

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large circular emblem in the background. It features a central figure of a man in a crown and robes, surrounded by various symbols including a castle, a lion, and a mountain. The Latin motto "ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMMATE INTER CÆTERAS" is inscribed around the perimeter.

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA
CAPACIDAD REDUCTORA DEL HIERRO, DE DIEZ ESPECIES NATIVAS
DE MESOAMÉRICA, CON POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

Seminario de Investigación
Presentado por

Gustavo Adolfo Castro Paz
Pedro Eleazar Orellana Noriega
Yemsy Aly Pajares Hernández

Para optar al título de

QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, Febrero de 2016.

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Mirada

Decano

Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.

Secretaria

MSc. Miriam Carolina Guzman Quilo

Vocal I

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Vocal II

Br. Michael Javier Mó Leal

Vocal IV

Br. Blanqui Eunice Flores de León

Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS NUESTRO PADRE

Por ser nuestro guía, darnos fortaleza en todo momento y permitirnos alcanzar una meta más en nuestras vidas.

A NUESTROS PADRES

Rosa Margarita Paz Morataya de Castro, Gustavo Adolfo Castro Hernández, Adriana Magdali Noriega Ovalle de Orellana, Fredy Roberto Orellana Palacios, Irma Yolanda Hernández Ruano de Pajares, José Pajares Gonzales. Por su gran amor, por ser unos padres maravillosos y excepcionales, quienes con esfuerzo y dedicación han estado en cada etapa de nuestra vida, brindándonos consejos y ejemplo de perseverancia siempre. Gracias a ellos estamos hoy aquí. ¡Nuestros triunfos son suyos!

A NUESTROS HERMANAS Y HERMANOS

Por su compañía, apoyo, paciencia y cariño.

A UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Por brindarnos los conocimientos y enseñanzas necesarias para nuestra formación académica.

A TODAS LAS PERSONAS E INSTITUCIONES, en especial al Lic. Armando Cáceres.

Por brindarnos su ayuda y apoyo condicional en todo momento.

ÍNDICE

Sección	Página
1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	01
2. RESUMEN	03
3. ANTECEDENTES	05
3.1 Generalidades	05
3.2 Radicales libre	06
3.2.1 Papel fisiológico y patológico de los radicales libres	07
3.3 Especies reactivas de oxígeno	09
3.3.1 Papel fisiológico y patológico de las especies reactivas de oxígeno	09
3.4 Clases de antioxidantes	10
3.4.1 Antioxidantes primarios	10
3.4.2 Antioxidantes secundarios	11
3.4.3 Antioxidantes terciarios	11
3.4.4 Antioxidantes sintéticos	12
3.4.5 Antioxidantes naturales	13
3.5 Mecanismo de acción de los antioxidantes	14
3.6 Importancia de los antioxidantes	16
3.7 Búsqueda de antioxidantes en alimentos y vegetales	17
3.8 Plantas con actividad antioxidante	18
3.9. Plantas con capacidad reductora de hierro	20
3.10 Antecedentes en Guatemala	21
3.11 Metodología para la determinación de la actividad antioxidante	23
3.11.1 Método ABTS	25
3.11.2 Método DPPH	26
3.11.3 Método de Folin-Ciocalteau	27
3.11.4 Poder reductor/antioxidante de hierro férrico (FRAP)	28
3.12 Información técnica de las especies vegetales a estudiar	30
3.12.1 <i>Gliricidia sepium</i> Jacq. (Fabaceae)	30
3.12.2 <i>Lippia graveolens</i> H.B.K. (Verbenaceae)	33
3.12.3 <i>Litsea guatemalensis</i> Mez. (Laureaceae)	36
3.12.4 <i>Neurolaena lobata</i> L. (Asteraceae)	38

3.12.5 <i>Ocimum campechianum</i> Willd. (Lamiaceae)	41
3.12.6 <i>Phlebodium pseudoaureum</i> Cav. (Polydiaceae)	43
3.12.7 <i>Pimenta dioica</i> L. (Myrtaceae)	45
3.12.8 <i>Smilax domingensis</i> Willd. (Smilacaceae)	48
3.12.9 <i>Solanum nigrescens</i> Mart. & Gal. (Solanaceae)	50
3.12.10 <i>Tagetes lucida</i> Cav. (Asteraceae)	52
4. JUSTIFICACIÓN	54
5. OBJETIVOS	56
5.1 Objetivo general	56
5.2 Objetivos específicos	56
6. HIPÓTESIS	57
7. MATERIALES Y MÉTODOS	58
7.1 Universo de trabajo	58
7.2 Recursos	58
7.3 Materiales y métodos	59
7.4 Diseño de la investigación	65
8. RESULTADOS	68
8.1 Estandarización del método	68
8.2.1 Macrométrico	68
8.2.2 Micrométrico	69
8.2 Obtención de extractos etanólicos de diez especies nativas de Mesoamérica	70
8.3 Análisis estadístico de equivalencia por t-student para diferencias pareadas para los métodos macro y micrométrico del ensayo FRAP	71
8.4 Determinación de la reducción de hierro en 10 especies nativas de Mesoamérica	73
9. DISCUSION	74
10. CONCLUSION	80
11. RECOMENDACIONES	81
12. REFERENCIAS	82
13. ANEXOS	96

1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACION

El presente trabajo forma parte del programa de investigación de productos naturales que se desarrolla en el laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología y en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT).

Dentro de dicho programa, se han ejecutado múltiples proyectos con el objetivo de investigar la actividad antioxidante de una gran variedad de especies vegetales, y evaluar sus posibles aplicaciones en la industria y/o la medicina. Entre las metodologías más frecuentemente utilizadas se encuentran: la medición del radical del ácido 2,2'-azino-bis-3-(etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), las cuales se fundamentan en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical, mediante un mecanismo de transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno. También se ha utilizado la metodología de fenoles totales, la cual consiste en la cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra, que se oxidan al reaccionar con un poli anión. Debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método único que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, es por eso que la utilización de distintas metodologías provee mayor información de dicho perfil. Con el fin de continuar con la investigación de la actividad antioxidante en especies vegetales, en el presente trabajo se estableció un cuarto ensayo, para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de diez especies nativas de Mesoamérica, denominado ensayo de poder reductor del hierro (FRAP), que provee información sobre la capacidad estabilizadora redox de una sustancia, dicho ensayo consiste en medir la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , siendo este último cuantificable espectrofotométricamente a 700 nm mediante la

formación de un producto coloreado, que es directamente proporcional a la concentración de antioxidante presente en la muestra.

Existen dos métodos de FRAP, el macrométrico (método de referencia) y el micrométrico; éste último no ha sido utilizado tan ampliamente como el de referencia, pero algunos investigadores la utilizan debido a que lleva menor tiempo para su desarrollo y consume menor cantidad de reactivos y muestra. Con el propósito de determinar si dichos métodos pueden utilizarse de forma equivalente, se desarrolló el presente trabajo, para establecer si el método micrométrico puede sustituir al de referencia en futuras investigaciones, debido a las ventajas que este presenta.

Durante el desarrollo de la presente investigación, se contó con el equipo, procedimiento y apoyo profesional del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología y del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

2. RESUMEN

La oxidación es fundamental en el ser humano para la producción de energía, pero en este proceso puede producirse radicales libres (RL) que pueden llegar a ser perjudiciales para el organismo, provocando la aparición de enfermedades metabólicas o degenerativas, tales como arteroesclerosis, cáncer, diabetes e incluso interferir en la cicatrización de heridas.

El sistema antioxidante se encarga de proteger a los tejidos atrapando los RL que se generan en el metabolismo, interviniendo en los pasos de iniciación, propagación o finalización de procesos oxidativos, siendo necesario su reemplazo constante por medio de la ingesta alimenticia; los antioxidantes son sustancias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, están presentes incluso en especies que son utilizadas como alimentos o medicamentos, y pueden llegar a jugar un papel importante en la regulación del proceso de oxidación en los seres humanos, pudiendo además prevenir los efectos perjudiciales que dicho proceso puede llegar a ocasionar, de ahí la importancia del desarrollo y aplicación de métodos para el estudio y la búsqueda de la actividad antioxidante en especies vegetales.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la equivalencia entre los métodos cuantitativos macrométrico (método de referencia) y micrométrico de FRAP, que serían utilizados para la determinación de actividad antioxidante de los extractos etanólicos de diez especies nativas de Mesoamérica, *Gliricidia sepium*, *Lippia graveolens*, *Litsea guatemalensis*, *Neurolaena lobata*, *Ocimum campechianum*, *Phlebodium pseudoaureum*, *Pimenta dioica*, *Smilax domingensis*, *Solanum nigrescens* y *Tagetes lucida*.

De cada una de las especies en estudio se preparó una solución madre de 20 mg/mL y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas de 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL.

Estas fueron evaluadas por quintuplicado mediante los métodos macro y micrométrico de FRAP, obteniéndose resultados de absorbancia, los cuales fueron convertidos mediante regresión lineal en datos de concentración para cada solución, expresados en valores de miligramos equivalentes de ácido ascórbico por miligramo de extracto y concentración inhibitoria media (CI₅₀).

La comparación de los métodos se realizó mediante un análisis univariado de los resultados, utilizando para este análisis la prueba de t-student para diferencias pareadas, a un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$). Se obtuvo un valor de $p<0.05$, lo que significa que no existe equivalencia entre los métodos.

Las especies estudiadas que presentaron mejor actividad por el método macrométrico fueron *T. lucida* (CI₅₀ 0.3925 mg/mL), *L. guatemalensis* (CI₅₀ 0.3938 mg/mL) y *P. pseudoaureum* (CI₅₀ 0.5801 mg/mL). Sin embargo, ninguno de los extractos analizados mostró tener actividad mayor o igual a la del estándar de ácido ascórbico (CI₅₀ 0.2935 mg/mL), el cual se utilizó como referencia por ser una sustancia reconocida por detener los procesos de oxidación, además de ser el estándar sugerido en el método de referencia. Por otra parte, se determinó que los resultados obtenidos por el método micrométrico, no son confiables, debido a la falta de concordancia con los resultados obtenidos por el método macrométrico.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades

En la naturaleza, existen moléculas que tienen uno o varios electrones no apareados, llamados radicales libres (RL) estas son inestables y tienden a buscar moléculas estables para formar combinaciones con ellas y saturar sus electrones. Este proceso se denomina oxidación y puede dar lugar a una reacción en cadena muy perjudicial para el organismo. Las estructuras dañadas más frecuentemente por los RL son: ácidos grasos insaturados en las membranas celulares, carbohidratos, proteínas y ADN (Halliwell, Gutteridge & Cross, 1992).

La oxidación es fundamental en el ser humano para la producción de energía, pero cuando la producción de oxígeno es superior a lo normal y existe un desequilibrio en la acción protectora de enzimas puede implicar la aparición de enfermedades metabólicas o degenerativas (Mau, Lin & Song, 2002).

El estrés oxidativo surge en sistemas biológicos después de una prolongada exposición a oxidantes, o debido a una disminución de la capacidad antioxidante del sistema; y está asociado con la generación de especies reactivas de oxígeno (EOR), que pueden tener relación con un gran número de enfermedades degenerativas, tales como arterosclerosis, cáncer, diabetes e incluso en la cicatrización de heridas, por lo que el interés en la utilización de extractos vegetales con actividad antioxidante ha crecido (Sánchez, Martínez & Fauré, 2011; Venereo, 2002).

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes en los alimentos o en el cuerpo a concentraciones bajas comparadas con las de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación de dicho sustrato. El sistema antioxidante es el encargado de proteger a los tejidos de los efectos de los RL, atrapándolos. Los antioxidantes intervienen

en cualquiera de los siguientes pasos: iniciación, propagación o finalización de los procesos oxidativos (Cui, Luo, Xu & Murthy, 2004).

En el sistema antioxidante, la vitamina E es de gran importancia, ya que actúa en las membranas celulares interrumpiendo la reacción en cadena de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Cui et al., 2004).

3.2 Radicales Libres

Los RL son átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos ya que tienden a ganar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Avello & Suwalsky, 2002).

Las fuentes más comunes de generación de RL son: las radiaciones, el metabolismo (ejercicio extenuante, bebidas alcohólicas, drogas, adriamicina y péptidos, α -amiloides), las sustancias químicas ambientales (productos de combustión, tabaco, hidrocarburos halogenados y metales pesados) y las infecciones (bacterias, virus, parásitos y priones). En la actualidad se reconoce que alrededor de 60 patologías pueden estar relacionadas con el aumento de RL, particularmente aquellas de tipo crónico y degenerativo (Halliwell et al., 1992).

No todos los RL son dañinos, las células del sistema inmune crean RL para defender al organismo de algunas bacterias y virus, pero si no hay control de la producción de estos pueden influir en la alteración de la estructura celular, lo cual puede contribuir al apareamiento de enfermedades crónicas degenerativas en el organismo y procesos de envejecimiento, entre otros (Domatoti, Babu & Sunil, 2013).

3.2.1 Papel fisiológico y patológico de los radicales libres

Se sabe que la acción de los RL o sus derivados como mediadores fisiológicos incluye: regulación del tono vascular, percepción de la presión de oxígeno, regulación de funciones que son controladas por concentración de oxígeno, así como potenciar la transducción de señales intracelulares de varios receptores de la membrana, incluyendo el receptor de antígeno de linfocitos y respuestas de estrés oxidante que aseguran el mantenimiento del sistema redox (reacciones de oxidación-reducción). El radical $\bullet\text{NO}$ es una molécula única, con las características propias de un neurotransmisor; tiene actividad vasodilatadora, es estimulante de la síntesis de músculo liso vascular y antiagregante plaquetario (Sen, Khanna, Gordillo, Bagchi, Bagchi & Roy, 2002).

En el sistema inmune los RL fungen como mediadores fisiológicos en contra de infecciones bacterianas. La presencia de oxígeno es un requisito vital para la destrucción y digestión de los agentes patógenos por los fagocitos. La fracción más abundante de las células de la sangre que pueden fagocitar son los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. El O_2 es el mediador del inicio del proceso fagocítico; los fagocitos captan el oxígeno en forma acelerada, aproximadamente cien veces más rápido que en su estado no activado, por lo que a este fenómeno se le conoce como estallido respiratorio, que es empleado para eliminar patógenos, y al mismo tiempo se producen algunos RL, con enorme poder destructor, gracias a su poder oxidante, tales como O_2^- , H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$ y el ácido hipocloroso (HClO) (Hamptom, Kettle & Winterbourn, 1998).

Otra de las funciones de los RL es ser mediadores en la síntesis de prostaglandinas, colesterol y hormonas esteroideas. La hidroxilación de los aminoácidos lisina y prolina a hidroxilisina e hidroxiprolina, necesarios para la biosíntesis del colágeno, requiere de la

participación del radical libre $\bullet\text{OH}$. Cada día se van conociendo nuevas funciones mediadas por RL (McCord, 2000).

Si bien es cierto que los RL son elementos fundamentales en el metabolismo, también constituyen un riesgo, especialmente para las células y las biomoléculas, como los ácidos nucleicos, las proteínas, polisacáridos y lípidos. El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases nitrogenadas o a las pentosas que constituyen el ADN, formándose el radical peroxilo, lo que resulta en daños estructurales y diversas mutaciones. A su vez, todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los RL, sobre todo por el radical hidroxilo. Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los más propensos a sufrir procesos oxidantes (Céspedes & Sánchez, 2000).

Esta oxidación puede generar un cambio conformacional de la proteína y como consecuencia la pérdida o modificación de su función biológica. El daño oxidante suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína. En las enzimas, puede impedir su actividad catalizadora y en los polisacáridos, cuya función es estructural, ocasiona su despolimerización, lo que da lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico, polisacárido, cuya función reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes, sobre todo al radical superóxido, provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, alteración que ocurre en la artritis reumatoide. Los lípidos, especialmente aquellos que contienen ácidos grasos poli-insaturados son especialmente susceptibles a desarrollar procesos de oxidación no controlados. El resultado es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la pérdida de los

gradientes iónicos a ambos lados de la membrana (Maldonado, Jiménez, Guapillo, Ceballos & Méndez, 2010).

3.3 Especies reactivas de oxígeno

Especies reactivas de oxígeno es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y son fácilmente convertidos a radicales (Avello & Suwalsky, 2002).

Las EOR son indispensables para mantener la homeostasis celular. En los últimos años se ha evidenciado su papel en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento que están involucrados en la regulación proliferativa. Sin embargo, si los niveles de moléculas oxidantes aumentan en mayor proporción que los sistemas enzimáticos antioxidantes, la célula se encuentra sometida a lo que se ha denominado *estrés oxidativo*. El resultado de este incremento en las EOR puede producir modificaciones en las proteínas, los lípidos y el ADN (Leighton, 2000).

Cuando la concentración de especies oxidantes causa más daño del que la célula puede reparar, puede incluso ocurrir muerte celular. Aun si existe un balance entre los oxidantes y los antioxidantes, pueden ocurrir daños puntuales que quedan sin reparar, pero que no alteran el metabolismo inmediato de las células. Dentro de los daños puntuales se puede mencionar, oxidación y peroxidación de lípidos, desnaturalización de proteínas, despolimerización de polisacáridos, rompimiento de las membranas celulares, inactivación de enzimas, pueden interferir con la inmunogenicidad y provocar carcinogénesis (Leighton, 2000).

3.3.1 Papel fisiológico y patológico de las especies reactivas de oxígeno

La evidencia sugiere que las EOR participan en la defensa del organismo contra cuerpos extraños y actúan como moduladores de procesos biológicos internos, incluyendo

señales de transducción, transcripción o muerte celular programada. La señal de transducción se puede describir como el proceso mediante el cual los componentes celulares reciben información de otros componentes y de afuera de la célula. La exposición ambiental a radiación inicia señalización a través del factor de necrosis tumoral alfa y otros factores requeridos para la activación del receptor de quinasas (Cui et al., 2004).

Por su alta reactividad química, los niveles de EOR mayores a los requerimientos celulares, pueden dañar indiscriminadamente la integridad funcional y estructural, por medio de modificación celular del ADN, proteínas y lípidos, o iniciando una cadena de reacciones que pueden extender el daño oxidativo a estas moléculas. Aunque las células tienen una variedad de mecanismos de defensa y de sistemas reparadores ante EOR, no siempre son suficientes. El estrés oxidativo puede relacionarse con el desequilibrio entre la producción de prooxidantes/RL y las defensas antioxidantes. El estrés oxidativo severo se ha asociado con enfermedades degenerativas, como aterosclerosis, diabetes, isquemia, enfermedades inflamatorias, cáncer, enfermedades neurológicas, hipertensión, enfermedades oculares, enfermedades pulmonares y enfermedades hematológicas (Cui et al., 2004; Kamath & Rajini, 2006).

3.4 Clases de antioxidantes

Los antioxidantes se pueden clasificar en los siguientes grupos principales:

3.4.1 Antioxidantes primarios

Estos previenen la formación de nuevos RL. Esto lo consiguen convirtiendo los RL existentes en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de RL a partir de otras moléculas. Por ejemplo: la superóxido dismutasa

convierte el O_2^- en H_2O_2 , la glutatión peroxidasa convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres y las proteínas de unión a metales como la ferritina y ceruloplasmina que limitan la disponibilidad de Fe(II) necesaria para formar el radical OH^- (Céspedes & Sánchez, 2000).

