

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DEL EXTRACTO
ETANÓLICO OBTENIDO POR ULTRASONIDO A PARTIR DE HOJAS DE *Cymbopogon
citratu*s (LIMONCILLO) CULTIVADO EN EL MUNICIPIO DE TIMBÍO (CAUCA)**

DIANA ISABEL CORREA OTERO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA
DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)**

POPAYÁN

2017

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DEL EXTRACTO
ETANÓLICO OBTENIDO POR ULTRASONIDO A PARTIR DE HOJAS DE *Cymbopogon
citratu*s (LIMONCILLO) CULTIVADO EN EL MUNICIPIO DE TIMBÍO (CAUCA)**

DIANA ISABEL CORREA OTERO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Director

FABIO ANTONIO CABEZAS FAJARDO Ph.D.
PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Asesor

JUAN CARLOS ARGOTI BURBANO Ph.D.
PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Asesor

OSCAR DARÍO BERMÚDEZ ZAMBRANO M.Sc.
PROFESOR DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA
DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)**

POPAYÁN

2017

Nota de aceptación

Director

Fabio Antonio Cabezas Fajardo. Ph.D.

Jurado

Edier Humberto Pérez. Ph.D.

Jurado

Danny Alejandro Arteaga. Ph.D.

Dedicatoria

A Dios por sostener y fortalecer mi vida en cada momento, por cumplir su propósito en mí, por su infinito amor y fidelidad.

A mis padres Luis y Patricia, por su apoyo incondicional, amor, comprensión, por enseñarme y ayudarme a ser mejor cada día y por creer y apoyarme siempre en todos mis proyectos.

A mis hermanas Ángela, Silvia y Gabriela por su compañía y consejos.

A mi novio Juan David, por acompañarme y comprenderme en todo este proceso.

Al profesor Fabio por brindarme su confianza y su conocimiento.

A mis compañeros de carrera Xime, Meli y Juanjo.

"Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste"

Marie Curie

Agradecimientos

Al profesor Fabio Antonio Cabezas Ph.D., quien me ha guiado, enseñado y motivado para entrar en el maravilloso mundo de la ciencia para culminar mi carrera con éxito.

Al profesor Fernando Hernández Ph.D., por su asesoría en el análisis estadístico, buenas ideas y tiempo dedicado.

Al profesor Juan Carlos Argoti Ph.D., por su asesoría en los ensayos de actividad antioxidante.

A la profesora Diana Muñoz M. Sc., por su asesoría, tiempo dedicado y colaboración en el desarrollo del *Allium test*.

Al profesor Víctor Campo Ph.D., por la asesoría y ayuda en la actividad de toxicidad sobre *Artemia salina*.

Al profesor German Cuervo Ochoa Ph.D., por facilitarnos y colaborarnos en el uso del UV-vis y refractómetro de la Unidad de Análisis de Aguas.

Al profesor Bernardo Ramírez Ph.D., por ayudarnos en la clasificación de la planta en estudio.

Al profesor Oscar Darío Bermúdez M. Sc., por su colaboración.

A la profesora Elena Stashenko Ph.D., por recibirme en su laboratorio CROM-MASS, Universidad Industrial de Santander, para desarrollar la identificación de los compuestos del aceite esencial y a Yuri Córdoba quien me recibió y me colaboró en todo.

Al profesor Oscar Marino Mosquera Ph.D., y a los integrantes del grupo de Biotecnología - Productos Naturales, de la Universidad Tecnológica de Pereira, por recibirme en su laboratorio para poder realizar las determinaciones ORAC, FRAP y flavonoides y por brindarnos su valioso conocimiento.

Al Departamento de Química y profesores por contribuir en mi formación como profesional y como persona.

A la Universidad del Cauca por su apoyo y colaboración para presentar algunos resultados de este trabajo en diferentes eventos nacionales e internacionales

A Hamilton Martínez por su colaboración, ayuda, sus aportes y buen ambiente en el grupo de investigación QCB.

A Lina Trujillo por ayudarme y enseñarme tantas cosas de la ciencia y de la vida.

