



**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES DE LAS HOJAS DE
Chromolaena tacotana (Klatt) R.M. King & H. Rob.**

LILIAN MARITZA GÓMEZ CALDERÓN

COD: 1032424497

ANGIE CRISTINA GUTIÉRREZ OTALORA

COD: 1013634777

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES (U.D.C.A)

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ, 2016

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES DE LAS HOJAS DE
*Chromolaena tacotana (Klatt) R.M. King & H. Rob.***

LILIAN MARITZA GÓMEZ CALDERÓN

COD: 1032424497

ANGIE CRISTINA GUTIÉRREZ OTALORA

COD: 1013634777

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

DIRECTOR

JEANET RODRIGUEZ MAYUSA MSc.

CODIRECTOR

RUBÉN DARIO TORRENEGRA GUERRERO

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES (U.D.C.A)

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE QUIMICA

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ, 2016

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES DE LAS HOJAS DE
Chromolaena tacotana (Klatt) R.M. King & H. Rob.**

**LILIAN MARITZA GÓMEZ CALDERÓN
ANGIE CRISTINA GUTIÉRREZ OTÁLORA**

JEANET RODRÍGUEZ MAYUSA
DIRECTOR

RUBEN DARIO TORRENEGRA
COORDIRECTOR

JURADO

JURADO

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES DE LAS HOJAS DE
Chromolaena tacotana (Klatt) R.M. King & H. Rob.**

LILIAN MARITZA GÓMEZ CALDERÓN

ANGIE CRISTINA GUTIÉRREZ OTÁLORA

JURADO

JURADO

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	8
INDICE DE FIGURAS.....	9
INDICE DE TABLAS	10
INDICE DE GRAFICAS	11
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCION.....	14
1. OBJETIVOS.	16
1.1. Objetivo General.....	16
1.2. Objetivos Específicos.....	17
2. MARCO TEORICO.....	17
2.1. Aspectos botánicos.	17
2.1.1. Clasificación taxonómica.....	17
2.1.2. Descripción y consideraciones botánicas.....	18
2.2. Características de los flavonoides	19
2.3. Estudios Químicos del género <i>Chromolaena</i>	20
2.4. Actividad antioxidante	23
2.4.1. Ensayo de captación de radicales con DPPH* (1,1-difenil-2-picrilhidrazina): ...	23
2.4.2. Ensayo de captación de radicales con ABTS** (Acido 2,2'-azino-bis-3- etilbenzotiazolin-6- sulfónico)	24
2.5. Estudios de actividad antioxidante en el género <i>Chromolaena</i>	25
3. METODOLOGIA.....	27
3.1. Recolección y preparación del material vegetal:	27
3.2. Extracción, Fraccionamiento y purificación de flavonoides	27
3.3. Ensayos cualitativos para identificación de flavonoides.....	29
3.4. Actividad Antioxidante.....	29
3.5. Análisis estadístico de IC ₅₀	30
4. RESULTADOS Y ANALISIS	30
4.1 Flavonoide Ct1	31
4.1.1 Características físicas.....	31
4.1.2 Elucidación estructural.....	31
4.1.3 Estructura Ct1	35

4.2 Flavonoide Ct2	35
4.2.1 Características físicas.....	35
4.2.2 Elucidación estructural.....	35
4.2.3 Estructura Ct2	42
4.3 Flavonoide Ct3	42
4.3.1 Características físicas.....	42
4.3.2 Elucidación estructural.....	42
4.3.3 Estructura Ct3	47
4.4 Flavonoide Ct4	47
4.4.1 Características físicas.....	47
4.4.2 Elucidación estructural.....	47
4.4.3 Estructura Ct4	51
4.5 Actividad antioxidante	52
4.5.1 Ensayo DPPH•	52
4.5.2 Ensayo ABTS•+	53
5. CONCLUSIONES	55
6. BIBLIOGRAFIA.....	56
7. ANEXOS	60

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a Dios quien nos dio vida y nos llenó de sabiduría e inteligencia para recorrer un trayecto profesional lleno de alegrías, grandes aprendizajes, triunfos y nos permitió conocer y compartir con personas inolvidables.

A nuestros padres quienes depositaron su confianza y nos brindaron su apoyo y acompañamiento incondicional para el inicio y culminación exitosa de nuestra carrera.

A nuestros abuelos que acompañaron este camino y guiaron nuestros pasos, compartiendo y apoyando celebraciones y fracasos y nos brindaron un sabio consejo a cada momento; dedicamos a ellos este trabajo, honrándolos, ya que sentimos su presencia a nuestro lado siempre.

AGRADECIMIENTOS

A los docentes Rubén Darío Torrenegra y Jeanet Rodríguez Mayusa quienes confiaron en nosotras y nos permitieron ser parte del grupo de investigación de PRONAUDCA, nos dirigieron durante el proceso investigativo de la tesis y nos apoyaron y alimentaron de su conocimiento para que este trabajo se llevara a cabo.

A el docente Oscar Rodríguez por su apoyo en la recolección del material vegetal y sus aportes a nuestro conocimiento a nivel fitoquímico.

Al docente John Edward Díaz por siempre tener una buena disposición y colaboración en temas relacionados con Resonancia Magnética Nuclear

A cada uno de los docentes que hicieron parte del ciclo académico quienes aportaron un grano de arena en nuestra formación a nivel profesional y personal.

RESUMEN

Las plantas contienen metabolitos primarios y secundarios que dan características importantes a cada una de las especies y les permiten su supervivencia; En estudios del género *Chromolaena* se han encontrado metabolitos activos como sesquiterpenos, triterpenos, flavonoides y ácidos grasos (Domínguez, 2002).

La *Chromolaena tacotana*, contiene diferentes metabolitos secundarios, dentro de los cuáles están los flavonoides, compuestos de interés en este estudio, ya que éstos se caracterizan por ser captadores de radicales libres (Brochet, 2009).

A las hojas de la *Chromolaena tacotana*, se les hizo una extracción en Soxhlet con diclorometano (CH_2Cl_2) posteriormente los compuestos fueron aislados por cromatografías en columna y eluidas con solventes de diferente polaridad (CHCl_3 ; $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, MeOH), para su identificación se hicieron cromatografías en capa fina y pruebas cualitativas como shinoda y cloruro férrico, se elucidaron estructuralmente por $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$ y UV, donde se encontraron los siguientes flavonoides: (Ct1) 3, 5, 4'-trihidroxi-7-metoxiflavona, (Ct2) 3,5,8-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona o 3,5,7-trihidroxi-8,4' dimetoxiflavona, (Ct3) 4',5-dihidroxi-7-metoxiflavanonol y (Ct4) 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona.

A cada flavonoide se le determinó la actividad antioxidante por los métodos DPPH• y ABTS•+, se utilizó como control positivo quercetina y trolox respectivamente y se obtuvo como resultados para el método de decoloración del radical ABTS•+, que el flavonoide con mayor actividad antioxidante fue el (Ct4) 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona con un IC_{50} de 2,13 mg/L en comparación con el control trolox que arrojó un IC_{50} de 3,05 mg/L, seguido por (Ct2) 3, 5, 8-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona o 3,5,7-trihidroxi-8,4' dimetoxiflavona, con 3,51 mg/L, el (Ct1) 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona con un valor de 6,26 mg/L y (Ct3) 4',5 dihidroxi-7 metoxi-flavanonol con un valor de IC_{50} de 33,94 mg/L con el ensayo DPPH• el que mayor inhibición del radical presentó fue el flavonoide (Ct4), seguido por (Ct2) y (Ct1) con valores de IC_{50} de 2,51, 4,85 y 6,46 mg/L respectivamente.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ejemplar seco *Chromolaena tacotana* (Klatt) R.M. King & H. Rob.
- Figura 2.** Estructura química general para flavonoides
- Figura 3.** Estructura del DPPH• antes y después de la reacción con un antioxidante
- Figura 4.** Estructura del ABTS•+ antes y después de la reacción con un antioxidante
- Figura 5.** Diagrama extracción, percolación, separación y purificación flavonoides
- Figura 6.** Cromatografía en capa fina de fraccionamiento CC1 en fase móvil éter-acetato de etilo 7:3 revelado con cloruro de cobalto.
- Figura 7.** Estructura molecular de la 3, 5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona
- Figura 8.** Estructura molecular de la 3, 5, 8-trihidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona o 3, 5, 7-trihidroxi-8, 4'-dimetoxiflavona
- Figura 9.** Estructura molecular de la 3, 5, 7-trihidroxi-8, 4'-dimetoxiflavona
- Figura 10.** Estructura molecular del 4',5- dihidroxi-7-metoxiflavanonol
- Figura 11.** Estructura molecular de la 5, 7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Flavonoides presentes en especies del género *Chromolaena*

Tabla 2. Señales con reactivos de desplazamiento espectro UV Ct1

Tabla 3. Señales con reactivos de desplazamiento espectro UV Ct2

Tabla 4. Señales con reactivos de desplazamiento espectro UV Ct3

Tabla 5. Señales con reactivos de desplazamiento espectro UV Ct4

Tabla 6. IC₅₀ para la actividad antioxidante del control y flavonoides por el método DPPH•

Tabla 7. IC₅₀ para la actividad antioxidante del control y flavonoides por el método ABTS•+

ANEXOS

Tabla 8. Ecuación de la recta e IC₅₀ para la actividad antioxidante del control y flavonoides por el método DPPH•

Tabla 9. Ecuación de la recta e IC₅₀ para la actividad antioxidante del control y flavonoides por el método ABTS•+

Tabla 10. Pruebas Post-Hoc: (HSD Tukey y Scheffé) método DPPH•

Tabla 11. Pruebas Post-Hoc: (HSD Tukey y Scheffé) método ABTS•+

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Espectro resonancia magnética nuclear ¹H RMN Ct1

Grafica 2. Espectro resonancia magnética nuclear ¹³C RMN Ct1

- Gráfica 3.** Espectros UV y desplazamientos Ct1
- Grafica 4.** Espectro resonancia magnética nuclear $^1\text{HRMN}$ Ct2
- Grafica 5.** Espectro resonancia magnética nuclear $^{13}\text{CRMN}$ Ct2
- Grafica 6.** Espectro resonancia magnética nuclear bidimensional HMBC Ct2
- Grafica 7.** Espectro resonancia magnética nuclear bidimensional NOESY Ct2
- Grafica 8.** Espectro resonancia magnética nuclear bidimensional HSQC Ct2
- Grafica 9.** Espectros UV y desplazamientos Ct2
- Grafica 10.** Espectro resonancia magnética nuclear $^1\text{HRMN}$ Ct3
- Grafica 11.** Espectro resonancia magnética nuclear $^{13}\text{CRMN}$ Ct3
- Grafica 12.** Espectros UV y desplazamientos Ct3
- Grafica 13.** Espectro resonancia magnética nuclear $^1\text{HRMN}$ Ct4
- Grafica 14.** Espectro resonancia magnética nuclear $^{13}\text{CRMN}$ Ct4
- Grafica 15.** Espectros UV y desplazamientos Ct4
- Grafica 16.** IC_{50} de flavonoides y control a través del ensayo con DPPH^\bullet
- Grafica 17.** IC_{50} de flavonoides y control a través del ensayo con $\text{ABTS}^{\bullet+}$
- Grafica 18.** Comparación entre IC_{50} de DPPH^\bullet y de $\text{ABTS}^{\bullet+}$

ANEXOS

- Grafica 19.** Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct1 por el método DPPH^\bullet
- Grafica 20.** Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct2 por el método DPPH^\bullet
- Grafica 21.** Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct3 por el método DPPH^\bullet
- Grafica 22.** Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct4 por el método DPPH^\bullet
- Grafica 23.** Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para quercetina
- Grafica 24.** Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct1 por el método $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Grafica 25. Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct2 por el método ABTS^{•+}

Grafica 26. Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct3 por el método ABTS^{•+}

Grafica 27. Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct4 por el método ABTS^{•+}

Grafica 28. Regresión lineal de porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para trolox

ABREVIATURAS

ABTS^{•+}: Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico

DPPH[•]: 1,1-difenil-2-picrilhidrazina

ETH: Extracto total hojas de *Ch tacotana* (diclorometano)

FSA: Fracción orgánica extracción liq-liq con diclorometano del tratamiento con etanol al 50% de ETH

CC1: Primera columna cromatográfica

CC2: Segunda columna cromatográfica

CC3: Tercera columna cromatográfica

Ct1: 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona

Ct2: 3,5,8-trihidroxi-7-4'dimetoxiflavona.

Ct2: 3,5,7-trihidroxi-8-4'dimetoxiflavona.

Ct3: 4',5 dihidroxi-7-metoxiflavanonol

Ct4: 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona.

IC₅₀: Cantidad de muestra que reduce la absorbancia de la solución del radical en un 50%.

AcONa: Acetato de sodio

AlCl₃: Tricloruro de aluminio

CHCl₃: Cloroformo

CH₂Cl₂: Diclorometano

H₃BO₃: Ácido bórico

HCl: Ácido clorhídrico

MeONa: Metóxido de sodio

MeOH: Metanol

EtOH: Etanol

INTRODUCCION.

Las plantas para su supervivencia contienen sustancias denominadas metabolitos primarios: carbohidratos, proteínas y grasas y metabolitos secundarios como cumarinas, aceites esenciales, flavonoides, alcaloides, terpenos, etc, que le dan propiedades específicas a cada una de las especies.

En estudios del género *Chromolaena* se han encontrado metabolitos activos como terpenos entre los cuales están los sesquiterpenos y triterpenos, flavonoides y ácidos grasos de tipo prostaglandina (Domínguez, 2002). También se han aislado alcaloides pirrolizídicos (Biller *et al.* 1.994), ácidos fenólicos y cumarinas. (Espitia, 1.992).

Los metabolitos secundarios de interés en la *Chromolaena tacotana*, son los flavonoides, ya que éstos se caracterizan por dar a la planta capacidad antioxidante, atrapando moléculas y radicales libres (Brochet, 2009) que se generan en el organismo humano muy fácilmente, por las actividades realizadas, los radicales libres son generados en reacciones bioquímicas que se desarrollan en nuestro cuerpo y que producen especies reactivas de oxígeno (Álvarez *et al.* 2.008). Estos radicales libres al no ser eliminados pueden causar enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, cáncer, diabetes, alzhéimer, párkinson, e inflamaciones causadas por el envejecimiento celular.

Es de gran importancia el estudio de nuevas especies que contengan metabolitos secundarios con actividad antioxidante, ya que Colombia atraviesa por una crisis de 79.660 personas afectadas por día a causa de enfermedades como el cáncer que están asociadas a la deficiencia de antioxidantes (World Health Organization, 2015), con estos estudios se pueden plantear soluciones como la implementación de productos o sustancias con alta capacidad antioxidante para la elaboración de medicamentos, suplementos vitamínicos y/o uso en las dietas diarias de las personas, así disminuir los radicales libres presentes en el cuerpo que son bioquímicamente la causa de las enfermedades antes mencionadas. De acuerdo a lo anterior se plantea la siguiente pregunta problema: ¿Qué flavonoides se encuentran presentes en los extractos de las hojas de *Chromolaena tacotana* y cuál es su capacidad antioxidante?

1. OBJETIVOS.

1.1. Objetivo General.

Evaluar la actividad antioxidante de flavonoides presentes en las hojas de *Chromolaena tacotana* (Klatt) R.M. King & H. Rob.

1.2. Objetivos Específicos.

1.2.1. Obtener el extracto de las hojas de *C tacotana* con diclorometano

1.2.2. Aislar, purificar e identificar los flavonoides presentes en los extractos de las hojas de *C tacotana*.

1.2.3. Determinar la actividad antioxidante de los flavonoides identificados en los extractos de las hojas de *C tacotana* por los métodos DPPH• y ABTS•+

2. MARCO TEORICO.

2.1. Aspectos botánicos.

2.1.1. Clasificación taxonómica.

REINO: *Plantae*

FILUM: *Magnoliophyta*

CLASE: *Magnoliopsida*

ORDEN: *Asterales*

FAMILIA: *Asteraceae*

TRIBU: *Eupatorieae*

SUBTRIBU: *Praxelinae*

GENERO: *Chromolaena*

ESPECIE: *Chromolaena tacotana* (Klatt) R.M. King & H. Rob.

2.1.2. Descripción y consideraciones botánicas.

La *Chromolaena tacotana* (Figura 1) es un arbusto que puede alcanzar los 2.5 m de altura. Se puede localizar entre los 900-2.350 msnm en la región Andina en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Santander, Tolima, Valle del Cauca, en la región Caribe en los departamentos de Bolívar, César, la Guajira y en la región Pacífica en Nariño y Cauca.

Los nombres comunes alrededor de Colombia donde se encuentra localizada la *Chromolaena tacotana* son “almoraduz”, “chicharrón”, “chicharrón morado”, “chilquilla”, “chucha”, “kite sey”, “mastranto”, “salvia negra”, “salvia morada”, “sanalotodo” y “restrentina”.

Se caracteriza por tener ramas algunas veces con corteza vino tinto en vivo o en seco, hojas pecioladas, envés piloso largo y denso o lanoso, venas principales asimétricas y a veces con tonalidad violeta o vino tinto, venas secundarias reticuladas o ascendentes, venación impresa por la haz y prominente por el envés, tiene abundantes glándulas refringentes en ramas y hojas, sin florescencias con capítulos generalmente sésiles. (Rodríguez *et al.* 2.014)



Figura 1. Ejemplar seco *Chromolaena tacotana* (Klatt) R.M. King & H. Rob.

2.2. Características de los flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios provenientes de los vegetales, derivan de la ruta del ácido shikímico y policétidos, se encuentran principalmente en hojas, flores y frutos.

Su estructura básica es de 15 átomos de carbono tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos denominados A y B unidos por una cadena C₃ ciclada por un oxígeno denominada anillo C (Figura 2) (Carrión *et al.* 2.010)

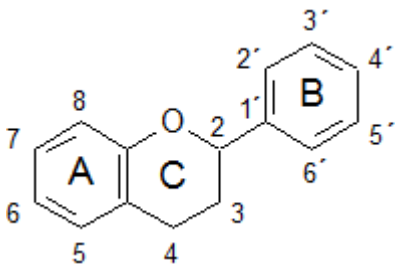


Figura 2. Estructura química general para flavonoides

Los flavonoides son benéficos para el organismo humano porque lo protegen de agentes oxidantes como rayos ultravioleta, sustancias químicas en alimentos, contaminantes ambientales, que son negativos para la salud, el metabolismo humano no está en capacidad de producir dichas sustancias.