3.4.2 Antioxidantes secundarios

Capturan los radicales, evitando la formación de las reacciones en cadena de RL, por ejemplo:

- Vitamina A (β -caroteno): que actúa por medio de la estabilización de radicales peróxidos orgánicos libres dentro de su estructura alquilo conjugada.
- Vitamina C (ácido ascórbico): considerado como el antioxidante más importante en el plasma humano ya que posee la habilidad de secuestrar radicales en la fase acuosa, incrementando la formación de radicales por el reciclamiento reductivo de los iones metálicos.
- Vitamina E (α -tocoferol): es la primera línea de defensa contra peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados contenidos en fosfolípidos mitocondriales y del retículo endoplásmico. Los tocoferoles actúan interrumpiendo reacciones de cadenas con radicales libres como resultado para transferir un hidrogeno fenólico a un radical peroxilo libre de un ácido graso poliinsaturado peroxidado (Céspedes & Sánchez, 2000).

3.4.3 Antioxidantes terciarios

Reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Incluyen enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Halliwell et al., 1992). Los antioxidantes son ingeridos diariamente en la alimentación ya que se encuentran en frutas,

verduras, raíces, tubérculos, hierbas, aceites vegetales y frutos secos (Hoffman-La Roche Ltd, 1994). Es por ello que en la actualidad se ha enfocado varios estudios de investigación en la determinación de la actividad antioxidante en plantas y hongos comestibles en varias partes del mundo.

En la búsqueda continua de extractos de plantas antioxidantes de América Central y Sur América, Aquino evaluó fitoquímica y biológicamente a *Tagetes lucida*, que es conocida comúnmente como pericón y utilizada como condimento. Utilizando la técnica del DPPH, mostró un efecto significativo en la remoción de radicales libres en comparación a α -tocoferol y un estándar de flavonoides (Aquino, Cáceres, Morelli & Rastrelli, 2002).

3.4.4 Antioxidantes sintéticos

Son definidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) como conservadores alimenticios que retardan específicamente el deterioro, rancidez o decoloración, debido a la oxidación lipídica. Los más comunes son los que se derivan de las estructuras fenólicas o los que tengan un grupo fenólico dentro de la configuración de su estructura molecular. Entre los fenólicos más frecuentemente (Figura 1) usados como antioxidantes son los derivados de las estructuras, 2,6-di-ter-butil-4-metilfenol (BHT), un antioxidante utilizado en la industria de alimentos, es un aditivo utilizado en el empaque de alimentos, por lo que se aplica como una emulsión; el ter-butil-4-hidroxianisol (BHA) es un antioxidante fenólico monohídrico que posee una aceptación significativa en la industria de alimentos y químicamente es una mezcla de dos isómeros, 3-tert-butil-4-hidroxianisol (90%) y 2-tert-butil-4-hidroxianisol (10%). Es efectivo en el control de la oxidación de ácidos grasos de cadena corta de los aceites de coco y palma usados en cereales y confitería. El ter-butil-hidroxiquinona (TBHQ) es un compuesto que se considera como el mejor antioxidante para la protección

contra la oxidación de los aceites para freír. Es liposoluble y no forma complejos con el hierro o el cobre. Este antioxidante está disponible como un polvo amarillento que es utilizado solo o en combinación con BHA o BHT a una cantidad de 0.02% es un buen estabilizador de aceites crudos y 6-ethoxi-1-2-dihidro-2,4-trimetilquinolina (etoxiquin, EQ) (Robledo, Bocalon, Giacomelli, Ceballos & Mattea, 2003).

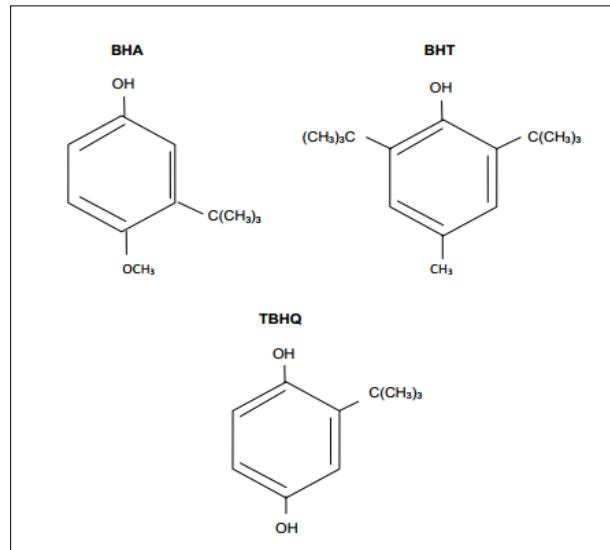


Figura 1. Estructura química de los antioxidantes sintéticos más comunes.

Fuente: Robledo et al., 2003.

3.4.5 Antioxidantes naturales

Se encuentran en todas las partes de las plantas, ya que las protegen contra lesiones del tejido, los polifenoles son el grupo más numerosos de componentes antioxidantes y están presentes en frutas, vegetales, semillas, granos, hierbas y especies (Murga, Sanz, Beltrán & Cabezas, 2002).

Entre los antioxidantes naturales se encuentran los taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavonas, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas, estos antioxidantes pueden retrasar o prevenir el comienzo

de enfermedades degenerativas debido a sus propiedades redox. Por tanto, una alternativa en el control de enfermedades degenerativas es la ingesta en la dieta de frutas y vegetales, muchos de los cuales son ricas fuentes de antioxidantes (Marwah, Fatope, Mahrooqi, Varma, Abadi & Al-Burtamani, 2007).

Algunos ejemplos de antioxidantes específicos son pimentol en la mayoría de las especies; galato, biflorin isómero del eugenol y acetato de eugenilo en el *Syzygium aromaticum*; carnosol, ácido carnósico, rosmanol, rosmaridifenol, rosmadial, rosmariquinona y varios ésteres de metil y etil de estas sustancias en el *Rosmarinus officinalis* y el género *Salvia*; diarilheptanoides, gingerol y zingerona en el *Zingiber officinale*; curcumina y tetrahidrocurcumina en la *Curcuma longa*, la cual ha sido extensamente estudiada por sus propiedades, como antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, antiteratogénico y por su potencial como agente para la quimiopreención del cáncer del tracto gastrointestinal (Miquel, Bernd, Sempere, Díaz & Ramírez, 2002; Sharma, Gescher & Steward, 2005).

El timol y cimenol derivados de ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles, ácidos rosmarínico y cineol se encuentran en el aceite esencial de *Origanum algerianum* y han demostrado actividad antioxidante (Tsai, Tsai, Yu & Ho, 2006).

3.5 Mecanismos de acción de los antioxidantes

Un método para controlar la velocidad de oxidación de los lípidos es mediante la adición de antioxidantes, los cuales interfieren con el proceso de oxidación por diferentes mecanismos, estos involucran, la iniciación y propagación de los procesos oxidativos. Estas reacciones conducen a un retraso en el inicio de la oxidación y la extensión del período de inducción. Los antioxidantes pueden donar un átomo de hidrógeno o un electrón

a los radicales formados en los ácidos grasos insaturados (Figura 2), formando productos más estables (Shahidi, Amarowicz, Abou-Gharbia & Shehata, 1997; Vertuani, Angusti & Manfredini, 2004).

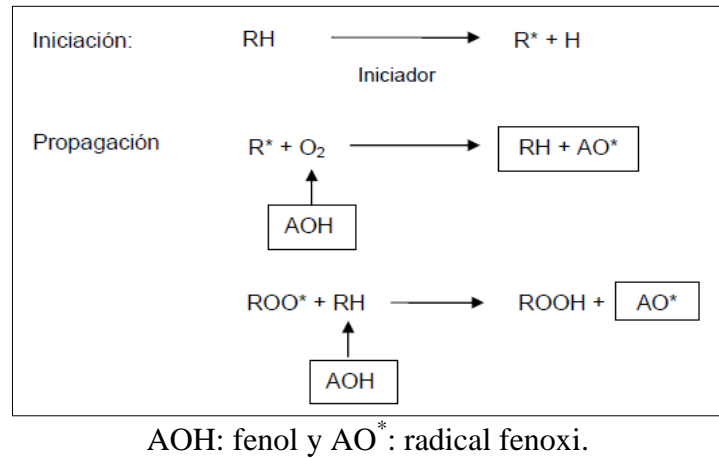


Figura 2. Mecanismos de acción de los antioxidantes.

Fuente: Shahidi et al., 1997.

El exceso de EOR es generalmente inactivado por un amplio espectro de antioxidantes de origen endógeno (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ácido úrico, bilirrubina) y exógenos a través de la dieta (vitaminas E y C, carotenoides, selenio, compuestos fenólicos); ambos interfieren en la cadena de reacciones, secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas, manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes, amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de EOR, también pueden realzar las defensas antioxidantes del organismo (Cui et al., 2004).

3.6 Importancia de los antioxidantes

Los antioxidantes han sido utilizados para prevenir el deterioro de la calidad de múltiples productos y mantener su valor nutricional. La aplicación de antioxidantes como el ácido ascórbico para mantener los valores nutricionales y la calidad de productos alimenticios se ha practicado por décadas en la industria alimentaria, la cual pretende el control de la oxidación lipídica para evitar su enranciamiento (Sin, Wong, Mak, Sze & Yao, 2006).

También son de importancia en la salud ya que ayudan al cuerpo a protegerse contra el daño causado por las EOR y las enfermedades degenerativas. El grado de oxidación depende de la estructura química de los ácidos grasos involucrados y otros factores que favorecen la reacción de oxidación (Shahidi et al., 1997).

El aumento del consumo de frutas y vegetales se ha asociado a la protección contra varias enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades cardio y cerebrovasculares. Esta asociación es usualmente atribuida a los antioxidantes, tales como las vitaminas C y E, carotenoides, licopenos y flavonoides que previenen el daño de radicales libres. En frutas y vegetales abundan los flavonoides y otros compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante que, aunque no constituyen parte del sistema antioxidante endógeno, lo refuerzan (DuToit, Volstedt & Apostolides, 2001).

Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación inversa entre el aumento de la ingesta de antioxidante y la reducción de la morbilidad y mortalidad por enfermedades degenerativas. Los antioxidantes inhiben la lipoperoxidación limitando la arterosclerosis y sus manifestaciones clínicas, tales como el infarto de miocardio. Otros efectos cardioprotectores asociados a la acción de antioxidantes son la inhibición de la adhesión de

monocitos, protección contra los efectos citotóxicos de la LDL oxidada e inhibición de la activación de plaquetas (Morales, Figueroa & Bustamante, 2003).

Ensayos en animales han demostrado que los derivados polifenólicos son bien tolerados y carecen de efectos secundarios. La evidencia clínica tiende a sostener la efectividad de las proantocianidinas en el tratamiento de la insuficiencia venosa y otras patologías asociadas con la alteración de la circulación sanguínea y la fragilidad capilar. Se ha reportado que la administración de 200 mg/día de proantocianidinas en tratamientos de 5 semanas, mejora la agudeza visual y la capacidad de visión nocturna en persona con los trastornos visuales (Morales et al., 2003).

3.7 Búsqueda de antioxidantes en alimentos y vegetales

Estudios recientes demuestran que varios extractos vegetales ejercen acción antioxidante. A partir de la perspectiva del valor potencial de los antioxidantes, se buscan sustancias naturales con potente actividad antioxidante y baja toxicidad. Actualmente se ha incrementado el interés en la investigación científica e industrial de hierbas y especies por su potente actividad antioxidante, las cuales superan a muchos de los actuales antioxidantes naturales y sintéticos. De acuerdo a la base de datos del año 2003 de Fitoquímica de la Información y Servicios del Departamento Federal de Agricultura (USDA, por sus siglas en inglés), algunas plantas con elevado contenido de antioxidantes son *Allium cepa*, *Camelliasinensis*, *Cocos nucifera*, *Foeniculum vulgare*, *Glycinemax*, *Juglans regia*, *Origanum vulgare*, *Psidium guajava*, *Thymus vulgaris* y otras plantas menos conocidas (Suhaj, 2006).

Varios estudios han demostrado que los compuestos fenólicos contenidos en el vino tinto y presentes en los extractos secos de *Vitis vinifera*, eran capaces de inhibir *in vitro* la

oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) humanas. Se ha determinado el contenido de los flavonoides (quercetina, kempferol, miricetina, apigenina y luteolina) en diversos alimentos y se comprobó que la ingesta de flavonoides resultó estar significativamente asociada en forma inversa con la mortalidad por enfermedad coronaria y además mostró una relación inversa con la incidencia de infarto de miocardio (Morales et al., 2003).

Las hierbas y especies son antioxidantes naturales importantes. Su actividad antioxidante ha sido atribuida a la presencia de compuestos fenólicos polares y aceites esenciales (Halliwell & Cross, 1994).

El extracto metanólico de la corteza de la raíz de *Hemides musindicus* es atrapador de radicales O_2^- , NO_3 , ROH e inhibidor de la peroxidación lipídica (Suhaj, 2006).

3.8 Plantas con actividad antioxidante

Numerosas plantas poseen sustancias antioxidantes activas. Se han llevado a cabo múltiples estudios sobre especies vegetales debido a que son fuentes ricas en antioxidantes, tales como las vitaminas A, C y E, carotenoides, compuestos polifenólicos y flavonoides, los cuales previenen el daño por RL, reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas (Miquel et al., 2002). Otra especie en la que se ha encontrado actividad antioxidante es *Rosmarinus officinalis*, de la cual se obtuvo un antioxidante natural que más adelante fue identificado como carnosol (compuesto fenólico) (Wu, Lee, Ho & Chang, 1982). Entre estos compuestos fenólicos los más reconocidos son los diterpenos, tales como ácido carnósico, rosmarol, y algunos ácidos fenólicos, como el ácido rosmarínico (Vicente, Villanueva, García, Fornari & Reglero, 2011).

En Brasil se estudiaron distintas especies vegetales, siendo *Platypodium elegans*, *Brillantaisi apalisatii*, *Apuleialeio carpa*, *Lantana trifolia*, *Brosimum guianense* y *Lantana camara* las que presentaron la mayor actividad contra los RL (Mensor, Menezes, Leitão, Reis, Santos, Coube et al., 2001).

En Paraguay, la actividad antioxidante fue estudiada en seis plantas (*Aristolochia giberti*, *Cecropiapa chystachya*, *Eugenia uniflora*, *Piper fulvescens*, *Schinusweina mannifolia* y *S. terebinthifolia*), encontrando el extracto metanólico como protector contra la peroxidación lipídica enzimática (Velásquez, Tournier, Mordujovich, Saavedra & Schinella, 2003).

El rol del estrés oxidativo en la neurodegeneración se estudió en Canadá, siendo *Petroselinum sativum* quien proporcionó la mayor protección al ADN ante los RL y *Lycopersicon esculentum* quien confirió mayor protección al ADN y los lípidos (Cui et al., 2004).

En estudios realizados en Finlandia, se encontró que *Ocimum basilicum*, *Laurus nobilis* y *Juniperus communis*, presentan un mayor poder de reducción de hierro (Hinneburg, Damien & Hiltunen, 2006).

Entre otras especies de plantas que presentan actividad antioxidante, en Portugal, se encuentran *Hypericum undulatum*, *Melissa officinalis*, *Laurus nobilis*, *Lavandula pedunculata* y *Menthasu aveolens*, las cuales se utilizan como condimento o plantas medicinales y *Sanguisorba minor* que se utiliza como planta medicinal (Ferreira, Proença, Serralheiro & Araújo, 2006).

Estudios han demostrado actividad antioxidante en especies secas como *Ocimum campechianum*, *Litsea guatemalensis*, *Petroselinum crispum*, *Pimpinella anisum*,

Foeniculum vulgare, *Origanum majorana* y *Thymus vulgaris* (Bonanni, Campanella, Gatta, Gregori & Tomassetti, 2006).

En España de 34 especies vegetales, diez (*Lycopus europaeus*, *Melissa officinalis*, *Sylibum marianum*, *Equisetum telmateia*, *Lythrum salicaria*, *Mentha pullegium*, *Mentha piperita*, *Mentha aquatica*, *Mentha suaveolens* y *Mentha longfolia*) demostraron que poseen actividad antioxidante y son empleadas en la medicina tradicional (López, Akerreta, Cavero & Calvo, 2007).

En Chile, se evaluó la actividad antioxidante y su relación para la mejora de la hiperglicemia e hipertensión en plantas medicinales, presentando mayor actividad la hoja de *Piper angustifolium* y *Phyllanthus niruri*; y el té de hierbas siendo la hoja de *Ilexpara guayensis* y *Peumus boldus*, los de mejor actividad (Gálvez, Kwon, Apostolidis & Shetty, 2010).

3.9 Plantas con capacidad reductora de hierro

En China, se estudiaron las semillas de *Carica papaya*, encontrándose que la fracción de etil acetato presenta la mayor actividad reductora de hierro (Zhou, Wang, Mei, Li, Luo & Dai, 2011).

En Colombia, se estudiaron algunas especies de *Passiflora*, en la cual se evidencio la presencia de sustancias antioxidantes en los frutos y en los sustratos provenientes de las hojas por la capacidad reductora del hierro. Demostrando mayor capacidad los frutos de granadilla silvestre y las hojas de gulupa (Carvajal et al., 2011).

En Chile, un estudio de la fruta de *Aristotelia chilensis*, demostró que la fracción etanólica del extracto de la misma presento la mayor actividad reductora de hierro (Céspedes, Valdez, Ávila, Mohammed, Alarcón & Paredes, 2010).

En Finlandia, se realizó un estudio de la actividad antioxidante de extractos de hierbas culinarias y especies, en el cual se encontró que el laurel, albahaca y enebro poseen la mejor actividad reductora de hierro (Hinneburg et al., 2006).

En Croacia, se estudiaron 70 extractos de plantas medicinales en las que se evaluó la capacidad antioxidante, donde se obtuvo que la especie de *Melissa efolium*, posee la mejor actividad reductora de hierro (Katalinic, Milos, Kulisic & Jukic, 2004).

3.10 Antecedentes en Guatemala

Las drogas vegetales nativas han sido estudiadas por sus efectos farmacológicos y poco se ha descrito sobre su actividad antioxidante. La diversidad vegetal del país ha sido poco estudiada para esta actividad, pudiendo haber entre los vegetales alimenticios y condimentarios nativos, algunos que contengan esta actividad y que podrían utilizarse como nuevas fuentes antioxidantes para conservar los alimentos o mejorar la calidad de vida (Aquino et al., 2002).

Desde 1996, el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala en colaboración con la Unidad de Investigación y Estudios Integrales sobre Alimentos Autóctonos de la Región (UNIAR) han realizado más de 12 investigaciones sobre actividad antioxidante en especies vegetales y jugos frutales, en los cuales se establecieron procedimientos para evaluar la actividad antioxidante por medio del radical DPPH, la determinación de vitamina C por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) y la cuantificación de polifenoles por Folin-Ciocalteu, evaluados por espectrofotometría (Bolaños, 2003; Caballeros, 2001).

Se estudiaron los procedimientos de extracción más eficientes, se optimizaron métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales y se evaluó la actividad antioxidante de unas 20 especies vegetales entre frutas y hierbas comestibles presentando mayor actividad *Solanum americanum* (Caballeros, 2001; Lima, 2003).

En 2003, realizaron estudios sobre cinco plantas (*Guazuma ulmifolia*, *Acalypha guatemalensis*, *Smilax spinosa*, *Ocimum campechianum* y *Piper auritum*) utilizadas en Izabal contra enfermedades infecciosas, donde el extracto metanólico de *A. guatemalensis* y *S. spinosa* mostraron una gran actividad contra el radical DPPH y los extractos metanólicos que mostraron mayor potencia en el barrido del radical OH⁻ fueron *S. spinosa* y *G. ulmifolia* (Navarro et al., 2003).