A Angie Rengifo por su colaboración y compañerismo en el grupo de investigación

A mis compañeros de grupo de investigación Hamilton Martínez, Lina Trujillo, Vanesa Bastidas, Anuar Caldón, Angie Rengifo, Alejandra Muñoz, Mary López, Norma Galíndez, Elizabeth Betancur por tantos momentos compartidos, cumpleaños, almuerzos, despedidas y un sin número de bellos recuerdos.

A mis compañeros de carrera Meliza Noriega, Ximena Prieto, Juan José Tobar, Diana Gómez, gracias por tantas risas, lágrimas y traspasadas.

Finalmente, a mi familia quienes han sido mi motor, mi apoyo y mi ayuda en todo momento, así como a mi novio por acompañarme y apoyarme durante toda mi carrera.

En fin, GRACIAS a todos los que contribuyeron a mi formación y a que este trabajo pueda ser concluido

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Fitoquímica	2
2.2 Metabolitos secundarios	2
2.2.1 Fenoles	2
2.3 Familia Poaceae	4
2.3.1 Género <i>Cymbopogon</i>	4
2.3.2 <i>Cymbopogon citratus</i>	4
2.3.3 Clasificación Taxonómica.....	5
2.3.4 Metabolitos secundarios de <i>Cymbopogon citratus</i>	6
2.4 Aceite esencial.....	7
2.5 Extracción por ultrasonido.....	7
2.6 Estrés oxidativo	8
2.7 Antioxidantes	9
2.8 Métodos de evaluación de capacidad antioxidante	9
2.8.1 Determinación de la capacidad antioxidante por el método del radical DPPH' ..	9
2.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante por el método del catión radical ABTS ⁺	11
2.8.3 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo ORAC	12
2.8.4 Determinación de la capacidad de reducción del ion férrico FRAP.....	13
2.8.5 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (FC)	14
2.8.6 Determinación de flavonoides totales por el método del tricloruro de aluminio.	14
2.9 Determinación de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	15
2.10 Ensayo de toxicidad en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	16

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5. METODOLOGÍA.....	20
5.1 REACTIVOS Y MATERIALES	20
5.2 MATERIAL VEGETAL	21
5.3 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	21
5.3.1 Extracción por ultrasonido.....	21
5.3.2 Extracción del aceite esencial	22
5.4 Tamizaje Fitoquímico.....	22
5.5 Fraccionamiento	22
5.6 Determinación de la actividad antioxidante	24
5.6.1 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH'	24
5.6.2 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS ⁺	24
5.6.3 Determinación de la capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)	25
5.6.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo FRAP	26
5.6.5 Cuantificación de fenoles totales	26
5.6.6 Cuantificación de flavonoides por el método de tricloruro de aluminio.....	27
5.7 Ensayo de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	27
5.8 Ensayo de toxicidad en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	28
5.9 Análisis por GC-MS	28
5.10 Análisis estadístico	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1 Rendimientos de extracción.....	31
6.2 Tamizaje fitoquímico	32

6.3 Actividad Antioxidante.....	33
6.3.1 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH'	33
6.3.2 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS ⁺	35
6.3.3 Determinación de la capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)	36
6.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo FRAP	38
6.3.5 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales	39
6.3.6 Correlaciones	41
6.4 Determinación de los compuestos del aceite esencial de <i>C. citratus</i>	42
6.5 Ensayo de determinación de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	45
6.6 Ensayo de toxicidad en células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	46
7. CONCLUSIONES	50
8. RECOMENDACIONES	52
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	Absorbancia
Á.A	Ácido ascórbico
A.E	Aceite esencial
AAPH	cloruro de 2,2'- azobis-(2- amidinopropano)
ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato
Acu	Acuosa
AcOEt	Acetato de etilo
BHT	Butilhidroxitolueno
BuOH	Butanol
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de especies vegetales aromáticas y medicinales tropicales
CL₅₀	Concentración letal 50
CV	Coeficiente de variación
D.E	Dosis eficaz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
ELL	Extracción Líquido-Líquido
EM	Espectrometría de masas
eq	Equivalente
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
EET	Extracto etanólico total
ES	Extracto seco
FC	Folin Ciocalteu
FRAP	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante
g	Gramos
HAT	Hydrogen atom transfer (transferencia de átomo de hidrogeno)
Hex	Hexano
IC₅₀	Concentración capaz de inhibir 50 % de la actividad máxima
IE	Impacto con electrones
IRL	Índice de retención lineal
IM	Índice mitótico