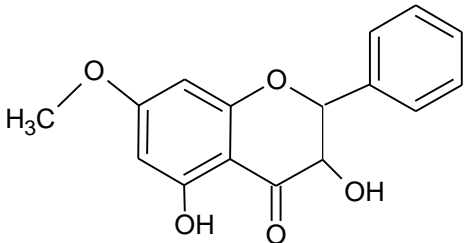
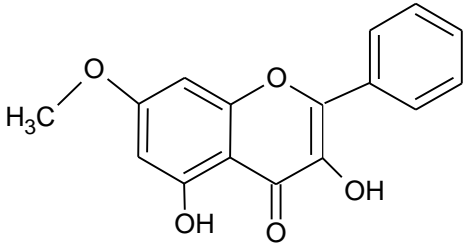
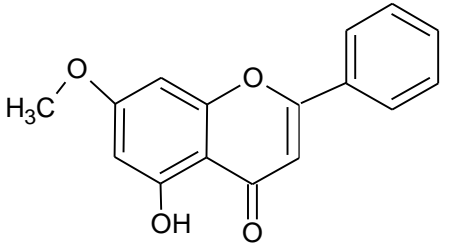
La actividad antioxidante en los flavonoides está dada por su estructura química, ya que contiene grupos hidroxilo fenólicos que les confiere excelentes propiedades quelantes con el hierro y diferentes metales de transición (Bohm, 1.998) también

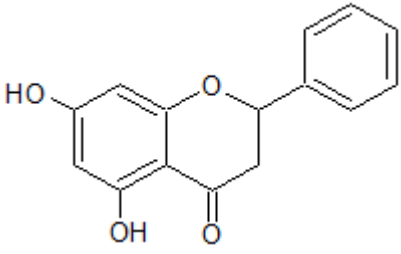
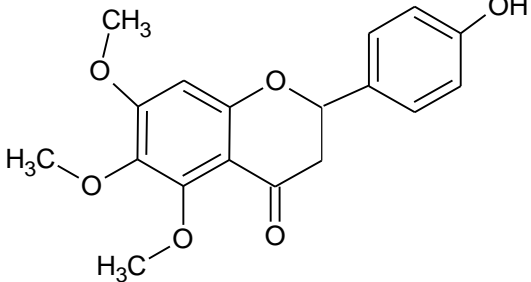
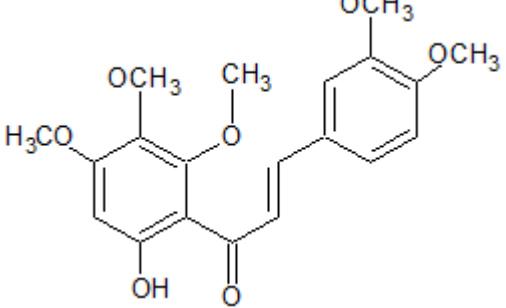
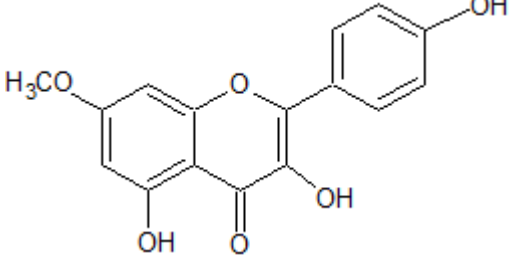
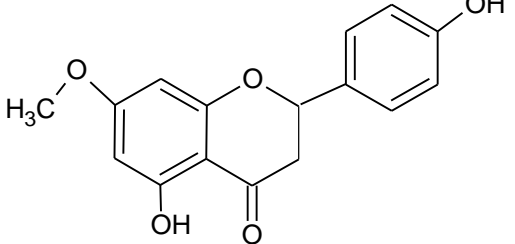
presenta características de inhibición de oxidasas (Groot *et al.* 1.998) y enzimas (Lindahl *et al.* 1.997) evitando producción de especies reactivas de oxígeno.

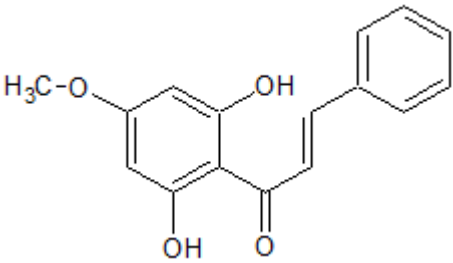
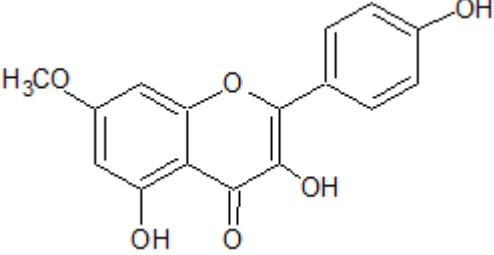
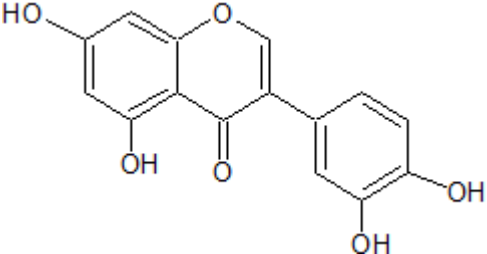
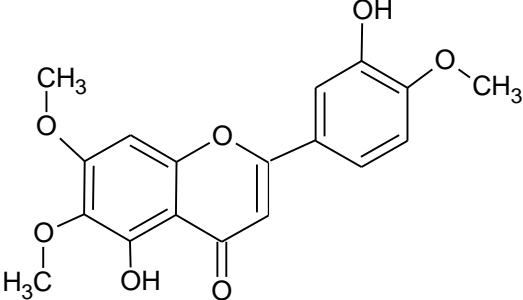
2.3. Estudios Químicos del género *Chromolaena*

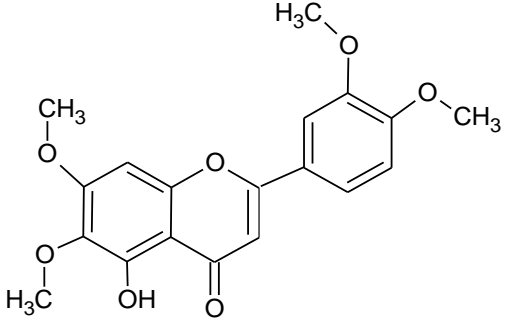
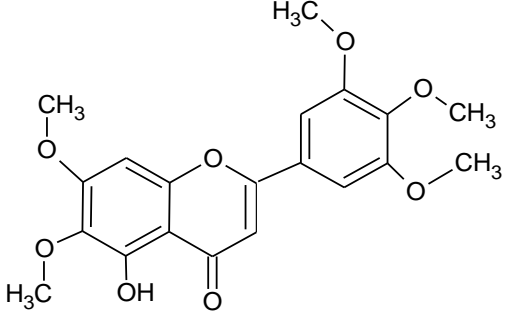
En los estudios del genero *Chromolaena* se han encontrado metabolitos activos como terpenos entre los cuales están los sesquiterpenos y triterpenos, flavonoides (Tabla 1), ácidos grasos de tipo prostaglandina como el ácido-8-[3-Oxo-2-(pent-2-en-1-il) ciclopent-1- enil]-octanoico. (Domínguez, 2002), alcaloides pirrolizídicos (Biller *et al.* 1.994), ácidos fenólicos y cumarinas. (Espitia, 1.992).

Tabla 1. Flavonoides presentes en especies del género *Chromolaena*

ESPECIE	FLAVONOIDE	ESTRUCTURA
<i>Chromolaena leivensis</i> y <i>Chromolaena tacotana</i>	3,5-dihidroxi-7-metoxiflavanona (Alpinona) (Rodríguez <i>et al.</i> 2.005)	
<i>Chromolaena leivensis</i> y <i>Chromolaena tacotana</i>	3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona (Izalpinina) (Rodríguez <i>et al.</i> 2.005)	
<i>Chromolaena tacotana</i>	5-hidroxi-7-metoxiflavona (Tectocrisina) (Rodríguez, 2.008)	

<p><i>Chromolaena tacotana.</i> <i>Chromolaena pseudoinsignis.</i> y <i>Chromolaena chasleae.</i></p>	<p>5,7-dihidroxi flavanona (Pinocembrina). (Rodríguez, 2008) (Bohlmann <i>et al.</i> 1.982).</p>	
<p><i>Chromolaena Odorata</i></p>	<p>4'-hidroxi-5,6,7-trimetoxi flavanona. (Barua <i>et al.</i> 1.978)</p>	
<p><i>Chromolaena Odorata</i></p>	<p>2'-hidroxi-3,4,4',5',6'-pentametoxichalcona (Barua <i>et al.</i> 1.978)</p>	
<p><i>Chromolaena subscandens</i></p>	<p>rhamnocitrina (5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavonol) (Guzmán <i>et al.</i> 2.008)</p>	
<p><i>Chromolaena subscandens</i></p>	<p>sakuranetina (5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavanona) (Guzmán <i>et al.</i> 2.008)</p>	

<p><i>Chromolaena perglabra</i></p>	<p>2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (Rodríguez, 2.008)</p>	
<p><i>Chromolaena perglabra</i></p>	<p>3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona (Rodríguez, 2.008)</p>	
<p><i>Chromolaena perglabra</i></p>	<p>5,7,3',4'-tetrahidroxiisoflavona (Rodríguez, 2.008)</p>	
<p><i>Chromolaena arnottiana</i></p>	<p>5,3'-dihidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona (Gutiérrez, 1.995)</p>	

<p><i>Chromolaena arnottiana</i></p>	<p>5-hidroxi-6,7,3',4'- tetrametoxiflavona (Gutiérrez, 1.995)</p>	
<p><i>Chromolaena arnottiana</i></p>	<p>5-hidroxi-6,7,3',4',5'- pentametoxiflavona (Gutiérrez, 1.995)</p>	

2.4. Actividad antioxidante

Hay compuestos que presentan capacidad para inhibir, retardar o interrumpir reacciones de oxidación llamados agentes antioxidantes, estos actúan deteniendo procesos que se generan por radicales libres que son los responsables de daños físicos en los tejidos, el consumo de estos agentes previene frente a enfermedades cardiovasculares, degenerativas, de envejecimiento prematuro, arterioesclerosis, etc. (Melnik *et al* 2.011)

2.4.1. Ensayo de captación de radicales con DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazina):

Ensayo de captación de radicales (Brand *et al.* 1.995) método usado frecuentemente en pruebas con plantas; el DPPH• es un radical estable que reacciona con compuestos donadores de hidrogeno y así en presencia de una sustancia antioxidante cambia su color de morado a amarillo. (Figura 3), mostrando actividad antioxidante por la disminución en la absorción medida a una longitud de onda de 517nm (Blois, 1.958)

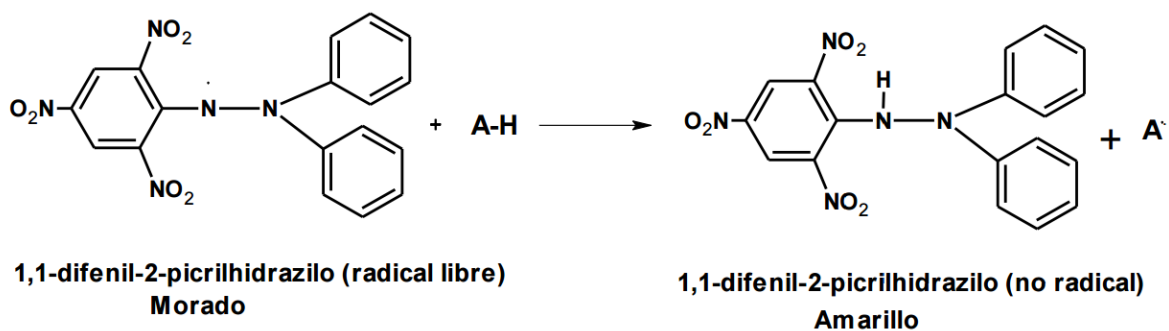


Figura 3. Estructura del DPPH• antes y después de la reacción con un antioxidante (Alam, 2.012)

2.4.2. Ensayo de captación de radicales con ABTS^{•+} (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico)

La medición de la actividad antioxidante por medio del ensayo ABTS^{•+} permite medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos, este ensayo es basado en la transferencia de electrones, generando una reacción redox con el oxidante.

Mediante la reacción del ABTS y el persulfato de potasio se obtiene el cromóforo ABTS^{•+} verde-azul, el cuál presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda 645nm, 734nm y 815nm. La reducción a ABTS²⁻ se produce al adicionar antioxidantes al radical pre-formado (Figura 4). Dependiendo de la concentración, tiempo y el valor correspondiente al estándar se puede determinar el grado de decoloración y el porcentaje de inhibición del radical catión ABTS^{•+} (Tovar, 2.013)

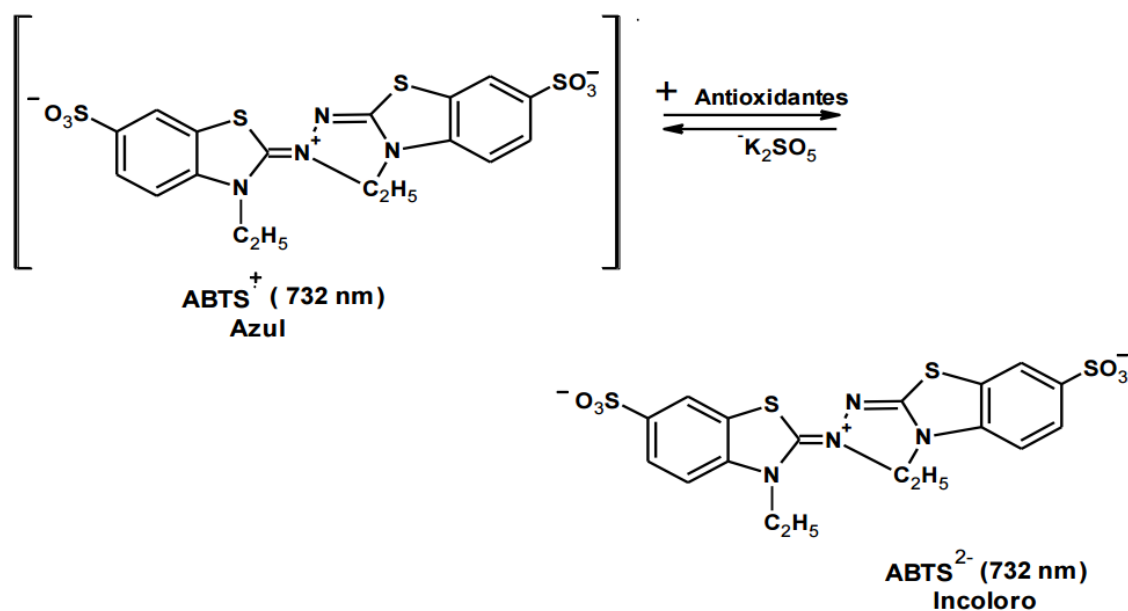


Figura 4. Estructura del ABTS^{•+} antes y después de la reacción con un antioxidante (Zuleta *et al.* 2.009).

2.5. Estudios de actividad antioxidante en el género *Chromolaena*

- Afolabi en el año 2007 realizó la actividad antioxidante al extracto metanólico de las hojas de *Chromolaena Odorata*; obtuvo como resultado un valor de $28.85 \pm 0.99\%$, alrededor de un tercio de porcentaje de actividad antioxidante con respecto al ácido ascórbico y gálico a través de la técnica de captación de radicales DPPH[•].
- Santamaría *et al*, en el año 2.011 evaluaron la actividad antioxidante de fracciones de metanol, diclorometano y éter de petróleo de flores y extracto total etanólico y fracciones de metanol y diclorometano de hojas de *Chromolaena bullata*; La fracción metanólica de flores fue la que mostró mayor actividad con un IC₅₀ de 2,37mg/L seguida del extracto total de hojas con un IC₅₀ de 3,3mg/L a través del método de decoloración de DPPH[•]; Con el ensayo de ABTS^{•+} la fracción de diclorometano de hojas mostró una menor actividad con un IC₅₀ de 0,09 mg/L a diferencia de la fracción metanólica de hojas que presentó un IC₅₀ de 0,02mg/L.
- Varón *et al*, en el año 2.011 realizaron en su estudio la medición de la actividad antioxidante a extractos y fracciones de hojas y flores de *Chromolaena leivensis* a través de la decoloración de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}. Con los extractos se obtuvieron resultados de porcentaje de inhibición de captación de radicales entre un $21,44 \pm 0,94$ y $88,95$ mediante el método DPPH[•] y con el método ABTS^{•+} se obtuvo un resultado en el rango de $37,64 \pm 1,89$ y $95,44 \pm 0,20$; El método ABTS^{•+} mostró alta actividad antioxidante en todos los extractos y fracciones.
- Irineu *et al*, en el año 2.015 analizaron la actividad antioxidante del extracto crudo, y de las fracciones de hexano, butanol, diclorometano, acetato de

etilo y hidrometanol de las hojas de *Chromolaena laevigata*, las fracciones con mejores resultados de actividad antioxidante son de las fracciones de acetato de etilo y butanol con valores correspondientes a $32,25 \pm 1,05$ y $57,44 \pm 2,58$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; el extracto crudo y las demás fracciones se supone que no tienen actividad ya que tienen un IC_{50} mayor a $100\mu\text{g/mL}$ en comparación con el IC_{50} de $16,9\mu\text{g/mL}$ del butilhidroxitolueno que es utilizado como antioxidante patrón.

3. METODOLOGIA

3.1. Recolección y preparación del material vegetal:

El material vegetal fue recolectado en el municipio de Villa de Leyva ubicado a una altura de 2.149 msnm (vereda Sabana, vía Arcabuco), departamento Boyacá; una muestra se llevó al herbario de la Universidad Nacional y fue registrada con el número COL507237, el resto del material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente, para su molienda y extracción.

3.2. Extracción, Fraccionamiento y purificación de flavonoides

Se sometieron 415,5 g de hojas molidas de *C tacotana* a una extracción por Soxhlet con diclorometano, el extracto total obtenido (ETH) fue concentrado en un rotaevaporador hasta eliminación total del solvente. Este extracto, se sometió a cinco extracciones sucesivas con 100 mL de etanol-agua al 50%, la fase polar fue concentrada en rotaevaporador y luego sometida a una extracción líquido-líquido con diclorometano; obteniéndose dos fases, una acuosa y otra con diclorometano que fue concentrada hasta la formación de un sólido amarillo (FSA), que pesó 19.023 g. Este sólido fue llevado a separación por columna cromatográfica (diámetro Silicagel, 0.063-0.2m.m) eluyendo con éter-acetato de etilo 7:3, 6:4, y 4:6 obteniendo 64 fracciones, que se reunieron según las características similares que presentaron las manchas reveladas en la cromatografía en capa fina. (Figura 6); de la fracción 10 a la 31 se unieron y se les adicionó cloroformo; a la fase insoluble se le realizó un proceso de recristalización con acetona y se obtuvo un compuesto sólido de color amarillo que se denominó Ct1.

Las fracciones 32 a la 47 se unieron para montar una segunda columna cromatográfica, se eluyó con cloroformo-metanol 9.8:0.2 y 9.5:0.5, se obtuvieron 15 fracciones de las cuales se unieron de la 7-10, se adicionó cloroformo y se le llevó a cabo un proceso de recristalización con petrol obteniendo el compuesto sólido de color blanco Ct3.