En otro estudio realizado en Guatemala, se trabajó con 24 especies nativas con potencial antioxidante para aplicación en la industria del país. Se cuantificó la actividad antioxidante por la metodología macro y micrométrica de fenoles totales, capacidad antioxidante total usando DPPH y por medio del poder reductor de hierro (macrométrico). La actividad antioxidante más importante fue demostrada por los extractos de *Smilax domingensis*, *Tagetes lucida*, *Litsea guatemalensis*, *Pimienta dioica*, *Phlebodium pseudoaureum* y *Piper auritum* (Cáceres et al., 2012a).

En Guatemala se realizaron estudios sobre actividad antioxidante de tres especies de *Passiflora* nativas del país. Las especies de *P. edulis*, *P. incarnata* y *P. ligularis* demostraron gran actividad antioxidante por la metodología de DPPH, en la cual, la mayor actividad fue demostrada por el extracto metanólico de *P. ligularis* (Marroquín, Cruz & Cáceres, 2012).

Diversas especies de *Piper* también han sido estudiadas en Guatemala para demostrar su potencial antioxidante, el cual puede ser aplicado en la industria de la

conservación de alimentos y cosméticos. Los extractos de *P. psilorhachis*, *P. shippianum* y *P. variable* son los que presentaron una importante actividad antioxidante por los métodos de ABTS, fenoles totales y DPPH (Cáceres, Cruz, Gaitán, Guerrero, Álvarez & Marroquín, 2012b).

Otro estudio realizado en Guatemala, fue la evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel. En donde se obtuvo que los extractos etanólicos que presentaron mayor actividad antioxidante fueron los de *L. guatemalensis* procedente del cerro Alux (IC₅₀ 0.87 mg/mL) y Magdalena Milpas Altas Sacatepéquez (IC₅₀ 0.88 mg/mL), y los extractos diclorometánicos que presentaron mayor actividad fueron los de *L. guatemalensis* procedente de Baja Verapaz (IC₅₀ 7.48 mg/mL) y Magdalena Milpas Altas, Sacatepéquez (IC₅₀ 7.28 mg/mL) (Cruz, 2012).

3.11 Metodología para la determinación de la actividad antioxidante

Los métodos para la determinación de actividad antioxidante se basan en distintos sistemas generadores de RL. Dichos radicales reaccionan con la muestra y en virtud de la capacidad antioxidante de esta, se inhibe la generación de los primeros. Así, lo que se determina realmente es el efecto antioxidante ya que la actividad antioxidante no se puede medir de forma directa. Lo ideal sería medir la actividad antioxidante de cada componente de la muestra por separado, sin embargo, y sobre todo en el caso de muestras naturales, es muy difícil determinar el número y concentración de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra (Sánchez-Moreno, 2002).

En la actualidad, debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por tanto, lo ideal es trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los

resultados. Las características “ideales” que debe reunir un método de determinación de capacidad antioxidante son: sencillez, mecanismo químico definido y punto final fijo, reproducibilidad, adaptabilidad a sustancias antioxidantes hidrofílicas y lipofílicas y elevado rendimiento de análisis. Las medidas de la actividad antirradicalaria se pueden realizar mediante dos estrategias distintas, en función de la información que se desea obtener (Sánchez-Moreno, 2002).

La determinación puede hacerse en forma directa o indirecta. En la forma directa, el radical se emplea como un factor de cuantificación (produce una señal analítica). La adición del antioxidante, antes o después de la generación del radical, provoca una disminución de la señal. En el ensayo de post-adición se forma el radical en ausencia de la muestra y así, cuando se añade la sustancia antioxidante se produce un descenso en la señal debido a la disminución de la concentración del radical. En ensayos de inhibición, la muestra se añade a los sustratos de oxidación antes que sea generado el radical, La reacción comienza con la adición del oxidante ABTS⁺ y DPPH (Sánchez-Moreno, 2002).

En la forma indirecta, la presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de un reactivo, y por tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal como los métodos ORAC (capacidad de absorbanza del radical oxígeno) y FRAP (Sánchez-Moreno, 2002).

Un método unificado para determinar capacidad antioxidante debería estar estandarizado y cumplir con los siguientes requisitos: (1) utilizar un radical biológicamente relevante, (2) ser un método simple, (3) utilizar un punto final definido y un mecanismo conocido, (4) emplear instrumentación fácilmente disponible, (5) tener buena reproducibilidad, (6) ser adaptable para medir antioxidantes lipofílicos/hidrofílicos y a

diferentes radicales, (7) ser adaptable a formatos de tamizaje de alta capacidad para control de calidad de rutina en gran cantidad de muestras (Garcés, 2011).

3.11.1 Método ABTS (azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico)

Este método se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado $ABTS^+$ (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico)) (Figura 3), el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS, por meta-mioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de trolox o TEAC (por su nombre en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan & Milner, 1993).

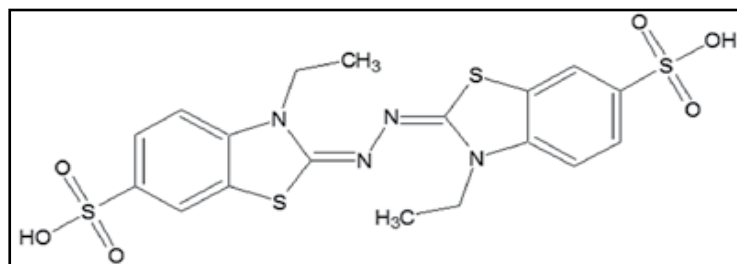


Figura 3. Estructura química del ABTS.

Fuente: Garcés, 2011.

Entre las ventajas de este método esta que los valores de TEAC de una amplia gama de alimentos están reportados, lo que permite establecer comparaciones; adicionalmente puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica, además de que el $ABTS^+$ es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Entre las desventajas están que el $ABTS^+$ debe ser generado previamente, que no es un radical fisiológico y que la cinética de reacción con algunos antioxidantes suele ser bastante lenta y, por lo tanto, el punto final de medición debe fijarse de manera arbitraria (Pietta, Simonetti, Gardana & Mauri, 2000).

3.11.2 Método DPPH (Difenil Picril Hidrazilo)

Este ensayo fue propuesto originalmente por Brand-Williams. El DPPH⁺ (Figura 4) es uno de los pocos radicales orgánicos estable, presenta una fuerte coloración violeta, es comercialmente disponible y no tiene que ser generado *in situ* como el ABTS⁺. El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH⁺, esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 517nm. La reacción de estabilización se considera que transcurre principalmente mediante un mecanismo de transferencia de electrones (TE), con un aporte marginal de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) (Brand-William, Cuvelier & Berset, 1995).

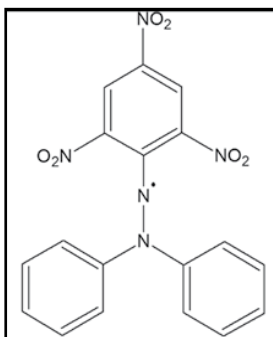


Figura 4. Estructura química del radical libre DPPH.

Fuente: Garcés, 2011.

Los resultados se suelen expresar como CE₅₀, es decir, la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del DPPH⁺. Sin embargo, han surgido otros parámetros como la eficiencia anti-radicalaria (EA) basada en la cinética de la reacción y que involucran, además de la concentración de antioxidante, el tiempo necesario para ejercer su efecto (Garcés, 2011).

Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental; sin embargo, entre las desventajas están la dificultad de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical; adicionalmente el DPPH⁺ es un radical estable, centrado en N₂, que dista mucho de parecerse a las especies reactivas de importancia biológica; de hecho muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales RO₂⁻ no lo hacen así con DPPH⁺, debido al impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad (Kulisic, Radonic, Datalinic & Milos, 2004).

3.11.3 Método de Folin-Ciocalteu

La determinación del contenido total de compuestos fenólicos, no es considerada en sí misma una metodología para medir actividad antioxidante, a pesar de que su principio se basa en la capacidad redox de los polifenoles. Sin embargo, la alta correlación de los resultados con otros métodos ha hecho que este método se popularice como una herramienta simple y rápida para predecir actividad antioxidante, principalmente en matrices complejas, donde la cantidad de compuestos fenólicos más que la composición específica de estas sustancias determinan la actividad antioxidante (Siatka & Kašparová, 2010).

El método se fundamenta en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra, por la acción del poli anión molibdotungsto fosfórico para generar un producto coloreado con un máximo de absorción a 765 nm. Una de las modificaciones al método propuesta por Singleton implica el uso de ácido gálico como compuesto fenólicos de referencia, de tal manera que los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico.

Sin embargo, múltiples trabajos han utilizado igual variedad de estándares, entre los que se cuentan: catequina, ácido tánico, ácido clorogénico, ácidocafeíco, ácidoprotocatecuico y ácidoferúlico, lo cual imposibilita la comparación entre muestras, además de las variaciones que implica la no estandarización del método en cuanto a condiciones críticas como proporciones de reactivos, temperatura y tiempo de lectura (Garcés, 2011).

3.11.4 Poder reductor/antioxidante de hierro férrico (FRAP)

En 1996, fue propuesto un método para determinar la capacidad del plasma sanguíneo para reducir iones férricos (“Ferric Reducing Ability of Plasma”, FRAP). La aplicación de este método a la estimación de la capacidad antioxidante de todo tipo de muestras ha dado lugar a una redefinición de las siglas FRAP (por las que comúnmente se conoce este ensayo), pasando a denominarse también este ensayo como poder reductor/antioxidante de hierro férrico (“Ferric Reducing Antioxidant Power”, FRAP) (Benzie & Strain, 1996).

FRAP se fundamenta en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} . El hierro es mediado por un complejo, por ejemplo, la 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) (Figura 5) que se reduce en un medio ácido. Al llevarse a cabo la reducción del Fe^{3+} da como resultado un producto coloreado (azul oscuro) que puede ser medido espectrofotométricamente (593nm) y que se considera que la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de compuestos con potencial redox (Garcés, 2011).

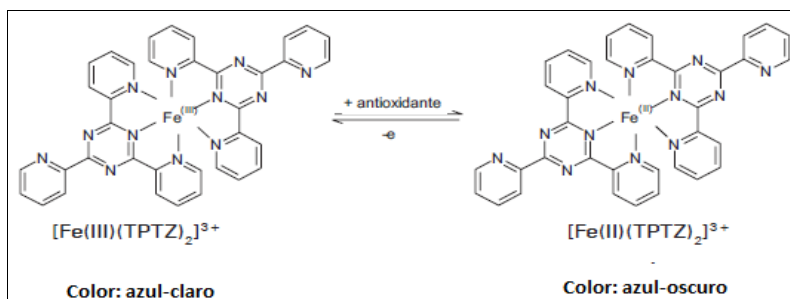


Figura 5: Complejo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) con Fe^{3+} .

Fuente: (Moura, Elesbão, Sousa, Maia, Goes, Perez et al., 2006).

Se cree que el poder reductor esta correlacionado con el grado de hidroxilación y conjugación en polifenoles; sin embargo, la capacidad para reducir el hierro férrico no puede detectar compuestos que actúan por mecanismo de TAH, subestimando el potencial antioxidante de mezclas que contengan, por ejemplo, tioles (Moura et al., 2006).

Se ha argumentado que la capacidad para reducir el hierro se correlaciona poco con la estabilización de radicales libres; sin embargo, la oxidación o reducción de radicales para formar iones puede detener la oxidación en cadena y por lo tanto el poder reductor reflejaría la capacidad de un compuesto para regular el estado redox de especies vegetales. FRAP sigue un mecanismo típicamente TE y, por lo tanto, en combinación con otros métodos puede ser útil para distinguir el mecanismo dominante de diferentes antioxidantes (Garcés, 2011).

El método descrito en 1986 por Oyaizu, se basa en la utilización de diferentes sales como el ferrocianuro de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), el cual aporta el Fe^{3+} que posteriormente será reducido por el extracto vegetal, si es que este posee actividad antioxidante. Se utiliza ácido tricloroacético como precipitante de todo compuesto que no es de interés con el fin de dejar libre el complejo para pueda reaccionar con el cloruro férrico (FeCl_3) y dar como

resultado la formación de un compuesto coloreado que puede medirse a 700 nm. Esta metodología utiliza como estándar ácido ascórbico (Duh, Yen, Du & Yen, 1997).

La utilización de este método se ha ido extendiendo por la facilidad en la obtención de los resultados, y se ha aplicado a muchos tipos de muestras biológicas. La principal desventaja de este método es que la capacidad reductora determinada no refleja necesariamente la actividad antioxidante total. Además, dado que el ensayo no incluye ningún sustrato oxidable, es imposible obtener información acerca de las propiedades protectoras de los antioxidantes (Benzie & Strain, 1996).

3.12 Información técnica de las especies vegetales a estudiar

Las especies mesoamericanas que se evaluarán en este proyecto ya han sido estudiadas anteriormente, en las cuales ha sido demostrada la actividad antioxidante con diversas metodologías. Dichos hallazgos se detallan brevemente a continuación, dentro de la descripción de cada una de las especies vegetales que formarán parte del estudio (Cáceres et al., 2012a).

Estas especies son de interés por su aplicación potencial en la industria de productos naturales y en muchas otras áreas. Por esta razón, se pretende seguir con la línea de investigación antioxidante de extractos de hojas de las siguientes especies vegetales:

3.12.1 *Gliricidia sepium* Jacq. (Fabaceae)

3.12.1.1 Sinonimias: *Galedupa pungam*, *Gliricidia lambii*, *G. maculata*, *Lonchocarpus maculatus*, *L. sepium*, *Millettia luzonensis*, *Robinia hispida*, *R. maculata*, *R. sepium*, *R. variegata* (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.1.2 Nombres comunes: madre cacao, matarratón, palo de hierro, cacahuanano, cocuite, cahuiananche, cocoite, chanté, mata ratón, yaité, cocomuite, cocuitle, muiti, cuchunuc, frijolillo, guie-niiza, yaga-le, muites, mata rata, sayab, sayuiab y sakyab (Cáceres, 1996).

3.12.1.3 Descripción botánica: árbol pequeño a mediano, de 2-15 m de altura. A menudo presenta múltiples tallos. Copa abierta, redondeada en árboles no descopados. Corteza lisa, pardo grisácea en ramas jóvenes o gris pálido con lenticelas pardas, fisurada en troncos de mayor tamaño. Hojas alternas, pinnadas, de 15-35 cm de largo, compuestas por 6-24 hojuelas elípticas opuestas, acabadas en punta y de 4-8 cm de largo. Cada flor mide unos 2 cm y son rosadas o lila. Frutos con vainas de 10-17 cm de longitud, las inmaduras de color verde rojizo, marrón amarillento al madurar (Standley & Williams, 1976).

3.12.1.4 Hábitat: su capacidad de adaptación la ha llevado a ocupar dunas costeras ligeramente salinas, bancos ribereños, planicies inundables, faldas de montañas, barrancos, áreas perturbadas, terrenos abiertos y terrenos inestables de las orillas de los ríos. En su ámbito de distribución natural prevalece un clima sub-húmedo relativamente uniforme, con temperaturas de 20 a 30°C, precipitaciones anuales de 500 a 2.300 mm. Crece igualmente en suelos derivados de material calcáreo, ígneo o volcánico. Se adapta tanto a suelos húmedos como a secos (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.1.5 Usos populares y medicinales: las hojas, raíces, semillas y corteza son venenosos para los roedores y perros, y la corteza u hojas secas, molidas y mezcladas con maíz cocido se usan a veces como veneno para ratas. Es una especie ornamental muy atractiva, y las

flores son una excelente fuente de néctar para las abejas melíferas. Las flores incluso se cocinan en algunas áreas en platos locales (Gómez, Estrada, Fernández & Botello, 2012).

Las hojas se usan como antipirético. La infusión se emplea para afecciones de la piel (erupciones, erisipela, quemaduras, picaduras de insecto y úlceras). Las hojas se emplean también como insecticida y como abortivas para el ganado vacuno. También puede actuar disminuyendo la actividad locomotora (Morales, Gómez, Iglesias & Villar, 2001).

3.12.1.6 Composición química: estudios realizados en el duramen del tallo demuestran la presencia de los flavonoides 2-7-dihidroxi-3'-metoxi-isoflavano-3'-4'-7'-trihidroxi, flavanona, gliricidin, gliricidol, isomucronulatol, robinetín, sepinol, sepiol, 2'-0-metilsepiol; los flavonoides astragalín, robinin y trifolín se han detectado en las flores; el azúcar raro pinitol, en las hojas y el polipéptido canavanina en las semillas (Kojima, Zhu & Ogihara, 1997).

3.12.1.7 Farmacología y Toxicología: se han evaluado diversas acciones farmacológicas con extractos etanólicos-acuosos (1:1) obtenidos a partir de las partes aéreas de las plantas. Administrado por vía oral, han resultado positivas la acción antiinflamatoria en ratas, por vía oral, antiespasmódica en fíleon de cobayo, diurética en ratas por la vía intraperitoneal, e hipotérmica en ratones por la misma vía (Aragón, Torija, Avelleira, Tapia, Contreras & López, 2008).

3.12.1.8 Actividad antioxidante: un estudio demostró que el extracto etanólico de las hojas de *Gliricidia sepium* posee baja actividad antioxidante, obteniendo resultados según la metodología macrométrica DPPH (CI₅₀ 0.47±0.12 mg/mL) y micrométrica (CI₅₀ 0.31±0.02

mg/mL) en donde CI_{50} equivale al 50% de concentración inhibitoria de DPPH expresada en mg de extracto. Mediante la metodología de fenoles totales macro y micrométrica el resultado fue, respectivamente, de $(49.94 \pm 3.48 \mu\text{g equivalentes de ácido gálico/mg de extracto})$ y $(313.53 \pm 18.91 \mu\text{g/mg})$ (Cáceres et al., 2012a).

3.12.2 *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae)

3.12.2.1 Sinonimias: *Goniostachyum graveolens*, *Lantana originoides*, *L. graveolens*, *Lippia amentácea*, *L. berlandieri*, *L. tomentosa* y *L. bolandieri* (Cáceres, 1996).

3.12.2.2 Nombres comunes: Orégano mexicano, orégano de cerro, orégano del monte, orégano de la tierra, mejorana, salvia, hierba dulce, xaak-ché y xakilché (Cáceres, 1996).

3.12.2.3 Descripción botánica: planta arbustiva delgada que puede llegar a medir hasta 2 m de alto, ramas con pubescencia cortante pilosa. Están provistas de tricomas cortos. Hojas en peciolos 5-10 mm de largo, oblongas e elípticas de 2-4 cm de largo, obtusas o redondas en el ápice, subcordadas a la base, densamente pilosas. Las flores pequeñas son blancas, subglobosas a oblongas de 4-12 mm de largo, brácteas ovando lanceoladas, agudas; cáliz 1-2 mm de largo, glandular; corola blanca, 3-6 mm de largo (Standley & Williams, 1976).

3.12.2.4 Hábitat: se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas, en partes planas, húmedas o secas, a elevaciones bajas, de aproximadamente 300-400 m sobre el nivel del mar. En Guatemala es reportado en los departamentos del Progreso, Zacapa y el Petén (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.2.5 Usos populares y medicinales: por su sabor, aroma y valor nutritivo las hojas secas se usan para sazonar carne, pescado, embutidos, ensaladas, guacamol, pozol, salsas y licores; además se usa como planta de jardín y para preparar arreglos florales. El aceite esencial tiene uso en perfumería, jabonería y cosmética (Martínez, 1992).

