

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES



ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ALFA-AMILASA Y PRESENCIA DE FLAVONOIDES EN
EXTRACTOS DE *NEUROLOENA LOBATA*

Trabajo de graduación en modalidad de tesis, presentado por

Cristian Yeeming Chau Romero

para optar al grado académico de Licenciado en Química

Guatemala

2018

ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ALFA-AMILASA Y PRESENCIA DE FLAVONOIDES EN
EXTRACTOS DE *NEUROLOENA LOBATA*

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES



ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ALFA-AMILASA Y PRESENCIA DE FLAVONOIDES EN
EXTRACTOS DE *NEUROLOENA LOBATA*

Trabajo de graduación en modalidad de tesis, presentado por

Cristian Yeeming Chau Romero

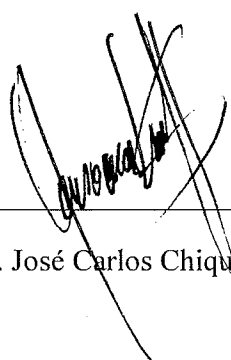
para optar al grado académico de Licenciado en Química

Guatemala

2018

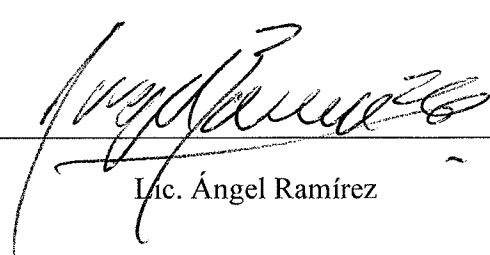
Vo. Bo.:

(f)

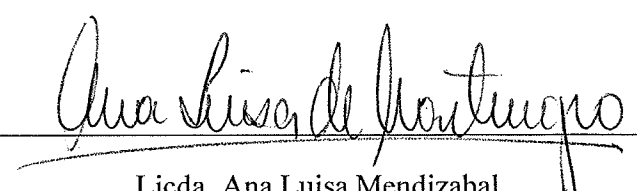

Lic. José Carlos Chiquín

Tribunal Examinador:

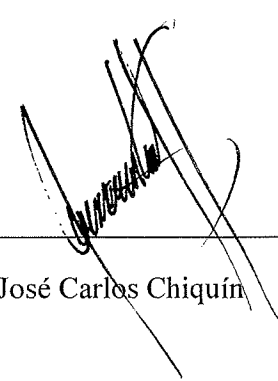
(f)


Lic. Ángel Ramírez

(f)


Licda. Ana Luisa Mendizabal

(f)


Lic. José Carlos Chiquín

Fecha de aprobación: Guatemala, 21 de junio de 2018. /

PREFACIO

Este trabajo surgió por un interés personal sobre la diabetes, ya que mi papa, abuelo y un amigo cercano sufre de esta enfermedad. Es una enfermedad que afecta a personas de todos los niveles sociales y edades, por lo que este tema es relevante para la salud a nivel mundial. Guatemala, siendo un país en desarrollo, necesita buscar alternativas de fácil acceso para cualquier persona. Ya que cuenta con una alta biodiversidad, tiene potencial para buscar un apoyo natural que pueda ayudar a controlar los niveles de azúcar. Tomando en cuenta esta idea se propuso el siguiente tema de investigación.

Agradezco a mi papá, Tat Wah Chau, por apoyarme en cada etapa de mi vida y por darme la oportunidad de tener una excelente educación. También agradecerle a cada miembro de mi familia que me apoyo durante mi época de colegio y universidad. Agradezco a mi novia, Patricia, por estar este año junto a mí y apoyarme en cada momento desde que entró a mi vida y a superarme cada día mas. De igual forma, a mis amigos que me apoyaron en diferentes momentos de mi vida, especialmente a mis mejores amigos Luis Gabriel, María José y Juan José, Karin por apoyarme en los momentos en que más necesitaba.

Le agradezco a la Universidad del Valle de Guatemala, a la Facultad de Ciencias y Humanidades y al Centro de Investigación. Al Lic. José Carlos Chiquin por ser mi asesor y por apoyarme académicamente durante la carrera y la realización de esta tesis. A la Licda. Ana Luisa Mendizábal por el apoyo de análisis instrumental y con su ayuda en el manejo del equipo que se utilizó en la tesis. A cada uno de mis catedráticos que me ayudo prepararme durante mi tiempo en la Universidad del Valle de Guatemala.

A todas las personas que contribuyeron en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

PREFACIO	III
LISTADO DE CUADROS.....	VII
LISTADO DE FIGURAS	IX
RESUMEN	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	3
III. HIPÓTESIS	5
IV. OBJETIVOS.....	7
V. MARCO TEÓRICO.....	9
VI. MARCO METODOLÓGICO	25
VII. RESULTADOS.....	31
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
IX. CONCLUSIONES	45
X. RECOMENDACIONES	45
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
XII. APÉNDICE I.....	59
XIII. CONTACTOS	81

LISTA DE CUADRO

1. Cuadro 1. Teimpo de elución de las muestras.....	31
2. Cuadro 2. Resultados de pruebas cualitativas para cada muestra (fracción) y controles.....	32
3. Cuadro 3. Cambios de color observados en las pruebas cualitativas para cada muestra (fracción) y controles.....	33
4. Cuadro 4. Resultados de pruebas cualitativas para cada muestra (fracción) y controles.....	34
5. Cuadro 5. Prueba de Shapiro-wilk para ver normalidad	35
6. Cuadro 6. Prueba post-hoc de Tuckey para ver subconjuntos.....	37
7. Cuadro 7. Regresión lineal del promedio del control y las muestras.....	37
8. Cuadro 8. Resultados de pruebas de normalidad de shapiro wilk.....	77
9. Cuadro 9. Modelo de regresión lineal planteado por SPSS.....	78
10. Cuadro 10. ANOVA para verificar que el modelo planteado es el correcto.....	79

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1. <i>Neurolaena lobata</i>	13
2. Figura 2. Localización de la <i>Neurolaena lobata</i>	14
3. Figura 3. Estructura general de los flavonoides.....	16
4. Figura 4. Estructura de la crisina.....	18
5. Figura 5. Estructura de la narangina.....	18
6. Figura 6. Estructura general de las antocianinas.....	19
7. Figura 7. Estructura general de isoflavonas.....	20
8. Figura 8. Estructura general de flavonas.....	20
9. Figura 9. Estructura general de flavonol.....	20
10. Figura 10. Regresión lineal utilizando el promedio del ln de la absorbancia.....	36
11. Figura 11. Revelado de primera placa con solvente tolueno acetato.....	59
12. Figura 12. Revelado de la segunda placa con solvente tolueno acetato.....	59
13. Figura 13. Revelado de la tercera placa con solvente metanol-cloroformo.....	60
14. Figura 14. Revelado de la cuarta placa con solvente metanol-cloroformo.....	60
15. Figura 15. Fracción 1 tiempo 0 a 3 horas.....	61
16. Figura 16. Fracción 2 tiempo 3 a 6 horas.....	61
17. Figura 17. Fracción 3 tiempo 6 a las 9 horas.....	62
18. Figura 18. Fracción 4 tiempo 9 al 12 horas.....	62
19. Figura 19. Fracción 5 tiempo 12 a 15 horas.....	63
20. Figura 20. Fracción 6 tiempo 15 al 18 horas.....	63
21. Figura 21. Fracción 7 tiempo 18 a 21 horas.....	64
22. Figura 22. Prueba de dimroth con controles y muestra 1 y 2.....	64
23. Figura 23. Prueba de dimroth con controles y muestra 3 y 4.....	65
24. Figura 24. Prueba de dimroth con controles y muestra 5 y 6.....	65
25. Figura 25. Prueba de Dimroth con controles y muestra 7.....	66
26. Figura 26. Prueba de cianidina con controles positivo y muestra 1 y 2.....	66

27. Figura 27. Prueba de cianidina con controles positivo y muestra 3 y 4.....	67
28. Figura 28. Prueba de cianidina con controles positivo y muestra 5 y 6.....	67
29. Figura 29. Prueba de cianidina con controles positivo y muestra 7.....	68
30. Figura 30. Prueba de Leucoantocianinas con controles positivo y muestra 1 y 2....	68
31. Figura 31. Prueba de Leucoantocianinas con controles positivo y muestra 3 y 4....	69
32. Figura 32. Prueba de Leucoantocianinas con controles positivo y muestra 5 y 6....	69
33. Figura 33. Prueba de Leucoantocianinas con controles positivo y muestra 7.....	70
34. Figura 34. Prueba de Marine-Bettolo con controles positivo y muestra 1 y 2.....	70
35. Figura 35. Prueba de Marine-Bettolo con controles positivo y muestra 3 y 4.....	71
36. Figura 36. Prueba de Marine-Bettolo con controles positivo y muestra 5 y 6.....	71
37. Figura 37. Prueba de Marine-Bettolo con controles positivo y muestra 7.....	72
38. Figuras 38. Grafico Q-Q de normalidad de residuos de la absorbancia del control..	73
39. Figuras 39. Grafico Q-Q de normalidad de residuos de la absorbancia de la muestra 5.....	73
40. Figuras 40. Grafico Q-Q de normalidad de residuos de la absorbancia de la muestra 6.....	74
41. Figuras 41. Grafico Q-Q de normalidad de residuos de la absorbancia de la muestra 7.....	74
42. Figuras 42. Grafico Q-Q de normalidad sin tendencia de los residuos estándares de la absorbancia del control.....	75
43. Figuras 43. Grafico Q-Q de normalidad sin tendencia de los residuos estándares de la absorbancia de la muestra 5.....	75
44. Figuras 44. Grafico Q-Q de normalidad sin tendencia de los residuos estándares de la absorbancia de la muestra 6.....	76
45. Figuras 45. Grafico Q-Q de normalidad sin tendencia de los residuos estándares de la absorbancia de la muestra 7.....	76

RESUMEN

En este trabajo se estudió una alternativa para poder ayudar a personas con diabetes a controlar sus niveles de azúcares. Para esto se realizó una investigación bibliográfica de las plantas nativas de Guatemala que tienen actividad antidiabética y se encontró la *Neuroloena lobata*. Se investigó por qué esta puede tener dicha actividad y se encontró que los metabolitos secundarios de la planta pueden ayudar en esto. Se sabe que los flavonoides pueden tener esta actividad y que se encuentran en la mayoría de las plantas. Dada esta información se planteó una investigación para ver las fracciones de extractos de las hojas de la planta que contenían flavonoides y su actividad antidiabética.

Para realizar esto se extrajo el material vegetal utilizando un sonificador. Se realizó una cromatografía en capa fina para encontrar que fase móvil óptima para la separación de los compuestos de la planta, para luego hacer una separación en columna. Las fracciones obtenidas en la separación de columna se sometieron a pruebas cualitativas y a las que se obtuvo positivo para flavonoide se les analizó su inhibición enzimática utilizando alfa-amilasa y almidón para simular la hidrólisis enzimática.

Se encontró que las fracciones que obtuvieron positivo para flavonoides si tenían actividad enzimática. También se evaluó que la cinética de reacción de hidrólisis enzimática de la α -amilasa con el almidón es de orden 1.

I. INTRODUCCIÓN

La etnobotánica es el estudio de los recursos naturales de un lugar específico, como las plantas nativas que se han ido recolectando a lo largo del tiempo. Esto es de gran importancia ya que se han ido descubriendo propiedades de las plantas que se pueden aprovechar para la salud de las personas. Durante la historia los seres humanos han descubierto propiedades que han ayudado en avances de distintas áreas de la medicina (Ocampo, 1994).

La búsqueda de alternativas para el tratamiento de diabetes ha aumentado su importancia debido al alza de su costo, puesto que la diabetes es una enfermedad considerablemente común en el mundo (AMA, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 2004 un aproximado de 300 millones de personas que padecen de diabetes (Wild *et al.* 2004). Una de las principales razones por la que la diabetes puede presentar problemas es el costo de los tratamientos, los cuales generan un gasto médico 2.3 veces mayor que el promedio según la Asociación Americana de Medicina, en 2013. En países europeos y Estados Unidos, la diabetes es una enfermedad que se encuentra cubierta por el seguro social o médico de las personas, sin embargo, en Guatemala, los medicamentos no son cubiertos por los seguros ni son proveídos por los hospitales (Barceló *et al.* 2003). Se puede observar que la búsqueda de alternativas más económicas es de gran importancia para mejorar la calidad de vida de las personas, por ejemplo, el uso de plantas medicinales.

Los flavonoides son una familia fitoquímica de metabolitos secundarios, los cuales aportan diferentes coloraciones a ciertas plantas (Havsteen, 1983). Unas de sus funciones en las plantas son como agentes antioxidantes, brindando protección ante rayos UV, condiciones ambientales y sustancias químicas (Havsteen, 1983). La estructura general de los flavonoides es de C₆C₃C₆, la cual tiene varios grupos fenólicos que permiten su actividad antioxidante (Havsteen, 1983).

En Guatemala existe una gran diversidad de plantas, se pueden encontrar una gran variedad de especies con diferentes propiedades medicinales (Ocampo, 1994). La *Neurolaena lobata* es una de dichas plantas, a la cual la población de diferentes lugares de

Guatemala, le tienen múltiples usos, varios medicinales (Ocampo, 1994). Una aplicación que le dan a las hojas de esta planta es como tratamiento para la diabetes por medio de una infusión de té (Cáceres, 1999; Ocampo, 1994; Soumyanath, 2005). Su actividad antidiabética puede deberse al contenido de flavonoides, sin embargo, no hay estudios formales que analicen su aplicación como un hipoglucemiante, únicamente se ha estudiado su aplicación como un cicatrizante (Nayak *et al.*, 2014), antipalúdico (Gupta, 1995), antimicrobiano (Kufer, 2005), macro y microfilarial (Gracioso, 2000), insecticida (Lewis y Lewis, 1976), antiinflamatorio (Lajter *et al.* 2014) y antimalárico (Castro *et al.* 1996). En 2011, Zhang y colegas realizaron un estudio en el cual se le administraron extractos de esta planta, a ratones con diabetes, encontrando que sí hay una disminución en la glucosa de la sangre de los ratones.