L-L	Líquido - líquido
MeOH	Metanol
mL	mililitro
mg	miligramos
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
ORAC	Capacidad de Absorbancia de los Radicales Libres de Oxígeno
OH[·]	Radical hidroxilo
P	Significancia
PBS	Solución de buffer fosfatos
QCB	Química de Compuestos Bioactivos
ppm	Partes por millón
RL	Radical libre
R²	Coeficiente de correlación
SET	Single electron transfer (transferencia de un solo electrón)
SD	Desviación Estándar
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
Tungsteno	W
TPC	Contenido de fenoles totales
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
%AA	Porcentaje de actividad antioxidante
λ	Longitud de onda
α-T	Tocoferol
μg	Microgramo
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esqueletos carbonados de algunos polifenoles.	3
Figura 2. Plantas de la familia Poaceae. A. <i>Pennisetum purpureum</i> , B. <i>Coix lacryma-jobi</i> , C. <i>Sorghum bicolor</i>	4
Figura 3. Planta de <i>Cymbopogon citratus</i> A. Tallos ramificados, B. Planta en su hábitat. Fuente: Fotografía tomada por Diana Correa. Lugar: Finca vereda Barro blanco, Timbío-Cauca. Fecha 20/06/2016.....	5
Figura 4. Compuestos fenólicos presentes en infusiones de <i>C. citratus</i> A. Ácido caféico, B. Trans p-ácido cumárico, C. Luteolina, D. Glicosilflavonas, E. Isoorientina.	6
Figura 5. Estructuras de los componentes mayoritarios del A.E de <i>C. citratus</i> . A. Isómeros del citral, B. Mirceno, C. Linalol.....	7
Figura 6. Curva de decaimiento de fluorescencia en presencia de un antioxidante.	12
Figura 7. <i>Artemia Salina</i> A. Huevos, B. Nauplio en eclosión, C. Nauplio. Fuente: Fotografía tomada por Diana Correa. Lugar: Laboratorios docencia Biología, Universidad del Cauca. Fecha: 22/02/2017.....	16
Figura 8. Diagrama del proceso de fraccionamiento del extracto etanólico total de <i>C. citratus</i> (EET).	23
Figura 9. Distribución de reactivos en microplaca de poliestireno.	25
Figura 10. Diagrama que ilustra el protocolo para la determinación de la capacidad reductora de hierro.	26
Figura 11. Valores de IC ₅₀ (mg/L) obtenidos para el extracto etanólico de <i>C. citratus</i> , sus fracciones y los patrones ácido ascórbico (A.A), BHT y α -Tocoferol (α -T) por DPPH'.....	34
Figura 12. Valores de IC ₅₀ obtenidos para el extracto etanólico de <i>C. citratus</i> , sus fracciones y los patrones ácido ascórbico, BHT y α -Tocoferol por el método ABTS ⁺	35
Figura 13. Intensidad de fluoresceína para extractos y fracciones de <i>C. citratus</i>	37
Figura 14. Valores ORAC del extracto etanólico, fracciones y aceite esencial de hojas de <i>C. citratus</i>	38
Figura 15. Actividad antioxidante determinada por el método FRAP del extracto etanólico, fracciones y aceite esencial de <i>C. citratus</i>	39
Figura 16. Cuantificación de fenoles y flavonoides en el extracto etanólico y fracciones de <i>C. citratus</i>	41
Figura 17. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>C. citratus</i> . Columna DB-5.	43
Figura 18. Componentes mayoritarios presentes en el AE de <i>C. citratus</i>	43