La decocción o infusión de hojas, se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales y respiratorias, hidropesía, ictericia, amenorrea, dismenorrea y reumatismo. La decocción en leche se usa para tratar asma y bronquitis; un jarabe de las hojas secas se usa para tratar diabetes, disentería, catarro y resfríos. Por sus propiedades desinfectantes la decocción se utiliza tópicamente para quemaduras, cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta; en baños se usa para fortalecer niños debilitados, combatir la gripe y para aliviar el prurito y la sarna; en cataplasma para adurar abscesos, calmar neuralgias y aliviar induraciones, cáncer y tumores; en fricciones y baños se usa como calmante. La planta fresca macerada en aceite se aplica a los dolores reumáticos. Se le atribuye propiedad antitusiva, antidiarreica, broncodilatadora, antioxidante, antiséptica, aromática, calmante, carminativa, cicatrizante, desinflamante, diaforética, expectorante, diurética y tónica (Cáceres, 1996).

3.12.2.6 Composición química: las hojas contienen glicosidos saponinicos, flavononas (pinocembrina, naringenina), lapachenol, icterogenina, taninos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales. La corteza y raíz contienen glicosidos saponinicos, aceite esencial y taninos (Domínguez, Sánchez, Suárez, Baldas & González, 1989).

Diferentes autores han reportado los siguientes compuestos en el aceite esencial de orégano: alcohol amílico, α -pineno, dipenteno, p-cimeno, acetato de bornilo, timol,

carvacrol, timoquinona y sesquiterpenos (α -humuleno, β -cariofileno, β -bisaboleno) (Domínguez et al., 1989).

3.12.2.7 Farmacología y toxicología: los extractos acuoso y etanólico de hojas de *L. graveolens* (500 ppm) presentan cierta toxicidad dosis-dependiente contra peces del género *Mollinesia*. Su administración durante el embarazo está contraindicada, ya que puede producir aborto. El lapachenol tiene actividad carcinogénica y podría explicar cierta actividad antiinfertilidad atribuida. La dosis letal del carvacrol por vía oral en conejos es 100 mg/Kg (Domínguez, García, Ramírez, Morán & Serrano, 2012).

3.12.2.8 Actividad antioxidante: en estudios realizados en 2007, la actividad antioxidante se evaluó en los extractos por el método DPPH. La reducción del radical con los extractos de prueba fue mayor a 91.2% en 100 mg/mL, excepto para el extracto acuoso que fue de 87.6% en 50 mg/mL, los valores de CI_{50} fueron relevantes para el extracto de acetato de etilo (sólido: 11.24 ± 1.10 mg/mL; extracto fluido: 12.94 ± 0.63 mg/mL). Estos resultados muestran la presencia en el tallo de moléculas bio-activas útiles para el desarrollo de fármacos derivados de productos naturales (González, Soto, Kite & Martínez, 2007). Según un estudio realizado en 2008, se demostró actividad antioxidante en los extractos metanólicos de aceites esenciales mediante el ensayo DPPH (Martínez, Puga, Hernández, Loarca & Mendoza, 2008). Otros estudios indican mediante metodología macrométrica de DPPH valores de (CI_{50} 0.136 ± 0.001 mg/mL) y micrométrico de (CI_{50} 0.127 ± 0.003 mg/mL). En el método macrométrico de fenoles totales el resultado fue de (55.31 ± 1.06 μ g/mg) y micrométrico de (28.54 ± 0.003 μ g/mg) respectivamente (Cáceres et al., 2012a).

3.12.3 *Litsea guatemalensis* Mez. (Laureceae)

3.12.3.1 Sinonimias: *Litsea acuminatissima*, *Litsea matudau*, *Tetranthera glaucescens* (Cáceres, 1996).

3.12.3.2 Nombres comunes: Aguairel, laurelillo, dpac-tzé, sufricalla, zit-zuch (Cáceres, 1996).

3.12.3.3 Descripción botánica: árboles 2-6 m de alto, ramas jóvenes teretes, glabras esparcidamente pubescentes, corteza oscura, pardo-rojiza o amarillo verdosas. Hojas alternas, peciolo 0.8-1.1 cm largo, glabros a densamente pubescentes: láminas 5.0-8.5 cm largo, 0.7-2.5 cm ancho, angostamente elípticas a ovadas, base atenuada o aguda rara vez obtusa, haz y envés esparcida a densamente pubescentes, con tricomas largos, rectos y adpresos, pinnatinervadas. Inflorescencia (masculinas y femeninas) axilares, solitarias o agrupadas a lo largo de ramas cortas áfilas, varias flores por inflorescencia, brácteas frecuentemente pubescentes, sobre todo en la nervadura principal. Frutos 0.9 mm diámetro, negros cuando maduros, discoide con tricomas largos (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.3.4 Hábitat: crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1500-3150 msnm; se ha descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá (Cáceres, 1996).

3.12.3.5 Usos populares y medicinales: las hojas aromáticas son muy empleadas como condimento en la preparación de platillos como sopas, guisos y repostería, se usa en forma similar a *Laurus nobilis*. De las hojas se extrae un aceite etéreo con aplicación en la industria de cerveza y salchichas (Cruz et al., 2012).

El cocimiento de hojas para tomar por vía oral se usa para el tratamiento de afecciones respiratorias (amigdalitis, males de la garganta, tos, tos ferina) y gastrointestinales (diarrea, cólico, úlcera), carencia de leche en la madre e hinchazón; por vía tópica se usa en lavado y baños para cansancio epilepsia. El cocimiento de la corteza se usa para tratar mordeduras de culebras y de perros. Tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia; en sahumeros se usa para parálisis. Se le atribuye propiedad aromática, antiséptica, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante, espamolítica, febrífuga y pectoral (Cáceres, 1996).

3.12.3.6 Composición química: se encuentra muy poca información sobre la composición química de las tres especies endémicas del país. Por su olor característico similar a *Laurus nobilis*, se asume que tiene un aceite esencial rico en derivados terpénicos y glicéridos de los ácidos láurico, oleico, palmítico y linoléico. El tamizaje fitoquímico de *L. guatemalensis* indica: alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, quercitina, estibina y taraxon; el aceite esencial contienen limoneno y citral (Cruz et al., 2012).

3.12.3.7 Farmacología y toxicología: la tintura de hojas de *L. guatemalensis* no tiene actividad contra enterobacterias, pero tiene moderada actividad contra *C. albicans*, *E. floccosum* y *M. canis*. El extracto etanólico presenta actividad insecticida contra hormigas, realizó la evaluación de la actividad antiinflamatoria de las infusiones al 10% a dosis de 750 y 1000 mg/Kg, determinando que no presentó dicha actividad (Hernández, 2007).

El extracto etanólico de *L. guatemalensis* presentó actividad contra *M. smegmatis* a una concentración de 0.25 mg/mL y contra *S. aureus* y *Salmonella typhi* a 1mg/mL.

Ninguno de los extractos vegetales evaluados presentó actividad antimicótica, citotóxica y larvicida (Cruz, 2012).

Los resultados de estudios realizados en Brasil confirman que tanto el extracto etanólico y el compuesto 5,7,3',4'-tetrahidroxi-isoflavona mostraron actividad anti-inflamatoria, para inhibir el edema inducido por carragenina, y también reducir la afluencia de leucocitos, especialmente neutrófilos, a la cavidad pleural y, por consiguiente actividad anti-hiperalgésico (Simão et al., 2012).

3.12.3.8 Actividad antioxidante: en 2012 un estudio realizado en Guatemala, demostró que *L. guatemalensis* posee actividad antioxidante, mediante metodología de fenoles totales macrométrica ($104.24 \pm 26.12 \mu\text{g}/\text{mg}$) y micrométrica ($217.32 \pm 48.48 \mu\text{g}/\text{mg}$) respectivamente; en la metodología con DPPH macrométrica se demostraron valores de ($\text{CI}_{50} 0.05 \pm 0.01 \text{ mg}/\text{mL}$) y en la micrométrica de ($\text{CI}_{50} 0.04 \pm 0.00 \text{ mg}/\text{mL}$) (Cáceres et al., 2012a). Otro estudio evaluó la CI_{50} de los extractos etanólicos, en donde estos presentaron mayor actividad que los diclorometánicos. Los extractos etanólicos de mayor actividad son los procedentes del cerro Alux con una CI_{50} de ($0.87 \text{ mg}/\text{mL}$) y Magdalena Milpas Altas Sacatepéquez con ($0.88 \text{ mg}/\text{mL}$). Mientras que los extractos diclorometánicos de mayor actividad fueron procedentes de Baja Verapaz con una CI_{50} de ($7.48 \text{ mg}/\text{mL}$) y Magdalena Milpas Altas, Sacatepéquez con ($7.28 \text{ mg}/\text{mL}$) (Cruz, 2012).

3.12.4 *Neurolaena lobata* (L.) (Asteraceae)

3.12.4.1 Sinonimias: *Coniza lobata*, *Caeta lobata*, *Plucheasym phytifolia*, *Conyzasym phytifolia* (Cáceres, 1996).

3.12.4.2 Nombres comunes: tres puntas, capitana, contraga vilana, hierba amarga, mano de lagarto, quina y ámica (Cáceres, 1996).

3.12.4.3 Descripción botánica: es una hierba erecta de 1 a 4 m de altura, perenne, hojas alternas con tres lóbulos dentados de 5 a 30 cm de largo, inflorescencias corimbopaniculadas, con cerca de 20 flores de color amarillo a amarillo-naranja, aquenios glabros con 30 o más cerdas de color blanco amarillento (Standley & Williams, 1976).

3.12.4.4 Hábitat: crece en matorrales o bosques de encino húmedos o muy húmedos, comúnmente en vegetación secundaria a campos cultivados a orillas de ríos, laderas y bordes de caminos. Requiere temperaturas de 20 a 36°C. Crece como una maleza, en huamiles o a la orilla de caminos; no tiene riesgo de extinguirse, ya que cada año posee una gran cantidad de semillas que aseguran su reproducción (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.4.5 Usos populares y medicinales: es una especie muy utilizada en la medicina popular en el tratamiento de malaria, parásitos intestinales, malestares estomacales, también en la agricultura orgánica como insecticida. Se ha usado como aperitivo, diurético, antibilioso, para resfriados, diabetes, dismenorrea, fiebre, agrandamiento cirrótico del mesenterio (Chinchilla et al., 2011).

La infusión amarga de hojas es administrada por vía oral para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (diarrea, cólicos), diabetes, malaria y otros procesos febriles, gonorrea e inflamaciones. Las hojas frescas machacadas se aplican tópicamente en áreas de comezón, el jugo es aplicado en la piel como repelente de garrapatas; la infusión se aplica para sanar diversos tipos de lesiones y úlceras. Se le atribuye propiedad antibiótica,

antimalárica, aperitiva, carminativa, diurética, espasmolítica, febrífuga, hipoglicémica, hipotensora y tónica. Es utilizada también para curar dolores gástricos y úlceras (Cáceres, 1996).

3.12.4.6 Composición química: las hojas y tallos contienen un principio amargo constituido por sesquiterpenlactonas (germacranólidos) derivados del timol, más 11 flavonoides: cinco derivados de quercetagenina, cuatro kampferoles y dos luteolinas (Passreiter & Isman, 1997).

3.12.4.7 Farmacología y toxicología: la administración diaria, durante siete días, del extracto acuoso liofilizado de las hojas a dosis de 3 g/Kg en ratones no induce efecto tóxico. El extracto etanólico (a dosis de 4, 6, 8 y 12 mg) y hexánico administrado por vía oral a diferentes dosis a ratones blancos no registró muertes prematuras y dichos animales presentaron un comportamiento normal después de 48 horas después de iniciada la prueba (Anderson, 1996).

La actividad antiagregante plaquetaria de 17 extractos acuosos de plantas tradicionalmente utilizado en Guatemala para la tratamiento de trastornos de la sangre y de las infecciones parasitarias fueron analizadas. La agregación de plaquetas humanas lavadas inducida por la trombina (0,075 UI/mL) fue inhibida por los extractos de *Tridax procumbens*, *Tagetes lucida*, *Annona reticulata*, *Neurolaena lobata*, *Bixa orellana*, *Rauwolfia tetraphylla*, *Petiveria alliacea* y *Tecoma stans*. Los valores de CI_{50} para los otros cinco extractos con actividad antiagregante oscilaron entre 0,5 y 0,9 mg/mL (Villar, Calleja, Morales & Cáceres, 1997).

Extractos, fracciones y lactonas sesquiterpenos de *N. lobata*, se probaron *in vitro* contra promastigotes de *Leishmania* spp., epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y

trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. El extracto etanólico inhibió el crecimiento de los parásitos de *L. mexicana*, *T. cruzi* y *T. vaginalis* significativamente. Los puros germacranolides 1 y una mezcla de 2 y 3, aislada del extracto de etanol, eran muy activos frente a *L. mexicana* y *T. cruzi* (Berger, Passreiter, Cáceres & Kubelka, 2001).

3.12.4.8 Actividad antioxidante: en un estudio de actividad antioxidante de *N. lobata*, se encontró que los extractos etanólicos poseen actividad antioxidante, mediante métodos macro y micrométricos como fenoles totales ($47.51 \pm 5.11 \mu\text{g/mg}$), ($28.11 \pm 0.07 \mu\text{g/mg}$) respectivamente y DPPH macrométrico ($\text{CI}_{50} 0.267 \pm 0.008 \text{ mg/mL}$) y micrométrico ($\text{CI}_{50} 0.161 \pm 0.015 \text{ mg/mL}$) (Cáceres et al., 2012a).

3.12.5 *Ocimum campechianum* Mill. (Lamiaceae)

3.12.5.1 Sinonimias: *O. micranthum*, *O. americanum*, *O. canum* (Cáceres, 1996).

3.12.5.2 Nombres comunes: Albaac, albahaca, albahaca cimarrona, albahaca de gallina, albahaca de monte, albahaca silvestre, albajoque, barsley, baisley, cacaltún, guinocuana, hierba del toro, kajaltun, xkakalun (Standley & Williams, 1976).

3.12.5.3 Descripción botánica: hierba bienal de 1.5 m de alto, fuertemente olorosa, erecta, ramificada. Hojas opuestas, elípticas u oblongas, puntiagudas, 2-4 cm de largo, dentada, verdes o moradas. Flores sin tallo, 9-10 mm de largo, separadas en racimos espinosos, 20-25 cm de largo, moradas o blancas. Semillas brillantes, café oscuro o negro, oblongas, oleosas, cubiertas de mucílago (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.5.4 Usos populares y medicinales: las hojas frescas y secas se usan para sazonar comidas y ensaladas. El olor de la planta es un buen repelente contra los mosquitos, razón por la que se cuelgan ramas frescas en las viviendas, tiene uso aromático, ornamental y cosmético. Ha sido utilizada para tratar afecciones gastrointestinales, respiratorias y nerviosas. Los indígenas lo han utilizado para dolor de oído y cabeza, inflamación, resfriados, catarros, tos, estreñimientos, dolor de cabeza, nervios, indigestión, diarrea, vómitos, cólicos y parásitos. La decocción de la planta es utilizada para matar larvas, para el dolor de estómago, mal de ojo, reumatismo, gota, fiebre, presión alta, dolor de muelas, llagas, úlceras y granos, insomnio, regulador menstrual y baño posparto (Lino et al., 2005).

3.12.5.5 Composición química: la composición química varía según las condiciones climáticas y genéticas. El tamizaje fitoquímico demuestra derivados terpénicos, saponinas, aceite esencial, safrol, sesquituyeno, tanino, y sales de calcio y potasio. La actividad biológica se atribuye al aceite esencial que le confiere propiedad aromática, antiséptica, aperitiva, digestiva, carminativa, espasmolítica, insecticida y sedante. La actividad tónica se atribuye al alcanfor con propiedad cardiaca y es un analéptico respiratorio (Cruz, 2001).

3.12.5.6 Farmacología y toxicología: los extractos acuosos y etanólicos fueron inocuos en peces del género *Mollinesia*. El jugo de la hoja puede ser ligeramente narcótico, algunos de sus compuestos como safrol y estragol pueden ser cancerígenos. La DL_{50} del estragol en ratas por vía oral es 1,820 mg/Kg, en ratones es 1,250 mg/Kg; la DL_{50} del eugenol en ratas por vía oral es 2,680 mg/Kg, en ratones es de 3,000 mg/Kg. El aceite volátil de la planta inhibe el movimiento de la musculatura intestinal y uterina (Morataya, 2006).

3.12.5.7 Actividad antioxidante: estudios realizados en 2012, demostraron que *O. campechianum* posee actividad antioxidante, esto fue demostrado mediante métodos macrométrico y micrométrico de fenoles totales con resultados de $(55.62 \pm 1.4991 \mu\text{g}/\text{mg})$ y $(33.83 \pm 0.0691 \mu\text{g}/\text{mg})$ respectivamente. La metodología macrométrica de DPPH, reportó una baja actividad de CI_{50} $(0.025 \pm 0.002 \text{ mg}/\text{mL})$ al igual con el método micrométrico $(0.121 \pm 0.002 \text{ mg}/\text{mL})$ (Cáceres et al., 2012a).

3.12.6 *Phlebodium pseudoaureum* Cav. (Polydiaceae)

3.12.6.1 Sinonimias: *Goniophlebium areolatum*, *Phlebodium aureum*, *Polypodium aureum*, *P. areolatum* (Standley & Williams, 1976).

3.12.6.2 Nombres comunes: Calaguala, calahuala, polipoido, helecho azul (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.6.3 Descripción botánica: el rizoma es de 0.7-1.5 cm de ancho, generalmente farinoso, escamas 5-8 mm subenteras a moderadamente denticuladas, la harina blanca, las escamas concoloras, generalmente anaranjadas, no clatradas; hojas monomorfas, pinnatisectas, a menudo glaucas en el envés articuladas al rizoma; con ápice atenuado, agudo o acuminado; pinnas de 10-33 x 1-3 cm, glabras en el envés, los márgenes engrosados y cartilagosos, enteros o casi enteros; nervaduras areoladas, las aréolas con o sin nérvulos incluidos; soros redondeados, sin parafisos, dispuestos en el ápice fusionado de 2 nérvulos incluidos, en 1-7 series entre la costa y el margen; esporas hialinas (Standley & Williams, 1976; Gattuso, Cortadi & Gattuso, 2008).

3.12.6.4 Hábitat: crece silvestre en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Se encuentran desde México y Centro hasta Sur América en alturas de 1200-2,200 msnm (Martínez, 1992). En Guatemala se han descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (Cáceres, 1996).

3.12.6.5 Usos populares y medicinales: el uso vernáculo les atribuye propiedades analgésicas, expectorantes, febrífugas, tranquilizantes, depurativas, diuréticas, antiinflamatorias, emenagogas y espasmolíticas. La infusión y decocción del rizoma de *P. pseudoaureum* se usa oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, estreñimiento y gastritis) respiratorias (asma, tos, tos ferina) y cardíacas, dolor de huesos, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre, parásitos, enfermedades venéreas, sífilis y afecciones renales (cálculos, hidropesía) (González, Lebrero, Del Rio & Jaén, 2007).