De las fracciones 48-64 se unieron y se les agregó cloroformo; la fase soluble se introdujo en una tercera columna cromatográfica, eluida con cloroformo puro y cloroformo-metanol 9.8:0.2, de esta columna se obtuvieron 24 fracciones, se unió

de la 19 a la 24 para un proceso de recrystalización con metanol-acetona de donde se obtuvo un compuesto sólido amarillo Ct2.

A la fase insoluble de las fracciones 48 a la 64 se le hizo un proceso de recrystalización con acetona y se obtuvo el compuesto Ct4. (Figura 5)

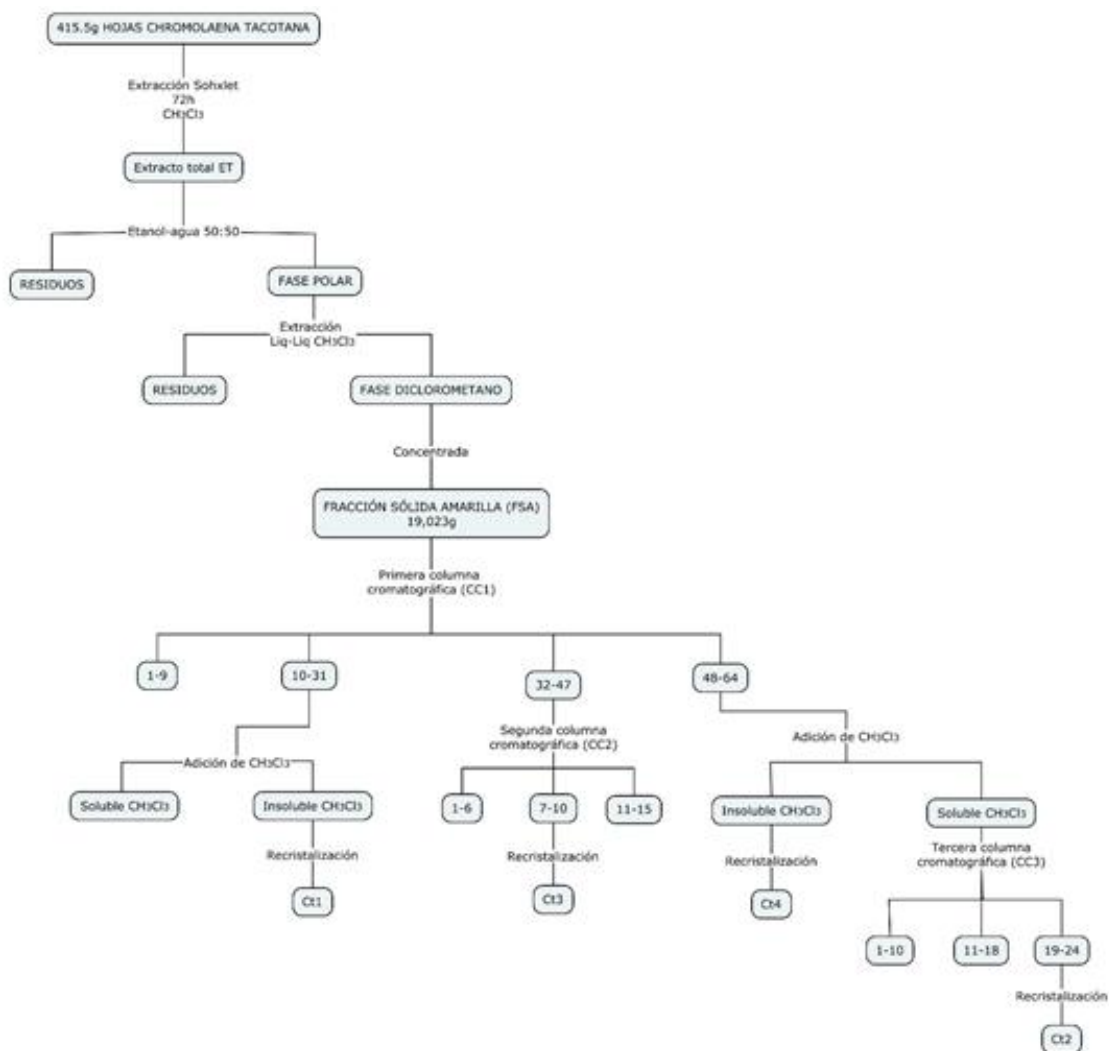


Figura 5. Diagrama extracción, percolación, separación y purificación flavonoides de las hojas de *Chromolaena tacotana*,

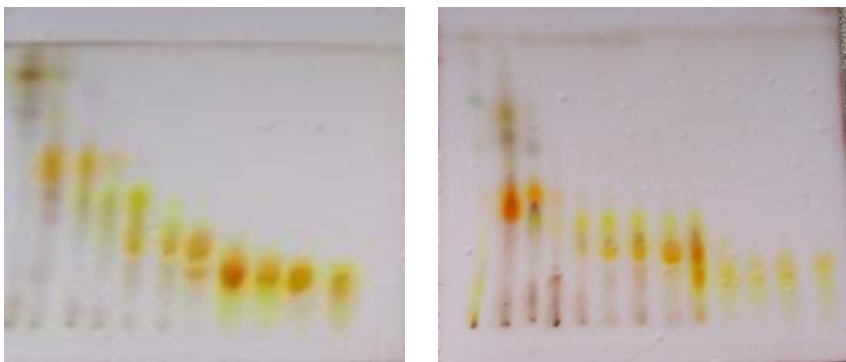


Figura 6: Cromatografía en capa fina (Silica gel 0.20m.m) de fraccionamiento CC1 en fase móvil éter-acetato de etilo 7:3 revelado con cloruro de cobalto -H₂SO₄ 2N

3.3. Ensayos cualitativos para identificación de flavonoides.

A cada uno de los compuestos (Ct1, Ct2, Ct3 y Ct4) se les realizó la prueba de shinoda que consistió en adicionar a una solución en MeOH de cada uno un pequeño pedazo de cinta de magnesio y gotas de HCl al 10% y se produjo una coloración rojiza; para el ensayo de cloruro férrico a cada solución del compuesto se le adicionó gotas de cloruro férrico y se observó una coloración azul verdosa, característico de flavonoides.

3.4. Actividad Antioxidante

Se utilizaron dos métodos para determinar la actividad antioxidante de los flavonoides, DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y ABTS•+ (Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico).

Para el método con DPPH•, se preparó 100mL de solución stock en metanol de DPPH• a 30 mg/L y como control positivo se utilizó una solución stock de quercetina a 500 mg/L que fue diluida a 25, 12.5 y 6.25 mg/L; Se realizaron mediciones de absorbancia en un (espectrofotómetro thermo scientific modelo 4001/4) a 517nm tomando 0,2mL de la disolución y 1mL de DPPH•.

Para el método con ABTS•+, se preparó 100mL de una solución de ABTS•+ persulfato 50:50 en metanol y como control positivo se preparó una solución stock de Trolox a 1000 mg/L, se realizaron disoluciones de 25, 12.5 y 6.25 mg/L, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro thermo scientific modelo 4001/4 a 734 nm tomando 0,2 ml de la disolución y 1ml de ABTS•+.

Para determinar la actividad antioxidante de los flavonoides se prepararon 10 mL de soluciones stock de cada uno de los flavonoides a 500 mg/L en metanol, a partir de éstas, se realizaron disoluciones a 100, 50 y 25 mg/L para los flavonoides Ct1 y Ct2. Para Ct3 se realizaron disoluciones a 500, 250 y 100 mg/L y finalmente a Ct4 se realizaron disoluciones a 25, 12.5 y 6.25 mg/L.

Para la valoración de la actividad antioxidante se realizaron mediciones de absorbancia tomando 0,2 mL de la disolución de cada flavonoide y 1ml de DPPH•, se midió a 517nm.

Para el ensayo ABTS•+ se tomaron 0,2 mL de la disolución de cada flavonoide y 1ml de ABTS•+, se midió a 734nm.

Se determinó la actividad antioxidante mediante la fórmula:

$\%Aa = (A_0 - A_m) / A_0 * 100$ donde,

A₀: Absorbancia de control negativo

A_m: Absorbancia de la muestra

En base a ésta fórmula y a la regresión lineal con ajuste al coeficiente de correlación r², se utilizó el inverso del IC₅₀ (1/ IC₅₀) y se evaluó el porcentaje de actividad antioxidante. (Avella *et al* 2008)

3.5. Análisis estadístico de IC₅₀

Para el análisis de los datos se desarrolló la prueba Post-Hoc: (HSD Tukey y Scheffé).

4. RESULTADOS Y ANALISIS

La elucidación de las estructuras de cada uno de los flavonoides se realizó mediante las técnicas espectroscópicas UV, ¹HRMN y ¹³CRMN.

Los espectros UV se realizaron con adición de los reactivos (AlCl₃, MeONa, AlCl₃/HCl H₃BO₃ y AcONa) a las diferentes soluciones de los flavonoide Ct1, Ct2, Ct3 y Ct4 disueltos en metanol, las lecturas de absorbancia se hicieron en un rango entre 230 y 500 nm en el espectrofotómetro Jenway 6504.

Los espectros $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ se tomaron disolviendo cada uno de los flavonoides en solventes de acuerdo a su polaridad; Ct1, Ct2 y Ct3 fueron disueltos en acetona y Ct4 en dimetilsulfóxido, se utilizó el equipo de Resonancia Magnética Nuclear marca Bruker de 300MHz .

4.1 Flavonoide Ct1

4.1.1 Características físicas

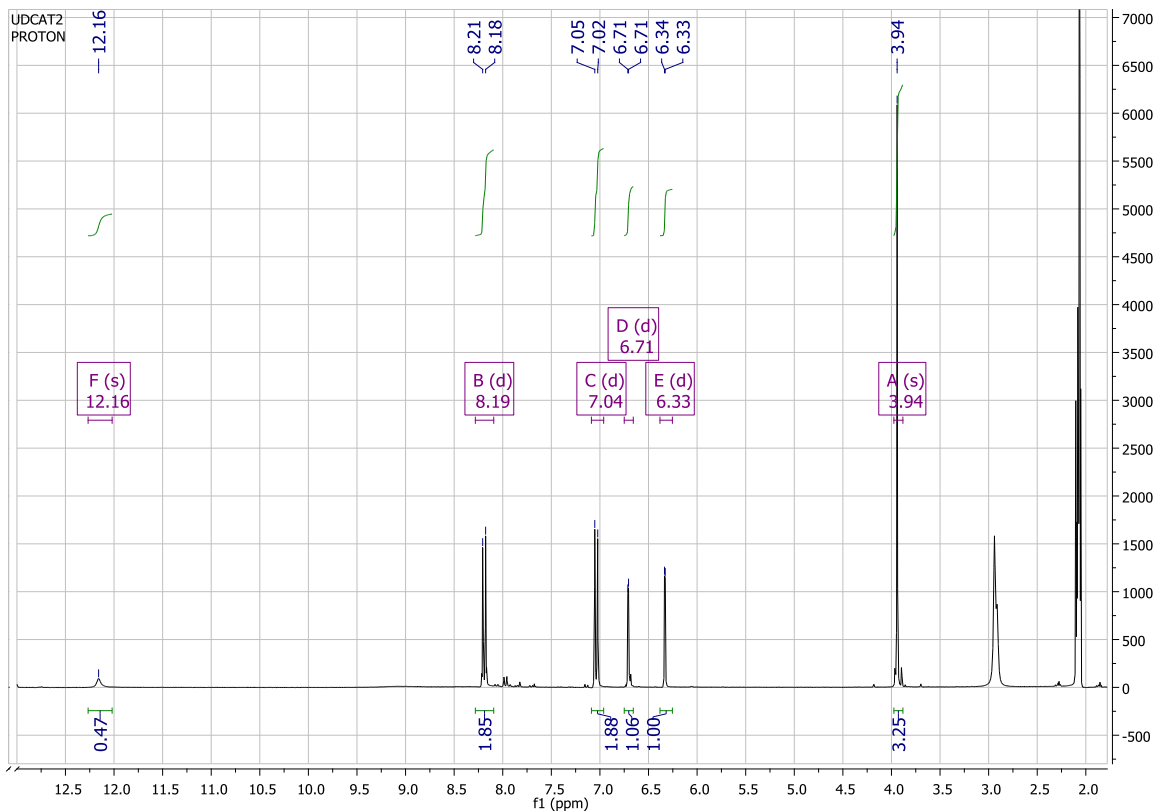
- ✓ **Color:** Amarillo
- ✓ **Punto de fusión:** 214-216 °C
- ✓ **Soluble en:** Acetona

4.1.2 Elucidación estructural

Para la deducción de la estructura molecular del flavonoide Ct1 se tomaron espectros UV, $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$.

En el espectro $^1\text{HRMN}$ se observan 6 señales que integran para 10 hidrógenos, de los cuales 3 se encuentran en un singlete en 3.94ppm probablemente debido a la presencia de un metoxilo, cada una de las señales en 7.04ppm y 8.19ppm integran para 2 hidrógenos con una constante de acoplamiento $^3J_{\text{HH}}$ de 9.1 Hz común para un sistema orto en un anillo aromático, se presenta con multiplicidad de dobletes es posible que sea una disustitución de tipo para en el anillo B, las señales en 6.71ppm y 6.33ppm integra para 1 hidrogeno cada una con una constante de acoplamiento $^4J_{\text{HH}}$ de 2.2 Hz común para un sistema meta en un anillo aromático, además como se presentan como dobletes es posible que sea una tetrasustitución en el anillo A, el singlete de la señal en 12.16ppm integra para 1 hidrogeno que puede deberse a la presencia de un hidróxilo.

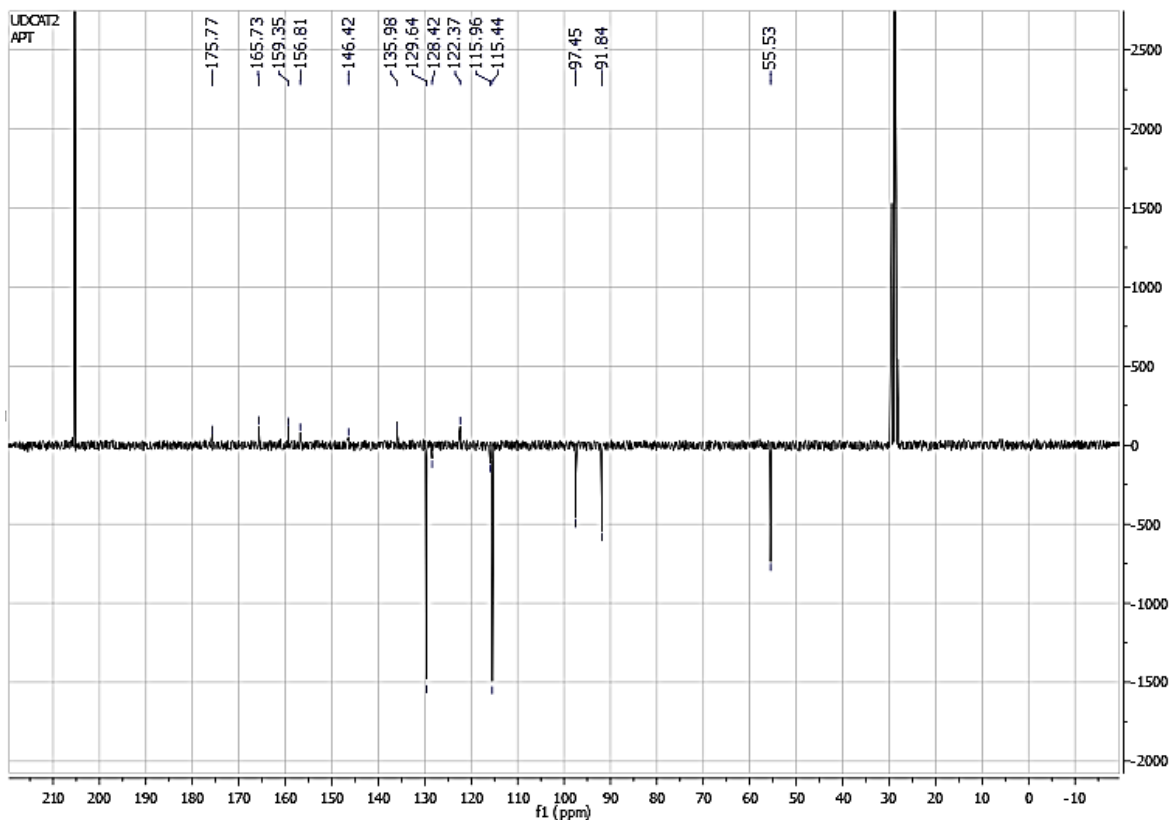
A continuación se muestra el espectro $^1\text{HRMN}$ (300MHz $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)



Gráfica 1. Espectro resonancia magnética nuclear ^1H RMN del compuesto Ct1

El espectro ^{13}C RMN se observan 14 señales de las cuales una se encuentra en zona de metoxilos a 55.53ppm, la señal en 175.77ppm se debe al carbonilo del flavonoide además las señales en 115.44ppm y 129.64ppm que se encuentran con una mayor intensidad pertenecen cada una a dos carbonos en el anillo B, las señal en 159.35ppm se debe a un carbón hidroxilado en la posición 4' del anillo B, en el carbono 7 del anillo A se confirma un metoxilo por la señal a 165.73ppm, la señal a 135.98ppm confirma otro carbón hidroxilado en la posición 3 del anillo C las señales entre 91.84ppm y 156.81ppm corresponden a los carbonos aromáticos característicos de flavonoides.

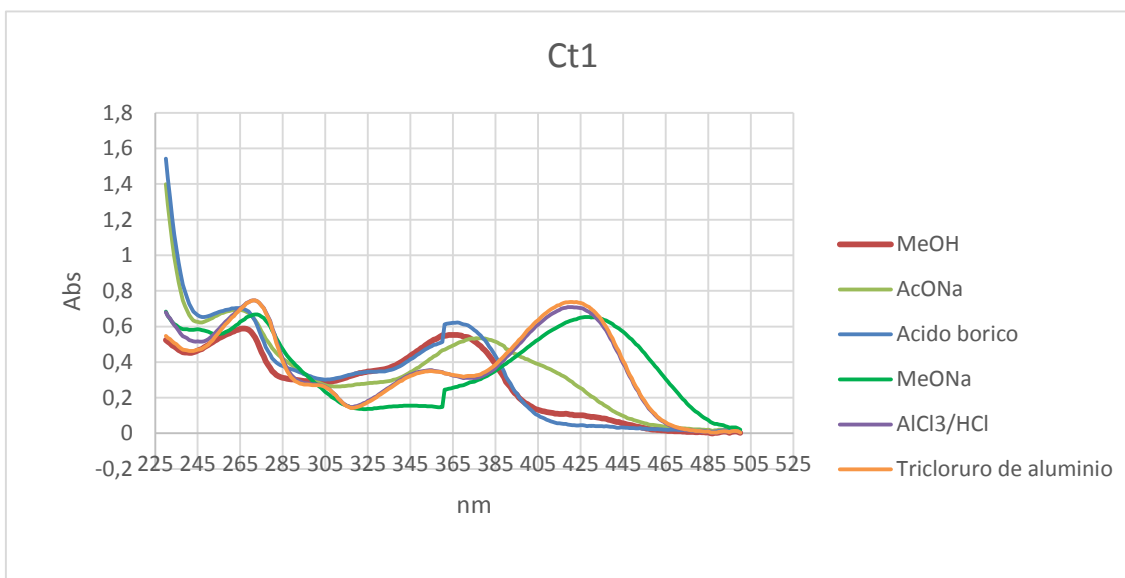
A continuación se muestra el espectro ^{13}C RMN (75MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)



Grafica 2. Espectro resonancia magnética nuclear ^{13}C RMN del compuesto Ct1

4.1.2.3 UV Y DESPLAZAMIENTOS

Gráfica 3. Espectros UV y desplazamientos del compuesto Ct1



En la (Tabla 2) se observan los datos obtenidos en los espectros U.V con y sin reactivos de desplazamiento y se muestran los valores de absorbancia y de λ_{max} para cada banda del espectro.