Lo que se pretende hacer con esta investigación es determinar la actividad antidiabética de las fracciones con presencia de flavonoides encontradas en las hojas de la *Neurolaena lobata*. Se espera aportar información de esta planta para evitar la pérdida de conocimientos valiosos de transmisión oral de la población guatemalteca y difundirlos para el conocimiento científico actual. Además, este estudio puede ser desarrollado a mayor profundidad en el futuro para que otros investigadores establezcan una dieta, suplemento o fármaco según estos resultados, a manera de mejorar el control de la diabetes y mejorar el estilo de vida de las personas que sufren de esta enfermedad.

II. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es una enfermedad que afecta severamente a los habitantes de Guatemala ya que esta no se ve tratada con la atención necesaria (Cornejo 2015). En Guatemala se tiene registrado que aproximadamente un 10.9% de la población del país sufre de diabetes, sin embargo no se tiene registro del porcentaje de personas que no han sido diagnosticadas ni del porcentaje de personas con pre-diabetes (Cornejo, 2015). De acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (2013), una persona con diabetes tiene un gasto de aproximadamente Q45,000 al año en medicamentos para regular su enfermedad; estos gastos no incluyen el costo de insumos básicos, ni de ningún tipo de dieta especial, únicamente son los gastos de medicinas. Sin embargo, más de la mitad de la población de Guatemala se encuentra en pobreza, por lo que no pueden comprar el tratamiento médico que requiere la diabetes (INE, 2013) no es factible para esta población. Además, el seguro social del país no tiene la prioridad de proveer de medicamentos a las personas que sufren diabetes, haciendo que aquellos individuos que deben comprar las medicinas deban pagar directamente de su propio sueldo (Barceló *et al.* 2013). Es por esto que se necesitan buscar alternativas más económicas para poder tratar la diabetes. Una de estas alternativas puede ser el uso de plantas medicinales.

Se sabe del uso de plantas que se pueden encontrar en Latinoamérica como remedios caseros para tratar la diabetes mellitus, como es el caso de la *Neurolaena lobata* (Soumyanath, 2005). En 1987, Gupta y colegas realizaron un estudio de la actividad antidiabética de la *N. lobata*, sin embargo no mencionan el porqué de la actividad

antidiabética. Aprovechando que esta planta es común encontrarla en Guatemala y crece en casi todos los lugares donde hay bastante incidencia del ser humano se desea continuar investigando al respecto (Cáseres, 1999). De manera que, para aportar al conocimiento general y desarrollar nuevas alternativas más económicas, se debe realizar un análisis de la actividad hipoglucemiante de *Neurolaena lobata* para determinar si es factible un tratamiento alternativo para el cuidado de la diabetes con infusiones o extractos de esta planta.

Al identificar la actividad de inhibición de la α -amilasa se pueden hacer estudios posteriores para lograr hacer un suplemento que a la larga puede ayudar económicamente a las personas que sufren de diabetes en Guatemala; y contribuir al desarrollo de nuevas alternativas a los medicamentos actuales para el control de las glicemias. Se necesita continuar con esta investigación para en un futuro lograr reducir los costos del tratamiento y ayudar considerablemente a aquellas que no tienen acceso a los medicamentos. Incluso, se podría disminuir la necesidad de las personas del uso diario de insulina, ya que se podrían implementar suplementos o infusiones a la dieta de las personas para tener un mejor control de los niveles de glucosa.

III. HIPÓTESIS

A. Hipótesis

Las fracciones con presencia de flavonoides van a inhibir la enzima α -amilasa. Esto va a provocar que no se hidrolice el almidón haciendo que no produzca azúcares reductores a partir de polisacáridos.

Ho: Las fracciones con presencia de flavonoides van a inhibir el α -amilasa.

Ha: las fracciones con presencia de flavonoides no van a inhibir el α -amilasa.

B. Descripción de variables:

Las variables que se van a tomar en cuenta van a ser las fracciones que tuvieron cambio de color indicando presencia de flavonoides, esta es una variable cualitativa, y la concentración de almidón que se va a medir por su concentración utilizando la absorbancia del complejo lugol-almidón a través del tiempo.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general:

Determinar si los extractos de la mezcla metanol-cloroformo de las hojas de la *Neuroloena lobata* con presencia de flavonoides inhiben la α -amilasa.

B. Objetivos específicos:

1. Determinar qué fase móvil da mejor separación de los compuestos de la *Neurolaena lobata*
2. Determinar presencia de flavonoides en los extractos metanol-cloroformo.
3. Evaluar la actividad antidiabética de los extractos metanol-cloroformo de hojas de *Neurolaena lobata* con presencia de flavonoides.
4. Determinar el orden de reacción es la hidrolisis enzimática del almidón utilizando α -amilasa salival.

V. MARCO TEÓRICO

Desde el principio de la historia del ser humano, su relación con las plantas ha sido la base para la supervivencia y desarrollo de los pueblos y culturas. Por ejemplo, durante la Edad Media, cuando la información no estaba disponible de manera sencilla, un médico tenía que basarse en el conocimiento popular sobre las propiedades medicinales de las plantas. Esto provocó una enorme dependencia del hombre con las plantas por lo que aún en la actualidad forman parte tanto de la vida material como espiritual de los pueblos. Este conocimiento popular se ha ido especializando a medida que el ser humano ha mejorado y modernizado las técnicas de investigación, además al mismo tiempo estos conocimientos se han diversificado y otros incluso han desaparecido (Pascual *et al.*, 2010).

El ser humano ha usado los diferentes recursos naturales como una fuente de alimento, medicamento y vestimenta. Estudiar las propiedades medicinales que poseen las plantas ha sido de gran interés a lo largo de la historia. Hace 3,500 años se fundó el templo de Torus que era una escuela de medicina donde se cultivaban plantas medicinales. Un acontecimiento importante que otorgó mayores conocimientos en el uso de plantas medicinales fue la llegada de españoles a América. Diversas publicaciones con descripciones de las nuevas plantas alimenticias, medicinales y alucinógenas fueron observadas (Rey, 2010).

Para el caso de América, uno de los primeros escritos de la medicina tradicional se llevó a cabo en el año 1552 por un indígena de la Escuela de Santa Cruz Tlatelolco en náhuatl. En él se recopilan 251 plantas. En Guatemala, se conocían diferentes remedios naturales

para curar enfermedades y dolencias. Por ejemplo, las poblaciones Q'eqchi, Kaqchikel y Tzutuhil contaban con médicos que transmitían sus conocimientos a las generaciones más jóvenes y con ello mantener el conocimiento en el uso de plantas medicinales. Este conocimiento, evidentemente proviene de las poblaciones mayas del país. Los mayas eran capaces de utilizar frutos, flores, raíces y hojas de diferentes plantas como emplastos, infusiones y brebajes para curar enfermedades o aliviar dolencias. También poseían el conocimiento de que determinados vegetales eran capaces de actuar como purgantes y sedantes, otros ayudaban a controlar la fiebre y otros con efectos diuréticos (Pöll, 2007).

En la actualidad ya se tiene la terapia química como principal base para el tratamiento de enfermedades y dolencias, sin embargo hasta el siglo XIX la mayoría de medicamentos fueron elaborados con base en vegetales que el poseía el boticario, quien también los preparaba y mezclaba de manera apropiada para potenciar su actividad. Este tipo de terapia natural es menos efectiva que una terapia química, pero posee menos efectos secundarios. Por eso la búsqueda de plantas siempre ha sido de gran ayuda a las culturas, y Guatemala teniendo gran biodiversidad se debería de aprovechar este recurso (Rey, 2010).

Uno de los países considerado como un paraíso de la diversidad es Guatemala debido a su elevada diversidad biológica, tanto en su fauna como en su flora, lo que hace que la etnobotánica sea de gran importancia para el país (Pöll, 2005). Muchas ciencias y disciplinas en la actualidad estudian el uso de plantas medicinales alrededor del mundo, desde su uso hasta la elaboración de nuevos fármacos. Entre estas disciplinas podemos encontrar la Etnobotánica y la Fitoterapia. La Etnobotánica se enfoca en el uso de los

recursos naturales por partes de las poblaciones locales, recolectando así información de las plantas nativas a través del tiempo (Ocampo, 1994).

Los estudios etnobotánicos están enfocados a la conservación de la diversidad cultural de los pueblos sociedad. Esta recopila los datos y permite el intercambio de conocimiento. Siendo una herramienta que ha permitido el desarrollo sostenido y ha logrado que la cultura sobreviva. En áreas como el trópico húmedo, la etnobotánica es importante, ya que en estas zonas se encuentra la mayor diversidad biológica y cultural del planeta (Pascual *et al.* 2010).

La etnobotánica médica posee un rol muy importante en comunidades rurales del país pues, como se mencionó, funciona como una reserva cultural y genética con un acceso fácil a diferentes componentes curativos con un precio inferior al de medicamentos sintetizados (Ardón, 2008). Por el otro lado la fitoterapia es el estudio del uso de plantas medicinales en tratamientos de diversas enfermedades. Cada planta está formada de diferentes metabolitos secundarios que en conjunto pueden generar una acción farmacológica incluso superior a los metabolitos secundarios aislados. (Aherne, 2002)

La fitoterapia surgió como pomadas, ungüentos, pociones, diluciones entre otros, y se relacionaba principalmente con sus creencias nativas espirituales. Hoy en día se sabe que esto se debe a los principios activos de la planta. Durante la historia de la humanidad se fueron descubriendo diferentes plantas y cada una con propiedades diferentes.

Las plantas son recursos naturales valiosos sobre todo en el área de salud en países en desarrollo. Se ha aproximado que un porcentaje por encima del 80% de toda la población mundial (según datos de la OMS) utiliza medicina natural para satisfacer sus necesidades

en salud. Es por ello que se define a estos recursos como especies con sustancias que pueden ser empleadas para fines terapéuticos, pues sus principios activos se utilizan como precursores en la síntesis de fármacos nuevos. Esto ya que pueden ser utilizados como la materia prima necesaria para producir medicamentos semisintéticos con una complejidad mayor. Además de ello, la complejidad estructural de los principios activos es utilizada como marcador taxonómico con el fin de buscar medicamentos nuevos (Bucay, 2009).

En la actualidad, diversas razones han provocado cierta marginación y rechazo de la medicina natural con base en plantas medicinales, lo cual impide su desarrollo. Esto en gran parte se debe al desconocimiento en cuanto a la forma de cultivar, mercadear y obtener infusiones u otra manera de utilizarla con un fin curativo. A pesar de ello, la planta medicinal sigue siendo considerada como un cultivo estratégico tanto para la medicina como la agricultura, ya que se aprovecha la diversidad del clima y la biodiversidad. La *Neuroloena lobata* es una de estas plantas ya que crece en muchas áreas alrededor de Guatemala.(Ardón, 2008).

La *Neuroloena lobata* es una planta que se puede encontrar en lugares pantanosos o bosques húmedos, al igual que en bosques de encino. Esta crece como una sucesión secundaria alrededor de campos de cultivos, a lo largo de la maleza que se encuentra alrededor de los riachuelos y en laderas o a la orilla de las carreteras (Cáceres, 1999). Esta se localiza en una altitud de 1 400 metros sobre el nivel de mar. En el área de Guatemala se encuentra en los departamentos de: Alta Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Izabal, Petén, El Progreso, Quezaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa y Suchitepéquez

(Missouri Botanical Garden, 2005). Los residentes de estos lugares la pueden identificar con facilidad ya que tiene rasgos muy pronunciados.

Esta planta es de 1 a 4 metros de altura, es poco ramificada, los tallos son surcados, estirados y pubescentes cuando están en sus primeros años. Las hojas son de 5 a 30 cm de largo, pecioladas o casi sésiles, dentadas, pilosas y voluminosas. Tiene inflorescencias corimbo-paniculadas, tiene diferentes cabezas de aproximadamente 20 flores con involucros de 5 a 6 mm de altura. Son pulverulentos, con corolas amarillas a anaranjadas como se puede ver en la Figura 2 (Nash, 1976). Lo que se utiliza de esta planta como recurso medicinal son las hojas.



Figura 1. *Neurolaena lobata* (White,1975)



Figura 2. Localización de la *Neurolaena lobata* (Missouri Botanical Garden, 2005)

Las hojas se colectan en floración y se deben lavar y secarse a la sombra, para poder utilizarse como tratamiento de picazón, como el repelente de garrapatas y para sanar diversos tipos de herida. (Kufer, 2005) La infusión de té amargo de las hojas puede ser administrado por vía oral para el tratamiento de las afecciones gastrointestinales, diabetes, malaria, gonorrea e inflamaciones (Berger, 2001). A la planta se le atribuyen propiedades antibióticas, antimaláricas, aperitivas, carminativas, diuréticas, espasmolíticas, febrífugas, hipoglucémicas, hipotensoras y tónicas (Cáceres, 1999) (Giron, 1991) (Gracioso, 2000)

Estudios antimicrobianos demuestran que las hojas se activan contra diversos tipos de bacterias con concentración inhibidora mínima para la *Salmonella aureus* y *Salmonella typhi* de 1 mg/mL; la infusión de las hojas *in vitro* tiene propiedades contra esquizontes del *Plasmodium bergheii* (Cáceres, 2005) (Kufer, 2005). El extracto de hojas secas tiene un terpenoide que se utiliza para el tratamiento antitumoral. También la actividad de las principales sesquiterpenlactonas ayudan a combatir el parásito de la malaria dentro de los vasos sanguíneos (Nash, 1976). También se logró demostrar que tiene una actividad

potencial macro y micro filarial (Gracioso, 2000). Estas actividades que ayudan a la salud del ser humano son debido a los metabolitos secundarios que tiene la planta.