3.12.6.6 Composición química: el rizoma contiene azúcar, aceite esencial, mucílago, almidón, nitrato de potasio y colorante rojo, además contiene calagualina, polipodina, aceites grasos y taninos, así como esteroides (ecdisterona y dos ecdisonas como la polipodaureina). Ecdisona: Secretado por el tejido ecdisial y luego es transformado en un compuesto más activo que es la 20-hidroxiecdisona, con peso molecular de 480.63, es inestable en solución alcalina, UV máxima de 243 nm, punto de fusión 240-242°C. Adenosina: Es un nucleósido distribuido en la naturaleza en formas de cristales con punto de fusión entre 234-235°C se observa a 260 nm (UV), prácticamente insoluble en alcohol y en terapéutica es utilizado como antiarrítmico (Meza et al., 2006).

3.12.6.7 Farmacología y toxicología: *P. pseudoaureum* es un antiinflamatorio, con mecanismo de acción similar a los corticosteroides y un inmunomodulador que estimula la acción de los linfocitos T. Es un espasmolítico, tranquilizante. Tiene efectos adversos, indeseables y contraindicaciones; puede producir irritación de la mucosa gástrica. Se ha descrito un efecto potenciador de los digitálicos, y la inducción de ligeras hiperglucemias en pacientes diabéticos. Contraindicado en casos de gastritis, úlceras gastroduodenales, diabetes, tratamiento con heterósidos cardiotónicos (Alonso, 2004).

3.12.6.8 Actividad antioxidante: Estudios de actividad antioxidante de *P. pseudoaureum*, demostraron actividad antioxidante mediante el método macrométrico de fenoles totales dando $(119.18 \pm 1.45 \mu\text{g}/\text{mg})$ y en el método micrométrico $(74.28 \pm 0.65 \mu\text{g}/\text{mg})$. Por el método macrométrico de DPPH se obtuvieron valores de $(\text{CI}_{50} 0.051 \pm 0.001 \text{ mg}/\text{mL})$ y micrométrico $(\text{CI}_{50} 0.040 \pm 0.002 \text{ mg}/\text{mL})$ (Cáceres et al., 2012a). Las hojas de *P. pseudoaureum* están relacionadas con la presencia y el contenido de compuestos fenólicos, el alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes (Aldana, 2007).

3.12.7 *Pimenta dioica* (L.) (Myrtaceae)

3.12.7.1 Sinonimias: *Caryophyllus pimento*; *Eugenia micrantha*; *E. pimenta*; *Evanesca crassifolia*; *Myrtus dioica*; *M. pimenta*; *Pimenta officinalis*; *P. pimenta*; *P. vulgaris*; *Pimentus vera* (Standley & Steyeramak, 1952).

3.12.7.2 Nombres comunes: pimienta, malagueta, pimentón, pimienta de tabasco, patalolote, u'cum, u'cun, u'ucum, xococóchitl (Standley & Williams, 1976).

3.12.7.3 Descripción botánica: árbol perennifolio de 6-10 m (hasta 30 m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de 20-50 cm. Hojas simples, opuestas, decusadas; lámina de 4-16 cm de largo por 2-6 cm de ancho, elíptica. Al estrujarlas emanan un olor a pimienta. Tronco derecho, ligeramente acanalado. Flores en panículas axilares de 6-12 cm de largo, con las ramas cimosas, finamente pubescentes; pedicelos de 1-5 mm o flores sésiles; flores actinomorfas, fragantes, de 6mm de diámetro; cáliz verde y pétalos blancos (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.7.4 Hábitat: Se desarrolla en climas de tipo cálido húmedo con lluvias todo el año, cálidas húmedas y sub-húmedos con lluvias en verano. Prospera sobre suelos arcillosos derivados de margas calcáreas (Chiapas). Suelos: negro rocoso, profundo, lateríticos con textura migajónarcillosa, arbumíferos y gley (Morán, 1996).

3.12.7.5 Usos populares y medicinales: Tiene uso como aromatizante el fruto, la semilla y la hoja. El fruto y semilla contienen un aceite esencial que se usa como agente aromatizante. Las hojas contienen esencias volátiles que se utilizan para la fabricación de cosméticos, esencias y perfumes y como fuente para la elaboración de eugenol y vainillina. También posee Actividad insecticida contra el gorgojo común del maíz (Macía, 1998).

La hoja se utiliza para té y sirve para espasmo, ventazón, acelera el parto, náuseas, vómito, dolor de estómago, disentería, diarrea. El aceite de la semilla se usa como estimulante y tónico, también como antiséptico y carminativo. Las hojas una vez destiladas

se usan como estomáquico contra dolores reumáticos (desinflamante) y contusiones, antidiabética, febrífuga, espasmolítica. El fruto aromático (pimienta) se utiliza como condimento alimenticio. Se utiliza en la elaboración de encurtidos, salsas y para condimentar carnes (Hoogesteger, 1988).

3.12.7.6 Composición química: Vitamina C, β -carotenos, tiamina. Contiene los minerales aluminio, cromo, vanadio; en el fruto contiene potasio, calcio, magnesio, fosforo, hierro, sodio, zinc y boro. Por otra parte, el fruto contiene ácido málico. En cuanto a su composición orgánica contiene cinamaldehído. También losmonoterpenes cineol, limoneno, felandreno y α -pineno, los sesquiterpenos cariofileno, alo-aromadendreno, epizonareno, muuroleno yselineno, y los alcholeslinalol (terpeno), eugenol ychavicol (fenilpropanos) (Macía, 1998).

3.12.7.7 Farmacología y toxicología: Esta planta presenta una notable actividad antifúngica, en especial el aceite esencial extraído de las hojas y frutos. Otras actividades evaluadas, que dieron resultados negativos, fueron la actividad antiviral y citotóxica, potenciadora y de disminución del tiempo de efecto de barbitúricos, así como efecto estrogénico (Seikizawa & Shibamoto, 1982).

3.12.7.8 Actividad antioxidante: Se ha demostrado que las hojas de *P. dioica* poseen actividad antioxidante, medida por los métodos macro y micrométricos de DPPH, obteniéndose los resultados de (CI₅₀ 0.016±0.001 mg/mL) y (CI₅₀ 0.015±0.001 mg/mL) respectivamente. Por el método de fenoles totales macrométrico se obtuvo (152.50±2.65 μ g/mg) y micrométrico (75.89±0.15 μ g/mg) (Cáceres, 2012a).

Los extractos solubles en éter de petróleo y metanólico-clorofórmico presentan actividad antioxidante (Seikizawa & Shibamoto, 1982).

3.12.8 *Smilax domingensis* Willd. (Smilacaceae)

3.12.8.1 Sinonimias: *S. caudata*, *S. lundellii*, *S. lanceolata*, *S. microscola* (Cáceres, 1996).

3.12.8.2 Nombres comunes: zarzaparrilla, tietie, china-root, zarza y corona de Cristo, bejuco de la vida, cocolmea, cuculmea, diente de chucho (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.8.3 Descripción botánica: tallos teretes, escasamente armados en la parte inferior con aguijones robustos recurvados, inermes en la parte superior. Hojas 6-15 cm por 1.5-10 cm, 1.4-6 veces más largas que anchas, ovadas, lanceoladas-ovadas, o lanceoladas, cartáceas, inermes, 5-nervias desde la base, las nervaduras primarias prominentes en el envés, no impresas en el haz, el par exterior submarginal, las nervaduras secundarias conspicuas, algo prominentes, reticuladas, el ápice brevemente acuminado obrevicuspidado, la base aguda, el margen entero; pecíolos 0.5-2 cm. Umbelas estaminadas solitarias; pedúnculo 1-5 mm, más corto que el pecíolo subyacente, subterete (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.8.4 Hábitat: crece en bosques o matorrales húmedos, desde cerca del nivel del mar hasta los 1,200 msnm (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.8.5 Uso populares y medicinales: esta especie americana se utilizaban principalmente para curar enfermedades reumáticas la piel y como afrodisiaco o tónico general las tribus de

la cuenca amazónica la utilizaban para combatir la lepra, la psoriasis o la dermatitis (López, 2004).

Las raíces y rizomas de algunas especies del género se utilizan como colorantes de refrescos. Se usa por vía oral para el tratamiento de anemia, afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, inapetencia), hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores. La decocción se aplica tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, liquen plano, tinea, psoriasis) (Cáceres, Cruz, Martínez & Gattuso, 2009).

3.12.8.6 Composición química: el tamizaje fitoquímico indica la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glucósidos esteroidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas. Se han aislado agliconas esteroidales (parillina, sarsasapogenina, smilagenina), β -sitosterol, stigmasterol, ácido sarsápico (Ferrufino & Gómez, 2004).

3.12.8.7 Farmacología y toxicología: la decocción tiene una DL_{50} por vía oral en ratones mayor de 30 g/Kg. La administración aguda del extracto no tiene efectos tóxicos en ratones; la crónica no produce ni síntomas, ni cambios sanguíneos sugestivos de toxicidad. La DL_{50} del extracto de la parillina cristalizada en ratones es de 10 mg/Kg administrada por vía intraperitoneal y 30 mg/Kg por vía oral (Cáceres, 1996).

3.12.8.8 Actividad antioxidante: estudios de la actividad antioxidante de *Smilax domingensis*, demostraron que posee actividad antioxidante mediante métodos como fenoles totales, la cual dio un resultado en la metodología macrométrica de $(287.77 \pm 3.70$

µg/mg) y micrométrica de (184.29±0.41 µg/mg). Otra metodología utilizada para la demostración de la actividad fue mediante el radical DPPH en macrométrico dando (CI₅₀ 0.015±0.001 mg/mL) y en el método micrométrico de (CI₅₀ 0.008±0.001 mg/mL) (Cáceres et al., 2012a).

3.12.9 *Solanum nigrescens* Mart. & Gal. (Solanaceae)

3.12.9.1 Sinónimos: *Solanum douglasii*, *Solanum oligospermum* (Cáceres, 1996).

3.12.9.2 Nombres comunes: hierba mora, quilete, macuy, chichiquelite, hierba mora negra, ix pakgcha tantisiksi, mustuluk (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.9.3 Descripción botánica: mide 0.5-3 m de alto; tallo piloso. Hojas en pares o solitarias de diferentes tamaños, forma similar, enteras o dentadas, lanceoladas, 3-18 cm de largo, ápice acuminado, base atenuada. Pecíolo 5.35 mm de largo; inflorescencia intermodal, racemiforme; pedúnculos 1-3 cm de largo; cáliz 1-15 mm de largo, lobulado; corola blanca o lila, mancha oscura en la base; filamentos ciliados; anteras 3-4 mm de largo; 5 estambres que en conjunto forman un cono de 2-3 mm de largo. Flor bisexual; cáliz 5 lobulado, de 1 a 1.25 mm de largo, ligeramente acrescente, deflexo, verde; ovario glabro. Fruto globoso, negro, en baya de 4-7 mm de diámetro; semilla 1-1.5 mm de largo (Standley & Steyermark, 1952).

3.12.9.4 Hábitat: está presente en climas cálido, semi-seco y templado desde el nivel de mar hasta los 3000 m. Se encuentra asociada a vegetación perturbada de bosque tropical perennifolio, matorral xerófilo, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino (Morán, 1996).

3.12.9.5 Usos populares y medicinales: la hoja madura en decocción o aplicación local en lavados vaginales, en la disípela y los erisemas, el fruto se aplica a manera de cataplasma o planta molida se pone en todo el cuerpo para quitar las erupciones y el enrojecimiento de la piel. El jugo utilizado en dolores de ojos y oídos se usa el jugo de la planta en gotas aplicándolo directamente (Argueta, Cano & Rodarte, 1994).

Suele emplearse en trastornos digestivos como bilis, dolor de estómago, estreñimiento de bebés recién nacidos, para el hígado, en la inflamación estomacal por alcohol y en úlceras estomacales. Otros usos son para problemas de bronconeumonía, catarro y pulmón; en inflamación de vientre y de riñón; cuando hay calor del cuerpo; contra mordida de coyote, piquete de hormiga o de insecto, tiricia y contra el susto (Argueta et al., 1994).

Se menciona su utilidad como cicatrizante, excitante, tónico y vulnerario y para usarlo como enjuague de pelo. Por su contenido de sales minerales es bueno reconstituyente, por lo que se recomienda en el tratamiento de anemia y debilidad de organismo (Germosén-Robineau, 2005).

3.12.9.6 Composición química: el tamizaje fotoquímico demostró alcaloides, esteroides policíclicos insaturados, saponinas, azúcares 2-desoxigenados, taninos, cardenolidos, ácido málico, riboflavina, tiamina, ácido ascórbico y sales minerales. La actividad fungicida se atribuye a la cantalosaponina (He et al., 1994).

3.12.9.7 Farmacología y toxicología: la α -solanina tiene una DL_{50} de 42 mg/Kg por vía intraperitoneal. Los principios tóxicos se atribuyen a la solanina y solanidina; los síntomas

de intoxicación son: vómitos, diarrea, dolores de cabeza y estómago, dificultad para ver y hablar, debilidad, sudoración, frío, alteración del pulso, alucinaciones e inconciencia (Cáceres, 1996).

3.12.9.8 Actividad antioxidante: estudios sobre actividad antioxidante de *Solanum nigrescens*, demostraron la actividad antioxidante la metodología macro y micrométrica de fenoles totales, la cual mostró resultados de $(51.86 \pm 2.73 \mu\text{g}/\text{mg})$ y $(88.45 \pm 3.80 \mu\text{g}/\text{mg})$ respectivamente. Con el método DPPH se obtuvo los valores $(\text{CI}_{50} 0.22 \pm 0.04 \text{ mg}/\text{mL})$ y $(\text{CI}_{50} 0.16 \pm 0.00 \text{ mg}/\text{mL})$ (Cáceres et al., 2012a).

3.12.10 *Tagetes lucida* Cav. (Asteraceae)

3.12.10.1 Sinónimos: *T. florida* (Cáceres, 1996).

3.12.10.2 Nombres comunes: pericón, i'yá, jolomocox, ucá, hierbanís, jericón, vomol, Santa María, ichka, cuahuayautli (Cáceres, 1996).

3.12.10.3 Descripción Botánica: hierba glabra y erecta, 30-95 cm de alto, se levanta desde una base corta y gruesa; cimosamente ramificada. Hojas expuestas, oblongolanceoladas, 5-10 cm de largo, puntiagudas, con numerosas glándulas oleosas. Flores amarillas en pequeñas cabezuelas terminales (Standley & Williams, 1976).

3.12.10.4 Hábitat: nativa de México a Honduras en bosques de encino y laderas de 1000-2000 msnm. Abundante en la época de lluvia, desaparece en la época seca (Standley & Williams, 1976).

3.12.10.5 Usos populares y medicinales: usada en té como tónico, como insecticida, fines ceremoniales y para condimentar bebidas y licores. Se utiliza contra diarrea, disentería, empacho, vómito, reumatismo, asma, tifoidea, varices y resfriado. Se utiliza también como antihelmíntico y abortivo (Guadarrama, Alarcón, Lezama, Vásquez & Bonilla, 2008).

3.12.10.6 Composición química: las hojas y flores contienen: aceite esencial, alcaloides cuaternarios, flavonoides (quercetagina, patuletina), saponinas, taninos, leucoantocianinas, ácido gálico, poliacetilenos, glicósidoscianogénicos, cumarinas (dimetilaliléter de 7-hidroxycumarina, 7-metoxicumarina, y 6,7,8-trimetoxicumarina), derivados de tiofeno, α -tertieleno, poliacetilenos, grasas, pectina y sales minerales (Abdala, 1999).

3.12.10.7 Farmacología y toxicología: las hojas y flores son activas contra enterobacterias (*E. coli* enteropatógena, *S. dysenterie*, *S. flexneri*, *S. typhi* y *S. pyogenes*). Popularmente se le atribuye propiedad abortiva. La DL_{50} de los extractos con actividad espasmolítica por vía oral es mayor de 100 mg/Kg de peso. El extracto alcohólico provoca en algunas personas síntomas cardiovasculares (Mansoor & Mashkoor, 1988).

3.12.10.8 Actividad antioxidante: estudios recientes de la actividad antioxidante de la especie *Tagetes lucida*, demostraron actividad antioxidante utilizando métodos como fenoles totales, el cual dio resultados en la metodología macrométrica de $(133.19 \pm 12.30 \mu\text{g}/\text{mg})$ y $(273.25 \pm 20.77 \mu\text{g}/\text{mg})$ en la metodología micrométrica. Por medio del radical DPPH se obtuvieron valores de $(CI_{50} 0.020 \pm 0.001 \text{ mg}/\text{mL})$ y $(CI_{50} 0.02 \pm 0.00 \text{ mg}/\text{mL})$ macro y micrométricamente respectivamente (Cáceres et al., 2012a).

4. JUSTIFICACION

En los últimos años se ha reconocido que muchas enfermedades pueden estar asociadas a RL; condiciones patológicas como cáncer, arterosclerosis y el envejecimiento, podrían ser causadas por sustancias que pueden provocar reacciones oxidativas en el organismo y desencadenar enfermedades metabólicas, infecciosas, neurodegenerativas y cardiovasculares.

Los antioxidantes son sustancias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, están presentes incluso en especies que son utilizadas como alimentos o medicamentos, y pueden llegar a jugar un papel importante en la regulación del proceso de oxidación en los seres humanos, pudiendo además prevenir los efectos perjudiciales que dicho proceso puede llegar a ocasionar, de ahí la importancia del desarrollo y aplicación de métodos para el estudio y la búsqueda de la actividad antioxidante en especies vegetales.

En Guatemala se han llevado a cabo varios proyectos de investigación en búsqueda de actividad antioxidante en especies vegetales usadas como alimento, condimento o medicina, en los que se han utilizado diversas metodologías como DPPH y ABTS, que miden la capacidad estabilizadora de RL, y fenoles totales, que determina el contenido de compuestos fenólicos en una muestra, lo que se asocia con la capacidad antioxidante de la misma.

Debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un único método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, es por eso que la utilización de distintas metodologías provee mayor información de dicho perfil. Con el afán de continuar con la investigación de actividad antioxidante, en el presente trabajo se estableció un cuarto ensayo, para medir el poder reductor del hierro (FRAP), el cual provee

información sobre la capacidad de una sustancia para detener la oxidación en cadena y regular así el estado redox, mediante la reducción de RL. FRAP consiste en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , siendo este último medible en forma proporcional a la concentración de antioxidante presente.

Existen dos métodos de FRAP, el macro (método de referencia) y el micrométrico, este último no ha sido utilizado tan ampliamente como el de referencia, pero algunos investigadores han optado por su utilización puesto que lleva menor tiempo para su desarrollo y consume menor cantidad de reactivos y muestra. Con el propósito de determinar si dichos métodos pueden utilizarse de forma equivalente, se desarrolló el presente trabajo, para establecer si el método micrométrico puede sustituir al de referencia en futuras investigaciones, debido a las ventajas que este presenta.

Para este estudio se seleccionaron diez especies vegetales nativas de Mesoamérica (*G. sepium*, *L. graveolens*, *L. guatemalensis*, *N. lobata*, *O. campechianum*, *P. pseudoaureum*, *P. dioica*, *S. domingensis*, *S. nigrescens* y *T. lucida*), con el objeto de continuar con la búsqueda de actividad antioxidante en las mismas y contribuir de esta manera a ampliar la información sobre las propiedades de los productos naturales que puedan tener potenciales aplicaciones en la industria y/o la medicina.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la equivalencia entre dos métodos para la evaluación de la capacidad reductora de hierro de diez especies nativas de Mesoamérica con potencial antioxidante.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Determinar la actividad antioxidante de diez especies nativas de Mesoamérica cuantitativamente por el método macrométrico de FRAP.