Figura 19. Toxicidad expresada en CL ₅₀ del extracto etanólico, fracciones y aceite esencial de <i>C. citratus</i> frente <i>Artemia salina</i>	46
Figura 20. Fitotóxicidad en raíces de <i>Allium cepa</i> causado por extracto etanólico de <i>C. citratus</i>	47
Figura 21. Inhibición en el crecimiento radicular de bulbos de <i>Allium cepa</i> , causado por extracto etanólico de <i>C. citratus</i> a diferentes concentraciones.....	48
Figura 22. Células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expuestas al extracto etanólico de <i>C. citratus</i> . A. Interfase B. Profase C. Metafase temprana D. Metafase tardía E. Anafase F. Telofase G. Panorámica de células meristemáticas.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles según su estructura base	3
Tabla 2. Fitoconstituyentes de <i>C. citratus</i> y sus actividades biológicas.....	6
Tabla 3. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	8
Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes ⁴⁷	9
Tabla 5. Clasificación de algunos ensayos de actividad antioxidante según su mecanismo HAT, SET o mixto ^{43,44}	11
Tabla 6. Reactivos, materiales y equipos de laboratorio utilizados.....	20
Tabla 7. Reacciones empleadas para la determinación cualitativa de metabolitos	22
Tabla 8. Parámetros cromatográficos empleados en el análisis del A.E de <i>C. citratus</i>	29
Tabla 9. Porcentajes de rendimiento de extracción y fraccionamiento	31
Tabla 10. Compuestos presentes en el extracto etanólico proveniente de hojas de <i>C. citratus</i> determinados por tamizaje fitoquímico.....	32
Tabla 11. Actividad antioxidante de extractos y fracciones de <i>C. citratus</i> por DPPH [•] y ABTS ^{•+}	33
Tabla 12. Valor ORAC y FRAP para los extractos de extractos y fracciones de <i>C. citratus</i>	37
Tabla 13. Contenido de fenoles y flavonoides en extracto y fracciones de <i>C. citratus</i>	40
Tabla 14. Coeficientes de correlación de Pearson entre el contenido de fenoles, flavonoides totales, y la actividad antioxidante encontrada por los métodos DPPH [•] , ABTS ^{•+} , ORAC y FRAP de las fracciones y el extracto etanólico total de hojas de <i>C. citratus</i>	42
Tabla 15. Composición química y cantidad relativa del A.E de <i>C. citratus</i>	44
Tabla 16. Clasificación toxicidad según el CYTED ⁹⁴	45
Tabla 17. Índices mitóticos y de fase para las células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expuesta a diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>C. citratus</i>	48

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción del DPPH [·] y A. Antioxidante, B. Ácido ascórbico.....	10
Esquema 2. Reacción del ABTS ^{•+} en presencia de un antioxidante.....	11
Esquema 3. Mecanismo para la oxidación de la fluoresceína.....	13
Esquema 4. Reacción del método de FRAP.....	14
Esquema 5. Reacciones que ocurren en la cuantificación de flavonoides.....	15

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. CURVAS DE CALIBRACIÓN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	61
ANEXO 2. CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	64
ANEXO 3. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.....	65

RESUMEN

Los compuestos bioactivos son moléculas producto del metabolismo secundario de las plantas, estos pueden tener infinidad de aplicaciones, por lo que a través de la historia el ser humano ha empleado las plantas como recurso valioso para el tratamiento de diferentes enfermedades, transmitiendo de generación en generación el conocimiento sobre las propiedades que estas tienen.

En el presente trabajo se realizó la identificación cualitativa de metabolitos secundarios mediante el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total, con lo que se determinó cualitativamente la presencia de compuestos como flavonoides, cumarinas entre otros compuestos.

Se evaluó la actividad antioxidante por los métodos DPPH[•], ABTS^{•+}, ORAC y FRAP del extracto etanólico, fracciones (hexano, acetato de etilo, butanol, acuosa) y aceite esencial obtenidos a partir de hojas de *Cymbopogon citratus*, encontrando que la fracción de butanol en todos los métodos presentó la mayor actividad antioxidante, también se realizó la cuantificación de fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico y fracciones, con lo que se determinó que las muestras tienen un alto contenido de polifenoles, siendo la fracción de butanol la que presentó la mayor cantidad en ambos casos.

El aceite esencial fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, con lo que se logró la identificación de componentes como linalol, mirceno, geraniol, tridecanona y se encontró que el citral corresponde al 75,4% del aceite.

Además, se determinó la toxicidad sobre *Artemia salina* del extracto etanólico, así como de fracciones y del aceite esencial de la planta en estudio, siendo el aceite esencial extremadamente tóxico a las 6 y 24 horas de exposición, en cuanto a las demás muestras el extracto etanólico y la fracción de hexano fueron los que mostraron mayor toxicidad.