Las plantas tienen la capacidad de almacenar y producir una enorme cantidad de compuestos, en especial metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios tienen la capacidad de actuar de diferentes formas para reducir los riesgos de desarrollar o contraer enfermedades. Por ejemplo, reducen la formación de aterosclerosis, pues muchos actúan como antioxidantes, incrementan la actividad enzimática para eliminar carcinógenos o destruyen a las sustancias capaces de formarlas. Además de esto, estimulan al sistema inmunológico para responder a la presencia de células anormales, reduce el riesgo a infecciones pues actúan como antimicrobianos y obstruyen la estimulación hormonal que puede provocar determinados tipos de cáncer. Estas funciones se deben a la compleja estructura química de cada metabolito secundario (Colindes, 2013).

Dichos metabolitos son utilizados por investigadores pues son una fuente significativa de compuestos biológicamente activos. Todos estos componentes poseen distintas funciones en el crecimiento, actividad biológica y producción de plantas. Estas características pueden utilizarse y aprovecharse ampliamente por la medicina natural (Anaya, *et al.*, 2001).

Entre los metabolitos más comunes e importantes de las plantas se encuentran los flavonoides. Los flavonoides fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-Gyorgy, que los logró aislar en 1930 de la cáscara del limón. Este compuesto fue la citrina que regula la permeabilidad de los capilares. Estos flavonoides se denominaron como vitamina P y

también vitamina C2 ya que se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a estas vitaminas. Ya para el año 1950 se comprobó que los flavonoides no son vitaminas si no compuestos que pertenecen al grupo de polifenoles (Singleton, 1981).

Su estructura química es un número variable de grupos fenólicos y estos son excelentes para la quelación del hierro y otros metales de transición, lo que le da una actividad antioxidante. Los flavonoides son los encargados de los pigmentos que se pueden presentar en las plantas. Desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, para combatir rayos UV, polución ambiental, sustancias químicas, etc. También tienen efectos terapéuticos que ayudan en problemas de cardiopatía isquémica, la aterosclerosis, diabetes o el cáncer (Havsteen, 1983) (Peres, 1994). El organismo del ser humano no produce estas sustancias químicas protectoras, pero las puede obtener mediante la alimentación de plantas con estos compuestos. Estos se pueden encontrar en diferentes plantas, frutas, verduras y diferentes bebidas, pues son componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. Los flavonoides tienen diferentes propiedades y esto se debe a la estructura que tiene (Aherne, 2002).

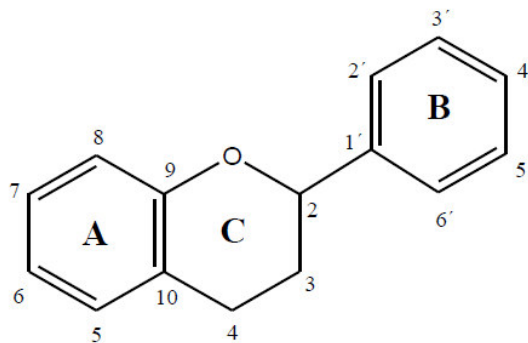


Figura 3. Estructura general de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que tiene un esqueleto C₆-C₃-C₆, compuesto de dos anillos fenilos (anillos aromáticos) polihidroxilados ligados a través de un heterociclo central oxigenado. Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los anillo B desde el 2' al 6'. Las diferentes familias de flavonoides se diferencian dependiendo del grado de insaturación que tenga el anillo heterocíclico (C). Con base en esto se pueden encontrar flavanoles, antocianidinas, flavonas y flavonoles. Además, estos compuestos pueden distinguirse de acuerdo al número y posición de los grupos funcionales hidroxilos y metoxilos observados en el anillo B. La estructura base puede ser glicosilada en el carbono 3 del anillo C. A su vez, los glucósidos que se forman pueden asilarse. Toda su estructura les da la capacidad de actuar como electrófilo y nucleófilo (Fanzone, 2012) (Kuhnau, 1976). Por los radicales del hidroxilo y peróxido tiene la característica de que son especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena peroxidación lipídica y su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides para prevenir la agregación plaquetaria y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación. Por los grupos hidroxifenólicos se le otorga también propiedades antioxidantes (Pace, 1995) (Jang, 1997) (Jovanoivic, 1998) (Yang, 2000) (Igura, 2001) (Geleijinse, 2002) (Stahl, 2002).

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural en diferentes partes de la estructura química. Estos se pueden clasificar por sus características estructurales como flavanos que contiene un grupo -OH en la posición 3 del anillo C. los flavonolesos poseen un grupo en posición 4 del anillo C y un grupo -OH en posición 3 del anillo C. Las flavonas

poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y no tienen el grupo hidroxilo en el C3. Estos se pueden identificar utilizando varios métodos cualitativos y cuantitativos. (Cartaya, 2001)

Dos flavonoides que presentan actividad antidiabética es la narangina y la crisina. La narangina con la combinación de ejercicio físico puede ayudar con diabetes tipo 2, hipertensión arterial y la dislipidemia, pero se sugiere seguir investigando para tener un mejor entendimiento de cómo funciona. La crisina presenta el mismo comportamiento que la metformina, esta es un medicamento que se utiliza para tratar la diabetes mediante la disminución de glucosa y ayuda a controlar la aterosclerosis como enfermedades cardiovasculares. (Ramirez-Espinosa, 2017) (Raffoul, 2017)

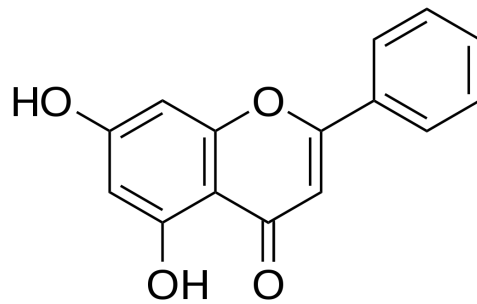


Figura 4. Estructura de la crisina

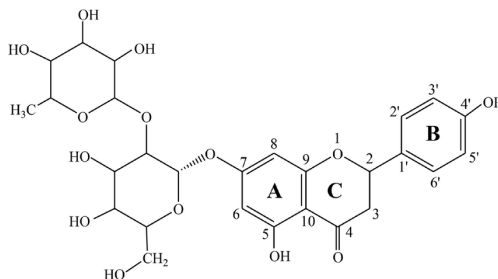


Figura 5. Estructura de la narangina

Existen varios métodos para la identificación de flavonoides: ensayos de coloración son los que se pueden reconocer experimentalmente mediante el cambio de color de la sustancia al agregarle un reactivo que reaccionará con el flavonoide (Sakakibara, 1997). Espectroscopía de UV-VIS para los flavonoides en metanol, estos se caracterizan por bandas de 310-350nm las flavonas, 330-360nm para los flavonoles3-O.sustituidos y 350-385nm flavonoles; debido a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos (Bartolome, 1987). Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) que permite reconocer características estructurales importantes como en ppm 8,9 se puede ver antocianinas, 7.5-8 se ven isoflavonas, 6-6.8ppm flavonas, 5.4 se ven flavonoles y flavanonas. (Giusti, 1998). Espectroscopia de masas que presentan fragmentos característicos en su espectro de masas de impacto electrónico IE40; difracción de rayos-X lo que permite ver la estructura tridimensional de la molécula (Chulia, 1995). Cada una de estas sub-familias que se pueden identificar tiene sus propias características una de ellas son las propiedades medicinales como antiespasmódicos, antimicrobianos y dilatadores coronarios (Colindres, 2013). Además de ello, se ha hablado de una actividad antidiabética (Zhang *et al.*, 2011).

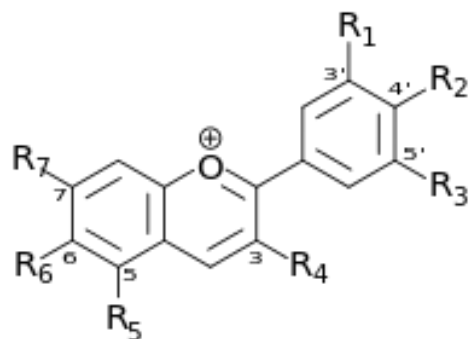


Figura 6. Estructura general de las antocianinas

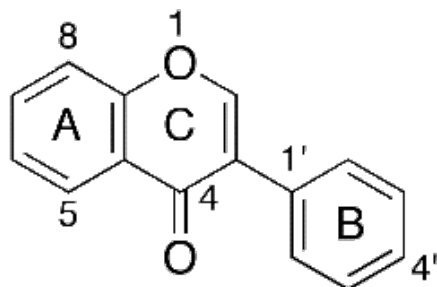


Figura 7. Estructura general de isoflavonas

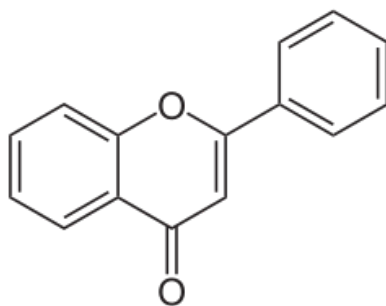


Figura 8. Estructura general de flavonas

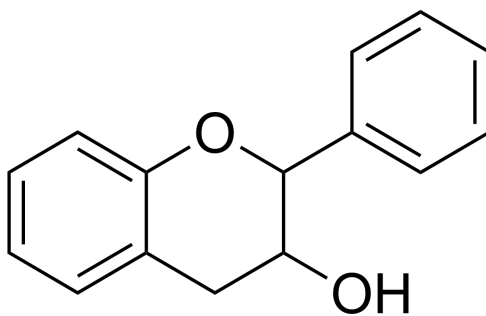


Figura 9. Estructura general de flavonol

La diabetes es una enfermedad crónica que es derivada por un alto nivel de glicemia, además de alteraciones del metabolismo de grasas y proteínas. El aumento de personas que son afectadas por la diabetes ha aumentado exponencialmente en los últimos años (Moreira

2014). Principalmente, se hablan de dos tipos de diabetes Mellitus: la diabetes Mellitus tipo I y la diabetes Mellitus tipo II (Sobel, 2002)(Lehninger, 2005).

La diabetes de tipo I es la diabetes insulino dependiente, es decir; el tipo de diabetes que depende de la administración de insulina. Esta suele aparecer en edades tempranas y puede desarrollar complicaciones graves rápidamente. Esto se debe a un defecto metabólico en el cual existe un déficit de células pancreáticas e incapacita la producción de suficiente de insulina. El tratamiento usual de este tipo de diabetes eses la administración de insulina, dieta y ejercicio. Por el otro lado es la diabetes tipo II que es la insulino independiente. (Buyukbalci, 2008) (Marroquin-Segura, 2005).

La diabetes de tipo II, la insulino independiente, es aquella que no depende de la administración de insulina. Esta suele presentarse en personas de mayor edad y en personas con sobrepeso, de manera que se desarrolla de manera lenta a comparación de la tipo I y los síntomas son menos graves e incluso pueden pasar desapercibidos. En este tipo de diabetes sí existe producción de insulina pero el sistema de respuesta no funciona, la insulina es de mala calidad o la cantidad de insulina no es la suficiente, lo cual crea una regulación mala de los niveles de glucosa en la sangre. Los dos tipos de diabetes vienen con complicaciones de corto y largo plazo para la salud (Hart, 1991).

Hay dos complicaciones de corto plazo que es la cetoacidosis diabética que es una condición que se observa por déficit de insulina y un aumento de la concentración de glucagón. Esto sucede por no utilizar la insulina como medicamento y estrés físico o emocional. En este proceso, el cuerpo gasta lípidos para producción de azúcares

produciendo cuerpos cetónicos. Esto causa que la sangre y la orina se acidifique (Smith, 1999). La otra complicación de corto plazo es el coma hipermolar. Esta complicación se da cuando hay una deshidratación profunda que es provocada por la diuresis hiperglucémica. Esto causa que el afectado no pueda beber la cantidad de agua que la orina le hace perder. Lo que provoca que el paciente presente hiperglucemia extrema, hiperosmolaridad y reducción de peso. Esto afecta el sistema nervioso central que causa que el afectado pierda la consciencia hasta el coma (Smith, 1999). Por el otro lado existen varias complicaciones a largo plazo que pueden causar mayor daño si no se cuida desde un inicio.

Una de las complicaciones de largo plazo puede ser complicaciones oculares. Esto puede causar ceguera en un 2% de la población con diabetes y en un 10% desarrolla una deficiencia visual grave. La diabetes también puede causar enfermedades del riñón e insuficiencia renal. En la enfermedad del riñón al llegar a los 50 años un 40% de las personas con diabetes tipo 1 desarrolla deficiencia del riñón y le requerirá diálisis o trasplante. La neuropatía afecta la sensibilidad de las manos, piernas y pies y puede conducir a ulceración y amputación. Esta complicación puede afectar el corazón, los pulmones, la vejiga, el estómago y órganos sexuales. Esta impotencia afecta a un 10% de los pacientes con diabetes. También existen enfermedades que pueden aparecer en forma esporádica. (Smith, 1999)

Una enfermedad que puede causar la diabetes puede ser la apoplejía ocurre de cada dos a cinco veces en las personas diabéticas. Tienen más probabilidades de tener un alto nivel de grasa en la sangre y de padecer hipertensión. La artereosclerosis produce síntomas de localización variada. Estos pueden causar claudicación intermitente, gangrena e impotencia

orgánica de origen vascular. Otras enfermedades que puede causar la diabetes son: hipertensión, obesidad, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia que a largo plazo causa complicaciones en la diabetes. Aparte si no se cuidan los pies esto pueden causar complicaciones en ellos.(Smith,1999)

El pie diabético produce úlceras que se desarrollan en los pies y extremidades inferiores. Estas úlceras se deben a una distribución anormal de la presión como consecuencia de la neuropatía diabética. También puede producir condiciones más graves que con llevan a la amputación. Esto se debe por la infección de una herida en el pie. Esto agrava el estado del paciente. (Smith, 1999).