5.2.2 Determinar la actividad antioxidante de diez especies nativas de Mesoamérica cuantitativamente por el método micrométrico de FRAP.

5.2.3 Determinar si el método micrométrico de FRAP puede ser utilizado en lugar del macrométrico (método de referencia) para la determinación de actividad antioxidante en especies vegetales.

6. HIPOTESIS

Los métodos macrométrico y micrométrico a utilizarse para la determinación de actividad antioxidante mediante la reducción de hierro, son equivalentes.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

Especies nativas de Mesoamérica utilizadas como alimentos y/o medicamentos.

7.1.1 Muestra

Extractos etanólicos de las hojas de diez especies vegetales: *G. sepium*, *L. graveolens*, *L. guatemalensis*, *N. lobata*, *O. campechianum*, *P. pseudoaureum*, *P. dioica*, *S. domingensis*, *S. nigrescens* y *T. lucida*.

7.2 Recursos

7.2.1 Recursos humanos

Para la realización de los bioensayos en el presente proyecto se contó con los seminaristas: Brs. Gustavo Castro, Pedro Orellana y Yemsy Pajares.

La supervisión de los procedimientos y la revisión del presente proyecto estuvieron a cargo de: Lic. Armando Cáceres. Colaboradores: Licdas. Isabel Gaitán y Nereida Marroquín.

7.2.2 Recursos institucionales

Esta investigación se desarrolló en la Unidad de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica y en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad San Carlos de Guatemala. Con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT).

7.3 Materiales y Métodos

Para la estandarización, realización y posterior comparación de los métodos macro y micrométrico de FRAP, se utilizaron los siguientes materiales y reactivos.

7.3.2 Método FRAP (Duh et al., 1997).

Para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de cada especie, se utilizaron dos métodos de FRAP, que se fundamenta en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Al llevarse a cabo la reducción del Fe^{3+} da como resultado un producto coloreado que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 700 nm, siendo la intensidad del color directamente proporcional a la concentración de compuestos en el extracto con capacidad estabilizadora redox.

Los insumos necesarios para desarrollar el método FRAP macro y micrométrico se citan a continuación, así como el procedimiento para su realización, respectivamente.

7.3.2.1 Equipo

- Espectrofotómetro (rango UV-Visible)
- Espectrofotómetro para microplacas (rango UV-Visible)
- Incubadora
- Centrifuga

7.3.2.2 Materiales

- Pipetas de 10 mL
- Placas estériles de 96 pozos, fondo en V con tapadera
- Micropipetas de 5-200 μL

- Cronómetro
- Agitador de vidrio
- Tubos de ensayo

7.3.2.3 Reactivos

- Amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 6.6
- Ferrocianuro de potasio 1%
- Ácido tricloroacético 10%
- Agua desmineralizada
- Cloruro Férrico 1%

7.3.2.4 Estándar

- Ácido ascórbico

7.3.2.5 Muestras

- Extractos etanólicos de hojas de diez plantas nativas de Mesoamérica (Ver Anexo 1, para procedimiento obtención de extractos)

7.3.2.6 Preparación de muestra y estándar

- Disolver 20 mg de extracto en 1 mL de etanol, a partir de dicha solución preparar soluciones de las siguientes concentraciones: 2.0, 1.0, 0.5, 0.250 y 0.125 mg/mL.

- Disolver 20 mg de ácido ascórbico en 1 mL de agua destilada, a partir de dicha solución preparar soluciones de las siguientes concentraciones: 2.0, 1.0, 0.5, 0.250 y 0.125 mg/mL.

7.3.2.7 Preparación de reactivos

- Buffer de fosfatos (0.2 M, pH 6.6): (agregar 62.5 mL de NaH_2PO_4 (13.61 g/500 mL), 20.5 mL de NaOH (0.1 M) y aforar a 250 mL con agua destilada).
- Disolver 0.1 g de cloruro férrico y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Disolver 1 g de ferrocianuro de potasio y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Disolver 10 g de ácido tricloroacético y aforar a 100 mL con agua destilada.

7.3.2.8 Estandarización de los métodos

Previo a realizar las mediciones y la comparación de los métodos macro y micrométrico, se estandarizaron los mismos, de la manera que se describe a continuación: se preparó una serie de soluciones del estándar sugerido por el método de referencia, ácido ascórbico, de concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL, con las cuales se realizó la curva de calibración respectiva, siguiendo la metodología FRAP, en donde el eje de las abscisas correspondía a las concentraciones de ácido ascórbico y el eje de las ordenadas correspondía a las absorbancias obtenidas con cada nivel concentración. Para cada solución se midió la absorbancia por quintuplicado y se calculó el promedio, por último, con los resultados obtenidos se determinó la ecuación de la recta. El procedimiento anterior se realizó en tres experimentos diferentes, en los que se obtuvo un valor de r^2 de 0.95 a 0.99, para cada curva obtenida. Los niveles de concentración del estándar se definieron en base al rango en el que la curva de calibración respectiva permanecía lineal.

7.3.2.9 Procedimiento para determinación de actividad antioxidante por método de referencia (macrométrico) (Duh et al., 1997).

- Mezclar 1 mL de solución de extracto, 1 mL de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 6.6) y 1 mL de ferrocianuro de potasio (1%).
- Incubar 20 min a 50°C.
- A la mezcla reaccionante, adicionar 1 mL de ácido tricloroacético (10% p/v).
- Centrifugar a 3000 r.p.m. (10 min).
- Mezclar 1.5 mL del sobrenadante de la solución, 1.5 mL de agua destilada y 0.375 mL de cloruro férrico (0.1%).
- Medir la absorbancia (Abs) a 700 nm en espectrofotómetro, luego de realizar el procedimiento anterior.
- Realizar una lectura del estándar de la misma concentración de los extractos y una lectura del blanco de reactivo en cada corrida, para validar la misma. El resultado del estándar debe ser muy cercano a su valor de concentración real.

7.3.2.10 Procedimiento para determinación de actividad antioxidante por método micrométrico (Myoda et al., 2010).

- Mezclar 200 µL de extracto, 200 µL de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 6.6) y 200 µL de ferrocianuro de potasio (1%).
- Incubar 20 min a 50°C.
- A la mezcla reaccionante, adicionar 200 µL de ácido tricloroacético (10% p/v).
- Centrifugar a 3000 r.p.m. (10 min).

- Mezclar 80 μL del sobrenadante de la solución, 80 μL de agua destilada y 20 μL de cloruro férrico (0.1%).
- Medir la absorbancia a 700 nm en espectrofotómetro para microplacas, luego de realizar el procedimiento anterior.
- Realizar una lectura del estándar de la misma concentración de los extractos y una lectura del blanco de reactivo en cada corrida, para validar la misma. El resultado del estándar debe ser muy cercano a su valor de concentración real.

7.3.2.11 Cálculos e interpretación de resultados

7.3.2.11.1 Concentración equivalente de ácido ascórbico

Utilizando la curva de calibración obtenida con el estándar, determinar por regresión lineal la concentración equivalente de ácido ascórbico de cada uno de los extractos analizados, a partir de los resultados de absorbancia obtenidos en cada medición, de la siguiente manera:

x = concentración; y = absorbancia; b = intercepto; m = pendiente;

$x = (y - b) / m = \text{mgEAA/mL} = \text{miligramos equivalentes de ácido ascórbico por mililitro.}$

Luego determinar la cantidad equivalente de ácido ascórbico por miligramo de extracto de la siguiente manera:

$\text{mgEAA/mL} / \text{mg extracto/mL} = \text{mgEAA/mg} = \text{miligramos equivalentes de ácido ascórbico por miligramo de extracto.}$

7.3.2.11.2 Concentración inhibitoria media (CI₅₀):

El CI₅₀ en el ensayo FRAP se calcula determinando la concentración de la muestra que es necesaria para obtener el 50% de la absorbancia máxima que puede alcanzarse con el estándar en su concentración más alta, bajo las condiciones previamente descritas para el ensayo, como sigue a continuación:

Primero calcular el porcentaje de inhibición (% inh) de cada planta y del estándar, para cada una de las concentraciones a las que se evaluó su capacidad reductora de hierro, utilizando la fórmula:

$$\% \text{ inh} = (\text{abs muestra} - \text{abs blanco} / \text{abs máxima del estándar} - \text{abs blanco}) * 100 =$$

Luego con los datos de porcentaje de inhibición (y) y los datos de los niveles de concentración (x) evaluados para cada planta y para el estándar, determinar la ecuación de la recta correspondiente, y mediante regresión lineal calcular la concentración necesaria para alcanzar el 50% de la absorbancia máxima alcanzada por el estándar bajo las condiciones establecidas para el ensayo, de la siguiente manera:

(x) = concentración de la muestra; (y) = % inh; b = intercepto; y m = pendiente;

Donde (y) = 50% de inhibición. (x) = (50 - b) / m = mg/mL.

7.3.2.11.3 Comparación de métodos

Para determinar la equivalencia entre los métodos, se realizó un análisis univariado de los resultados obtenidos por los métodos macro y micrométrico de FRAP, expresados en mgEAA/mL, utilizando la prueba de t de student para diferencias pareadas a un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$), mediante el paquete estadístico SPSS versión 20.0 para Windows, esto se realizó para cada uno de los extractos del estudio.

7.3.2.11.4 Interpretación de resultados

Basándose en la curva realizada con el estándar se obtienen las concentraciones relativas de antioxidante presente en el extracto, mediante regresión lineal. Una alta concentración relativa de ácido ascórbico indica un alto poder reductor, es decir mayor capacidad antioxidante.

Cuanto menor sea un valor de CI_{50} para una muestra, mejor es su capacidad antioxidante, puesto que necesita una menor concentración para aumentar en un 50% la absorbancia, respecto al valor máximo que puede alcanzarse con el estándar bajo las condiciones establecidas para el ensayo.

Un valor de ($p>0.05$) obtenido de la prueba de t de student para diferencias pareadas indica que los métodos son equivalentes, por el contrario un valor ($p<0.05$) indica que los métodos no son equivalentes.

7.4 Diseño de la investigación

7.4.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio comparativo entre dos métodos para determinación de actividad antioxidante mediante la reducción de hierro.

7.4.2 Variables

7.4.2.1 Independientes

Métodos macrométrico y micrométrico para la determinación actividad antioxidante mediante la reducción de hierro.

7.4.2.2 Dependientes

Resultados de actividad antioxidante obtenidos por medio de los métodos macrométrico y micrométrico de FRAP, que serán operativizados de forma cuantitativa, expresándose en concentración equivalente de ácido ascórbico y concentración inhibitoria media.

7.4.3 Análisis estadístico

Los métodos de FRAP fueron estandarizados previo a la realización de las mediciones de actividad antioxidante de los extractos, para la cuantificación de actividad antioxidante, se realizó cinco réplicas para cada extracto y sus respectivas concentraciones. Se determinó para cada resultado obtenido la desviación estándar y el coeficiente de variación, para determinar la confiabilidad de los mismos. Además, para validar cada corrida, en cada determinación realizada de cada extracto y cada concentración, se realizó una determinación con ácido ascórbico a los mismos niveles de concentración de los extractos y una determinación con agua desmineralizada.

Para determinar la equivalencia entre los métodos, los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión 20.0 para Windows, realizando un análisis univariado de los resultados obtenidos por los métodos macro y micrométrico de FRAP para cada uno de los extractos del estudio, expresados en miligramos equivalentes de ácido ascórbico por mililitro, utilizando para ello la prueba de t-student para diferencias pareadas

a un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$), finalmente, los resultados fueron tabulados utilizando el programa Microsoft Excel 2013.

8. RESULTADOS

En el presente estudio se determinó la equivalencia entre el método macro y micrométrico de FRAP, con los que se evaluó la actividad antioxidante en extractos etanólicos de diez especies vegetales nativas de Mesoamérica.

8.1 Obtención de extractos etanólicos de diez especies nativas de Mesoamérica

Los extractos etanólicos de las especies vegetales que formaron parte del presente estudio fueron provistos por el LIPRONAT, dichos extractos fueron obtenidos mediante la metodología de extracción descrita en el Anexo 1, y luego almacenados a 4°C y protegidos de la luz.

Previo a comenzar con la determinación de capacidad antioxidante, se preparó una solución stock de 20 mg/mL de cada uno de los extractos, a partir de la cual fueron preparadas las diluciones seriadas que serían analizadas posteriormente (2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL).

8.2 Estandarización de los métodos macro y micrométrico de FRAP

Para obtener resultados confiables, los métodos macro y micrométrico fueron estandarizados, realizando para ello curvas de calibración dosis-efecto, siendo la dosis la concentración de la muestra y el efecto el aumento en la absorbancia. En dichas curvas se esperaba obtener valores de r^2 de 0.95 a 0.99, cuando se alcanzaron valores aceptables, se realizaron las mismas por triplicado.

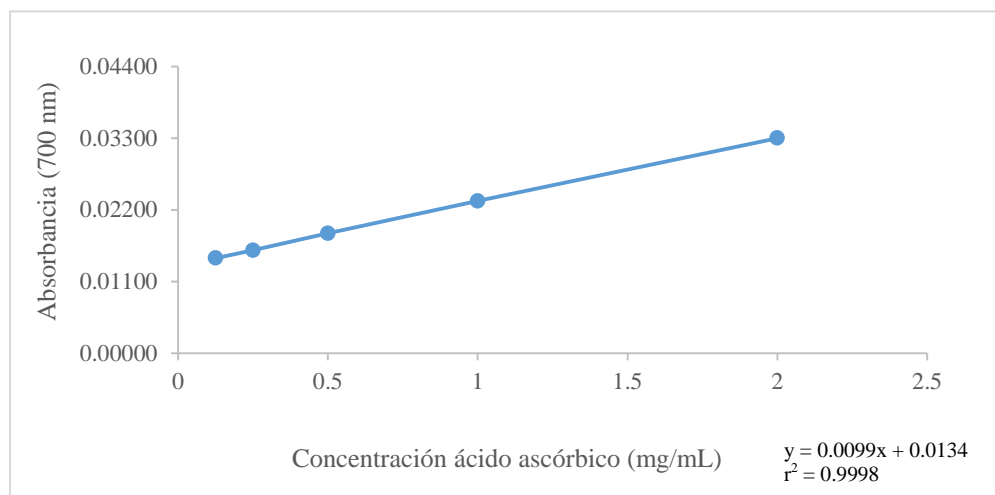
Para realizar las determinaciones de concentración equivalente de ácido ascórbico de cada una de las especies analizadas, por ambos métodos, se seleccionó la curva con el

valor de r^2 más alto para cada método respectivamente, cada corrida fue validada verificando que el resultado obtenido para el estándar fuese muy cercano a la concentración conocida.

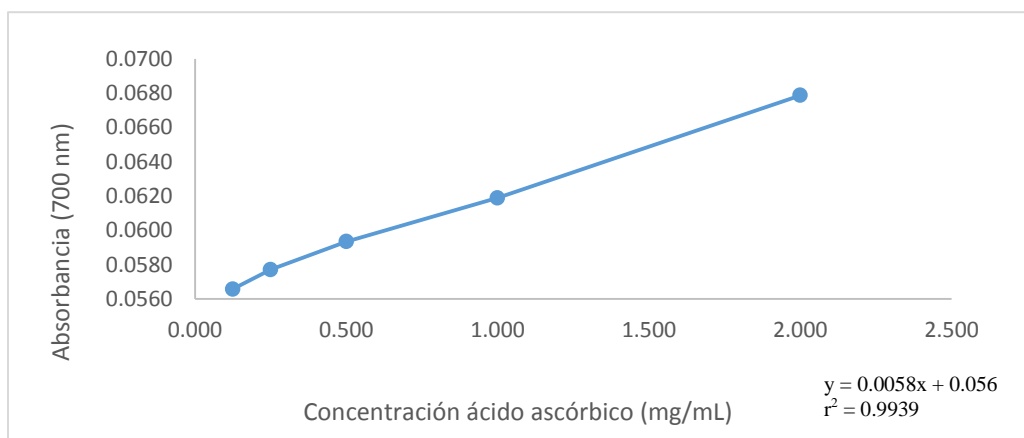
8.1.1 Métodos macro y micrométrico de FRAP

En las Gráficas 1 y 2, se muestran las curvas de calibración de los métodos macro y micrométrico de FRAP, respectivamente, en donde se utilizó ácido ascórbico como estándar.

Gráfica 1. Curva de calibración del método macrométrico FRAP.



Gráfica 2. Curva de calibración del método micrométrico de FRAP.



El ácido ascórbico reacciona con un complejo férrico, reduciéndolo a ferroso, cada punto de la gráfica representa la absorbancia del complejo ferroso formado, puede observarse que existe un aumento en la absorbancia proporcional al aumento de la concentración de ácido ascórbico que reacciona.

8.3 Análisis estadístico de equivalencia para los métodos macro y micrométrico de FRAP

La equivalencia entre los métodos de FRAP, se determinó mediante un análisis univariado de los resultados de actividad antioxidante obtenidos por cada método, para las diez especies vegetales del estudio, esto se realizó utilizando la prueba de t de student para diferencias pareadas.

Tabla 1. Actividad antioxidante reductora de hierro de extractos etanólicos de diez especies Mesoamericanas medida por los métodos macro y micrométrico de FRAP en diluciones seriadas.

Especie vegetal	Método	Concentración					p^* ($\alpha = 0.05$)	
		[mg/mL]	0.125	0.25	0.5	1.0		2.0
<i>Gliricidia sepium</i>	macro		0.0263	0.1051	0.1515	0.2828	0.5556	0.0046
	micro		0.2931	0.3793	0.5517	0.8103	1.2069	
<i>Lippia graveolens</i>	macro		0.0404	0.0808	0.2323	0.3333	0.6263	0.0048
	micro		0.4828	0.6207	0.8103	1.1552	1.7586	
<i>Litsea guatemalensis</i>	macro		0.0909	0.1919	0.3899	0.7273	1.3434	0.0030
	micro		0.5000	0.6379	0.7069	0.8966	1.6034	
<i>Neurolaena lobata</i>	macro		0.0404	0.1172	0.1313	0.3737	0.7475	0.0001
	micro		0.7069	0.7241	0.8276	0.8966	1.2414	
<i>Ocimum campechianum</i>	macro		0.0404	0.1010	0.1818	0.3535	0.6970	0.0008
	micro		0.8621	0.8966	0.9310	1.0000	1.1034	
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	macro		0.0606	0.1212	0.2626	0.4202	1.1515	0.0019
	micro		0.3793	0.5517	0.7241	0.9828	1.3966	
<i>Pimenta dioica</i>	macro		0.0505	0.1687	0.2121	0.4040	0.7879	0.00004
	micro		0.8103	0.9828	1.0690	1.3621	1.7931	
<i>Smilax domingensis</i>	macro		0.0606	0.1212	0.2323	0.5657	0.9414	0.0004
	micro		0.4655	0.6379	0.8966	1.1552	1.6552	
<i>Solanum nigrescens</i>	macro		0.0404	0.0808	0.1616	0.2505	0.5859	0.0121
	micro		0.0862	0.2069	0.3793	0.5517	0.8966	
<i>Tagetes lucida</i>	macro		0.0848	0.2141	0.3939	0.6606	1.6586	0.0166
	micro		1.4655	1.4828	1.5345	1.6034	1.6897	

* p : valor p ($p < 0.05$, indica que no existe equivalencia entre los métodos).