Tabla 2. Señales con reactivos de desplazamiento espectro UV Ct1 (autores).

REACTIVO DE DESPLAZAMIENTO	λ_{max} nm y absorbancia banda II	λ_{max} nm y absorbancia banda I	DESPLAZAMIENTO	ASIGNACIÓN
MeOH	266; 0.589	360; 0.551		
AcONa	263; 0.694	376; 0.534	Batocrómico banda I 16nm.	Ausencia de OH en 7.
H ₃ BO ₃	263; 0.703	361; 0.622	No presenta	No es Flavonoide orto- hroxilado en el anillo A ni en B.
MeONa	272; 0.668	427; 0.653	Batocrómico en banda I de 67nm	OH en posición 3 de flavona Flavona 4' hidroxilada.
AlCl ₃	271; 0.747	420; 0.737	Batocrómico 60nm	Flavona con OH en C3 y C5.
AlCl ₃ /HCl	271; 0.747	420; 0.708	Batocrómico 60nm	Flavona con OH en C3 y C5.

Se registraron máximos de absorbancia en la banda II de 266nm y en la banda I de 360nm con un efecto batocrómico al adicionar MeONa en la banda I de 67nm, lo que indica la presencia de grupos OH en la posición 3 y en el anillo B en 4'. Se observa un efecto batocrómico al adicionar AlCl₃ de 60nm, el mismo desplazamiento ocurre con la adición de HCl lo que evidencia la presencia de grupos hidroxilo libres en C3. No se presentaron desplazamientos con la adición de AcONa ni con H₃BO₃

lo que indica ausencia de grupos hidroxilos libres en C7 y de grupos orto-hidroxilo en el anillo A y en B.

4.1.3 Estructura Ct1

El análisis de los espectros $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, los reactivos de desplazamiento en UV y la comparación de estos datos con investigaciones previas (Rodríguez, 2008) (Guzmán, *et al* 2008) nos permiten proponer como estructura para Ct1: 3, 5, 4'-trihidroxi-7-metoxiflavona estructura que también se puede denominar 5,4'-dihidroxi-7-methoxiflavonol (figura 7)

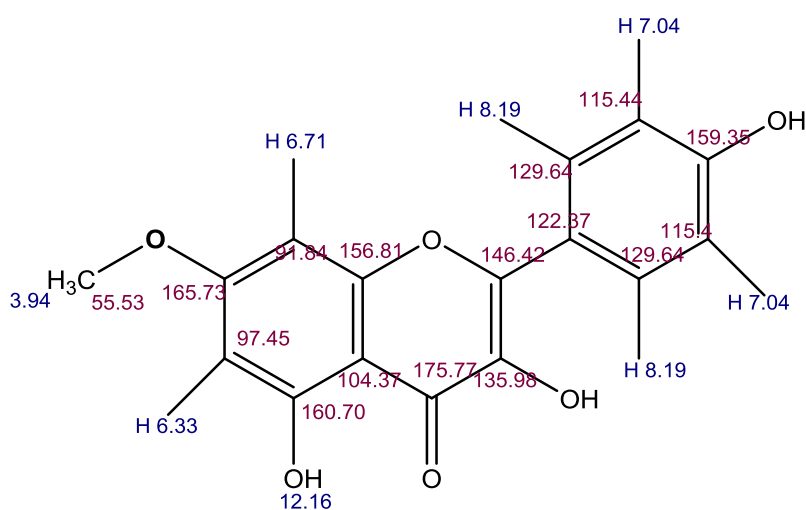


Figura 7. Estructura molecular de 3, 5, 4'-trihidroxi-7-metoxiflavona

4.2 Flavonoide Ct2

4.2.1 Características físicas

- ✓ **Color:** Amarillo
- ✓ **Punto de fusión:** 270 °C
- ✓ **Soluble en:** Acetona

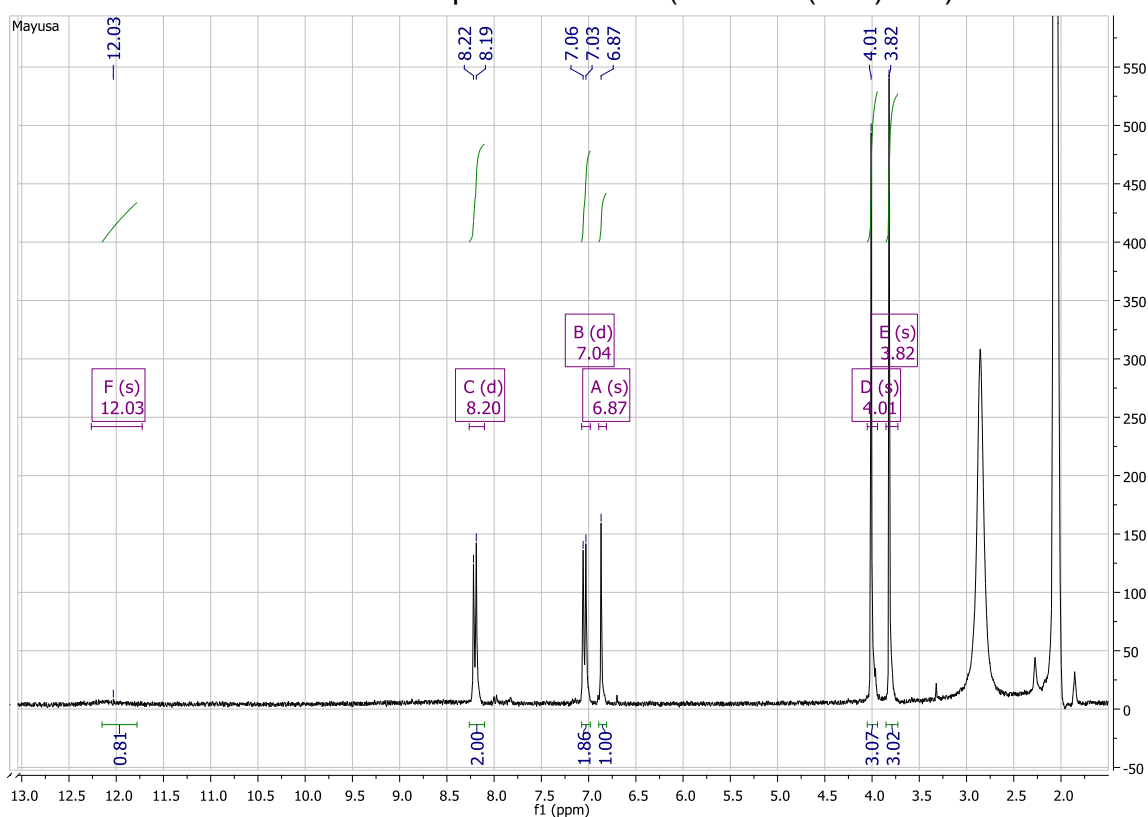
4.2.2 Elucidación estructural

Para la deducción de la estructura molecular del flavonoide Ct2 se tomaron espectros UV, $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$.

En el espectro $^1\text{HRMN}$ se observan 6 señales que integran para 12 hidrógenos, de los cuales 6 se encuentran en dos singletes; uno en 3.82ppm y otro en 4.01ppm

cada uno integra para 3 hidrógenos probablemente debidos a la presencia de metóxilos, las señales en 7.04 y 8.20ppm integra para 2 hidrógenos cada una con una constante de acoplamiento $^3J_{HH}$ de 8.9 Hz común para un sistema orto en un anillo aromático, se presenta con multiplicidad de dobletes es posible que sea una disustitución de tipo para en el anillo B, la señal en 6.87ppm es un singlete que integra para un hidrogeno aromático correspondiente al anillo A, y el singlete de la señal en 12.03ppm integra para 1 hidrogeno probablemente por la presencia de un hidróxilo en el anillo A.

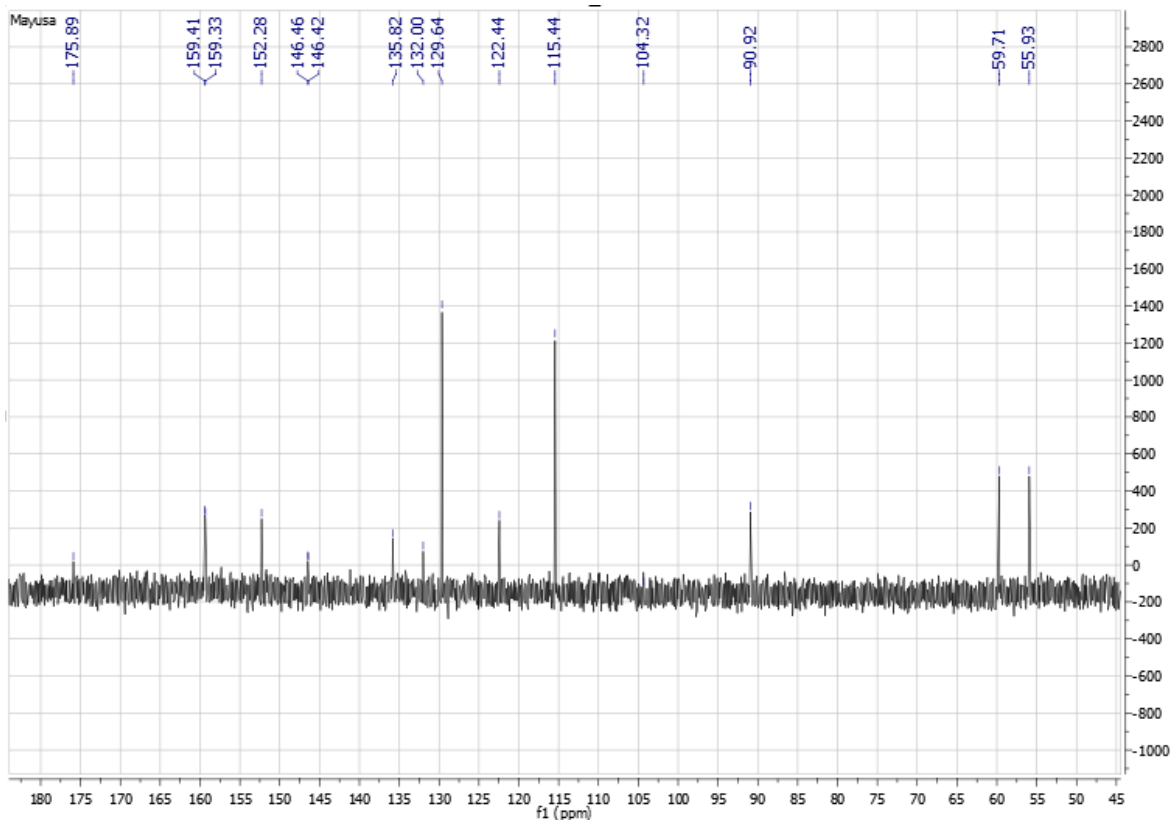
A continuación se muestra el espectro $^1\text{HRMN}$ (300MHz $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)



Grafica 4. Espectro resonancia magnética nuclear $^1\text{HRMN}$ del compuesto Ct2

El espectro $^{13}\text{CRMN}$ presenta 15 señales de las cuales dos se encuentran en zona de metóxilos a 55.93ppm y 59.71ppm, la señal en 175.89ppm se debe al carbonilo del flavonoide además las señales en 115.44ppm y 129.64ppm que se encuentran con una mayor intensidad pertenecen cada una a dos carbonos en el anillo B y las señales entre 90.92ppm y 159.41ppm corresponden a los carbonos aromáticos característicos de flavonoides.

A continuación se muestra el espectro $^{13}\text{CRMN}$ (75MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

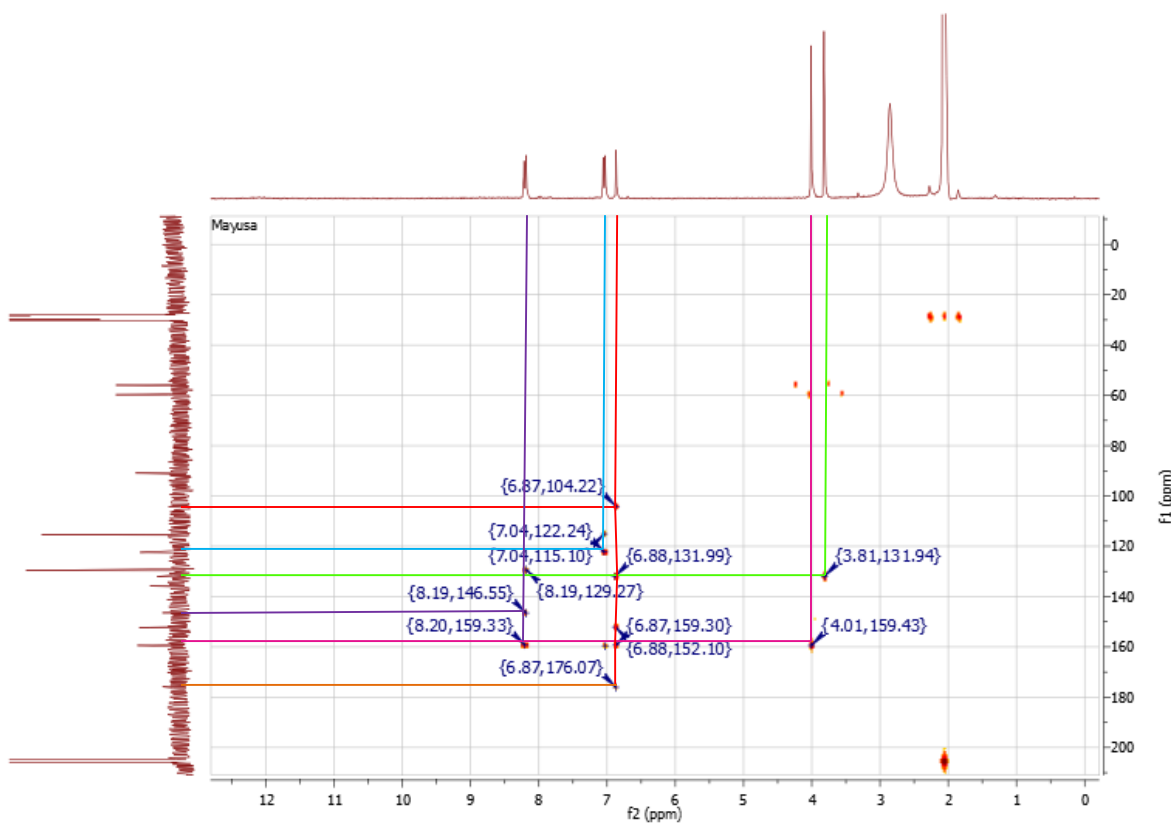


Grafica 5. Espectro resonancia magnética nuclear ^{13}C RMN del compuesto Ct2

Para la asignación completa de la estructura se utilizaron los espectros bidimensionales HSQC, HMBC y NOESY

El espectro HMBC presenta correlaciones a $^3\text{J}_{\text{HC}}$ entre los hidrógenos de 3.82ppm y el carbono de 132.00ppm, y $^3\text{J}_{\text{HC}}$ de los hidrógenos de 4.01ppm con el carbono 159.41ppm el carbono de 159.41ppm también se encuentra correlacionado con los hidrógenos de 7.04 y 8.02ppm, además se observa la correlación de los hidrógenos en los carbonos 6' y 2' con el carbono alfa al oxígeno que tiene una señal de 146.46 ppm, los hidrógenos 7.04ppm muestran correlación con el carbono 1' de señal 122.6ppm, dándonos a conocer los desplazamientos completos del anillo B y el carbono 2, por último el hidrogeno que se encuentra en 6.87ppm presenta correlaciones $^2\text{J}_{\text{HC}}$ y $^3\text{J}_{\text{HC}}$ con los carbonos de 104.22, 132.00, 152.28 y 159.33 ppm y a $^4\text{J}_{\text{HC}}$ 175.89ppm por lo tanto la señal de 146.42ppm es del carbono cuaternario en el C9.