Existen diferentes tratamientos para poder prevenir estas complicaciones a corto y largo plazo. Las personas con diabetes tienen que llevar una dieta equilibrada. Esto se da según el peso corporal ideal. La dieta se ve proporcionada por la American Diabetes Association; esto le da el contenido de carbohidratos, grasas y proteínas para facilitar la dieta más adecuada. El ejercicio diario y continuo reduce el nivel de azúcar de la sangre. Esto funciona igual que la insulina, ayuda a disminuir el azúcar de la sangre y además puede ayudar a que funcione mejor. La insulino terapia funciona ya que la insulina es la hormona que permite la utilización de la glucosa. Es producida por el páncreas pero para el diabético el páncreas no segrega insulina, por esto tiene que inyectarse insulina los hipoglucemiantes orales actúan aumentando la liberación de insulina del páncreas. Esto es para los pacientes con diabetes tipo II (Smith, 1999).

También existen tratamientos naturales que ayudan a disminuir y controlar el consumo de azúcares. Estos tratamientos naturales provienen de diferentes tipos de plantas. Esto se debe a que estas plantas tienen compuestos que ayudan al cuerpo en diferentes maneras. Las plantas medicinales como los vegetales en general contienen diferentes compuestos bioactivos, diferentes de nutrientes como minerales y vitaminas. A estos compuestos se les llama metabolitos secundarios, ya que son capaces de producir efectos fisiológicos en un organismo. Dichos efectos tienen la capacidad de modificar funciones biológicas de las células a nivel metabólico en momentos en los que el organismo está enfermo (Colindres, 2013).

Se ha encontrado solo un estudio relacionado a la actividad de la *Neurolaena lobata* en 1984 hecho por Gupta y colegas. En este estudio se utilizaron hojas frescas y se sometieron a una extracción con solvente etanólico. Se les administró la extracción a los ratones con diabetes. A estos se les midió la glucosa en la sangre antes de ponerle la dosis y posteriormente se realizaron mediciones de glucosa cada hora por 24 horas. Se llegó a la conclusión que los extractos sí tenían actividad antidiabética, con el pico de mayor actividad antidiabética a las 4 horas y dejando de surtir efecto a las 24 horas. Lamentablemente, no se han realizado más estudios del por qué tiene esta actividad antidiabética en las hojas de la *Neurolaena lobata* (Gupta, 1984).

VI. MARCO METODOLÓGICO

A. Obtención de la muestra

La muestra fue donada y secada usando un secado con aire caliente por el personal en una finca localizada en Petén, departamento al norte de Guatemala. La muestra consistió en varias hojas colectadas de varias plantas de la especie *Neuroloena lobata*. de la finca, durante marzo 2017.

B. Extracción de la muestra

Se pesó 5 gramos de las hojas secas y se colocó en un erlenmeyer. Se agregó 60 mL de una mezcla de metanol, acetona y Hexano (1:1:1). Se colocó por 1 hora en un sonicador serie VH, 230V marca Branson a una frecuencia de 40KHz. Posteriormente, se decantó a un Erlenmeyer vacío. Se repitió el procedimiento hasta que el extracto obtenido quedó transparente. Se realizó el mismo procedimiento para otras dos muestras de hojas, de 5 gramos cada una. El volumen recolectado se redujo usando una corriente de nitrógeno para eliminar todo el solvente y se re disolvió en 40 mL de metanol (Perez, *et.al.* 2013).

C. Cromatografía de capa fina

Para la separación de compuestos, se utilizó dos cámaras para cromatografía de capa fina saturadas. La primera cámara se utilizó con tolueno-acetato de etilo (2:1) y la segunda con una solución de metanol y cloroformo al 5%(V/V). En cada cámara se colocó dos placas de vidrio de sílica gel 0.2 mm de grosor. Se colocó la muestra con una pipeta, 10

veces en el mismo punto. Dejando que se secase entre cada aplicación. Se dejó secar y se reveló utilizando una lámpara UV (Barriga, 2013).

D. Cromatografía de columna

Se secó y se activó la sílica gel utilizando un horno por 24 horas a una temperatura de 120°C y luego se empacó la columna. Para la fase móvil se utilizó la fase con mejor separación en el paso anterior que fue la de metanol-cloroformo. Por lo tanto, la columna se empacó con una mezcla de sílica gel con la fase móvil hasta llegar a 30 cm y se dejó asentar. Se agregó más mezcla hasta obtener 20 cm de sílica gel compactada (Zhang, 2001).

Se utilizó la naringina y la crisina como controles para medir el tiempo de elución agregando 4.0 mL de naringina a 0.01 M a la columna dejando la correr hasta que llegara a la mitad. Luego se agregó 4.0 mL de crisina 0.01 M a la misma columna, dejándolo correr hasta que ambas especies salieran de la misma, tomando el tiempo de la naringina y la crisina para salir de la columna. Para correr el extracto de muestra se agregó 4.0 mL a la columna y se fue haciendo pasar por la fase móvil. Se colectaron fracciones cada tres horas durante 21 horas, obteniendo siete fracciones finales, considerando que en estas fracciones se colectó el flavonoide ya que incluye la referencia de tiempo de colecta de la naringina y crisina.

E. Pruebas cualitativas

Se utilizó la naringina que es una flavanona y la crisina que es una flavona como controles positivos. Para cada muestra se tomó alícuotas de 1 mL de cada fracción y se sometió a diferentes pruebas. (verde-star, 2016). Luego de evaluar el mejor solvente para la separación de compuestos, se prosiguió a realizar las pruebas cualitativas para la determinación de flavonoides. Se utilizaron las siguientes pruebas cualitativas:

Prueba Dimroth: Se agregó tres gotas de AgNO_3 al 12% en agua. Se agitó por 15 minutos y se calentó por un minuto en baño maría hirviendo. Si hay flavonoides con posición orto o para entre si se formara un espejo de plata (Rios,2014).

Ensayo de Cianidina: Se agregó 1mL de HCl y tres virutas de Mg. Se esperó un intervalo de 10 minutos y se anotó cualquier cambio de color. Se agregó 1mL de octanol, se agitó y se esperó a que se separe en dos fases. Se considera positivo si existe un cambio de color en la fase octanol. En presencia de flavonas de un color amarillo, naranja o rojo; con flavonol o flavanonol, un color rojo carmesí o rojo magenta; con flavanonas, un color magenta, rojo, violeta o azul; con isoflavonas, un color amarillo; y en isoflavanonas, calconas y auronas serán incoloras. (Rios,2014)

Test de Leucoantocianinas: Se agregó 1mL de HCl concentrado y se calentó sobre un baño de vapor por 10 minutos. Se observó y se anotó cualquier cambio de color. Esperar 1 hora para ver una formación de color y anotar los resultados. Las leucoantocianinas se

detectan por un cambio de color rojo o marrón y las antocianidinas por un color anaranjado o rojo azulado. (Rios,2014)

Prueba de Marine-bettolo: Se agregó 1mL de H₂SO₄ concentrado. Se observó el cambio de color. Los flavonoles dan un color amarillo intenso. Las flavononas dan anaranjado o guinda. Las calconas o auronas dan rojo guinda o rojo azulado. (Rios,2014)

Para este paso las fracciones se van a llamar muestra. Se hizo ensayos anti-diabéticos para observar la inhibición de los flavonoides con el α -amilasa. Para esto, se preparó un buffer de fosfato al 0.02 M con NaCl 0.06 M y ajustando pH a 6.9. Se hizo una solución al 1% de almidón en buffer de fosfato, preparado anteriormente. Para el α -amilasa se recolectó 10 mL de saliva del investigador, asegurándose que alcanzara para todos los análisis. Para el análisis se utilizaron las fracciones donde se obtuvo un resultado positivo para flovonoides en las pruebas cualitativas.

F. Pruebas de α -amilasa

Cada ensayo de control y muestra se trabajó en triplicado. Cada triplicado se trabajó simultáneamente con un intervalo de 1 minuto entre cada uno y tomando mediciones cada cinco minutos. Se tomó una medición de absorbancia al inicio del ensayo que contenía almidón y lugol y una medición al final. Esto se utilizó para ver si el complejo de almidón y lugol queda constante durante el tiempo. Como control se agarró 2 mL de saliva y se mezcló con 2 mL de metanol. Luego a un beaker de 5mL, se agregó 1.8mL de la solución de almidón, 0.2mL de la solución de saliva y 0.1 mL lugol. Se tomó mediciones de

absorbancia a 620 nm(Akshatha,2014) y como blanco se utilizó 1.8 mL de almidón y 0.2 mL de la solución de saliva. Se tomó mediciones de absorbancia al tiempo cero y cada 5 minutos por 45 minutos, manteniendo en agitación el beaker con la mezcla del control.

Por cada fracción que contenía flavonoides, se mezcló 2mL de dicha fracción con 2mL de saliva. A un beaker de 10 mL se agregó 1.8 mL de almidón, 0.2 mL de la mezcla de saliva y 0.1mL de lugol. Se tomó mediciones de absorbancia a 620 nm(Akshatha,2014) y se utilizó como blanco 1.8 mL de almidón y 0.2 mL de la solución de saliva. Se tomó mediciones de absorbancia al tiempo cero y cada 5 minutos por 45 minutos, manteniendo en agitación el beaker con la mezcla del control. (Xiao et al, 2006; Chrastil,1985)

G. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico de SPSS versión 23 para analizar los datos. En primer lugar, se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Esta prueba se hace de primero para poder observar si los datos son normales y en dado caso que sean normales ya poder hacer comparación entre ellos. Una vez establecido la normalidad de los datos, se realizó una prueba de ANOVA para hacer una comparación múltiple entre los replicados del control y las muestras. La prueba de ANOVA sirve para comparar si entre el triplicado hay diferencia o no para poder hacer una regresión lineal. Seguido de una prueba post-hoc de Tukey que se utiliza en conjunto con la ANOVA para hacer comparación en parejas entre el control y la muestra, entre tiempo inicial y tiempo final. Además, se utilizó Excel para hacer un análisis de regresión lineal y graficar los puntos para graficar la absorbancia contra el tiempo y obtener la ecuación lineal de cada muestra y el control.

VII. RESULTADOS

A. Muestras

El Cuadro 1 indica el tiempo de elución de la separación de columna en que se tomaron las muestras.

Cuadro 1. Tiempo de elución de las muestras

Muestra	Tiempo de colección
1	0-3 horas
2	3-6 horas
3	6-9 horas
4	9-12 horas
5	12-15 horas
6	15-18 horas
7	18-21 oras

B. TLC

En el Cuadro 2 se puede observar que para el solvente, tolueno-acetato de etilo, utilizado en las placas 2 y 3 no es el adecuado ya que su Rf es cercano a 1 que es el de la clorofila. Se puede utilizar el solvente de metanol/cloroformo ya que en las placas 3 y 4 se puede ver un Rf de 0.8 indicando mejor separación que el anterior de la clorofila.

Cuadro 2. Resultados de pruebas cualitativas para cada muestra (fracción) y controles.

	Rf compuesto A	Rf del control
Placa 1	0.98	0.98
Placa 2	0.98	0.98
Placa 3	0.85	0.85
Placa 4	0.80	0.80

C. Pruebas cualitativas

En los Cuadros 3 y 4 se puede observar los resultados que se obtuvieron para las pruebas cualitativas. En el Cuadro 3 se van a observar que tipo de cambio de color hubo

entre las muestras positivas. El Cuadro 4 se observarán para que pruebas las muestras y el control dio positivo o negativo como lo mostrado en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Cambios de color observados en las pruebas cualitativas para cada muestra (fracción) y controles.

Muestra/ Control	Dimroth	Cianidina	Leucoantocianinas	Marine-Bettolo
Naringina	No hubo cambio	Hubo una coloración rosado intenso	Hubo una coloración leve amarillo	Hubo una coloración rojo intenso
Crisina	No hubo cambio	Hubo una coloración amarillo	Hubo una coloración de amarillo intenso	Hubo una coloración amarillo intenso
Muestra 3	Hubo una coloración rosada	Se vio una coloración leve verde-amarillo	No hubo cambio	No hubo cambio
Muestra 4	Hubo coloración amarillo-verde	Se vio una coloración leve verde-amarillo	Hubo una coloración amarillo-verde	Hubo una coloración anaranjada
Muestra 5	Se formó un precipitado negro	Se oscureció a un color verde	Se oscureció a un color verde	Se oscureció a un color verde
Muestra 6	Se formó un precipitado negro	Se oscureció a un color verde	Se oscureció a un color verde	Se oscureció a un color verde
Muestra 7	Se formó un precipitado negro	Hubo una coloración verde suave.	Hubo una coloración verde suave.	Hubo una coloración verde

Cuadro 4. Resultados de pruebas cualitativas para cada muestra (fracción) y controles.

Muestra/Control	Dimroth	Cianidina	Leucoantocianinas	Marine-Bettolo
Naringina	Negativo	+++	Negativo	+++
Crisina	Negativo	++	+	+++
Muestra 1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 3	+	+	Negativo	Negativo
Muestra 4	+	Negativo	+	+
Muestra 5	+	++	++	++
Muestra 6	++	++	+++	+++
Muestra 7	+	+++	++	++

* + Cambio de coloración leve

++ Cambio de coloración pronunciado

+++ Cambio de coloración intenso

D. Pruebas de inhibición α -amilasa:

En el Cuadro 5 se podrá ver que cada muestra y el control son normales ya que el valor p es mayor al alfa de 0.05. La ANOVA del control y las muestras tienen una significancia de 0 indicando que la regresión que se va a usar en cada una es la adecuada. El Cuadro 6 tiene los subconjuntos creados para los ensayos, el tiempo 0 y el tiempo 45. El Cuadro 7 nos da la regresión lineal del promedio del control y las muestras.