** mgEAA/mL: miligramos equivalentes de ácido ascórbico por mililitro de solución de extracto ($n = 5$).

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el LIPRONAT y el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología.

En la Tabla 1 se muestra los valores promedio de las concentraciones equivalentes de ácido ascórbico de las cinco repeticiones realizadas para cada dilución de los diez extractos etanólicos del estudio, obtenidos por los métodos macro y micrométrico de FRAP. Seguidamente se muestra el valor p obtenido de la prueba de t de student para diferencias pareadas, para cada especie vegetal, con el que se comparó los métodos. La

prueba de t de student para diferencias pareadas se realizó a un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$), en donde un valor $p>0.05$ indica no existe diferencia significativa entre los métodos y por tanto, son equivalentes, por el contrario, un valor $p<0.05$ indica que los métodos no son equivalentes, el valor p obtenido para cada extracto fue inferior a 0.05, lo que indica que no existe equivalencia entre los mismos.

8.4 Determinación de la actividad antioxidante en diez especies nativas de Mesoamérica por medio de FRAP

Utilizando el método de referencia de FRAP, se determinó la actividad antioxidante de los extractos de las especies vegetales del estudio, utilizando como referencia el estándar de ácido ascórbico.

Tabla 2. Actividad antioxidante reductora de hierro de diez especies nativas de Mesoamérica por el método macrométrico de FRAP.

Especie vegetal	mgEAA/mg \pm DS *	CV **	CI ₅₀ *** mg/mL
Estándar (ácido ascórbico)	NA ****	NA	0.2935
<i>Gliricidia sepium</i>	0.2889 \pm 0.006	1.9151	1.0301
<i>Lippia graveolens</i>	0.3232 \pm 0.005	1.5625	0.8753
<i>Litsea guatemalensis</i>	0.6818 \pm 0.004	0.5238	0.3938
<i>Neurolaena lobata</i>	0.3838 \pm 0.006	1.6115	0.8150
<i>Ocimum campechianum</i>	0.3586 \pm 0.006	1.7250	0.8275
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	0.5859 \pm 0.004	0.6096	0.5801
<i>Pimenta dioica</i>	0.4040 \pm 0.004	0.8839	0.6927
<i>Smilax domingensis</i>	0.4808 \pm 0.004	0.8788	0.5817
<i>Solanum nigrescens</i>	0.3030 \pm 0.004	1.1785	1.0008
<i>Tagetes lucida</i>	0.8394 \pm 0.006	0.7845	0.3925

* mgEAA/mg \pm DS: miligramos equivalentes de ácido ascórbico por miligramo de extracto \pm desviación estándar (n = 5).

** CV: coeficiente de variación.

*** CI₅₀: concentración inhibitoria media.

**** NA: no aplica.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el LIPRONAT y el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología.

En la Tabla 2 se muestra la capacidad antioxidante reductora de hierro de cada extracto del estudio por la metodología de referencia de FRAP. Se expresan los resultados como concentración equivalente de ácido ascórbico por miligramo de extracto y concentración inhibitoria media (CI₅₀).

Los extractos de las especies vegetales que presentaron mejor actividad antioxidante al ser analizados por medio del método macrométrico fueron *T. lucida*, *L. guatemalensis* y *P. pseudoaureum*. Por otra parte, los extractos de las especies vegetales que presentaron menor actividad fueron *G. sepium*, *S. nigrescens* y *L. graveolens*.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la naturaleza existen moléculas que tienen uno o más electrones sin aparear, estas se denominan radicales libres (RL). Estos tienden a formar combinaciones con otras moléculas para saturar sus electrones, este proceso se conoce como oxidación. En el ser humano es fundamental para la producción de energía, pero cuando la producción de RL es superior a lo normal y existe un desequilibrio en la acción protectora de enzimas, puede dar lugar a una reacción en cadena perjudicial para el organismo e incluso implicar la aparición de enfermedades metabólicas o degenerativas (Mau, 2002).

Por otra parte, también existen sustancias capaces de neutralizar el proceso de oxidación, las cuales se conocen como antioxidantes. Según Halliwell (2011), una sustancia antioxidante es aquella molécula que tiene como objetivo principal proteger un tejido biológico contra el daño oxidativo. Estas sustancias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, estando presentes incluso en especies que son utilizadas como alimentos o medicamentos, y que pueden llegar a jugar un papel importante en la regulación del proceso de oxidación en los seres humanos. Pueden además prevenir los efectos perjudiciales que dicho proceso puede llegar a ocasionar, de ahí la importancia del desarrollo y la aplicación de métodos para el estudio y la búsqueda de la actividad antioxidante en especies vegetales (Halliwell & Grootveld, 1987; Halliwell, Gutteridge & Cross, 1992; Mau, 2002).

El ensayo del poder reductor de hierro (FRAP) fue desarrollado originalmente para medir el poder reductor del plasma; sin embargo, posteriormente fue adaptado para medir actividad antioxidante estabilizadora redox de productos fitoterapéuticos y nutriceuticos, como es el caso de los extractos de especies vegetales. El ensayo consiste en la reducción

de Fe^{3+} a Fe^{2+} en medio ácido que da lugar a la formación de un complejo coloreado, el cual puede ser medido espectrofotométricamente, siendo la intensidad directamente proporcional a la actividad antioxidante (Benzie & Strain, 1996; Garcés, 2011).

En el presente estudio se analizó extractos etanólicos de diez especies vegetales nativas de Mesoamérica en búsqueda de actividad antioxidante mediante FRAP. Dicho análisis se llevó a cabo por medio del método macro (método de referencia) y micrométrico, y luego se determinó la equivalencia entre estos con el objeto de evaluar si los resultados obtenidos con el método micrométrico son semejantes a los obtenidos con el macrométrico. De ser así, en futuros estudios resultaría más conveniente la utilización del micrométrico, puesto que lleva menor tiempo de realización y consume menor cantidad de insumos y muestra (Duh, Yen, Du & Yen, 1997; Myoda, Fujimura, Park, Nagashima, Nakagawa & Nishizawa, 2010).

Previo a iniciar el análisis FRAP de los extractos y la comparación de los métodos, fue necesario estandarizar los mismos por medio de curvas dosis-efecto, hasta obtener un r^2 entre 0.95 a 0.99. Se utilizó para ello el estándar de ácido ascórbico, por ser una sustancia reconocida por detener los procesos de oxidación, además de ser el estándar sugerido en el método de referencia (Garcés, 2011). Las curvas se realizaron por triplicado y se seleccionó la que tenía el r^2 más alto para transformar mediante regresión lineal los datos de absorbancia en datos de concentración equivalente de ácido ascórbico, para cada una de las especies evaluadas. Los valores de r^2 obtenidos fueron 0.9998 y 0.9939 para los métodos macro y micrométrico respectivamente, lo que demuestra que el cambio en la absorbancia (eje de las ordenadas) depende altamente de la concentración de antioxidante en la reacción (eje de las abscisas), en ambos métodos (Cui, Luo, Xu & Ven, 2004; Garcés, 2011; Travieso, Bravo, Escobar, Linares, Rodríguez & Pérez, 2011).

Las concentraciones elegidas de cada solución del estándar para realizar la curva, fueron 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL, debido a que en este rango la curva permanece lineal bajo las condiciones en las que fue llevado a cabo el experimento, como se observa en las Gráficas 1 y 2 en la sección de resultados. Luego de evaluar cada especie vegetal por FRAP, los datos de absorbancia se transformaron mediante análisis de regresión lineal a datos de concentración equivalente de ácido ascórbico por mililitro de solución (mgEAA/mL) y estos a su vez en miligramos equivalentes de ácido ascórbico por miligramo de extracto (mgEAA/mg), que representan su capacidad antioxidante. Además, para comparar la capacidad antioxidante de las especies con el estándar de ácido ascórbico, se determinó valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) para cada una, que indican la concentración necesaria de una solución de extracto, para alcanzar el 50% de la capacidad antioxidante máxima producida por el estándar, bajo las condiciones en las que se realizó el experimento. Una alta cantidad equivalente de ácido ascórbico por miligramo de extracto y/o una baja concentración inhibitoria media, representan una alta actividad antioxidante (Cáceres et al., 2012a; Thaipong, Boonprakov, Crosby, Cisneros-Zevallos & Hawkins, 2006; Travieso et al., 2011).

La mayor parte de las especies seleccionadas para este estudio no habían sido evaluadas por el método macrométrico de FRAP, además ninguna había sido evaluada por el método micrométrico, siendo la mayoría de los resultados obtenidos hallazgos propios. El método macrométrico, fue descrito por Oyaizu en 1986; la utilización de este método se ha ido extendiendo por la facilidad en la obtención de los resultados, y se ha aplicado a muchos tipos de muestras biológicas, como en el caso de los extractos de especies vegetales. Los resultados obtenidos por el método macrométrico se presentan en la Tabla 2, en donde de las diez especies evaluadas, las que demostraron tener mejor actividad

antioxidante fueron *T. lucida* (CI₅₀ 0.3925 mg/mL), *L. guatemalensis* (CI₅₀ 0.3938 mg/mL) y *P. pseudoaureum* (CI₅₀ 0.5801 mg/mL). No obstante, ninguna de las especies presentó un resultado similar o superior al estándar de ácido ascórbico (CI₅₀ 0.2935 mg/mL), por tanto, puede decirse que ninguna presenta actividad significativa. Las especies con menor actividad fueron *G. sepium* (CI₅₀ 1.0301 mg/mL) y *S. nigrescens* (CI₅₀ 1.0008 mg/mL) (Duh, Yen, Du & Yen, 1997).

Existen varias metodologías que aportan información sobre los distintos mecanismos de actividad antioxidante, en el caso del presente estudio, FRAP aporta información sobre la capacidad para estabilizar el estado de óxido reducción que posee una sustancia, por tanto *T. lucida* y *L. guatemalensis*, son las que demostraron tener mejor capacidad estabilizadora redox (Garcés, 2011).

Las especies *T. lucida* y *L. guatemalensis* ya han demostrado poseer actividad antioxidante. En un estudio realizado por Aquino y colaboradores en 2002, se determinó que *T. lucida* posee mayor actividad que el α -tocoferol. En otro estudio realizado por Cáceres y colaboradores en 2012, se evaluó la actividad antioxidante de 24 especies vegetales por tres metodologías, incluyendo FRAP macrométrico, cuatro de las 24 especies fueron comunes con el presente estudio, en donde se encontró por medio de FRAP que las especies con mayor actividad fueron *T. lucida* (CI₂₀ 35.73 μ g/mL) y *L. guatemalensis* (CI₂₀ 66.75 μ g/mL), y las especies con menor actividad fueron *G. sepium* (CI₂₀ 208.29 μ g/mL) y *S. nigrescens* (CI₂₀ 155.84 μ g/mL). Debe mencionarse que los resultados obtenidos en dicho estudio no son comparables con los del presente, debido a que los mismos fueron obtenidos utilizando como estándar ácido gálico y expresados en CI₂₀, por tanto, estos hallazgos coinciden, para ambos estudios, únicamente en que las especies *T. lucida* y *L. guatemalensis* demostraron tener la mayor actividad y *G. sepium* y *S. nigrescens* la menor

actividad, bajo las condiciones en las que fueron realizados, respectivamente. Además, en dicho estudio se determinó por cromatografía de capa fina que *T. lucida* y *L. guatemalensis* tienen contenido de antocianinas, flavonoides y cumarinas. Por otra parte se determinó que de las 24 especies evaluadas, dichas especies poseen la mayor capacidad estabilizadora de radicales libres, mediante la técnica de DPPH, y un alto contenido de fenoles totales, lo cual es consistente con los hallazgos obtenidos mediante FRAP en el presente estudio (Cáceres et al., 2012a).

Las especies que demostraron mejor actividad antioxidante por el método micrométrico fueron *P. dioica* (0.9224 mgEAA/mg), *L. graveolens* (0.9052 mgEAA/mg) y *S. domingensis* (0.8534 mgEAA/mg) (Anexo 2). Sin embargo dichos resultados no son confiables, por no ser equivalentes a los obtenidos por el método de referencia. Adicionalmente, los valores de CI_{50} no pudieron determinarse por el método micrométrico, debido a que los porcentajes de inhibición para cada concentración de extracto resultaron muy cercanos entre sí y el 50% de inhibición quedó fuera de este rango, no pudiendo compararse la actividad de las especies con la del estándar, con esto también se evidencia que el método micrométrico de FRAP, bajo las condiciones en que fue desarrollado, no ofrece resultados confiables (Pulido, Bravo & Saura-Calixto, 2000).

Luego de realizar las mediciones por cada método, los resultados fueron comparados utilizando para ello la prueba de t-student para diferencias pareadas a un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$), en donde un valor $p>0.05$ indica que no existe diferencia significativa entre los métodos, es decir, que son equivalentes. Por el contrario, un valor $p<0.05$ indica que los métodos no son equivalentes. El resultado obtenido del valor p , fue menor a 0.05 para cada una de las especies en estudio (Tabla 1), por lo que se concluye que el método micrométrico del ensayo, bajo las condiciones en que se realizó, no es

equivalente al macrométrico, y no es conveniente su utilización para medir la actividad antioxidante, a pesar de las ventajas antes mencionadas que posee el mismo (Anderson & Nelson, 2008; Lieber, 1990).

Realmente no se conoce con certeza todas las causas que provocan la falta de equivalencia, por lo que en futuros estudios podría realizarse un análisis de las causas de variación y de esta forma definir si puede realizarse modificaciones al método micrométrico de FRAP, mediante las cuales se pueda alcanzar equivalencia con el macrométrico, principalmente en las variaciones que eventualmente pudiera provocar el uso de microplacas (Pulido, Bravo & Saura-Calixto, 2000; Thaipong et al., 2006).

A pesar de los hallazgos obtenidos en el presente estudio, no debe subestimarse el potencial de las especies Mesoamericanas para ser utilizadas como antioxidantes naturales, productos medicinales que reduzcan el daño oxidativo o preservantes antioxidantes en la industria alimenticia, por lo que en futuras investigaciones debería continuarse con el desarrollo, comparación y aplicación de metodologías para el estudio de actividad antioxidante de especies vegetales.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 No existe equivalencia estadística entre el método de referencia (macrométrico) y el micrométrico de FRAP, por lo que, el método micrométrico de FRAP, bajo las condiciones en que se llevó a cabo en el presente estudio, no puede reemplazar al de referencia en la determinación de actividad antioxidante de especies vegetales.
- 10.2 De las diez especies nativas de Mesoamérica evaluadas, las que presentaron mayor actividad antioxidante, mediante la estabilización del estado redox, por la metodología de referencia de FRAP son *T. lucida* (0.8394 mgEAA/mg) y *L. guatemalensis* (0.6818 mgEAA/mg).
- 10.3 De las diez especies nativas de Mesoamérica evaluadas, las que presentaron mayor actividad antioxidante, mediante la estabilización del estado redox, por la metodología micrométrica de FRAP son *P. dioica* (0.9224 mgEAA/mg) y *L. graveolens* (0.9052 mgEAA/mg).

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Determinar en futuros estudios las causas específicas de falta de equivalencia entre los métodos macro y micrométrico de FRAP.
- 11.2 Emplear otros métodos que determinen actividad antioxidante para ampliar la información sobre las propiedades de las especies de Mesoamérica y comparar metodologías.
- 11.3 Realizar fraccionamiento bioguiado de los extractos activos de los que se desconoce su principio activo, con el fin de identificar la(s) molécula(s) responsable(s) de la actividad.
- 11.4 Evaluar otras partes de la planta para determinar si presentan actividad antioxidante y si existe diferencia en cuanto a su actividad.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdala, L. (1999). Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 27(1), 753-754.
- Alonso, J. (2004). Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Argentina: *Corpus*.
- Anderson, A. & Nelson, A. (2008). Analisis de datos: pruebas estadísticas simples. *North Carolina Center for Public Health Preparedness*. 3(6).
- Anderson, M. (1996). Evaluación de la toxicidad subaguda de *Neurolaena lobata* (tres puntas) y *Simarouba glauca* (aceituno). Manuscrito no publicado. *Tesis de licenciatura de Química Farmacéutica*. Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Aquino, R., Cáceres, A., Morelli, S. & Rastrelli, L. (2002). An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *Journal of Natural Products* 65(12), 1773-1776.
- Aragón, A., Torija, A., Avelleira, R., Tapia, A., Contreras, I. & López, J. (2008). Pest control of jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) with *Gliricidia sepium* (Jacq.) in Chiautla de Tapia, Puebla. *Avances en Investigacion Agropecuaria* 12(3), 33-42.
- Argueta, A., Cano, L. & Rodarte, M. (1994). Atlas de plantas de medicina tradicional. México: *Editorial Instituto Tradicional Mexicano*.
- Avello M. & Suwalsky M. (2002). Radicales libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. *Ciencia Ahora* 41(1) 01-04.
- Benzie, I. & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239(1), 70-76.

- Berger, I., Passreiter, C., Cáceres, A. & Kubelka, W. (2001). Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. *Phytotherapy Research* 15(1), 327-330.
- Bolaños, B. (2003). Determinación de las propiedades antioxidantes de los jugos de frutas producidos industrialmente disponibles para su consumo en el área metropolitana de la ciudad de Guatemala. *Tesis de licenciatura de Química Farmacéutica*. Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Bonanni, A., Campanella, L., Gatta, T., Gregori, E. & Tomassetti, M. (2006). Evaluation of the antioxidant and prooxidant properties of several commercial dry spices by different analytical methods. *Food Chemistry*, 102(3), 751-758.
- Brand-William W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28(1), 25-30.
- Caballeros, K. (2001). Optimización de dos métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Tesis de licenciatura de Química Farmacéutica*. Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Cáceres, A. (1996) Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: *Editorial Universitaria*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cáceres, A., Lange, K., Cruz, S., Velásquez, R., Lima, S., Menéndez, M... & González, J. (2012a). Assessment of antioxidant activity of 24 native plants used in Guatemala for their potencial application in natural product industry. *Acta Horticulturae* 964(1), 85-92.
- Cáceres, A., Cruz, S., Gaitán, I., Guerrero, K., Álvarez, L. & Marroquín, N. (2012b). Antioxidant activity and quantitative composition of extracts of *Piper* species from Guatemala with potential use in natural product industry. *Acta Horticulturae* 964(1), 77-84.