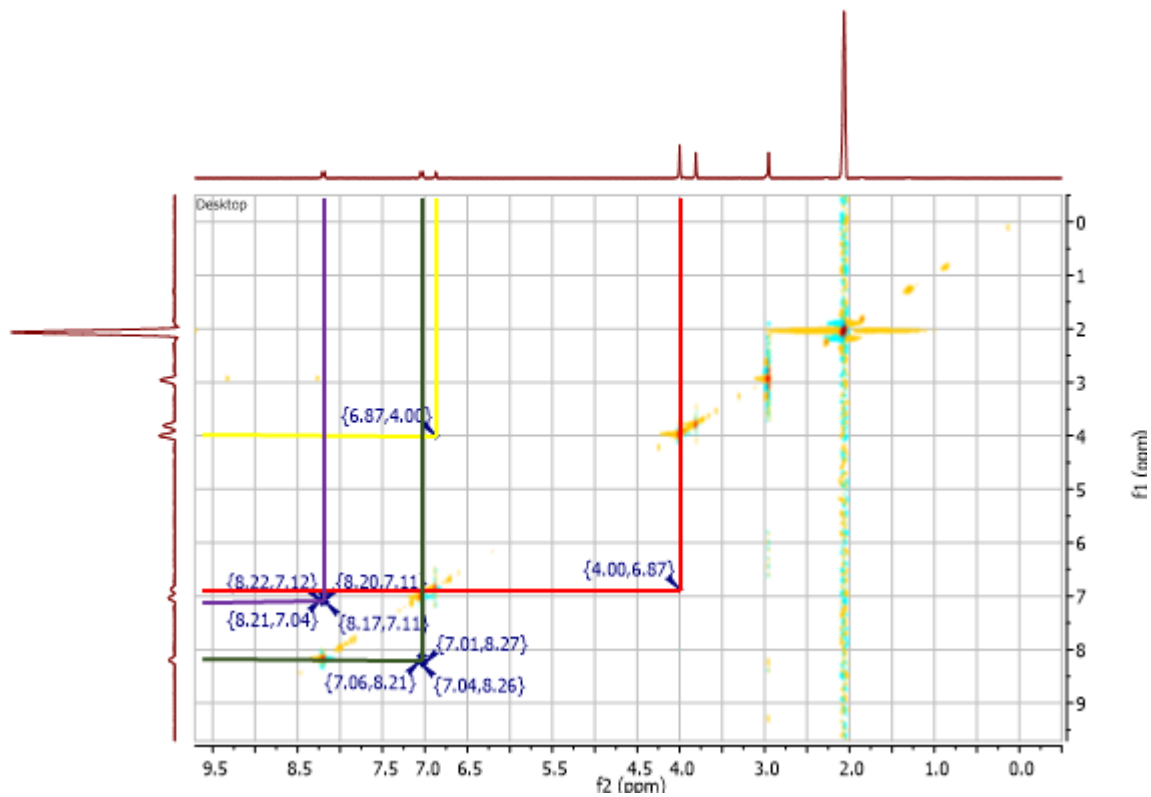
A continuación se muestra el espectro HMBC



Grafica 6. Espectro resonancia magnética nuclear bidimensional HMBC del compuesto Ct2

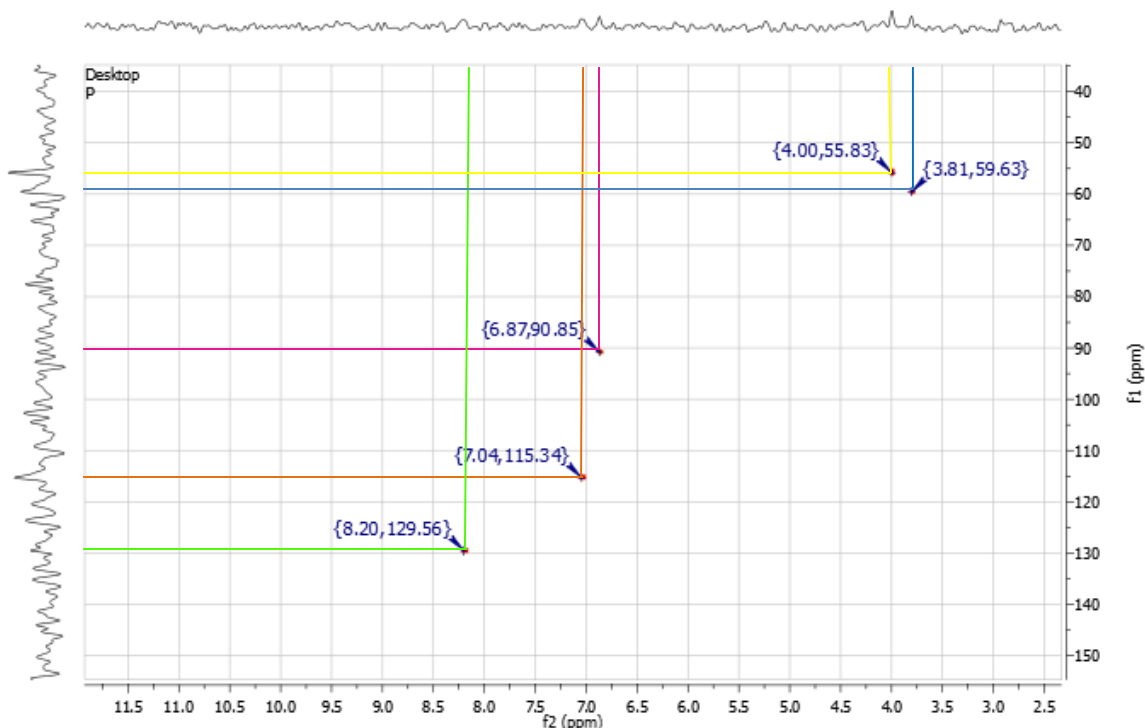
El espectro NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) es un espectro bidimensional en el cual se observan las interacciones entre hidrógenos debidas a efectos dipolares, es decir a través del espacio, se verán las correlaciones sin importar la cantidad de enlaces que los separen, la señal de correlación (6.87, 4.00) y la señal (4.00, 6.87) muestran la interacción entre el hidrogeno aromático de la posición 6 y los hidrógenos alifáticos del metoxilo en la posición 7 confirmando así el metoxilo en el carbono 7 del anillo A, y las señales (8.21, 7.04) y (7.04, 8.13) muestran la interacción entre los hidrógenos aromáticos de las posiciones 2' y 6' y los hidrógenos aromáticos en las posiciones 3' y 5' del anillo B.

A continuación se muestra el espectro NOESY



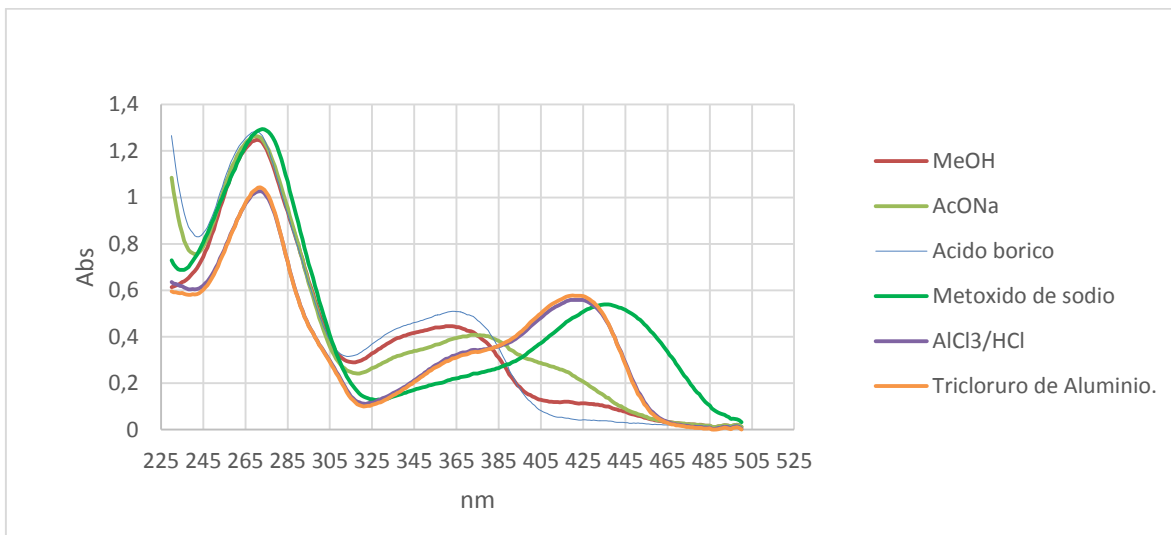
Grafica 7. Espectro resonancia magnética nuclear bidimensional NOESY del compuesto Ct2

En el espectro HSQC se ven las correlaciones directas $^1J_{CH}$ 3.81-59.63 ppm, $^1J_{CH}$ 4.00-55.83ppm $^1J_{CH}$ 6.87-90.85ppm $^1J_{CH}$ 7.04-115.34ppm $^1J_{CH}$ 8.20-129.56ppm
 A continuación se muestra el espectro HSQC



Grafica 8. Espectro resonancia magnética nuclear bidimensional HSQC del compuesto Ct2

4.2.2.3 UV Y DESPLAZAMIENTOS



Grafica 9. Espectros UV y desplazamientos del compuesto Ct2

En la (Tabla 3.) se observan los datos obtenidos en los espectros U.V con y sin reactivos de desplazamientos y se muestran los valores de absorbancia y de λ_{max} para cada banda del espectro.

Tabla 3. Señales con reactivos de desplazamiento espectro UV Ct2 (autores)

REACTIVO DE DESPLAZAMIENTO	λ_{max} nm y absorbancia banda II	λ_{max} nm y absorbancia banda I	DESPLAZAMIENTO	ASIGNACIÓN
MeOH	271; 1.248	370; 0.426		
AcONa	270; 1.264	372; 0.408	No presenta	Ausencia de OH en 7.
H ₃ BO ₃	270; 1.283	362; 0.508	Hipsocromico banda I de 8nm	No es flavona orto-hidroxilada en el anillo A ni en el B.
MeONa	273; 1.295	435; 0.539	Batocrómico banda I de 65nm	Flavona 4' hidroxilada.
AlCl ₃	272; 1.043	420; 0.578	Batocrómico banda I de 50nm	Flavona en 3 y 5 hidroxilada
AlCl ₃ /HCl	272; 1.027	420; 0.559	Batocrómico banda I de 50nm	Flavona en 3 y 5 hidroxilada

Se registraron máximos de absorbancia en la banda II de 271nm y en la banda I de 370nm con un desplazamiento batocrómico de 65nm en la banda I al adicionar MeONa lo que indica la presencia de un hidroxilo libre en 4', no se presentaron desplazamientos en el espectro luego de la adición de AcONa lo que indica ausencia de grupos hidroxilo libres en C7. No se observan efectos batocrómicos en la banda I entre 12-36nm o menores con la adición de H₃BO₃ lo que indica que no es una flavona orto-hidroxilada en el anillo A ni en el B, se observa un efecto batocrómico al adicionar AlCl₃ de 50nm, el mismo desplazamiento ocurre con la adición de HCl lo que evidencia la presencia de grupos hidroxilo libres en C3 y/o C5.

4.2.3 Estructura Ct2

El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, HSQC, NOESY, HMBC y los reactivos de desplazamiento en UV nos permiten proponer como estructuras para Ct2 (figura 8 y figura 9)

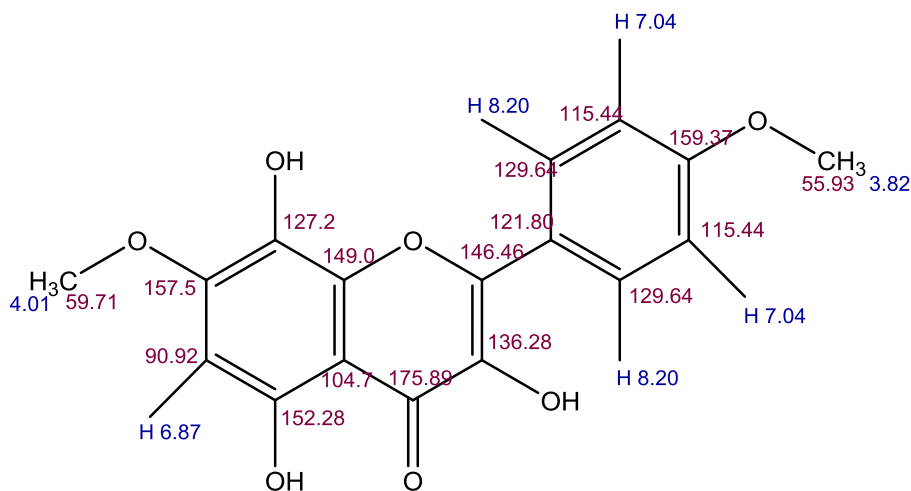


Figura 8. Estructura molecular de 3, 5,8 trihidroxi-7,4´dimetoxiflavona.

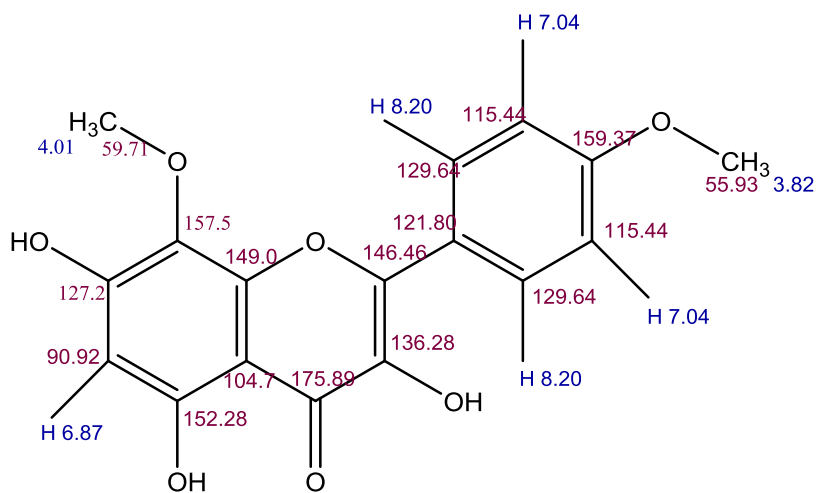


Figura 9. Estructura molecular de 3, 5,7 trihidroxi-8,4´dimetoxiflavona.

4.3 Flavonoide Ct3

4.3.1 Características físicas

Color: Blanco

Punto de fusión: 176°C

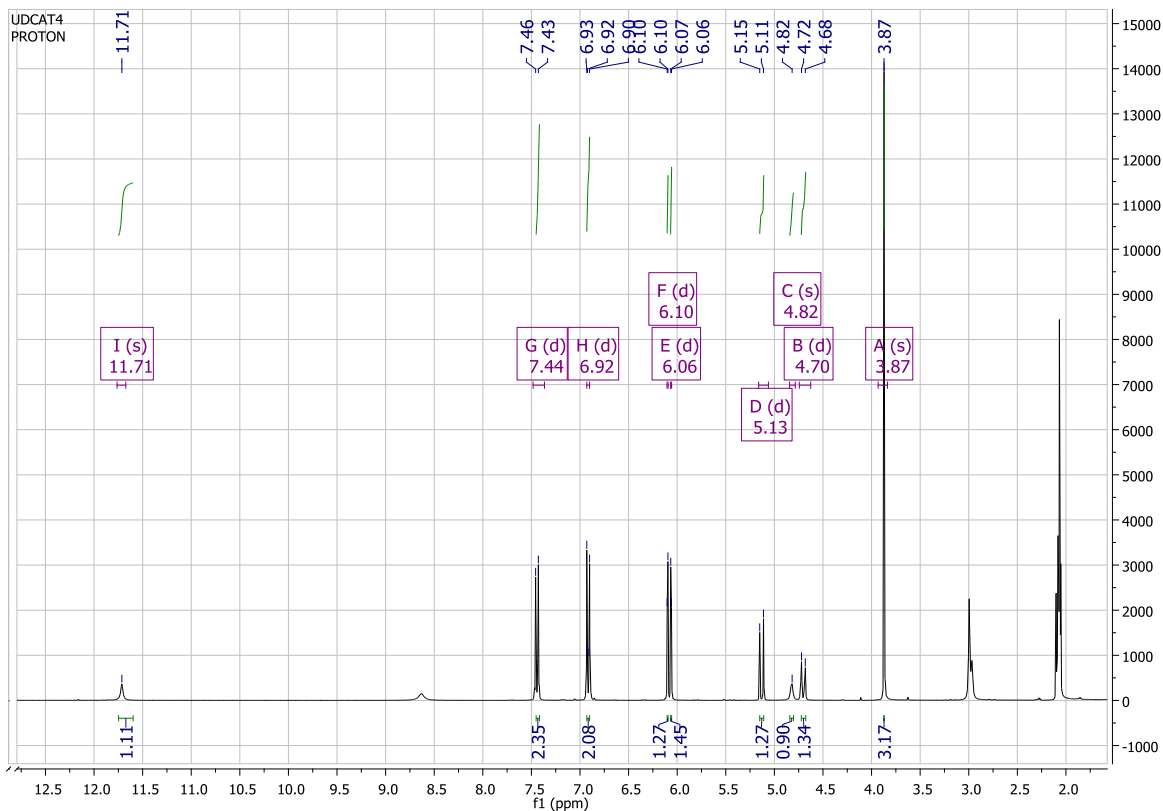
Soluble en: Acetona

4.3.2 Elucidación estructural

Para la deducción de la estructura molecular del flavonoide Ct3 se tomaron espectros UV, $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$.

En el espectro $^1\text{HRMN}$ se observan 9 señales que integran para 13 hidrógenos, de los cuales 3 se encuentran en un singlete en 3.87ppm probablemente debido a la presencia de un metoxilo, cada una de las señales en 6.92ppm y 7.44ppm integran para 2 hidrógenos y cada una tiene una constante de acoplamiento $^3J_{\text{HH}}$ de 8.6Hz común para un sistema de acoplamiento orto en un anillo aromático, además como se presentan como dobletes es posible que sea una disustitución de tipo para en el anillo B, cada una de las señales en 5.13ppm y 4.70ppm integran para 1 hidrogeno, cada una con una constante de acoplamiento axial-axial J_{HH} de 11.6Hz común para un sistema cis de un heterociclo entre las posiciones 2 y 3 del anillo C, las señales en 6.06ppm y 6.10ppm integra cada una para 1 hidrogeno y cada una tiene constantes de acoplamiento $^3J_{\text{HH}}$ de 2.3 Hz común para un sistema meta en un anillo aromático, además como se presenta con multiplicidad de dobletes es posible que sea una tetrasustitución en el anillo A, la señal en 4.82ppm es un singlete que integra para un hidrogeno que puede ser por la presencia de un hidróxilo en el anillo C, al igual que el singlete que aparece en 11.71ppm y que integra para un hidrogeno puede dar indicios de la presencia de un hidroxilo en el anillo A.