Cuadro 5. Prueba de Shapiro-wilk para ver normalidad

Control/Muestra	Valor p
Control	0.901
Muestra 5	0.179
Muestra 6	0.211
Muestra 7	0.194

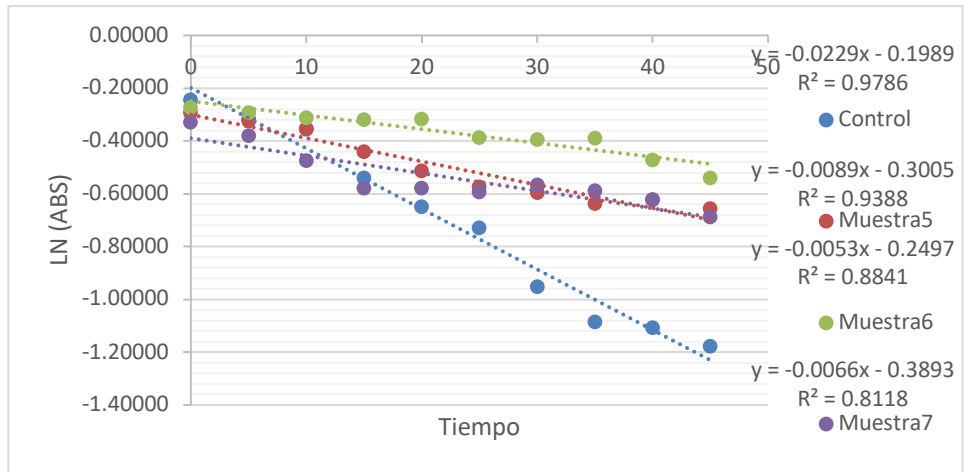


Figura 10. Regresión lineal utilizando el promedio del ln de la absorbancia

En la Figura 3 se puede observar el promedio de la regresión lineal de cada uno de los ensayos. Se puede observar que el control tiene una mayor pendiente que las muestras. Esto indica que puede haber una inhibición de la α -amilasa, se realizó una prueba de post-hoc de Tuckey para ver si hay una diferencia significativa en las pendientes de las muestras con el control.

Cuadro 6. Prueba post-hoc de Tuckey para ver subconjuntos

Prueba de Tuckey	Subconjuntos	Interpretación
Ensayo	Subconjunto 1 Control	La formación de cada subconjunto nos indica que entre el control y las muestras las regresiones lineales no son iguales. También nos indican que la muestra 5 y 7 si son iguales.
	Subconjunto 2 muestra 7 y 5	
	Subconjunto 3 muestra 6	
Tiempo 0	Subconjunto 1 Control Muestra 5,6 y 7	Ya que el control y las muestras están en el mismo subconjunto nos indica que en el tiempo 0 todo tienen el mismo valor
Tiempo 45	Subconjunto 1 Control	Ya que el control se encuentra separado de las muestras se sabe que en el tiempo 45 el valor del control es diferente al valor de las muestras
	Subconjunto 2 Muestra 5,6 y 7	

Cuadro 7. Regresión lineal del promedio del control y las muestras.

	Intercepto	Pendiente	R ²
Control	-0.199	-0.0229	0.978
Muestra 5	-0.3	-0.009	0.939
Muestra 6	-0.25	-0.005	0.884
Muestra 7	-0.389	-0.007	0.812

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La muestra tuvo mayor afinidad con la fase móvil, tolueno-acetato, que con la fase estacionaria haciendo que hubiera ninguna separación entre los compuestos de la muestra. Ya que como se pudo observar viendo el Rf de las manchas del compuesto A están cercanas a la de la clorofila. Por el otro lado con la fase móvil de metanol-cloroformo se observó una menor afinidad con la muestra ya que esta tuvo un Rf de 0.80. Dado este caso se decidió trabajar con una columna con fase móvil de metanol-cloroformo.

El tiempo que se decidió dejar pasar el material vegetal por la columna es de 21 horas en base a que el tiempo de elución de la crisina que fue de 15 y de la naringina que fue de 13.5 horas. Mientras pasaba la crisina por la mitad de la columna, se agregó la naringina afectando el tiempo de elución de la crisina ya que se paró de agregar el solvente. Aun así, se decidió trabajar con el tiempo de la crisina ya que fue mayor el tiempo entre cada elución. Los flavonoides que se utilizaron no son los óptimos ya que la mayoría de flavonoides encontrados en plantas son glucosidados (Cartaya, 2001). Esto puede aumentar el tiempo dentro de la columna ya que las moléculas son más grandes por los azúcares unidos a los flavonoides.

Para cada una de las fracciones obtenidas de la muestra en intervalo de 3 horas en el paso anterior se les administro pruebas cualitativas para observar presencia de flavonoides. Se trabajaron todas las fracciones en simultáneo para cada prueba, debido

a que si no se ve un cambio de color inmediato se observara durante la siguiente hora. Se comparó con los controles de naringina y crisina para ver si hubo un cambio de color. Las pruebas a realizar son las de Dimroth, Cianidina, Leucoantocianinas y Marine Bettolo.

La prueba de Dimroth no es concluyente ya que según (Rios,2014) la formación de precipitado blanco significa presencia de cloruros. Sin embargo, el precipitado se formó en la fase superior fue negro, aunque cabe la posibilidad de que el color de la muestra, siendo verde, influya en el color del precipitado.

La prueba de cianidina la muestra uno y dos dio negativo ya que no hubo un cambio de color. La prueba no es concluyente ya que aunque no de cambio de color puede haber isoflavanonas, calconas o auronas que son incoloras. Para las muestras tres y cuatro se obtuvo un cambio de color leve a un amarillo-verde, indicando presencia de flavonoide, posiblemente de la sub-familia de flavonas o isoflavonas. Para la muestra cinco y seis se observa un cambio de tonalidad, pero no se puede observar con claridad que color se forma, indicando la presencia de flavonoides pero sin poder saber la sub-familia. Esto se debe a que la muestra es de color verde y no se podía distinguir un cambio de color claro. En la fase orgánica se observa una tonalidad verde-amarillo, indicando posible presencia de flavonas. La muestra 7 tuvo un cambio de color café a un verde claro, indicando presencia de flavonoide, pero sin poder saber la sub-familia.

La pruebas de leucoantocianinas la muestra uno, dos, tres y cuatro no hubo ningún cambio de color, indicando negativo para los flavonoides específicos de la prueba. Para

la muestra cinco, seis y siete si hubo un cambio de tonalidad pero no se logró diferenciar el color. Esto indica positivo para flavonoide pero no se puede concluir en la sub-familia.

La prueba de Marine-Bettolo no se logró concluir el color de cambio ya que la muestra es de un color café-verde y la prueba oscureció este color. Esto no deja concluir una subfamilia de flavonoide. La muestra siete tuvo un cambio de color de café a verde. No se pudo concluir a que sub-familia pertenece pero sí que tiene flavonoide.

Se trabajó con la muestra cinco, seis y siete ya que estas presentaron un cambio de color más pronunciado que las demás muestras. El cambio de color no dio suficiente información para saber las sub-familias, pero si la suficiente para indicar que en estas muestras hay flavonoides.

Para el análisis de las pruebas de inhibición del α -amilasa se procuró llevar a cabo bajo las mismas condiciones 22°C, tomando medidas cada 5 minutos, utilizando el mismo lote de saliva y agitación constante para cada corrida. Para la muestra de α -amilasa se decidió usar la saliva del investigador. Se colectó la suficiente cantidad de saliva para poder utilizarla durante todo el proceso de análisis para las muestras y control. No se agregó más saliva durante el ensayo ya que puede cambiar la concentración de α -amilasa y por lo tanto la velocidad del ensayo.

Sabiendo que la absorbancia del lugol es directamente proporcional a la concentración del almidón se decidió trabajar con la absorbancia en vez que la

concentración. Utilizando este supuesto se trabajó para ver qué orden de reacción es la hidrólisis enzimática. Para lograr hacer esto se graficó 3 veces cada control y cada muestra utilizando en cada una la variable dependiente como: abs , $\ln(\text{abs})$ y $1/(\text{abs})$. Se trabajó con el $\ln(\text{abs})$ y $1/\text{abs}$ ya que daba un mejor R^2 que los demás. Esto indica que la reacción es de orden 1.

Dado que los datos son normales se aplicó una ANOVA para saber si la regresión planteada es la adecuada para el modelo. Como se observó que el p-valor es menor que el alfa se puede decir que la regresión si es la adecuada para el modelo. Con este resultado ya se puede comparar las regresiones lineales de los ensayos entre ellos.

Se observó en la Figura 3 si hubo inhibición de la enzima α -amilasa ya que la pendiente del control es más pronunciada que en las muestras. Esto indica que la concentración del control disminuye más rápido que la concentración de las muestras. Se trabajó con un modelo logarítmico y en la recta se obtuvo un R^2 cercano a 1 como se observa en la Figura 3. Con este resultado se puede sugerir que la reacción tiene un modelo cinético de orden 1 y esto concuerda con el estudio de Abe *et. al* (1993), el cual también soporta el modelo cinético de orden 1. Luego se realizó una comparación múltiple entre los ensayos para verificar diferencia entre la muestra y el control. En el Cuadro 4 se puede observar la comparación entre los datos. Para los ensayos se puede observar que el control existe únicamente en un subconjunto indicando de que este si es diferente a las fracciones eluidas de las muestras 5, 6 y 7. También que las fracciones del tiempo 5 y 7 tiene el mismo comportamiento. Para la fracción 6 difiere de las otras

fracciones y con una pendiente menor a las demás es la que contiene mayor inhibición enzimática. La diferencia de por qué el 5 y 7 se comportan igual y el 6 diferente puede ser que existe una mayor concentración de flavonoides en la muestra 6. Esto se debe a que durante la muestra 5 comenzaron a salir los metabolitos secundarios, existiendo una mayor concentración en la muestra 6. Al llegar el tiempo de colecta de la muestra 7 la mayoría de metabolitos secundarios ya habían salido.

Se analizó el inicio y el final de cada ensayo para verificar que en el tiempo inicial partían de la misma absorbancia y que en el tiempo 45 hubiera diferencia significativa. Para el tiempo inicial, Cuadro 5, se observó que todos los ensayos se encuentran bajo el mismo sub-conjunto, indicando que no había diferencia de absorbancia en el inicio del ensayo. Para el final del ensayo, Cuadro 5, se puede observar que el control se encuentra en su propio subconjunto y que las muestras se encuentran en otro subconjunto. Esto indica que aunque todos partieron de la misma concentración para el final del ensayo hubo una disminución mayor en el control que en las muestras.

Observando todos los resultados se puede decir que si existió una inhibición de la enzima α -amilasa. La inhibición del α -amilasa indica que al consumir carbohidratos esta no se hidroliza para crear glucosa y ayuda a mantener el nivel de glucosa en la sangre estable. Esto puede ayudar parcialmente a los diabéticos para mantener un control de su azúcar al ingerir carbohidratos. Las muestras que presentaron positivo para flavonoides fueron las que presentaron esta inhibición. Pero no se puede concluir que la inhibición fue dada por los flavonoides ya que estos no se pudieron aislar.

IX. CONCLUSIONES

1. Utilizando pruebas cualitativas se logró encontrar que hay flavonoides en las fracciones de la mezcla de metanol cloroformo.
2. Las fracciones que dieron positivo en las pruebas cualitativas mostraron una inhibición enzimática de la enzima salival α -amilasa.
3. La fase móvil con mejor separación de los compuestos de la planta *Neurolaena lobata* es la fase de metanol-cloroformo.
4. El mecanismo de la hidrólisis enzimática del α -amilasa con el almidón sigue una cinética de orden 1, lo cual concuerda con estudios de Abe *et al* (1993).

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el estudio utilizando muestras recolectadas en diferente época para ver si hay variación. Se puede trabajar con otras partes de la planta, como el tallo o la flor, para ver si estas también contienen alguna actividad o diferentes compuestos. Se recomienda seguir con el estudio ya que este parece prometedor para buscar suplemento que ayude a controlar mejor los niveles de azúcares. Para lograr esto se tiene que aislar los flavonoides y lograr caracterizarlos. Para la caracterización se recomienda utilizar un HPLC-MS, ya que por GS-MS tiene el inconveniente que los flavonoides no son muy volátiles. Luego para cada flavonoide caracterizado y aislado se recomienda hacer la prueba antidiabética para ver cuáles de estos son los que otorgan esta característica. También se recomienda hacer estudios con la misma planta alrededor del año para ver si el clima afecta la concentración de metabolitos secundarios en la planta. Para las pruebas antidiabéticas *in vitro* se recomienda utilizar diferentes enzimas como el α -amilasa de páncreas o alfa-glucosidasas. Al realizar todas las pruebas *in vitro* se recomienda pasar a las pruebas *in vivo* para ver el posible uso de esta planta en seres vivos. Se recomienda buscar un método que elimine la clorofila. Si se hacen mayores estudios se podría utilizar como un suplemento para inhibir la hidrólisis enzimática.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, J. Sidenius, U. Svensson, B. (1993). *Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds*. *Biochem J.* 293 (1): 151–155

Aherne SA y O'Brien NM. (2002) *Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism*. *Nutrition*, 18:75-81.

Akshatha, V., M.S. Nalini, M., D'Souza, C., Prakash, H.. (2014). *Streptomyces Endophytes from Anti-Diabetic Medicinal Plants of the Western Ghats Inhibit Alpha-Amylase and Promote Glucose Uptake*. *Letters in Applied Microbiology* 58, n.º 5: 433-39.

