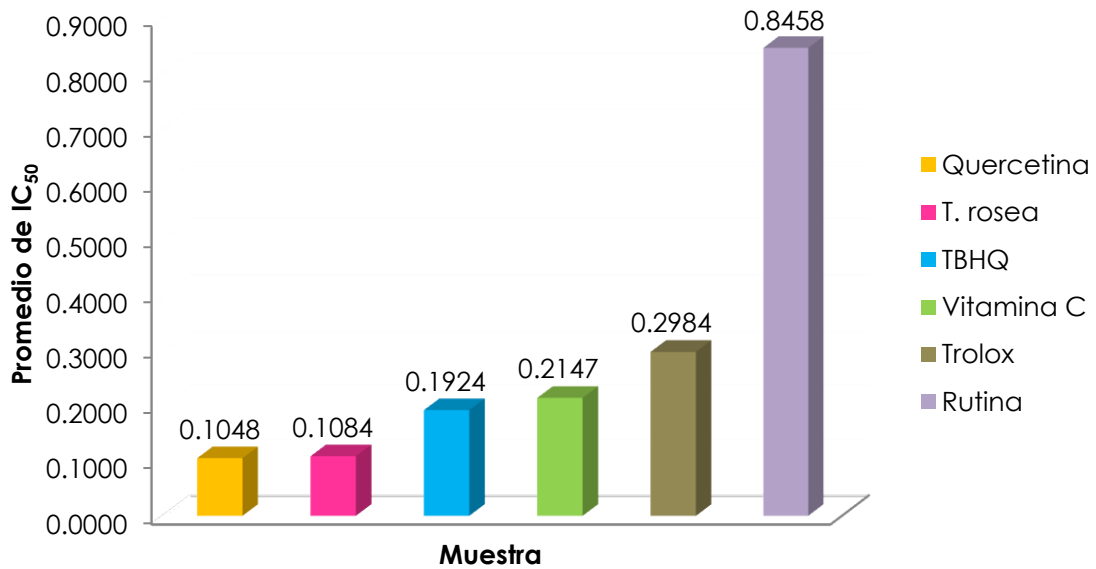
15. Contenido de fenoles totales (técnica micrométrica) expresado como μg de ácido gálico por gramo de extracto seco comparado contra los estándares.



16. Procedimiento para la cuantificación de la actividad antioxidante por ABTS (Técnica macrométrica).



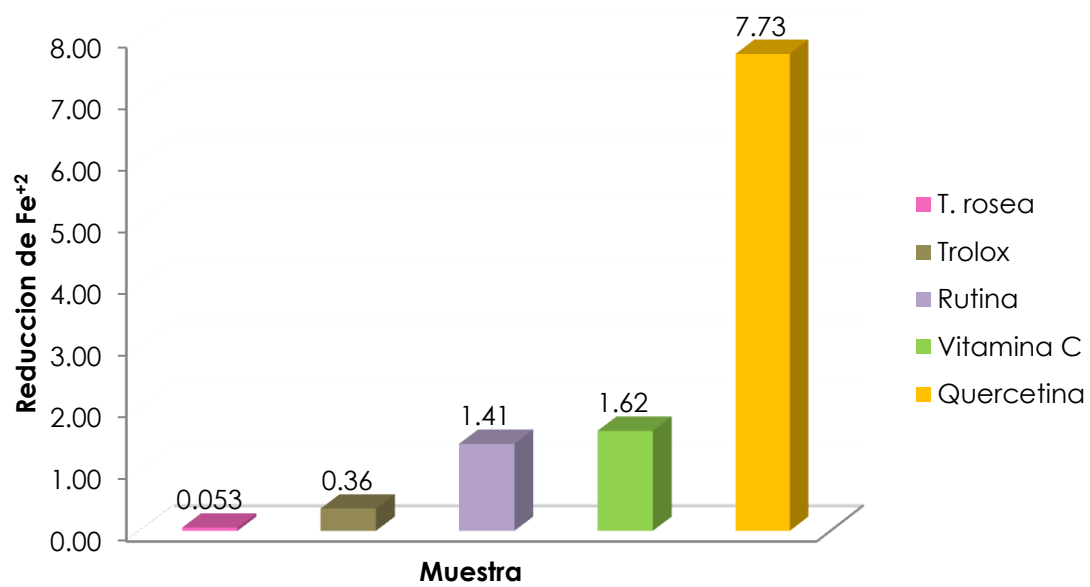
17. Actividad antioxidante total (método macrométrico) expresado como mg del extracto seco necesario para producir el 50% de inhibición del reactivo ABTS comparado con el CI50 de los estándares.



18. Procedimiento para la determinación de la actividad FRAP



19. Actividad antioxidante total (método micrométrico)





Irene Beatriz Flores Castellanos

Tesista



Dra. Sully Margaret Cruz Velásquez, Ph.D

Asesora



Lic. Julio Chinchilla Vettorazzi

Revisor



Lic. Hada Marieta Alvarado Beteta, MSc.

Directora de escuela



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

Decano