Se realizó un estudio de fitotóxicidad y citotoxicidad del extracto etanólico total en células radiculares de *Allium cepa*, los resultados mostraron alta inhibición del proceso de mitosis lo que conllevó a escaso crecimiento de las raíces.

Palabras clave: *Cymbopogon citratus*, DPPH[•], ABTS^{•+}, ORAC, FRAP, fenoles, citral, *Artemia salina*.

ABSTRACT

Compounds bioactives are molecules product of secondary metabolism of plants, those can have many applications that throughout history the human being has used plants as a valuable resource for the treatment of different diseases, transmitted from generation to generation properties that they have.

This work was carried out the qualitative identification of secondary metabolites by total ethanolic extract phytochemical screening, also was evaluated the antioxidant activity by the DPPH methods*, ABTS*⁺, ORAC and FRAP of ethanolic, fractions and essential oil obtained from the leaf extract of *Cymbopogon citratus*, found that the fraction of butanol in all methods presented the greatest antioxidant activity, also quantification of phenols and total flavonoids in extract ethanolic and fractions, was conducted which determined that the samples contain high levels of polyphenols being the fraction of butanol which presented the largest number in both cases.

The essential oil was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry, which achieved the identification of components and determined that the citral corresponds to 75.4% of the oil.

In addition, determined the toxicity of *Artemia salina* of ethanolic extract, as well as fractions and the essential oil of the plant study, being extremely toxic essential oil at 6 and 24 hours of exposure, in terms of other samples the ethanolic extract and hexane fraction were showing greater toxicity.

A study of phytotoxicity and cytotoxicity of the total ethanolic extract in *Allium cepa* root cells was carried out. The results showed high inhibition of the mitosis process, which led to low root growth as well as mitosis.

Key words: *Cymbopogon citratus*, DPPH*, ABTS*⁺, ORAC, FRAP, phenols, citral, *Artemia salina*

1. INTRODUCCIÓN

El *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, es una planta herbácea de la familia de las gramíneas, nativa de la India y Asia tropical, aunque en la actualidad crece alrededor de todo el mundo en climas tropicales o subtropicales, necesita abundante lluvia y exposición solar.

Esta planta es ampliamente utilizada en medicina tradicional para el tratamiento de trastornos nerviosos y gastrointestinales¹, así como también se ha reportado la actividad antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Nocardia* sp, *Serratia* sp, *Enterobacteria aeruginosa* y alta actividad antioxidante determinada por el método DPPH[•] en extractos acuosos, metanólicos y clorofórmicos obtenidos por el método de Soxhlet².

Los aceites esenciales son usados en gran cantidad en la industria alimentaria, farmacéutica, de fragancias, cosméticos y productos de aseo, por lo que la producción de los mismos está relacionada con el desarrollo agrícola, establecimiento y manejo de cultivos industriales para la obtención de la materia prima. Las hojas de *C. citratus* contienen del 1-2% de aceite esencial, en el que el componente mayoritario es el citral, compuesto que tiene gran variedad de aplicaciones y propiedades como: aditivo alimentario, precursor en síntesis de iononas, vitamina A y β -caroteno, agente contra células leucémicas, también ha demostrado tener una alta actividad antimicrobiana contra 42 microorganismos entre ellos 20 bacterias, 7 levaduras y 15 hongos; se han reportado numerosos estudios de su actividad antimutagénica en células mamarias e inhibición de cáncer de hígado y de mucosa intestinal en ratones, lo cual se atribuye a los compuestos geranial, neral y mirceno³.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fitoquímica

La fitoquímica es una rama de la ciencia que se encarga de estudiar las moléculas producidas en el metabolismo secundario de las plantas, tiene una gran importancia para la determinación de los componentes bioactivos de un material vegetal medicinal, su cuantificación y análisis de los efectos beneficiosos y perjudiciales a la salud humana⁴.

2.2 Metabolitos secundarios

Los productos naturales han sido una parte importante en la historia de la medicina humana, esto debido al contenido de metabolitos secundarios presentes en extractos vegetales, muchos de los cuales han sido incorporados en la medicina occidental⁵, uno de ellos es la digoxina, metabolito extraído de la *Digitalis lanata*⁶. Dentro de los medicamentos existentes el 25% provienen de plantas, ya sea como un compuesto puro o derivado⁷.