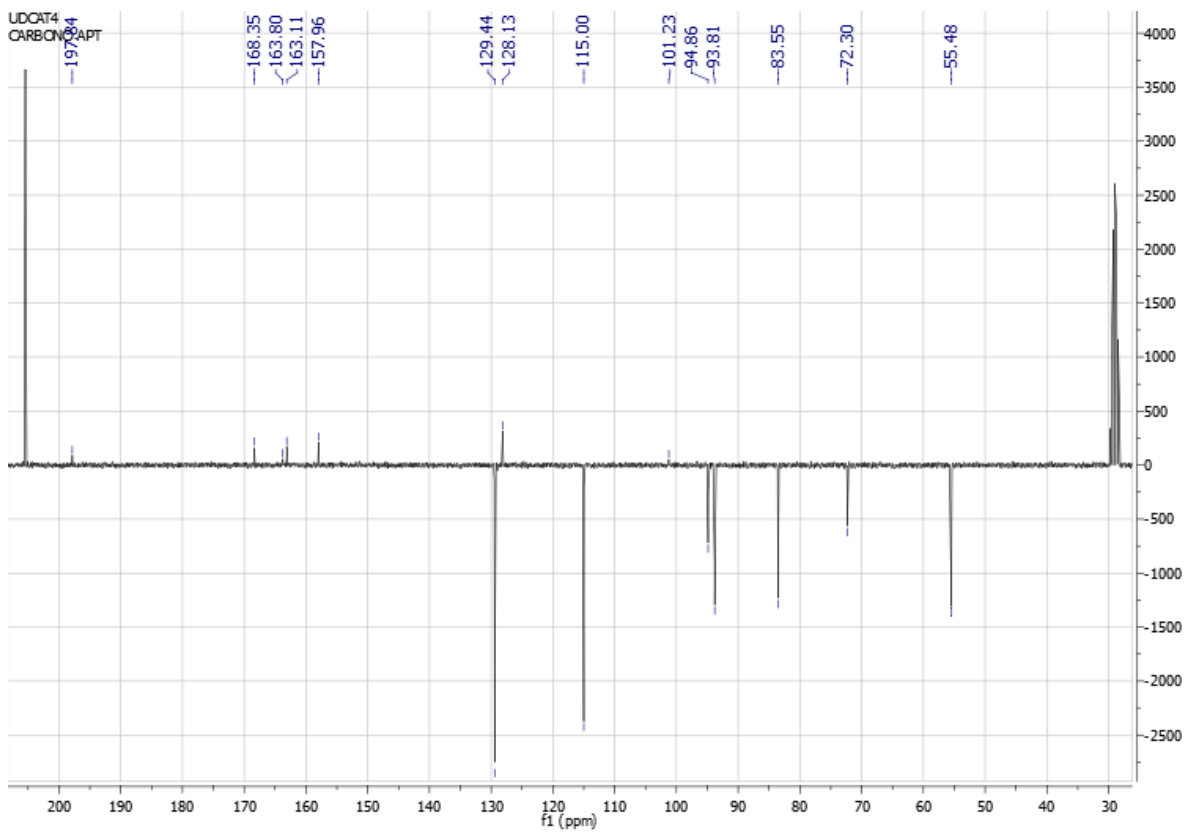
A continuación se muestra el espectro $^1\text{HRMN}$ (300MHz $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)



Grafica 10. Espectro resonancia magnética nuclear $^1\text{HRMN}$ del compuesto Ct3

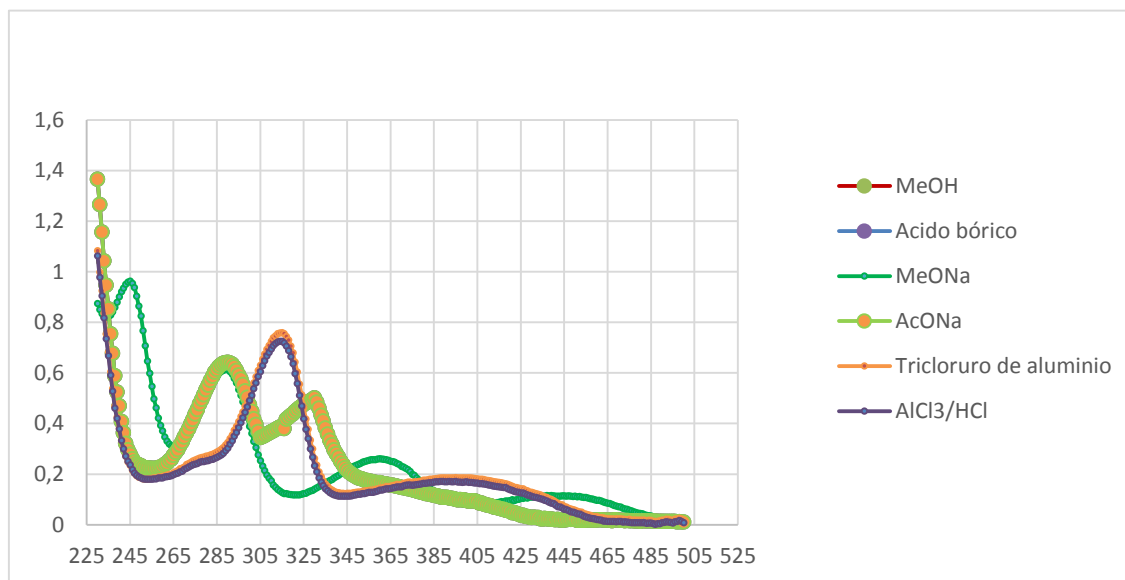
El espectro $^{13}\text{CRMN}$ presenta 14 señales de las cuales una se encuentran en zona de metóxilos a 55.48ppm, la señal en 197.84ppm se debe al carbonilo del flavonoide además las señales en 115.00ppm y 129.44ppm que se encuentran con una mayor intensidad pertenecen cada una a dos carbonos en el anillo B. las señales a 72.30ppm, 163.80ppm y 157.96ppm indican la presencia de tres carbonos hidroxilados en las posiciones 3, 5, y 4' respectivamente, así mismo la señal a 168.35ppm confirma la presencia de un metoxilo en el carbono 7 del anillo A, las 6 señales restantes corresponden a carbonos aromáticos característicos de flavonoides.

A continuación se muestra el espectro $^{13}\text{CRMN}$ (75MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)



Grafica 11. Espectro resonancia magnética nuclear ^{13}C RMN del compuesto Ct3

4.3.2.3 UV Y DESPLAZAMIENTOS



Grafica 12. Espectros UV y desplazamientos Ct3

En la (Tabla 4) se observan los datos obtenidos en los espectros U.V con y sin reactivos de desplazamientos y se muestran los valores de absorbancia y de λ_{max} para cada banda del espectro.

Tabla 4. Señales con reactivos de desplazamiento espectro UV Ct3 (autores)

REACTIVO DE DESPLAZAMIENTO	λ_{max} y absorbancia banda II	λ_{max} y absorbancia banda I	DESPLAZAMIENTO	ASIGNACIÓN
MeOH	290; 0.635	330; 0.502		
AcONa	290; 0.642	330; 0.520	No presenta	Ausencia de OH en 7.
H ₃ BO ₃	290; 0.640	330; 0.510	No presenta	No es flavonoide orto-hidroxilado en A ni en B.
MeONa	289; 0.614	360; 0.261	Batocrómico en banda I de 30nm.	OH libre en el anillo B
AlCl ₃	315; 0.760	388; 0.186	Batocrómico en banda II de 25nm y en banda I de 58nm.	Flavanonol. Flavonoide 5-hidroxilado.
AlCl ₃ /HCl	314; 0.726	388; 0.172	Batocrómico en banda II de 24nm y en banda I de 58nm.	Flavanonol. Flavonoide 5-hidroxilado.

Se registraron máximos de absorbancia en la banda II de 290nm y en la banda I de 330nm con un desplazamiento batocrómico al adicionar MeONa en la banda I de 30nm lo que indica grupos hidroxilos libres en el anillo B, luego con AlCl₃/HCl se registró desplazamiento batocrómico en las bandas II de 25nm lo que demuestra que el compuesto es un flavanonol y en la banda I hubo un desplazamiento de

58nm lo que indica la presencia de OH libres en C5; No se presentan desplazamientos con AcONa ni con H₃BO₃ lo que muestra la ausencia de grupos hidroxilo libres en C7 y de grupos orto-hidroxilo en el anillo B.

4.3.3 Estructura Ct3

El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹HRMN, ¹³CRMN, los reactivos de desplazamiento en UV y la comparación de éstos datos con investigaciones previas (Carrero, *et al*, 1995) nos permiten proponer como estructura para (Ct3) la 4',5 dihidroxi-7 metoxi-flavanonol (figura 10)

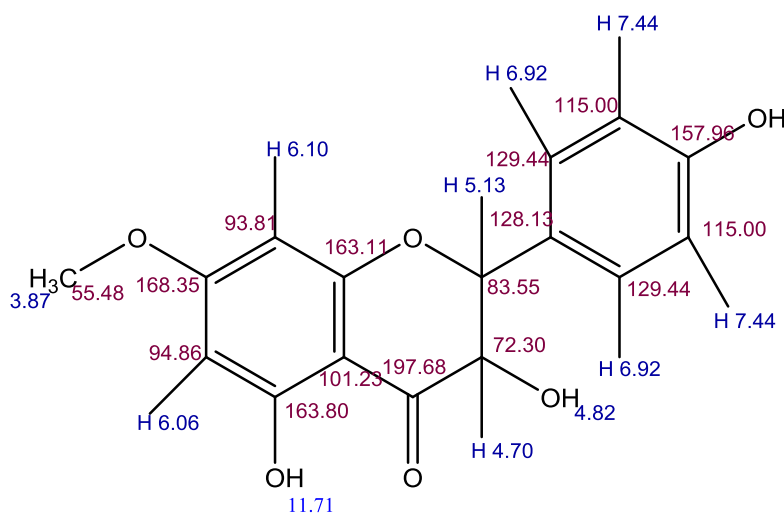


Figura 10. Estructura molecular de 4',5 dihidroxi-7 metoxi-flavanonol

4.4 Flavonoide Ct4

4.4.1 Características físicas

Color: Amarillo

Punto de fusión: 268 °C

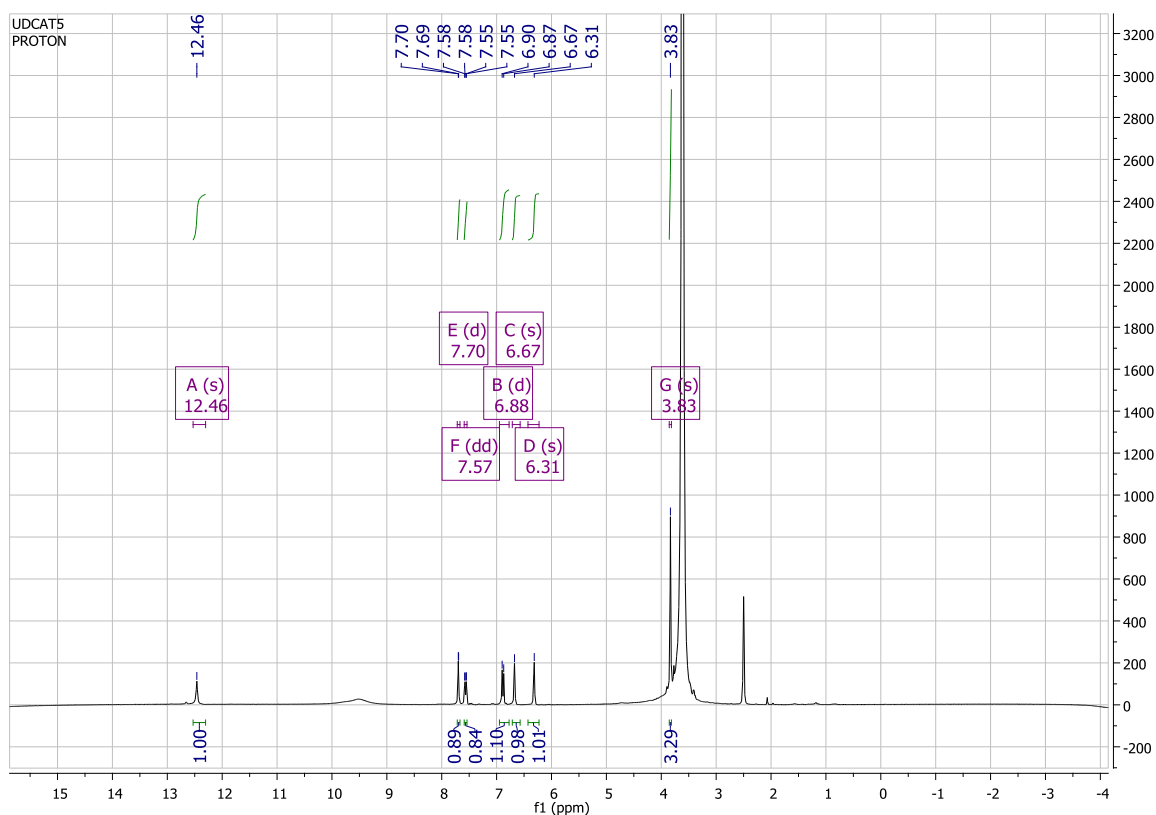
Soluble en: Dimetilsulfóxido.

4.4.2 Elucidación estructural

Para la deducción de la estructura molecular del flavonoide Ct4 se tomaron espectros UV, ¹HRMN y ¹³CRMN.

En el espectro $^1\text{HRMN}$ se observan 7 señales que integran para 9 hidrógenos de los cuales 3 se encuentran en un singlete en 3.83ppm probablemente debido a la presencia de un metoxilo, cada una de las señales en 7.70ppm y 7.57ppm integra para 1 hidrógeno cada una con constantes de acoplamiento $^3J_{\text{HH}}$ de 1.5 y 0.8Hz respectivamente, comunes para un sistema para en un anillo aromático, además la señal en 7.57ppm presenta una segunda constante de acoplamiento de 7.6Hz que junto con la constante de 8.5Hz correspondiente a la señal en 6.88ppm son comunes para un sistema orto en un anillo aromático, el singlete de la señal en 12.46ppm integra para un hidrogeno que puede estar acompañado de un oxígeno en el anillo A.

A continuación se muestra el espectro $^1\text{HRMN}$ (300MHz $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

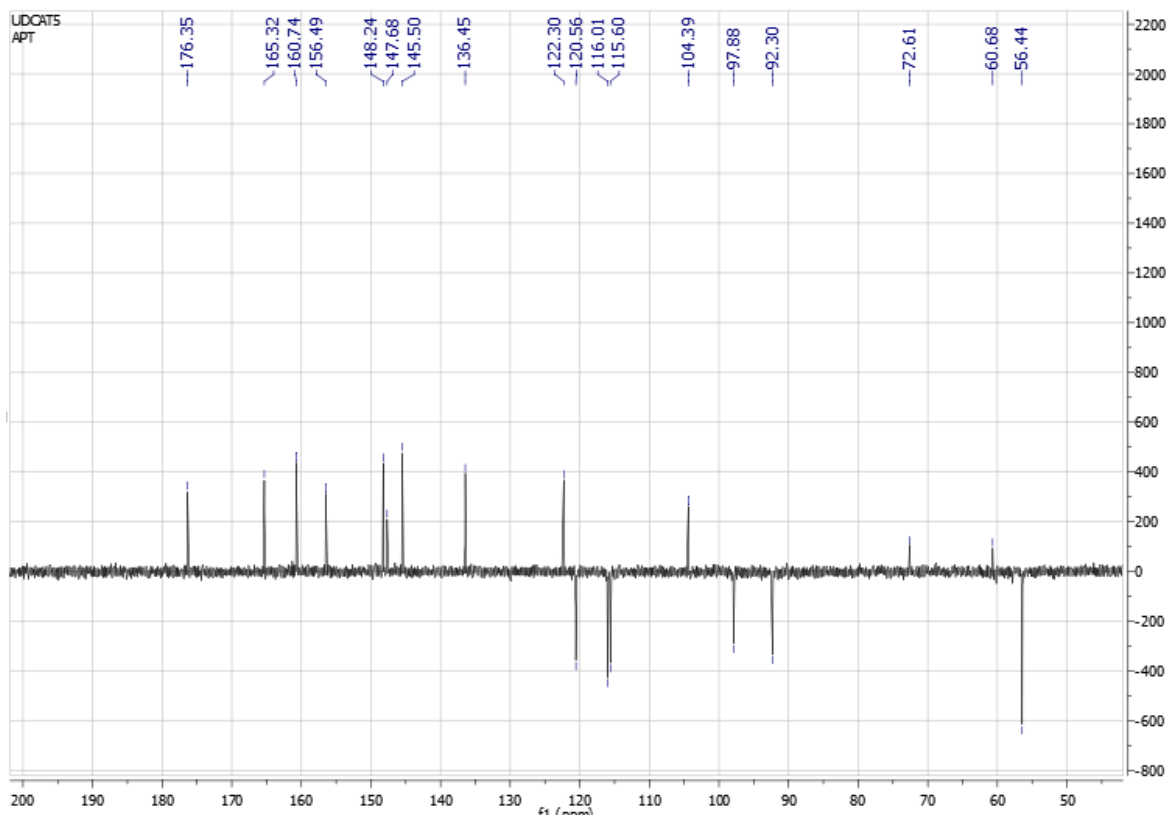


Grafica 13. Espectro resonancia magnética nuclear $^1\text{HRMN}$ del compuesto Ct4

El espectro $^{13}\text{CRMN}$ presenta 16 señales de las cuales una se encuentran en zona de metóxilos a 56.44ppm, la señal en 176.35ppm se debe al carbonilo del flavonoide además las señales en 160.74ppm y 165.32ppm indican la presencia de dos carbonos hidroxilados en las posiciones 7 y 5 del anillo A, así mismo las señales en

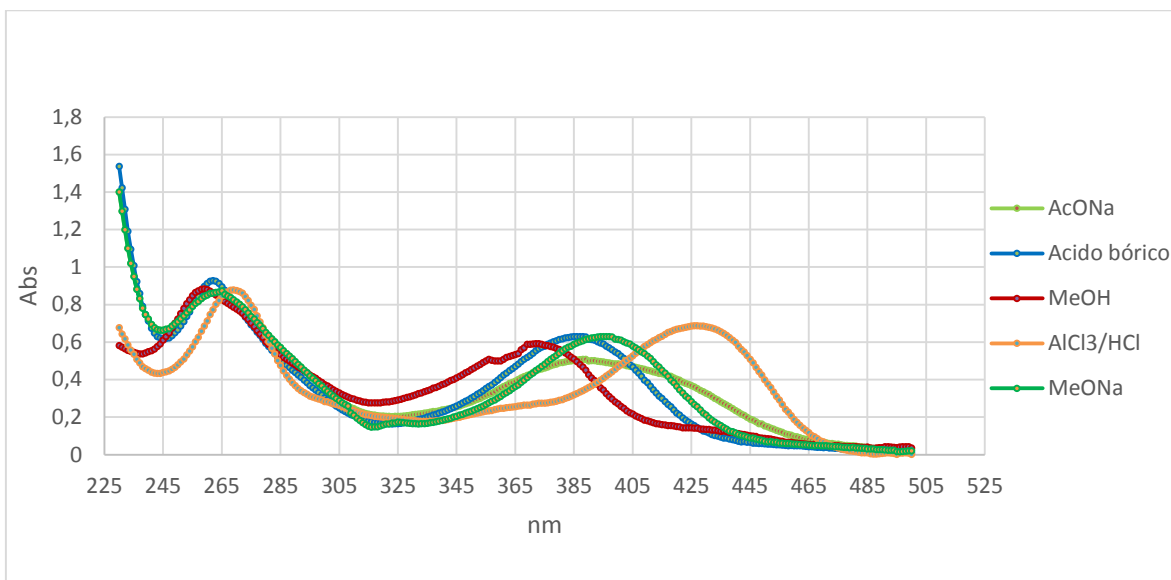
145.5ppm y 148.24ppm indican la presencia de dos carbonos hidroxilados en las posiciones 3' y 4' del anillo B, la señal a 136,45ppm confirma la metoxilacion en la posición 3 del anillo C las 9 señales restantes corresponden a los carbonos aromáticos característicos de flavonoides.

A continuación se muestra el espectro $^{13}\text{CRMN}$ (75MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)



Grafica 14. Espectro resonancia magnética nuclear $^{13}\text{CRMN}$ del compuesto Ct4

4.4.2.3 UV Y DESPLAZAMIENTOS



Gráfica 15. Espectros UV y desplazamientos Ct4

En la (Tabla 5) se observan los datos obtenidos en los espectros U.V con y sin reactivos de desplazamientos y se muestran los valores de absorbancia y de λ_{max} para cada banda del espectro.