Anaya, A. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. México: Plaza y Valdés. Págs. 165-167.

Ardón, C. E. (2008). *Descripción y uso de especies con propiedades medicinales en las comunidades de San Francisco Chancó, Salitrón y Corral de Piedra, de la microcuencia del Río Chancó, del municipio de San Juan Ermita, departamento de Chiquimula*. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala: Centro Universitario de Oriente Agronomía. 226 págs.

Barceló, A.; Aedo, C.; Rajpathak S. y Robles S. (2013). *The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean*. Bulletin of the World Health Organization (WHO) 81(1): 19-21

Barriga, M. (2013). *Characterization of flavonoids from Artemisia annua*. Worcester polytechnic institute. 95pp.

Berger I, Passreiter C, Cáceres A, Kubelka W. (2001) *Antiprotozoal Activity of Neurolaena lobata*. Phytotherapy Research; 15:327-330.

Bucay, L. (2009). *Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana de la Violetilla (Hybanthus parviflorus)*. Tesis de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador: Escuela de Bioquímica y Farmacia. 74 págs.

Büyükbalci, A., & El, S. (2008). *Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas*. Plant Foods for Human Nutrition, 63,27-33.

Cáceres A. (1999). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala: Guatemala USAC*.402p.

Cartaya, O., Reynaldo, I. (2001) *Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones*, s. f., 11.

Castro, O., Barrios, M., Chinchilla M., Guerrero, M. (1996). *Evaluación química y biológica del efecto de extractos de plantas contra Plasmodium berghei*. Rev. Biol. Trop. 44: 361-367.

- Chrastil, J. (1985). *Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours*. Elsevier science publishers B.vV.. Amsterdam (159)154-158
- Colindres, M. (2013). *Determinación del análisis fitoquímico preliminar y proximal de las flores y tallo joven de Yucca guatemalensis (Izote) y Rytidostylis gracilis (Cochinito)*. Tesis de la Universidad de El Salvador. El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. 184 págs.
- Federación Internacional de Diabetes (FID). (2013). *Atlas de la Diabetes de la FID*. 6ta ed, Federación Internacional de Diabetes. de: www.idf.org/diabetesatlas el 19/11/2015]
- Geleijnse, J., Launer, L., Van der Kuip, D., Hofman, A. y Witteman J. (1999). *Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study*. Am J Clin Nutr, 75:880-886.
- Girón, L., Freire, V., Alonzo, A., Cáceres, A. (1991). *Ethnobotanical Survey of the Medicinal Flora used by the Caribs of Guatemala*. *Journal of Ethnopharmacology* ;34:173-1778.
- Gracioso, J., Hiruma-Lima, A., Brito, A. (2000) *Antiulcerogenic effect of ahydroalcoholic extract and its organic fractions of Neurolaena lobata (L.) R.BR*. *Phytomedicine*. 7(4): 83-289.
- Gupta, M; Solis, N; Avella, M; Sanchez, C. (1984). *Hypoglycemic activity of Neurolaena lobata (L.) R. Br*. *Journal of ethnopharmacology*, 10, pp323-327.

Gupta, M. (1995). 270 *Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Convenio Andrés Bello. CYTED. Editorial Presencia Ltda. Santa Fe de Bogotá, pp. 198,199.

Harborne, J. (1998). *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Tercera edición. Chapman & Hall. New York. Pp302

Havsteen, B. (1983): Flavonoids. *A class of natural products of high pharmacological potency*. *Biochem Pharmacol*, 32:1141-1148.

Igura K, Ohta T, Kuroda Y y Kaji K.(2001). *Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro*. *Cancer Letts*,, 171:11-16.

Instituto Nacional de Estadística (INE). (2013). *Indicadores sociodemográficos*. Instituto Nacional de Estadística, Ciudad de Guatemala. de: <http://www.ine.gob.gt/index.php/estadisticas/tema-indicadores> en 19/11/2015

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. (1997).: *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. *Science*, 275:218-221.

Jovanovic, S., Steenken, S., Simic, M., Hara, Y.(1998). *Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals*. Marcel Dekker. 137-161.

Kufer, J., Forther, H., Poll, E., Heinrich, M. (2005). *Historical and modern medicinal plant uses the example of the Ch'orti' Maya and Ladinos in Eastern Guatemala*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*;57(9):1127-1152.

Kühnau, J. (1976). *The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition*. World Rev Nutr Diet, 24:117-190.

Lajter, I.; A. Vasas; Z. Béni; P. Forgo; M. Binder; V. Bochkov; I. Zupkó; G. Krupitza; R. Frisch; B. Kopp y J. Hohmann. (2014). *Sesquiterpenes from Neurolaena lobata and Their Antiproliferative and Anti-inflammatory Activities*. Journal of Natural Products 77: 576-582

Lehninger, D., & Cox, M. (2005). *Lehninger principios de bioquímica*. 4 ed.. Barcelona:Omega

Lewis, W.H. y M.P.F. Elvin-Lewis. (1977). *Medical Botany: Plants Affecting Man's Health*. John Wiley and Sons, NY.

Marroquín-Segura, R., Flores P, M., García B, M. M., Mora G, J. L., Sánchez R, J. F., & Aguilar C, A. (2005). *Efecto antihiperglucémico de un extracto acuoso de Colubrina elliptica*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 36 (2), 27-32.

Martin, G. (1995). *Etnobotánica, Pueblos y Plantas. Manual de Conservación*. Reino Unido: Nordan Comunidad.

Missouri Botanical Garden. Database online. (2005). Disponible en: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>

Narkhede, M., Ajimire, P., Wagh, A., Mohan, M., y Shivashanmugam, A. (2011). *In Vitro Antidiabetic Activity of Caesalpinia Digyna (R.) Methanol Root Extract*, 6.

Nash, D., Williams, L. (1976) *Flora of Guatemala*. Fieldiana Botany. USA: Vol. 24, Tomo 12, Chicago Field Musseum,. 603 p

Ocampo, R.; J, Martínez; A. Cáceres. (2007). *Manual de agrotecnología de plantas medicinales nativas*. Guatemala: Proyecto OEA/AICD/AE-089/95.

Orellana, R. (1998). *Estudio Etnobotánico de siete comunidades de la Reserva de Biosfera Sierra de las Minas Guatemala, con énfasis en plantas medicinales*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G y Goldberg DM. (1995). *The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease*. Clin Chim Acta, 235:207-219.

Pascual, M., Cáceres, T. (2010). *La etnobotánica una ciencia del pasado para el futuro*. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.España. P41-42.

Peres, W. (1994). *Radicaís Livres em níveis biológicos*. Ed. Universidade Católica de Pelotas, Brasil, 49-81.

Perez-Najera, V;, Lugo-Cervantes, EC; Guitierrez-lomeli, M; Del-Toro, Cl. (2013). *Extraccion de compuestos fenolicos de la cascara de lima y dterminacion de su actividad antioxidante*. Revista de ciencias biologicas y de salud 15(3): 18-22.

Pöll, E. (2007). *Plantas Medicinales de Guatemala: reseña histórica*. Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal. 6(2):27.

Pöll, E. et. al. (1983). *Plantas Comestibles y Toxicas de Guatemala*. (2a ed.). Guatemala: CECON. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Raffoul, A; Gonzalez, A; Cancela, J. (2019) *Efectos de la ingesta de naringina en combinacion con el ejercicio sobre respuestas clinicas: una revision sistematica*, Vol.22, Num 1.

Ramírez-Espinosa, J.J.; Saldaña-Ríos, J.; García-Jiménez, S.; Villalobos-Molina, R.; Ávila-Villarreal, G.; Rodríguez-Ocampo, A.N.; Bernal-Fernández, G.; Estrada-Soto, S. (2018) *Chrysin Induces Antidiabetic, Antidyslipidemic and Anti-Inflammatory Effects in Athymic Nude Diabetic Mice*. *Molecules*, 23, 67

Rey, Mar. (2010). *Las enseñanzas del Centauro Quitón. Historia de las hierbas mágicas y medicinales*. España: Ediciones Nowtilus S. L. págs. 13-37.

Ríos, N., Flor A. Leidy, P.(2014) *Extracción de Pigmentos Colorantes Tipo Flavonoides*, s. f., 10.

Singleton, V. (1981) *Flavonoids*. En: Childester CO, Mrak EM, Stewart Gf (eds.): *Advances in Food Research*. New York: Academic Press, 149-242.

Smith, R.(1999). *Farmacología*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp 2331

Sobel, B. E., & Schneider, D. J. (2002). *Medical management of diabetes and heart diseases*. New York: Marcel Dekker.

Soumyanath, A. (2005). *Traditional Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants*.
Ilustrado, CRC Press, FL:336pp

Stahl, W., Ale-Agha, N. y Polidori, M. (2002) *Non-antioxidant properties of carotenoids*.
Biol Chem, 383:553-558.

Verde-Star, M; García-González, S y Rivas-Morales, C (2016). *Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Investigación en plantas de importancia médica, de Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 1-40, 1.ª ed. OmniaScience.*

Villatoro, E. (1984). *Etnomedicina de Guatemala*. (Vol. 1) Guatemala: Centro de estudios folklóricos. Universidad de San Carlos de Guatemala.

White, R., (1975). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 62: p. 1258, fig. 97

Wild, S. (2004). *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care 27(5):1047-1053

Yang, K., Lamprecht, S., Liu, Y. (2000) *Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon*. Carcinogenesis, 2000, 21:1655-1660.

Zhang, Z., Qi C., Min Zhu, Y., Walter, K. y Zhen-Yu, C. (2001). *Characterization of Antioxidants Present in Hawthorn Fruit*. The Journal of Nutritional Biochemistry 12, (3): 144-52.

Zhizhuang, X., Storms, R. y Tsang, A. (2006). *A Quantitative Starch-iodine Method for Measuring Alpha-Amylase and Glucoamylase Activities*. Analytical Biochemistry 351, n.º 1: 146-48.

XII. APÉNDICE I

A. Separación de TLC

Relevado de las placas de TLC con fase móvil tolueno acetato

Figura 11. Revelado de primera placa con solvente tolueno acetato

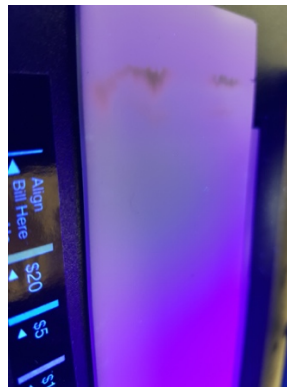


Figura 12. Revelado de la segunda placa con solvente tolueno acetato



En la Figura 4 y 5 se pueden observar que la fase móvil de tolueno acetato no es la óptima para la separación de flavonoides ya que no se ve diferencia entre bandas en la sílica.

Figura 13. Revelado de la tercera placa con solvente metanol-cloroformo



Figura 14. Revelado de la cuarta placa con solvente metanol-cloroformo



Se puede observar en la Figura 6 y 7 una mejor separación de flavonoides utilizando la fase móvil metanol-cloroformo.

B. Fracciones en el tiempo

Figura 15. Fracción 1 tiempo 0 a 3 horas



Figura 16. Fracción 2 tiempo 3 a 6 horas

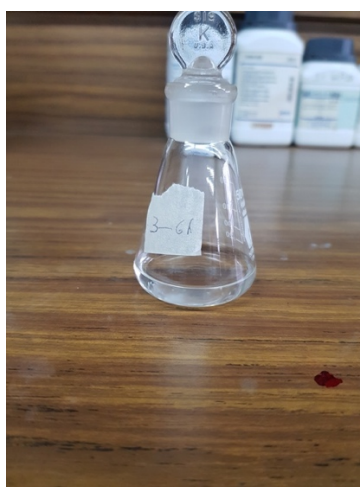


Figura 17 Fracción 3 tiempo 6 a 9 horas



Figura 18. Fracción 4 tiempo 9 a 12 horas



Figura 19. Fracción 5 tiempo 12 a 15 horas

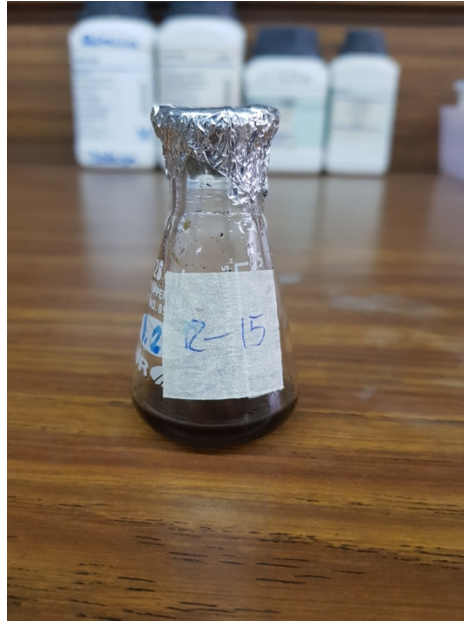


Figura 20. Fracción 6 tiempo 15 a 18 horas

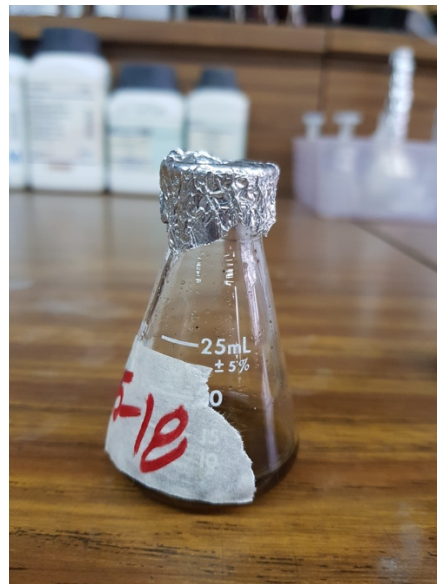
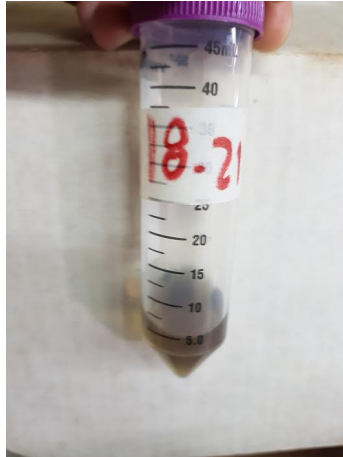


Figura 21. Fracción 7 tiempo 18 a 21 horas



Para las imágenes de las fracciones se puede observar la coloración de cada una que se comparara con las pruebas cualitativas.