Los metabolitos secundarios son definidos como un variado grupo de moléculas activas que no tienen un papel bien establecido en el mantenimiento de procesos vitales fundamentales como el crecimiento en plantas. Algunos de ellos son subproductos extraños de las vías metabólicas debido a la actividad enzimática variada o biosintetizados a partir de uno o más metabolitos generales por una amplia variedad de vías metabólicas^{4,8}. Uno de los grupos más importantes es el de los fenoles.

2.2.1 Fenoles

Los fenoles son biosintetizados por dos vías metabólicas, la del ácido shiquímico y la de los policétidos siendo la primera la más utilizada por las plantas, la cual parte de la eritrosa-4-fosfato y del ácido fosfoenolpirúvico conduciendo a la formación de aminoácidos aromáticos, ácido cinámico y derivados fenilpropanoides⁹, debido a las numerosas rutas metabólicas se obtienen numerosos compuestos fenólicos como: flavonoides, ácidos fenólicos, isoflavonoides, estilbenos, lignanos, cumarinas, polímeros fenólicos y antocianidinas¹⁰, algunos ejemplos se presentan en la figura 1.

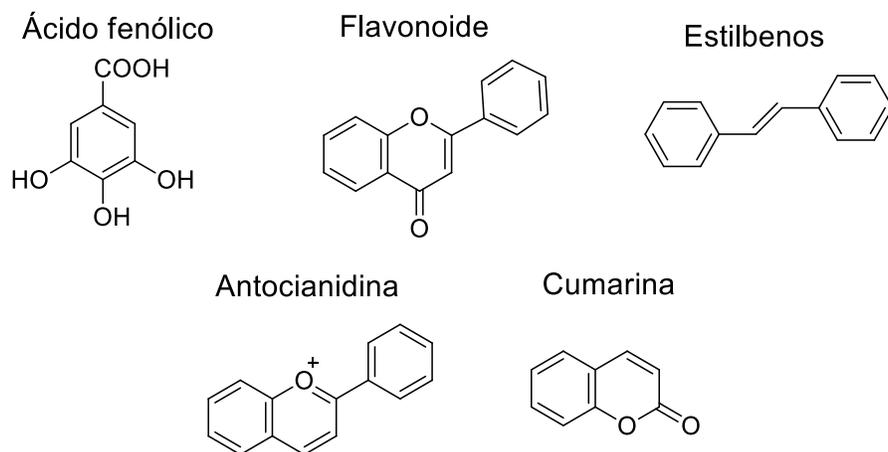


Figura 1. Esqueletos carbonados de algunos polifenoles.

Los fenoles pueden clasificarse en dos grandes grupos según su estructura base en flavonoides y no flavonoides los cuales se dividen en otros tipos de compuestos según las sustituciones que sufra el esqueleto principal¹¹ los cuales se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles según su estructura base.

Flavonoides	Ejemplos	No flavonoides	Ejemplos
Flavonoles	Quercetina, kaempferol	Alcoholes fenólicos	Metil fenol
Flavonas	Luteolina, apigenina	Ácidos fenólicos	Ácido gálico, ácido vinílico
Flavanonas	Pinocembrina, Naringenina	Estilbenos	Resveratrol, astringina
Flavanoles	Catequina, epigallocatequina	Lignanós	Enterodiól, pinosinol
Antocianidinas	Cianidina, petunidina	Cumarinas	Esculetina, warfarina
Isoflavonas	Genisteína, daidzeína	Chalconas	Buteina, phloretina

Este tipo de metabolitos se caracterizan principalmente por presentar actividad antioxidante, lo que se ha correlacionado con la estructura, número y posición del grupo hidroxilo donador de hidrógeno a diferentes tipos de radicales y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno^{11,12}, por lo que se les atribuyen propiedades como antiinflamatorios¹³⁻¹⁵, antimutagénicos¹⁶, anticancerígenos^{16,17}, neuroprotectores¹⁸⁻²⁰, cardioprotectores²¹⁻²⁴.