Tabla 5. Señales con reactivos de desplazamiento espectro UV Ct4 (autores)

REACTIVO DE DESPLAZAMIENTO	λ_{max} nm y absorbancia banda II	λ_{max} nm y absorbancia banda I	DESPLAZAMIENTO	ASIGNACIÓN
MeOH	259; 0.884	356; 0.509		
AcONa	273; 0.866	388; 0.520	Batocrómico en banda II de 14nm.	Flavona 7 hidroxilada.
H ₃ BO ₃	262; 0.929	386; 0.631	Batocrómico en banda I de 17nm	Flavona orto-hidroxilada en el anillo B.
MeONa	271; 0.684	400; 0.269	Batocrómico en banda I de 44nm	Flavona 4' hidroxilada.

AlCl ₃	273; 0.827	426;0.680	Batocrómico en banda I de 57nm e hipsocrómico de 14nm en banda II	Flavona 5 hidroxilada.
AlCl ₃ /HCl	269; 0.879	426; 0.689	Batocrómico en banda I de 57nm y en banda II de 10nm.	Flavona 5 hidroxilada.

Se registraron máximos de absorbancia en la banda II de 259nm y en la banda I de 356nm con un desplazamiento batocrómico en la banda II tras la adición de AcONa que indica la presencia de un hidroxilo en la posición 7 del anillo A, el desplazamiento batocrómico de 44nm en la banda I indica un hidroxilo en la posición 4'. Hay desplazamiento batocrómico de 17nm en la banda I con la adición de H₃BO₃, lo que confirma que la estructura es una flavona orto-hidroxilada en el anillo B, el desplazamiento batocrómico en la banda II tras la adición de AlCl₃ y luego con AlCl₃/HCl indica que es una flavona con hidroxilo en la posición 5

4.4.3 Estructura Ct4

El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H RMN, ¹³C RMN, los reactivos de desplazamiento en UV y la comparación de éstos datos con investigaciones previas (Eiroa, 1994) (Mohamed, 2016) (Tsukasa, *et al*, 2012) nos permiten proponer como estructura para Ct4 la 5, 7, 3', 4' tetrahidroxi-3-metoxiflavona. (Figura 11)

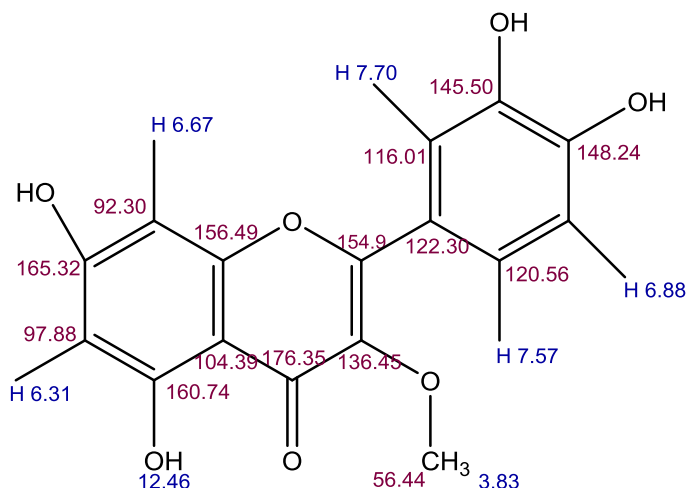


Figura 11. Estructura molecular de 5, 7, 3', 4' tetrahidroxi-3-metoxiflavona.

4.5 Actividad antioxidante

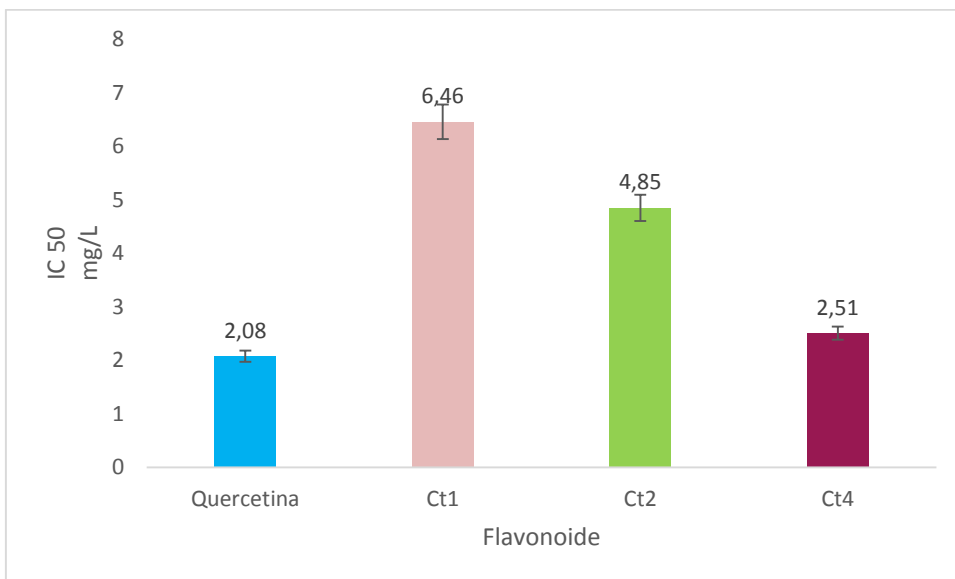
4.5.1 Ensayo DPPH•

Con los resultados obtenidos para actividad antioxidante de cada uno de los flavonoides (Ct1, Ct2, Ct3 y Ct4) se discriminó la actividad de Ct3 ya que éste no presentó inhibición mayor al 50% del radical DPPH•

Se realizó la prueba estadística a posteriori o Post-hoc: HSD Tukey y Scheffé para determinar cuál de los tratamientos es el mejor, teniendo en cuenta que ésta prueba organiza los tratamientos de acuerdo a sus diferencias se demostró que el flavonoide que tiene mejor respuesta en actividad antioxidante es el Ct4 ya que es el más polar y tiene el menor valor de IC₅₀, es decir, que se requiere la menor concentración de éste en comparación con los demás flavonoides para lograr el 50% de la inhibición del radical DPPH•.

Tabla 6. IC₅₀ para la actividad antioxidante del control y flavonoides por el método DPPH•.

COMPUESTO	IC ₅₀ mg/L (x)
Quercetina	2,08
Ct1	6,46
Ct2	4.85
Ct4	2,51

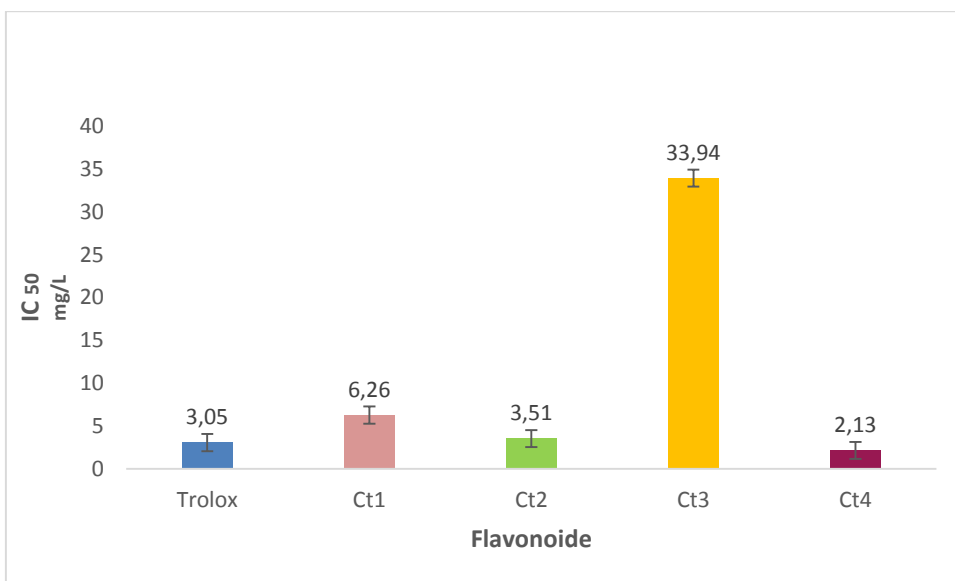


Grafica 16. IC₅₀ de flavonoides y control, a través del ensayo con DPPH•

4.5.2 Ensayo ABTS•+

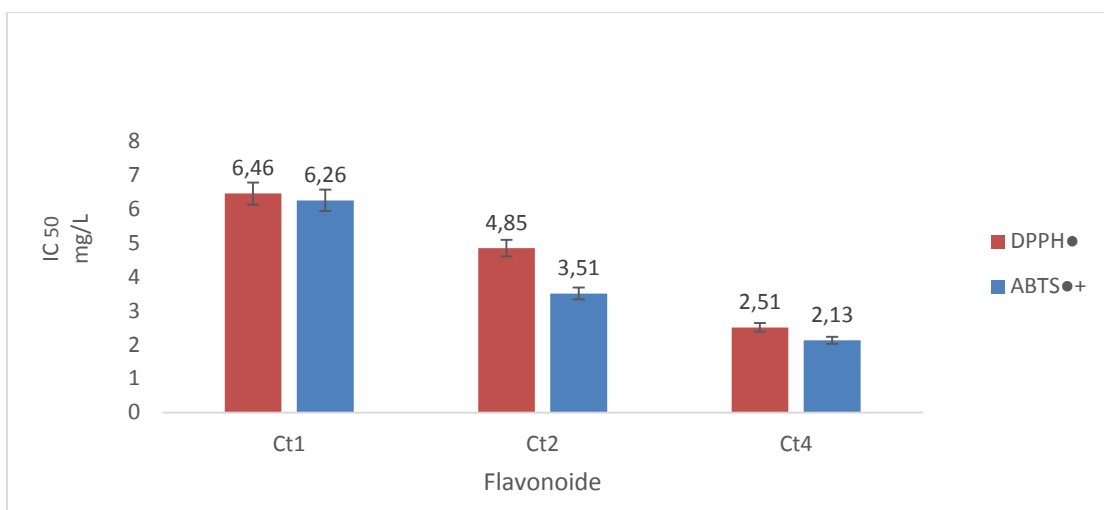
Tabla 7. IC₅₀ para la actividad antioxidante del control y de los flavonoides por el método ABTS•+

COMPUESTO	IC ₅₀ mg/L (x)
Trolox	3,05
Ct1	6,26
Ct2	3,51
Ct3	33,94
Ct4	2,13



Grafica 17. IC₅₀ de flavonoides y control, a través del ensayo ABTS•+.

Las pruebas Post Hoc: HSD Tukey y Scheffé demostraron que el flavonoide que tiene mejor respuesta en actividad antioxidante es el Ct4 ya que tiene el menor valor de IC₅₀, es decir, que se requiere la menor concentración de éste en comparación con los demás flavonoides y el control trolox para lograr el 50% de la inhibición del radical ABTS••.



Grafica 18. Comparación del IC₅₀ de los flavonoides con los dos métodos DPPH• y de ABTS••.

La anterior gráfica comparativa donde se evaluaron ambos métodos indica que el menor IC₅₀ corresponde al flavonoide Ct4 (5,7,3',4'tetrahidroxi-3-metoxiflavona) es decir que se demuestra que éste compuesto es el que presenta mayor inhibición o captación de los radicales DPPH• y ABTS•• frente a los flavonoides Ct1 y Ct2.

No se observan diferencias significativas de IC₅₀ entre los dos métodos; sin embargo se observa que el IC₅₀ siempre fue menor en ABTS•• que con DPPH• debido a la poca selectividad del ABTS•• frente al DPPH• ya que éste último no reacciona con flavonoides carentes de grupos OH en el anillo B mientras que el ABTS•• reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado. (Roginsky *et al.* 2,005)

Los resultados obtenidos de actividad antioxidante con los métodos DPPH• y ABTS•• concuerdan con (Tepe *et al.*, 2.007) y (Sarikurkcu *et al.*, 2.009) quienes evidenciaron la estrecha relación existente entre polaridad de los flavonoides y la actividad antioxidante, siendo los flavonoides más polares los que tienen mayor potencial para capturar los radicales libres.

5. CONCLUSIONES

- Las hojas de *Chromolaena tacotana* contienen los flavonoides 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona, 3,5,8 trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona o 3,5,7 trihidroxi-8,4'dimetoxiflavona, 4'5-dihidroxi-7-metoxiflavanonol y 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona.
- De los flavonoides de las hojas de *C. tacotana* el 5,7,3',4'- tetrahidroxi-3-metoxiflavona (Ct4) con un IC₅₀ de 2.51mg/L fue el que mayor actividad antioxidante presentó mediante los métodos DPPH• y ABTS•• frente a 3,5,8 trihidroxi-7,4'dimetoxiflavona o 3,5,7 trihidroxi-8,4'dimetoxiflavona (Ct2), y (Ct1) 3, 5, 4'-trihidroxi-7-metoxiflavona, que arrojaron valores de IC₅₀ de 4.85 y 6.46 mg/L respectivamente.
- La actividad antioxidante que tienen los flavonoides es aumentada por la presencia de sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B, además de la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un hidroxilo en la posición 3 y un carbonilo en la posición 4 que poseen en su estructura dan características de polaridad y captación de radicales libres.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Afolabi C., A. (2.007). Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*. *Scientific research and essays*, 2(6), 191-194.
2. Alam N., B. N. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2)143-152.
3. Álvarez, E., Jiménez, O., Posada, C., Rojano, B., Gil, J., García, C y Durango, D., (2.008) Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del genero *Visimia* (Guttiferae). *Productos naturales*, 15(1) 165-172.
4. Avella, D., Mendoza, A y Ortiz, C. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de queretaro. México, 3-4.
5. Barua, R., Sharma, R y Hertz, G. T. (1.978). Flavonoids of *Chromolaena odorata*. *Phytochemistry.*, 17(10), 1807-1808.
6. Biller, A., Boppré, M., Witte, L y Hartmann, T. (1.994). Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*. Chemistry and chemoecological aspects. *Phytochemistry*, 35(3), 615-619.
7. Blois, M. (1958). antioxidant determinations by the use of a stable free radical . *Nature*, 182, 1199-1200.
8. Bohlmann, F., Singh, P., Jakupovic, J y King, R. a. (1.982). Three cadinene derivatives and a prostaglandin-like acid from *Chromolaena* species. *Phytochemistry*, 21(2) 371-374.
9. Bohm, B., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B y Kroke, A. (1998). Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Bergholz-Rehbrücke*, 37(2), 146-163.
10. Brand, W., Cuvelier, M y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food science andi technolgy*, 28(1) 25-30.
11. Brochet, N. d. (2009). Antioxidantes y radicales libres luchan a muerte. *Portafolio*. Disponible en internet:

<http://ezproxy.utadeo.edu.co:2048/login?url=http://search.proquest.com/docview/334465728?accountid=32602>

12. Carrión, A., García, C y Candida, R. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. (tesis de pregrado) Universidad de Cuenca Cuenca, Ecuador.
13. Carrero, M y Sanabria, A (1995). Un flavonol con actividad antimicrobiana de *Chromolaena tacotana*. Revista Colombiana de ciencias químico-farmacéuticas, (24)24-28.
14. Domínguez O, M. (2002). ORAC y TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. (tesis de doctorado) Universidad de Colima, Tecoman, Colima.
15. Eiroa, J. (1994). Estudio y consideraciones químico taxonómicas de las especies de *allagopappus* y *vieraea*, géneros endémicos de las islas canarias. Universidad de las palmas de gran canaria. Las palmas gran canaria, Islas canarias.
16. Espitia, C. (1992). Flavanonas de *Chromolaena Tyleri*. Química del género *Chromolaena*. Universidad nacional de Colombia, facultad de ciencias, departamento química. Bogotá, Colombia
17. Groot, H y Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental and clinical pharmacology*, 12(3) 249-255.
18. Gutiérrez, A. C. (1995). Sesquiterpene lactones, a labdane and other constituents of *Urolepis hecatantha* and *Chromolaena arnottiana*. *Phytochemistry*, 39(4), 795-800.
19. Guzmán A, A. J., Rodríguez A, O y Torrenegra G, R. D., (2008). Flavonoides de *Chromolaena subscandens* (Hieron.) R.M. King & H. Rob. *Productos Naturales*. 2(1), 5.
20. Irineu B, D., Bento Balbinot, R., Pereira M, B., Benassi Z, E., Ueda N, T., Barroto, M. R y Baldoqui, D. C. Estudio químico y biológico de *Chromolaena laevigata* (LAM.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae).

21. Lindahl, M y Tagesson, C. (1997). Flavonoid as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation*, 21(3), 347-356.
22. Melnyk y Marcone. (2011). How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food research international*, 44(1), 14-22.
23. Mohamed, G, A. (2016). Tagenols A and B: new lipoxygenase inhibitor flavonols from *Tagetes minuta*. *Phytochemistry letters*, 16, 141-145.
24. Rodríguez A, O. E., y Torrenegra G, R. D. (2005). Flavonoides de *Chromolaena tacotana* (Klatt) R.M. King y H. Rod. *Actual Biol*, 27(1) 113-115
25. Rodríguez A., O. E. (2008). Química de cromolaenas colombianas (*C. perglabra*, *C. tacotana*) y actividad biológica de algunos de sus compuestos. *Universitas Scientiarum*, 13(3) 321.
26. Rodríguez Cabeza, B., Díaz Piedarrita, S., y Parra, C. (2014). *Flora de Colombia # 31*, U Nacional de Colombia. (Bogota).
27. Roginsky V y Lissi E A. (2005) Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92(2) 235-254.
28. Santamaría A, D., Torrenegra, R. D., y Rodríguez A, O. E. (2011). Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de *Chromolaena bullata* (Klatt) R.M. King & H. Rob. hojas y flores. *Vitae*, 18(2). S81.
29. Sarikurcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abail, G y Mete, E. (2009). studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitexagnuscastus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 47(10) 2479-2483.
30. Tepe ,B., Daerera, D., Tepe, A., Polissiou, M y Sokmen, A. (2007). Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavidahub mor*. From Turkey. *Food chemistry*, 103(4) 358-1364.
31. Tovar, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la eco región cafetera. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.

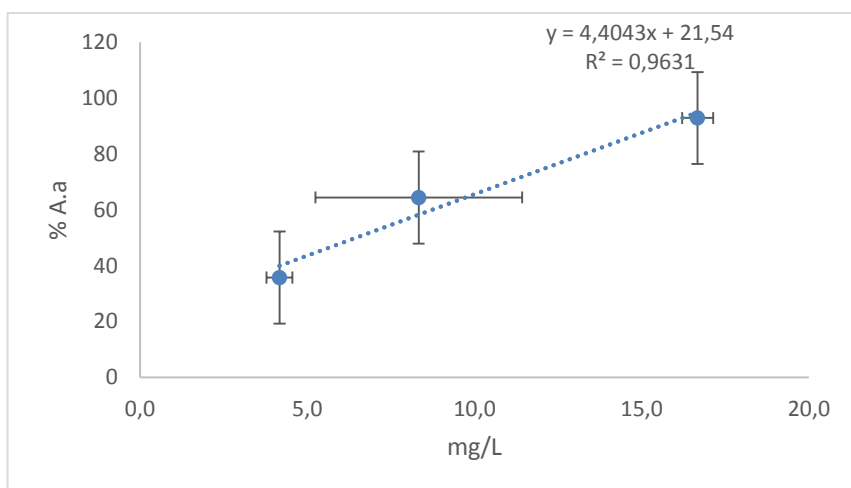
32. Tsukasa I, Sergey V, Smirnov , Oyunchimeg D y Katsuhiko K. (2012). Flavonoids from *Reaumuria soongarica* (Tamaricaceae) in Mongolia, 38(4), 189–195.
33. Varón, M. M., Torrenegra G, R. D y Rodríguez A, O. E. (2.011). Antioxidante de la *Chromolaena leivensis* (Hieron) R.M. King & H.Rob. Vitae, 18(2)82.
34. World health organization, (2.015) International agency for research on cancer. Disponible en internet : <http://www.iarc.fr/>
35. Zuleta, A., Esteve, M., Frigola, A. (2.009). ORAC y TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chemistry, 114(1) 310-316.