C. Pruebas cualitativas

Figura 22. Prueba de dimroth con controles y muestra 1 y 2

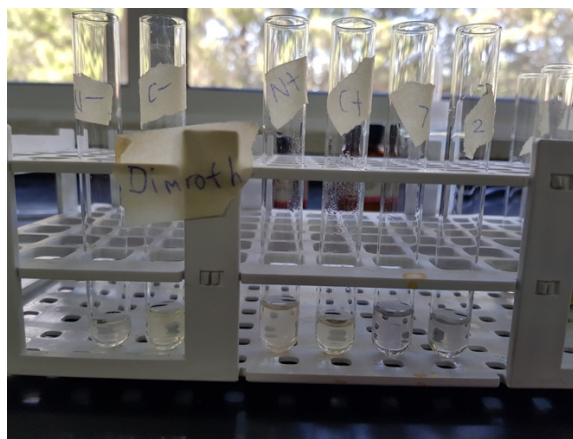


Figura 23. Prueba de dimroth con controles y muestra 3 y 4

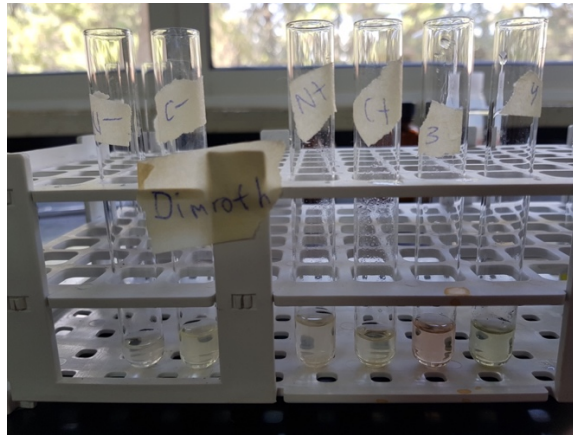


Figura 24. Prueba de dimroth con controles y muestra 5 y 6

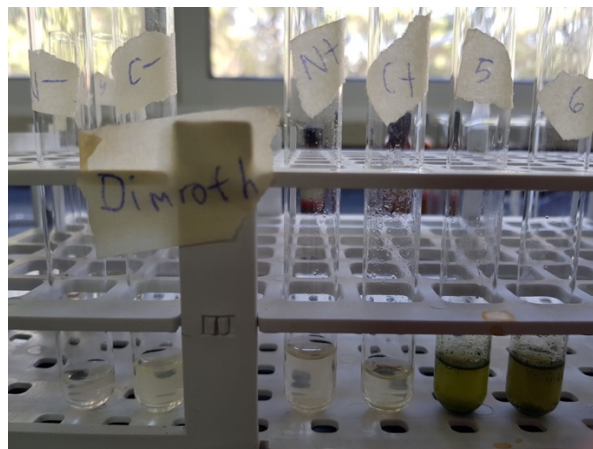
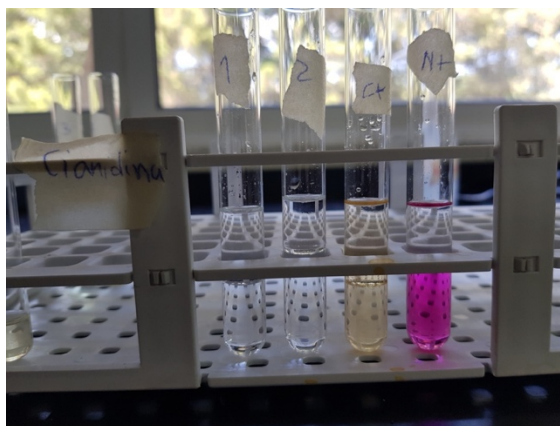


Figura 25. Prueba de Dimroth con controles y muestra 7

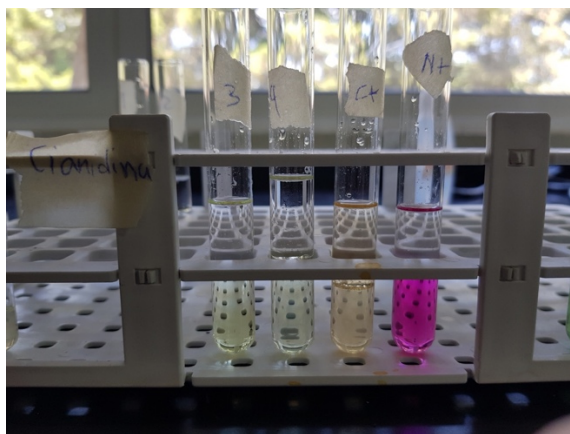


Figura 26. Prueba de cianidina con controles positivo y muestra 1 y 2



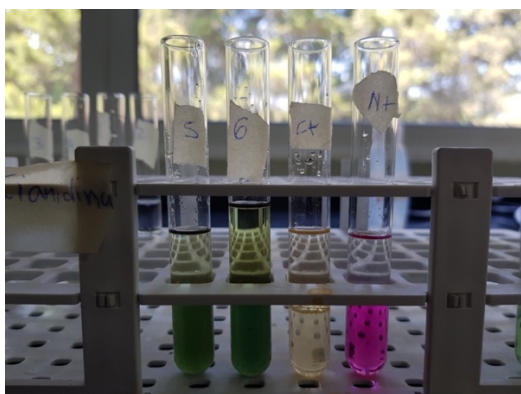
Se puede observar un cambio de coloración magenta para la naringina y anaranjado para la crisina. No se observó cambio de coloración para la fracción 1 y 2.

Figura 27. Prueba de cianidina con controles positivo y muestra 3 y 4



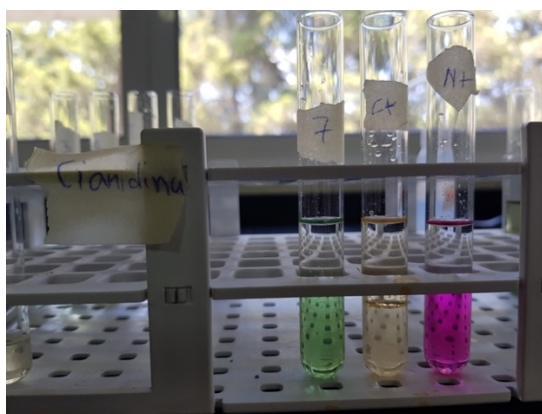
Se observó un cambio de coloración tenue verde-amarrillo para la muestra 3 y 4.

Figura 28. Prueba de cianidina con controles positivo y muestra 5 y 6



Se observó un cambio de tonalidad de café-verde a verde intenso para la muestra 5 y 6. Para la muestra 6 se pudo observar que el octanol formo un color verde amarillo.

Figura 29. Prueba de cianidina con controles positivo y muestra 7



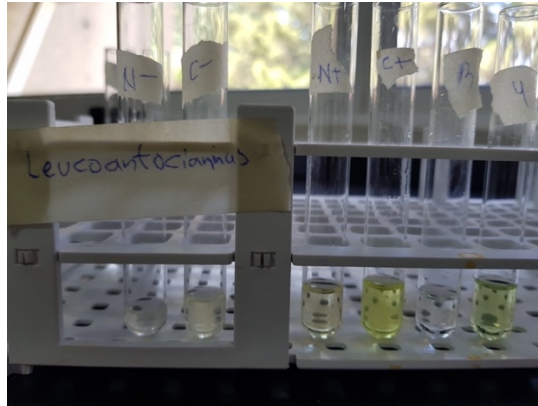
Se observó un cambio de coloración verde claro para la muestra 7.

Figura 30. Prueba de Leucoantocianinas con controles positivo y muestra 1 y 2



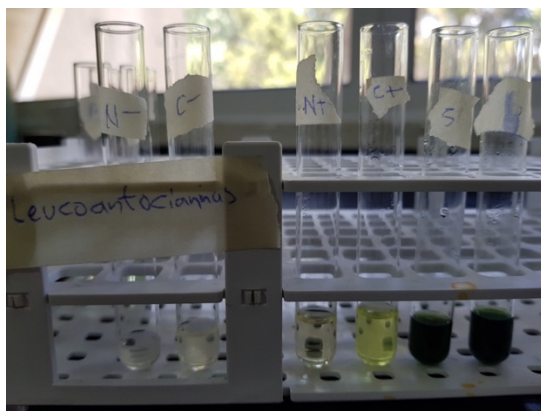
Para el control de naringina se obtuvo una coloración anaranjada y para la crisina una coloración amarillo. Para la fracción 1 y 2 no hubo cambio de coloración.

Figura 31. Prueba de Leucoantocianinas con controles positivo y muestra 3 y 4



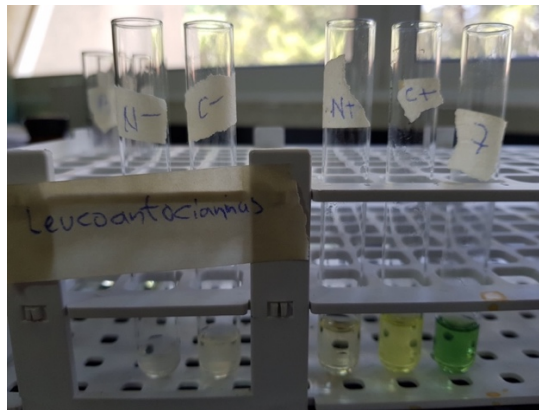
Para la muestra 3 no se observó cambio de color y para la muestra 4 se observó un cambio de coloración verde-amarrillo.

Figura 32. Prueba de Leucoantocianinas con controles positivo y muestra 5 y 6



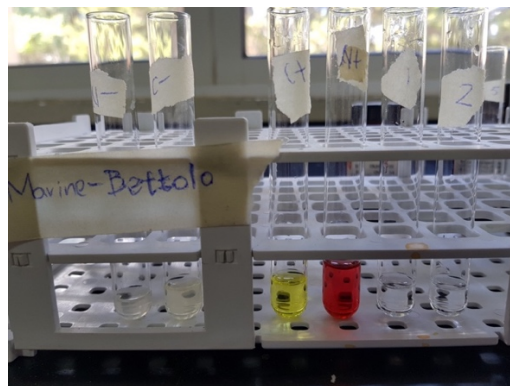
Para la muestra 5 y 6 se observa un cambio de tonalidad de café-verde a un verde oscuro.

Figura 33. Prueba de Leucoantocianinas con controles positivo y muestra 7



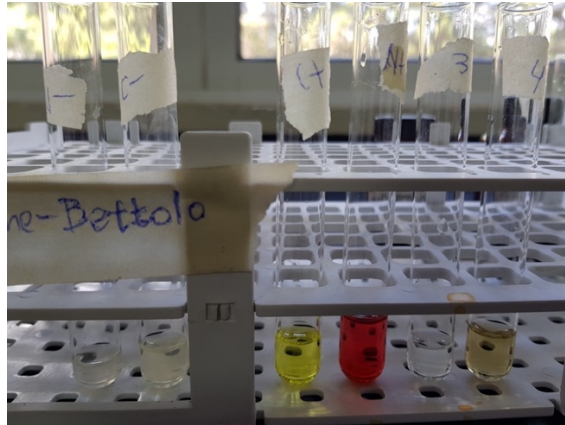
La muestra 7 tiene un cambio de coloración de verde-amarillo.

Figura 34. Prueba de Marine-Bettolo con controles positivo y muestra 1 y 2



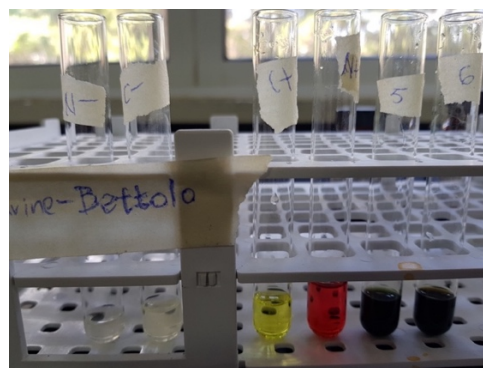
En la Figura 27 se puede observar que los controles positivos dan un color amarillo para la crisina y un color rojo fuerte para la naranjina. La muestra 1 y 2 no se observó ningún cambio de coloración

Figura 35. Prueba de Marine-Bettolo con controles positivo y muestra 3 y 4



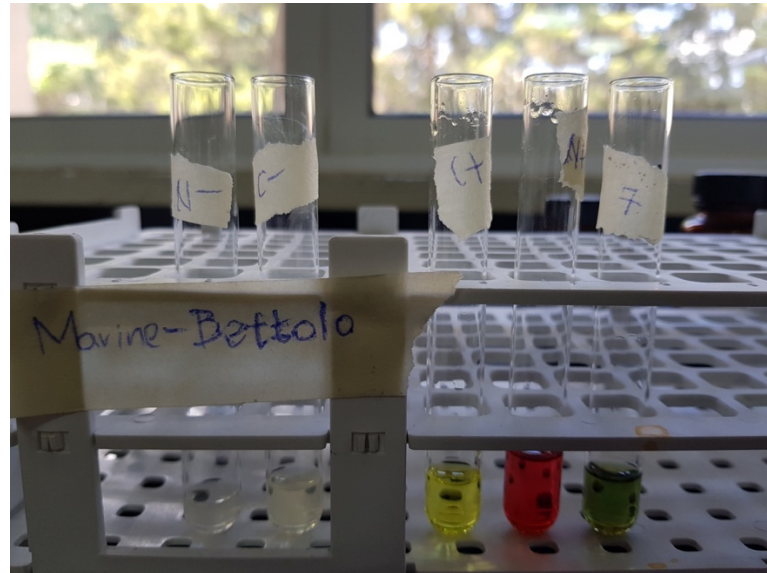
Se puede observar que para la muestra 3 no se observó ningún cambio de coloración, pero para la muestra 4 se observó un cambio de color anaranjado.