- Cáceres, A., Cruz, S., Martínez, J. & Gattuso, M. (2009). Validación de la actividad biocida e inmunomoduladora del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Smilax domingensis* Willd. Cultivado en Guatemala. *Revista de Fitoterapia* 9(1), 45-48.
- Carvajal, L., Turbay, S., Rojano, B., Álvarez, L., Restrepo, S., Álvarez, J., Bonilla, K., Ochoa, C. & Sánchez, N. (2011). Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 16(4), 354-363.
- Céspedes, C., Valdez-Morales, M., Avila, J., Mohammed, E., Alarcón, J. & Paredes-López, O. (2010). Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristoteliachilensis* (Mol) Stuntz (Elaeocarpaceae). *Food Chemistry*, 119(3), 886-895.
- Céspedes, T. & Sánchez, D. (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana Cardiol* 14(1), 55-60.
- Chinchilla, M., Valerio, I., Sánchez, R., Mora, V., Bagnarello, V., Martínez, A... & Vanegas, J. (2011). In vivo evaluation of the antimalarial activity of 25 plants from a Biological Conservation Reserve of Costa Rica. *Revista Chilena de Historia Natural* 84(1), 115-123.
- Cruz, S. (2012). Evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel (*Litsea glaucescens* Kuth y *L. guatemalensis* Mez). *Tesis de Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Cruz, S., (2001) Fraccionamiento Bioguiado y tamizaje Fitoquímico del Extracto etanólico con actividad antiartemia de *Ocimum micranthum* Willd, albahaca de monte. *Tesis de licenciatura de Química Farmacéutica*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Cruz, S., Merida, M., Perez, F., Santizo, A., Caceres, A., Apel, M. & Henrique, A. (2012). Composición química del aceite esencial de *Litsea guatemalensis* (Mexicano bay) de diferentes procedencias de Guatemala. *Acta Horticulturae* 1(32), 39-46.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K. & Murthy, M. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28(1), 771-799.
- Domatoti, S., Babu, S. & Sunil. U. (2013). Antioxidants Role in the Prevention of Free Radical Formation. *Int. Journal of Biopharma Research* 02(02), 78-82.
- Domínguez, A., García, R., Ramírez, Y., Morán, J. & Serrano, L. (2012). The Aqueous Extract from Oregano (*Lippia graveolens* HBK) from the North of Mexico has Antioxidant Activity without Showing a Toxic Effect in vitro and in vivo. *International Journal of Morphology* 30(3), 937-944.
- Domínguez, X., Sánchez, H., Suárez, M., Baldas, J. & González, M. (1989). Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Médica* 55(1), 208-209.
- Du Toit, R., Volstedt, Y. & Apostolides, Z. (2001). Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and tea measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 166(1), 63-69.
- Duh, P., Yen, W.J., Du, P & Yen, G.C. (1997). Antioxidant activity of mung bean hulls. *Journal of the American Oil Chemists Society* 74(9), 1059-1063.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. & Araújo, M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1), 31-37.

- Ferrufino, L. & Gomez, J. (2004). Estudio morfológico de *Smilax L.* (Smilacaceae) en Costa Rica, con implicaciones sistemáticas. *Lankesteriana* 4(1), 5-36.
- Gálvez, L., Kwon, Y., Apostolidis, E. & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101(6), 4676-4689.
- Garcés, L. (2011). Antioxidante: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En J. Londoño, (Ed.), Desarrollo y transversalidad serie lasallista, investigación y ciencia (pp. 129-162). Colombia: Board.
- Gattuso, M., Cortadi, A., Gattuso, S. (2008). Caracteres morfoanatómicos de especies de *Phlebodium*. *Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas (BLACPMA)* 7(1), 10-17.
- Germosén-Robineau, L. (2005). Farmacopea vegetal Caribeña. UNAN-León, Nicaragua: Editorial Universitaria.
- Gómez, I., Estrada, L., Fernández, J. & Botello, A. (2012). Utilización de piñón florido (*Gliricidia sepium*: Fabaceae) en fincas agropecuarias. *Agricultura Orgánica* 18(1). 28-29.
- González, M., Soto, M., Kite, G. & Martínez, M. (2007). Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK var. *Berlandieri* Schauer). *Fitotecnia* 30(1), 43-49.
- González, S., Lebrero, A., Del Rio, R. & Jaén, P. (2007). *Phlebodium aureum* extract: a nutraceutical with photoprotective properties. *Drogas de Hoy* 43(7), 475-485.

- Guadarrama, G., Alarcón, F., Lezama, R., Vásquez, G. & Bonilla, H. (2008). Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. In the forced swimming test. *Journal of Ethnopharmacology* 120(1), 277-281.
- Halliwell, B. (2011) Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences* 32(3), 125-130.
- Halliwell, B. & Cross, C. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives* 102(10), 5-12.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. & Cross, C. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 119(6), 598-620.
- Halliwell, B. & Grootveld, M. (1987) The measurements of free radical reactions in humans. *Elsevier Science Publishers* 213(1), 9-14.
- Hamptom, M., Kettle, A. & Winterbourn, C., (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9), 3007-17.
- He, X., Mocek, U., Floss, H., Cáceres, A., Girón, L., Buckley, H... & Wilson, B. (1994). An antifungal compound from *Solanum nigrescens*. *Journal of Ethnopharmacology* 43(1), 173-177.
- Hernández, I. (2007). Validación farmacológica del efecto antiinflamatorio de hoja de *Solanum hartwegii* Benth. (Huiz), de hoja de *Litsea guatemalensis* Mez. (Laurel) y de hoja de *Piper jacquemontianum* Kunth. (Cordoncillo). Tesis de Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Hinneburg, I., Damien, H. & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry* 97(2), 122-129.
- Hoffman-La Roche Ltd. (1994). Vitamins basics. (1st Ed.) New York: Seaboard Lithographers. Pp. 52.

- Hoogesteger, C. (1988) *Uso de Plantas medicinales*. México: Pax Mexico.
- Jeong, C., Jeong, H., Kwak, J., Kim, J., Choi, G., Kim, D. (2011) Phenolic composition and *in vitro* antioxidant activities of *Smilax china* root. *Journal of Food Biochemistry* 37(2013), 98–107.
- Kamath, V. & Rajini, P. (2006). The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. *Food Chemistry* 103(2), 428-433.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. & Jukic, M. (2004). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(3), 550-557.
- Kojima, K., Zhu, X. & Ogihara, Y. (1997). Saponins from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry* 45(5), 885-888.
- Kulisic, T., Radonic, A., Datalinic, V. & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry* 85(1), 633-640.
- Lee, S., Ju, E. & Kim, J. (2001) Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root. *Experimental And Molecular Medicine* 33(4), 263-268.
- Leighton, F. (2000). Daño Oxidativo del ADN en el Desarrollo de Cáncer. *Facultad de Ciencias Biológicas* 41(1), 01-04.
- Lieber, R. (1990). Statistical significance and statistical power in hypothesis testing. *Journal of Orthopaedic Research* (1) 304-309.
- Lima, S. (2003). Evaluación de distintos solventes para el proceso de extracción en la determinación de la actividad antioxidante de quilete (*Solanum americanum*) y

- mamey (*Mammea americana*). Tesis de licenciatura de Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Lino, C., Gomes, P., Lucetti, D., Diogenes, J., Sousa, F., Silva, M. & Viana, G. (2005). Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory activities of the essential oil (EO) of *Ocimum micranthum* Willd. From Northeastern Brazil. *Phytotherapy Research* 19(1), 708-712.
- López, A. (2004). Caracterización morfológica y fenológica de una plantación de zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willd.) en el municipio de Samayac, Suchitepéquez. Tesis de licenciatura de Ingeniero Agrónomo en sistemas de producción agrícola. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- López, V., Akerreta, S., Cavero, R. & Calvo, I. (2007). Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. *Revista de Fitoterapia*, 7(1), 43-47.
- Macía, M. (1998). La pimienta de Jamaica (Pimienta dioica L.) Merrill, Myrtaceae en la sierra norte de Puebla (México). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 56(2), 337-349.
- Maldonado, O., Jiménez, E., Guapillo, M., Ceballos, G. & Méndez, E., (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. (México). *Revista Medica UV* 10(2), 32-39.
- Mansoor, S. & Mashkoor, A. (1988). Toxicity of different plant parts of *Tagetes lucida* to plant parasitic nematodes. *Indian Journal of Nematology* 18(2), 181-185.
- Marroquín, M., Cruz, S. & Cáceres, A. (2012). Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnate*, *P. ligularis*) from Guatemala. *Acta Horticulturae* 964(1), 93-98.

- Martínez, A., Puga, R., Hernández, L., Loarca, G. & Mendoza, S. (2008). Antioxidantes y Actividades Antimutagénicas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth). *Planta de Alimentos para la Nutricion Humana* 63(1), 1-5.
- Martínez, M. (1992). Las plantas medicinales de México. México: Botas.
- Mau, J., Lin, H., & Song, F. (2002). Antioxidant properties of several speciality mushrooms. *Food Research International*, 35(6), 519-526.
- McCord, J. (2000). Evolution of Free Radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine* 108, 652-659.
- Mensor, L., Menezes, F., Leitão, G., Reis, A., Santos, T., Coube, C. & Leitão, S. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(1), 127-130.
- Meza, E., Sota, E. & Ferrucci, M. (2006). *Phlebodium aureum* (Polydiaceae, Pteridophyta): su presencia en Argentina. *Bulletin of the Botanical Society of Argentina* 41(1-2), 71-76.
- Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V. & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84(4), 407-412.
- Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J., Díaz, J. & Ramírez, A. (2002). The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 34(1), 37-46.
- Mohamed, S. (2008). In vitro antioxidant activities of *Aloe vera* leaf skin extracts. *Journal de la Société Chimique de Tunisie* 10(1), 101-109.

- Morales, C., Gómez, M., Iglesias, I. & Villar, A. (2001). Neuropharmacological profile of ethnomedicinal plants of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology* 76(1), 223-228.
- Morales, M., Figueroa, H. & Bustamante, S. (2003). Bases farmacológicas y clínicas del extracto de *Vitis vinifera* en patologías asociadas al estrés oxidativo. *Revista de Fitoterapia* 3(2), 135-144.
- Morán, R. (1996). Polypodiaceae. En G. Davidse, M. Sousa, & A. Chater, (Eds.), *Flora Mesoamericana*. (pp. 130-133). México: Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum.
- Morataya, A. (2006). Caracterización Farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala Albahaca de monte (*Ocimum micranthum*), Orégano (*Lippia graveolens*), Salvia sija (*Lippia alba*) y Salviyá (*Lippia chiapasensis*). Tesis de licenciatura de Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Moura, M., Elesbão, R., Sousa, E., Maia, S., Goes, C., Perez, J. & Saura, F. (2006). Metodología científica: determinação da actividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Fortaleza, CE* 125(1), 1-4.
- Murga, R., Sanz, M., Beltrán, S. & Cabezas, J. (2002). Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 23(2):113-121.
- Myoda, T., Fujimura, S., Park, B., Nagashima, T., Nakagawa, J. & Nishizawa, M. (2010). Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(2), 304-307.

- Navarro, M., Montilla, M., Cabo, M., Galisteo, M., Cáceres, A., Morales, C. & Berger, I. (2003). Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in Izabal for infectious diseases. *Phytotherapy Research* 17(1), 325-329.
- Passreiter, C. & Isman, M. (1997). Antifeedant bioactivity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* and their antagonism by aminobutyric acid. *Biochemical Systematics and Ecology* 25(5), 371-377.
- Perez, J. & Saura, F. (2007). Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. Rev. CSIC (pp. 1150-1160) España: Departamento de Metabolismo y Nutrición.
- Pietta, P., Simonetti, P., Gardana, C. & Mauri, P. (2000). Trolox capacidad antioxidante equivalente (TEAC) de Ginkgo biloba flavonol y Camelliasinensis. Metabolitos catecol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23(1): 223-226.
- Pulido, R., Bravo, L. & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. *J. agric. Food. Chem.* 46, 3396-3402.
- Quiñones, J., Trujillo, R., Capdesuñer, Y., Quirós, Y. & Hernández, M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). *Revista cubana de Plantas Medicinales* 18(2), 201-215.
- Robledo, S., Bocalon, J., Giacomelli, L., Ceballos, C. & Mattea, M. (2003). Estudios de la influencia de antioxidantes en aceites vegetales durante la oxidación térmica forzada. Rev BVS (pp. 1-6). Argentina: Departamento de tecnología química.
- Sahaa, M., Hasana, S., Aktera, R., Hossaina, M., Alamb, M., Alam, M. & Mazumder, M. (2008). In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi* Linn. *Bangl. Journal of Veterinary Medicine* 6(2), 197-202.

- Sánchez, J., Martínez, G. & Faure, R. (2011) Efecto protector de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. sobre el daño oxidativo a proteínas y ADN. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 16(1), 1-12.
- Sánchez-Moreno, (2002). Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International* 8(3), 121-137.
- Sarikurkcü, C. (2011). Antioxidant activities of solvent extracts from endemic *Cyclamen mirabile* Hildeber, tubers and leaves. *African Journal of Biotechnology* 10(5), 831-839.
- Seikizawa, J. & Shibamoto, T. (1982). Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems. *Mutation Research* 101(1), 127-140.
- Sen, C., Khanna, S., Gordillo, G., Bagchi, D., Bagchi, M. & Roy, S. (2002), Oxygen, Oxidants, and Antioxidants in Wound Healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 239–249.
- Shahidi, F., Amarowicz, R., Abou-Gharbia, H. & Shehata, A. (1997). Los antioxidantes endógenos y la estabilidad de aceite de sésamo como en el procesamiento y almacenamiento. *Diario de la Sociedad de la American Oil Chemistry* 74(1), 143-148.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Bogotá: *Convenio Andrés Bello*.
- Sharma, R., Gescher, A. & Steward, W. (2005) Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer* 41(1), 1955-1968.

- Siatka, T. & Kašparová, M. (2010). Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. *Journal Molecules* 15(1), 9450-9461.
- Simão, K., Klein, L., Cruz, S., Cáceres, A., Meira, N., Delle Monache, F. & Cechinel, V. (2012). Anti-inflammatory and anti-hyperalgesicevaluation of the condiment laurel. (*Litsea guatemalensis* Mez.) and its chemical composition. *Food Chemistry* 132(1), 1980-1986.
- Sin, D., Wong, Y., Mak, C., Sze, S. & Yao, W. (2006) Determination of five phenolic antioxidants in edible oils: Method validation and estimation of measurement uncertainty. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(1), 784-791.
- Standley, P. & Steyermark J. (1952). Flora of Guatemala. Part III. Chicago: Natural History Museum.
- Standley, P. & Williams, L. (1976). Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*, 24(1), 331-332.
- Suhaj, M., (2006) Spice antioxidants isolation and their antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(1), 531-537.
- Thaipong, K., Boonprakov, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Hawkins, D. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(1), 669-675.
- Tortoriello, J., Meckes-Fischer, M., Villarreal, M., Berlin, B. & Berlin, E. (1995) Spasmolytic Activity of Medicinal Plants Used to Treat Gastrointestinal and Respiratory Diseases in the Highland of Chiapas. *Phytomedicine* 2(1), 57-66.
- Travieso, C., Bravo, A., Escobar, A., Linares, A., Rodriguez, Y. & Pérez, T. (2011) Validación del método de cuantificación de taninos totales en formulaciones

- semisólidas de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 16(1), 82-93.
- Tsai, P., Tsai, T., Yu, C. & Ho, S. (2006). Evaluation of NO-suppressing activity of several Mediterranean culinary spices. *Food and Chemical Toxicology* 45(3), 440-447.
- Velásquez, E., Tournier, H., Mordujovich, P., Saavedra, G. & Schinella, G. (2003). Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, 74(1), 91-97.
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
- Vertuani, S., Angusti, A. & Manfredi, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10(1), 1677-1694.
- Vicente, G., Villanueva, D., García, M., Fornari, T. & Reglero, G. (2011). Extracción de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*) utilizando solventes líquidos presurizados. *Flucomp* 4, 95-96.
- Villar, R., Calleja, J, Morales, C. & Cáceres, A. (1997). Screening of 17 Guatemala medicinal plants for platelet antiaggregant activity *Phytotherapy Research* 11(1), 441-445.
- Wu, J., Lee, M., Ho, C. & Chang, S. (1982). Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society* 59(8), 339-340.
- Zhou, K., Wang, H., Mei, W., Li, X., Luo, Y. & Dai, H. (2011). Antioxidant Activity of Papaya Seed Extracts. *Molecules* 16(8), 6179-6192.

13. ANEXOS

Anexo 1

13.1 Obtención de extractos etanólicos por la técnica de percolación (Sharapin, 2000).

Los extractos utilizados en el presente estudio fueron tomados del LIPRONAT, los mismos fueron obtenidos mediante la técnica de percolación para lo cual se requirió los siguientes insumos.

13.1.1 Equipo

- Percolador de vidrio o de acero inoxidable
- Balanza analítica
- Rotavapor R- 3000, R-440, Chiller
- Desecadora

13.1.2. Material

- Algodón
- Papel filtro
- Vasos de precipitado
- Erlenmeyers
- Termómetro
- Cristalizador
- Balón aforado
- Etanol

- Silicón

7.3.1.3. Procedimiento de extracción

- Pesar 200 g del material vegetal en la balanza analítica.
- Colocar papel filtro y algodón en la parte inferior del percolador previamente limpio y seco.
- Transferir el material vegetal al percolador y agregar 2.0 L de etanol a manera de cubrir toda la muestra y tapar con aluminio.
- Dejar reposar 24 h para que se lleve a cabo la extracción.
- Abrir la llave inferior del percolador y dejar gotear a una velocidad moderada, recolectando el líquido en un Erlenmeyer.
- Añadir disolvente extra, hasta recolectar en el Erlenmeyer la cantidad de disolvente agregada al inicio.
- Colocar todo el líquido obtenido dentro de un balón aforado y este colocarlo en un rotavapor. Encender el baño de María y llevar la temperatura a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Engrasar con silicón todas las partes esmeriladas y armar el rotavapor según el instructivo específico.
- Iniciar la destilación del extracto con etanol y conectar la bomba de vacío e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a la consistencia semisólida (repetir el procedimiento cuantas lavadas sean necesarias).
- Verter el extracto concentrado en un cristizador de vidrio debidamente tarado y rotulado.
- Colocar en una desecadora durante 7-15 días.

- Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales debidamente tarados y rotulados.
- Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos en refrigeración (2-4°C).

Anexo 2

13.2. Resultados obtenidos por el método micrométrico de FRAP.

Tabla 1, Actividad antioxidante reductora de hierro de diez especies nativas de Mesoamérica por el método micrométrico de FRAP.

Especie vegetal	mgEAA/mg \pm DS *	CV **
Estándar	NA ***	NA
<i>Gliricidia sepium</i>	0.6293 \pm 0.006	0.9686
<i>Lippia graveolens</i>	0.9052 \pm 0.006	0.6734
<i>Litsea guatemalensis</i>	0.8276 \pm 0.009	1.0417
<i>Neurolaena lobata</i>	0.6466 \pm 0.006	0.9428
<i>Ocimum campechianum</i>	0.5776 \pm 0.006	1.0554
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	0.7241 \pm 0.006	0.8418
<i>Pimenta dioica</i>	0.9224 \pm 0.006	0.6608
<i>Smilax domingensis</i>	0.8534 \pm 0.006	0.7142
<i>Solanum nigrescens</i>	0.5172 \pm 0.009	1.6667
<i>Tagetes lucida</i>	0.6983 \pm 0.006	0.8730

* mgEAA/mg \pm DS: miligramos equivalentes a ácido ascórbico por miligramo de extracto \pm desviación estándar (n = 5).

** CV: coeficiente de variación.

*** NA: No Aplica.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el LIPRONAT y el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología.

Los extractos de las especies vegetales que presentaron mejor actividad por el método micrométrico fueron *P. dioica*, *L. graveolens* y *S. domingensis*, aunque es de mencionar que los resultados no son confiables, debido a que no son concordantes con los obtenidos por el método de referencia.

Los valores de concentración inhibitoria media no pudieron determinarse debido a que los porcentajes de inhibición para cada concentración resultaron muy cercanos entre sí y el 50% de inhibición quedaba fuera de este rango, con esto también se confirma que el método micrométrico de FRAP, bajo las condiciones en que fue desarrollado, no ofrece resultados confiables.

Gustavo Adolfo Castro Paz
Autor

Pedro Eleazar Orellana Noriega
Autor

Yemsy Aly Pajares Hernández
Autor

Lic Armando Cáceres
Asesor

Dra. Patricia Saravia, Ph.D.
Revisora

MSc. María Eugenia Paredes
Directora

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda, Ph.D.
Decano