7. ANEXOS

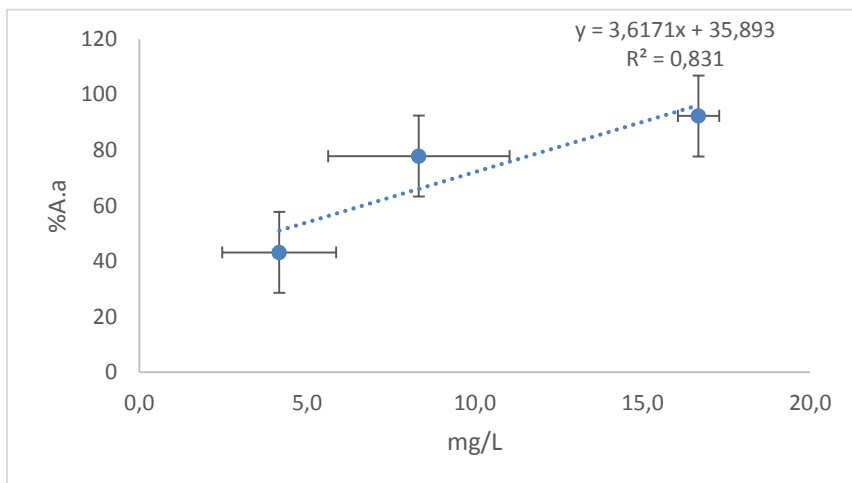
Ensayo DPPH•

Tabla 8. Ecuación de la recta e IC₅₀ (x) para la actividad antioxidante del control y flavonoides por el método DPPH•

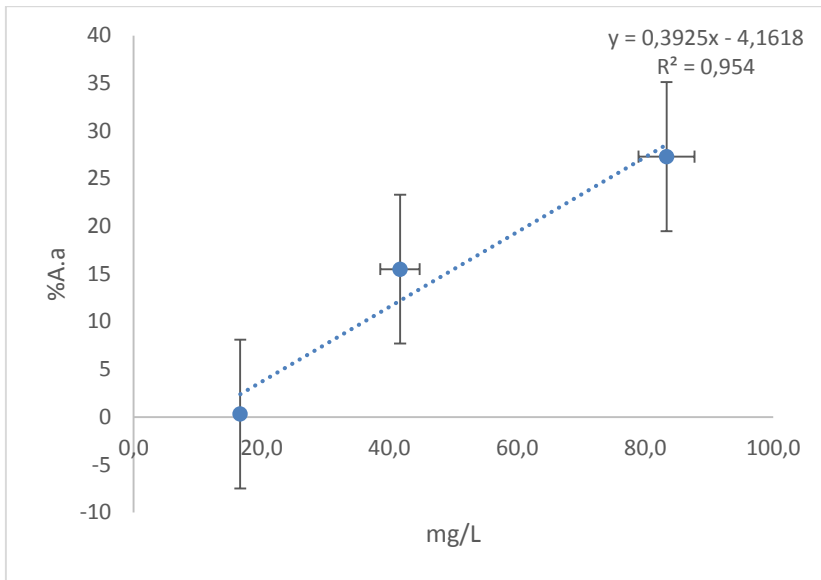
COMPUESTO	ECUACIÓN	R ²	X
Quercetina	$y=21,669X + 4,9067$	0,9678	2,08
Ct1	$y=4,4043X + 21,54$	0,9631	6,46
Ct2	$y=3,6171X + 35,893$	0,831	3,9
Ct3	$y=0,3925X - 4,1618$	0,954	137,99
Ct4	$y=25,067X - 12,972$	0,9986	2,51



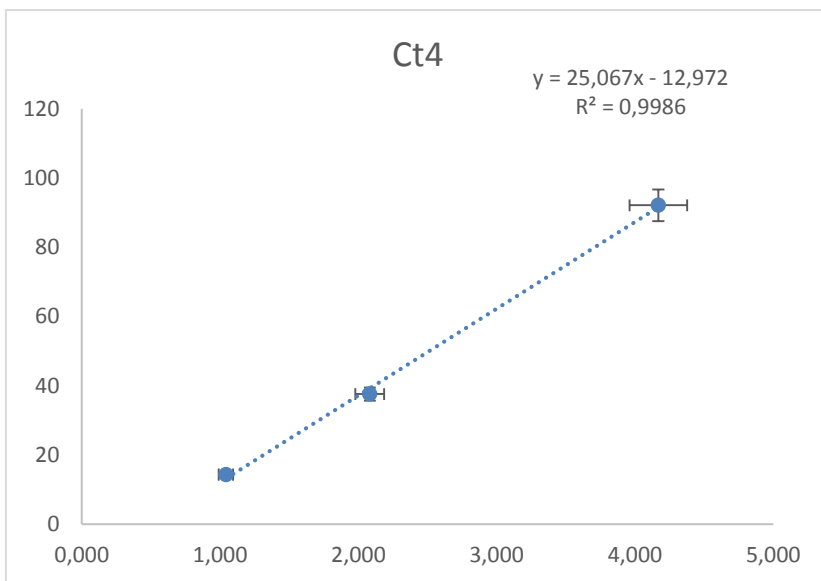
Gráfica 19. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct1 por el método DPPH•



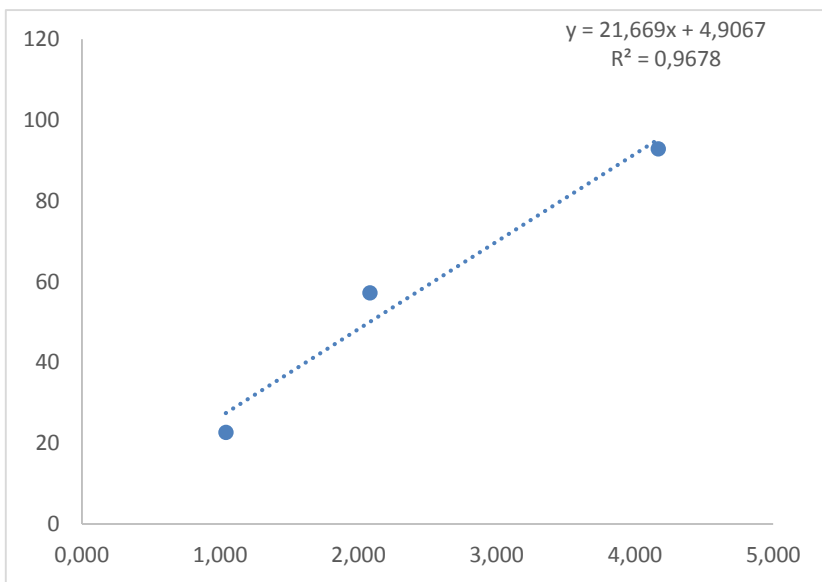
Gráfica 20. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct2 por el método DPPH•



Grafica 21. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct3 por el método DPPH•



Grafica 22. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct4 por el método DPPH•

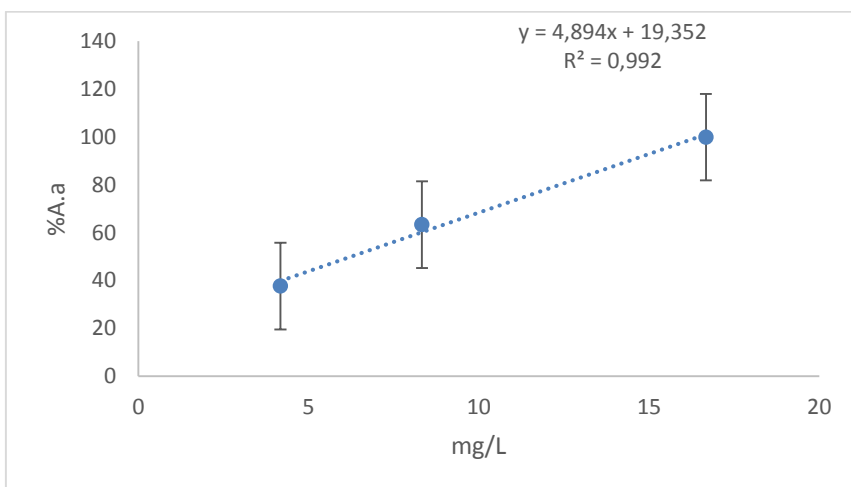


Gráfica 23. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para quercetina

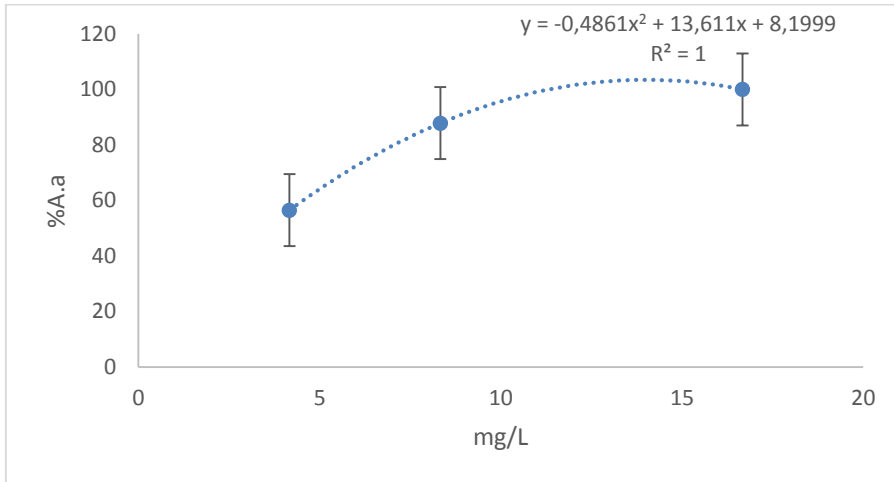
Ensayo ABTS^{•+}

Tabla 9. Ecuación de la recta e IC₅₀ (x) para la actividad antioxidante del control y flavonoides por el método ABTS^{•+}

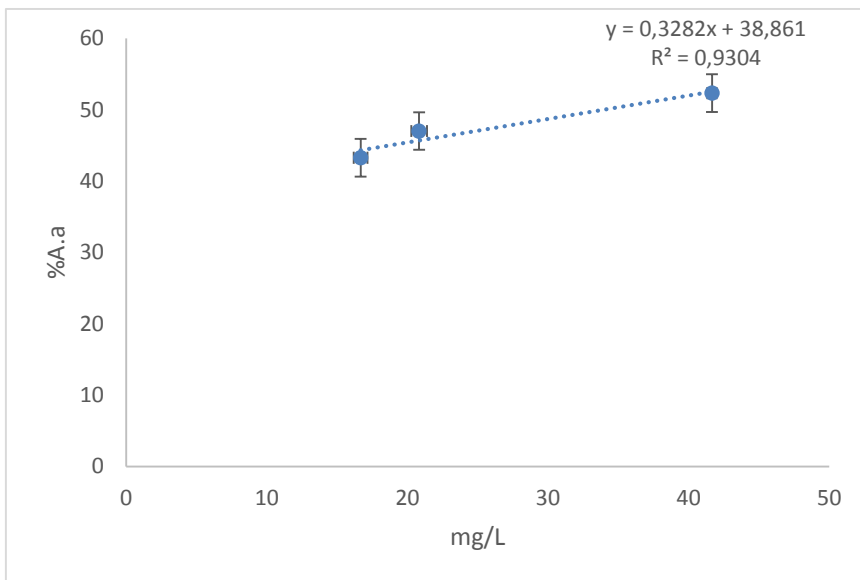
COMPUESTO	ECUACIÓN	R ²	X
Trolox	$y=12,238X + 12,639$	0,9959	3,05
Ct1	$y=4,894X + 19,352$	0,992	6,26
Ct2	$y = -0,4861x^2 + 13,611x + 8,1999$	1	3,51
Ct3	$y=0,3282X + 38,861$	0,9304	33,94
Ct4	$y=16,928X + 13,93$	0,9891	2,13



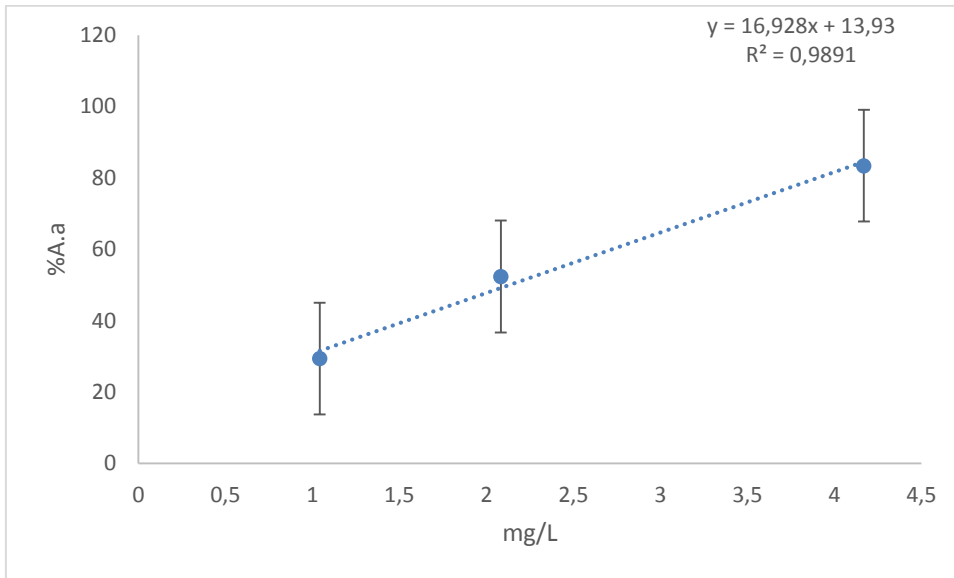
Gráfica 24. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct1 por el método ABTS^{•+}



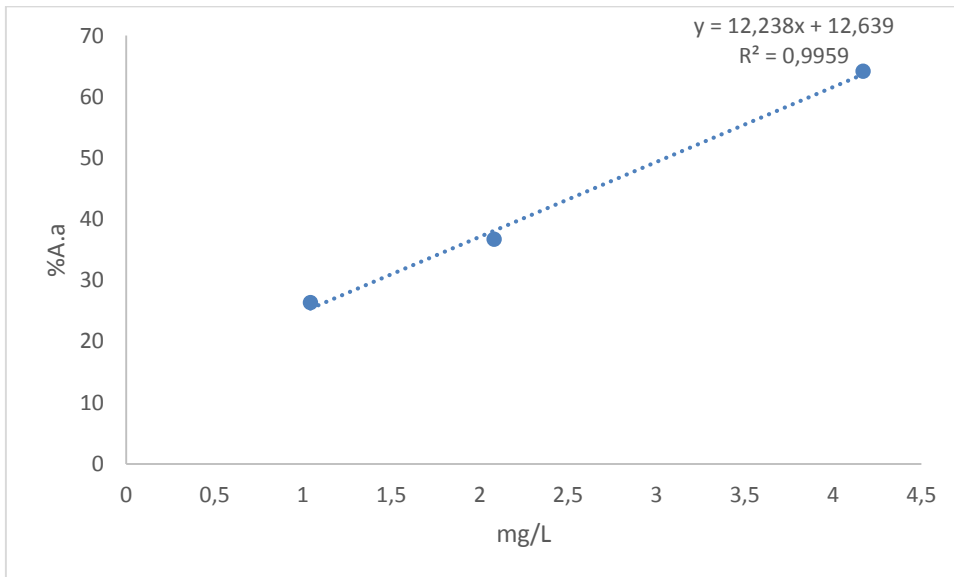
Gráfica 25. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct2 por el método ABTS•+



Gráfica 26. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct3 por el método ABTS•+



Gráfica 27. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para el flavonoide Ct4 por el método ABTS*+



Gráfica 28. Regresión lineal del porcentaje de actividad antioxidante vs concentración para trolox

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar cuál de los tratamientos es el mejor se usan pruebas a posteriori o

Post-hoc que organizan los tratamientos conforme a sus diferencias.

Pruebas Post-Hoc: (HSD Tukey y Scheffé)

Tabla 10. Pruebas Post-Hoc: (HSD Tukey y Scheffé) método DPPH•

		LNIC50DPPH•					
	Muestra	N	1	2	3	4	5
HSD de Tukey ^a	Quercetina	3	,7333				
	Ct4	3		,9167			
	Ct2	3			1,5767		
	Ct1	3				1,8667	
	Ct3	3					4,9267
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000
Scheffé ^a	Quercetina	3	,7333				
	Ct4	3		,9167			
	Ct2	3			1,5767		
	Ct1	3				1,8667	
	Ct3	3					4,9267
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000

El test de Scheffé y HSD de Tukey sirve para organizar los tratamientos conforme a sus diferencias, entre los flavonoides y el control, la prueba organiza por subconjuntos homogéneos aquellos que se parecen entre sí, para este caso todos los tratamientos fueron organizados en subconjuntos para cada uno, se debe mirar las medias para identificar cuál de ellos tiene menor media de IC₅₀ es decir cual requiere en promedio menor concentración para lograr el 50% de la inhibición del radical DPPH•.

Pruebas Post-Hoc: (HSD Tukey y Scheffé)

Tabla 11. Pruebas Post-Hoc: (HSD Tukey y Scheffé) método ABTS••.

		LNIC50ABTS••					
	Muestra	N	1	2	3	4	5
Hsd de Tukey	Ct4	3	,7567				
	Trolox	3		1,1167			
	Ct2	3			1,2567		
	Ct1	3				1,8333	
	Ct3	3					3,5233

	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Scheffé ^a	Ct4	3	,7567				
	Trolox	3		1,1167			
	Ct2	3			1,2567		
	Ct1	3				1,8333	
	Ct3	3					3,5233
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

El test de Scheffé y HSD de Tukey sirve para organizar los tratamientos conforme a sus diferencias, entre los flavonoides y los controles, la prueba organiza por subconjuntos homogéneos aquellos que se parecen entre sí, para este caso todos los tratamientos fueron organizados en subconjuntos para cada uno, se debe mirar las medias para identificar cuál de ellos tiene menor media de IC₅₀ es decir cual requiere en promedio menor concentración para lograr el 50% de la inhibición del radical ABTS^{•+}.