Figura 36. Prueba de Marine-Bettolo con controles positivo y muestra 5 y 6



Para la muestra 5 y 6 hubo un cambio de color de verde-café claro a verde oscuro.

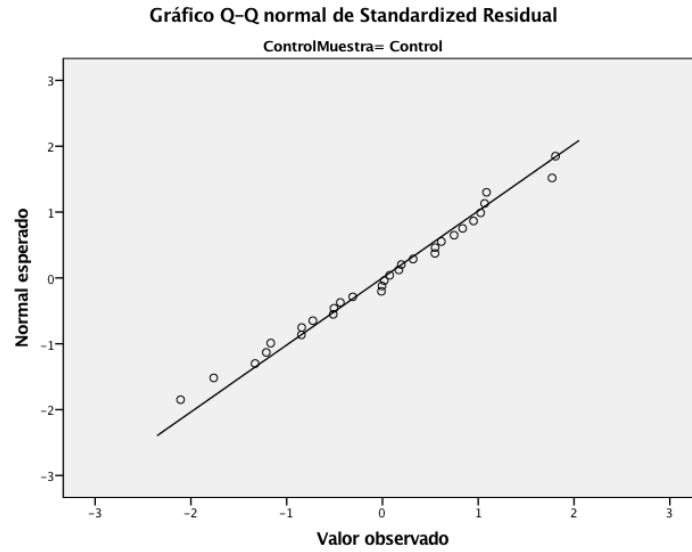
Figura 37. Prueba de Marine-Bettolo con controles positivo y muestra 7



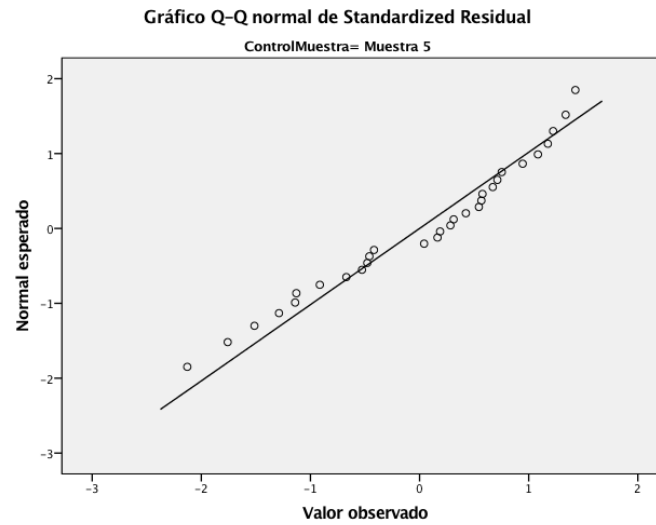
En la Figura 30 se puede observar que la muestra 7 sufro un cambio de color de café a un verde-amarrillo.

D. Gráficos Q-Q normales

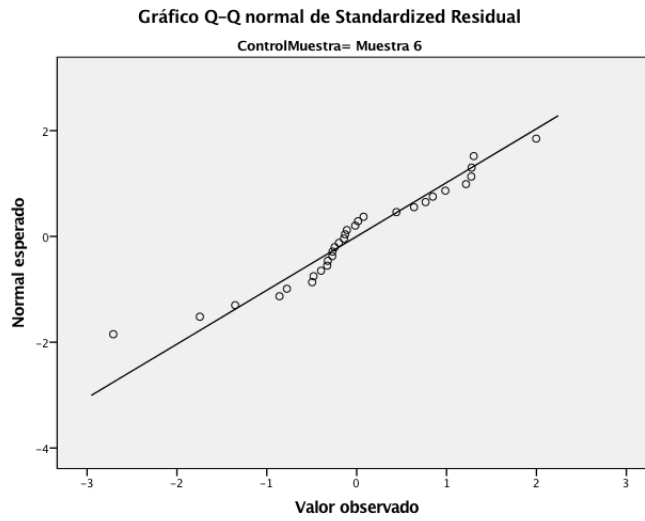
Figuras 38. Gráfico Q-Q de normalidad de residuos de la absorbancia del control



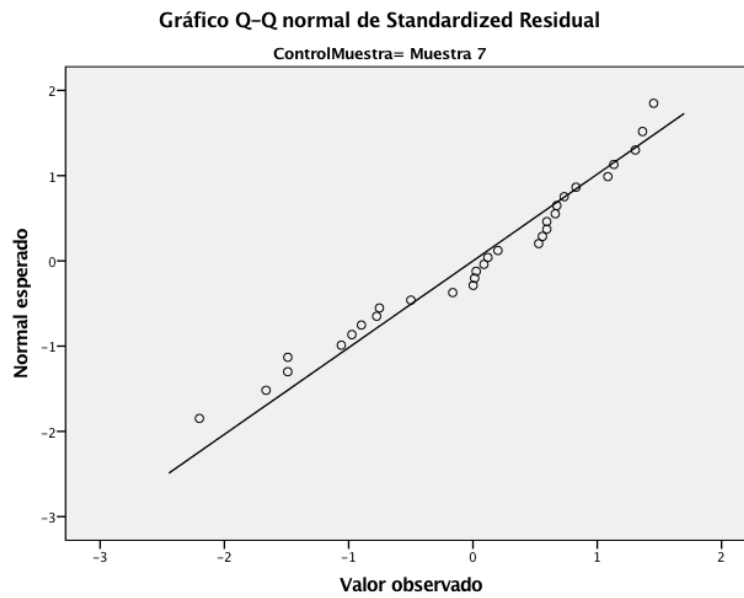
Figuras 39. Gráfico Q-Q de normalidad de residuos de la absorbancia de la muestra 5



Figuras 40. Gráfico Q-Q de normalidad de residuos de la absorbancia de la muestra 6

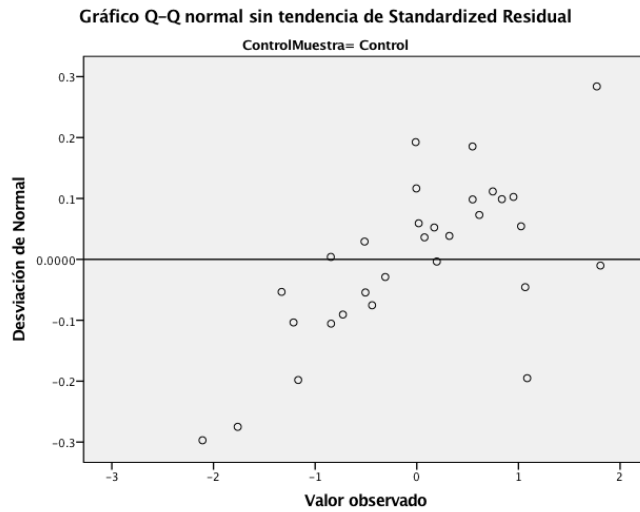


Figuras 41. Gráfico Q-Q de normalidad de residuos de la absorbancia de la muestra 7

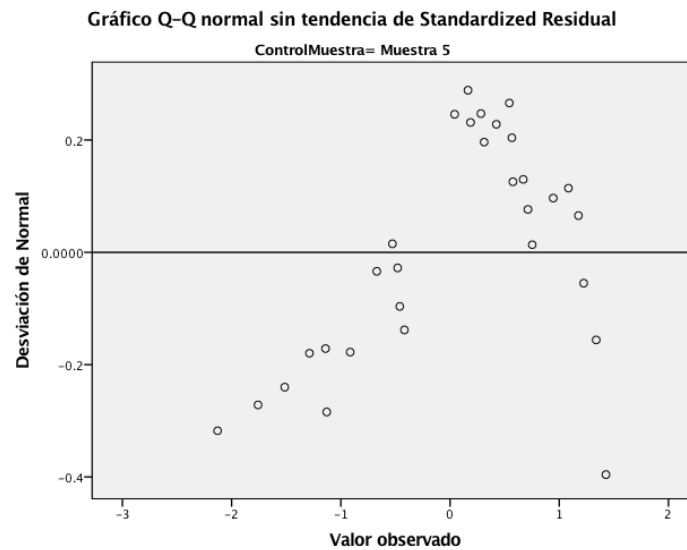


E. Gráficos Q-Q normales sin tendencia

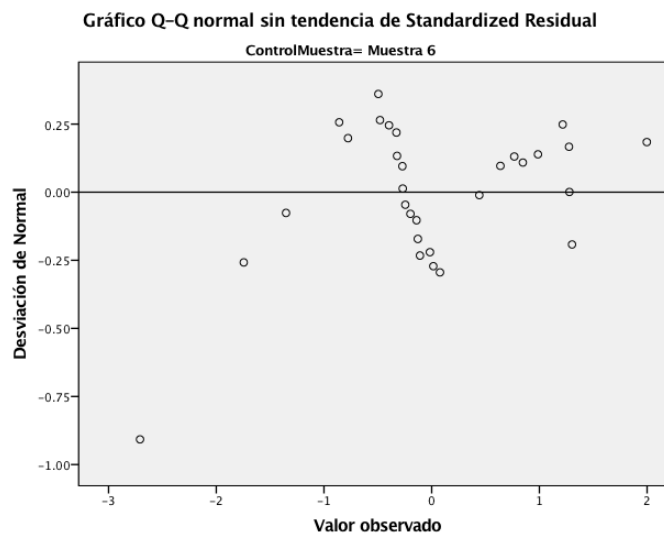
Figuras 42. Gráfico Q-Q de normalidad sin tendencia de los residuos estándares de la absorbancia del control



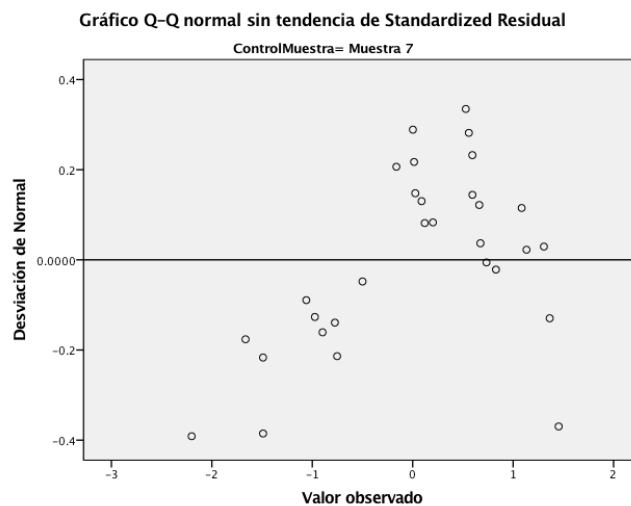
Figuras 43. Gráfico Q-Q de normalidad sin tendencia de los residuos estándares de la absorbancia de la muestra 5



Figuras 44. Gráfico Q-Q de normalidad sin tendencia de los residuos estándares de la absorbancia de la muestra 6



Figuras 45. Gráfico Q-Q de normalidad sin tendencia de los residuos estándares de la absorbancia de la muestra 7



Cuadro 8. Resultados de pruebas de normalidad de shapiro wilk

Pruebas de normalidad

ControlMuestra	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Control Standardized Residual	.983	30	.901
Muestra 5 Standardized Residual	.951	30	.179
Muestra 6 Standardized Residual	.954	30	.211
Muestra 7 Standardized Residual	.952	30	.194

Cuadro 9. Modelo de regresión lineal planteado por SPSS

ControlMuestra	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	95.0% intervalo de confianza para B	
		B	Error estándar	Beta			Límite inferior	
Control	1	(Constante)	- .199	.034		-5.913	.000	-.268
		Tiempo	- .023	.001	-.960	- 18.186	.000	-.026
Muestra 5	1	(Constante)	- .300	.015		- 19.692	.000	-.332
		Tiempo	- .009	.001	-.946	- 15.483	.000	-.010
Muestra 6	1	(Constante)	- .250	.023		- 10.631	.000	-.298
		Tiempo	- .005	.001	-.749	-5.990	.000	-.007
Muestra 7	1	(Constante)	- .389	.017		- 22.980	.000	-.424
		Tiempo	- .007	.001	-.892	- 10.468	.000	-.008

Cuadro 10. ANOVA para verificar que el modelo planteado es el correcto

ControlMuestra	Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Control	1	Regresión	3.251	1	3.251	330.739	.000 ^b
		Residuo	.275	28	.010		
		Total	3.526	29			
Muestra 5	1	Regresión	.485	1	.485	239.724	.000 ^b
		Residuo	.057	28	.002		
		Total	.541	29			
Muestra 6	1	Regresión	.172	1	.172	35.874	.000 ^b
		Residuo	.134	28	.005		
		Total	.306	29			
Muestra 7	1	Regresión	.273	1	.273	109.586	.000 ^b
		Residuo	.070	28	.002		
		Total	.343	29			

XIII. CONTACTOS

Estudiante: Cristian Yeeming Chau Romero

Teléfono: 42208678

Correo electrónico: chiri92.cc@gmail.com

Asesor: Lic. José Carlos Chiquin

Teléfono: 50242489

Correo electrónico: jchiquin@uvg.edu.gt