2.3 Familia Poaceae

La familia Poaceae o también llamada Gramineae se caracteriza por su amplia distribución en diferentes países del mundo, desde el Ecuador hasta los círculos polares, en todos los pisos térmicos presentando su mayor dominancia en el trópico. A esta familia pertenecen unas 10.000 especies las cuales se agrupan a su vez en 650 géneros y 26 tribus; aproximadamente 400 especies de esta familia son plantas cultivadas, mientras que unas 40 se usan como pastos mejorados. Las Poaceae juegan un papel muy importante en la economía mundial y son la base de la alimentación humana, pertenecen a esta familia algunos cereales como el *Triticum aestivum* (trigo) y pastos como el *Saccharum guadua* (caña de azúcar), algunas especies representativas de esta familia se presentan a continuación en la figura 2 (A, B, C)^{25,26}.



Figura 2. Plantas de la familia Poaceae. **A.** *Pennisetum purpureum*, **B.** *Coix lacryma-jobi*, **C.** *Sorghum bicolor*.

2.3.1 Género *Cymbopogon*

Las especies del género *Cymbopogon* en cuanto a sus características morfológicas tienen muchas similitudes entre sí, las cuales se evidencian en partes vegetativas con macollas compactas, rizomas y tallos cortos, además de hojas erectas y con acumulación de aceite esencial, el cual es almacenado exactamente en el mesófilo²⁷.

2.3.2 *Cymbopogon citratus*

El *Cymbopogon citratus* (*C. citratus*) es una hierba robusta, de rápido crecimiento, con numerosos tallos, hojas alargadas las cuales se destacan por su gran aroma. Por lo anterior esta planta es ampliamente cultivada en todo el mundo como materia prima para la

obtención de citral, un compuesto de gran valor en la industria y que se encuentra como componente principal en el aceite esencial²⁸; esta planta también se caracteriza por tener altos contenidos de fenoles entre otros compuestos aromáticos²⁹. En la figura 3 (A, B) se ilustran los tallos ramificados y un ejemplar de *C. citratus* en su hábitat natural.



Figura 3. Planta de *Cymbopogon citratus* **A.** Tallos ramificados, **B.** Planta en su hábitat.

Fuente: Fotografía tomada por Diana Correa. Lugar: Finca vereda Barro blanco, Timbío- Cauca. Fecha 20/06/2016.

De esta especie se encuentran gran cantidad de estudios enfocados en sus propiedades medicinales y actividades biológicas entre otros¹, entre las cuales se destacan: efecto antibacterial^{2,30}, efecto gastroprotector³¹, efecto antiinflamatorio y antioxidante^{14,15}, efecto acaricida³², conservante de alimentos³³, material biosorbente de níquel³⁴, todas estas propiedades se deben a su alto contenido de metabolitos secundarios. Esto hace que el *Cymbopogon citratus* sea una planta apetecida para ser estudiada.

2.3.3 Clasificación Taxonómica

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelinidae

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia: Panicoideae

Tribu: Andropogoneae

Género: *Cymbopogon*

Especie: *Cymbopogon citratus*

2.3.4 Metabolitos secundarios de *Cymbopogon citratus*

Como se ha indicado anteriormente los metabolitos secundarios son los responsables de la alta actividad biológica que presentan los extractos de *C. citratus*. En la tabla 2 se mencionan algunos de ellos¹:

Tabla 2. Fitoconstituyentes de *C. citratus* y sus actividades biológicas.

Fitoconstituyente	Actividad biológica
Flavonoides	Antioxidante, antipirético, antimicrobiano
Alcaloides	Astringente, acción neurofarmacológica
Vitaminas	Antioxidante, acción cardioprotectora
Taninos	Antimicrobiano, antioxidante, astringente, antiinflamatorio
Saponinas	Antiinflamatorio, astringente suave, hipocolesterolémico
Aceite esencial	Aromaterapia, conservante de alimentos, antidiabético, antimicrobiano, diurético, antiinflamatorio, antioxidante, anticancerígeno, acción neurofarmacológica, hipoglucémico.

Dentro de los metabolitos del *C. citratus* se han estudiado compuestos fenólicos, entre ellos ácidos fenólicos y flavonoides^{29,35}, algunas estructuras se registran en la figura 4.

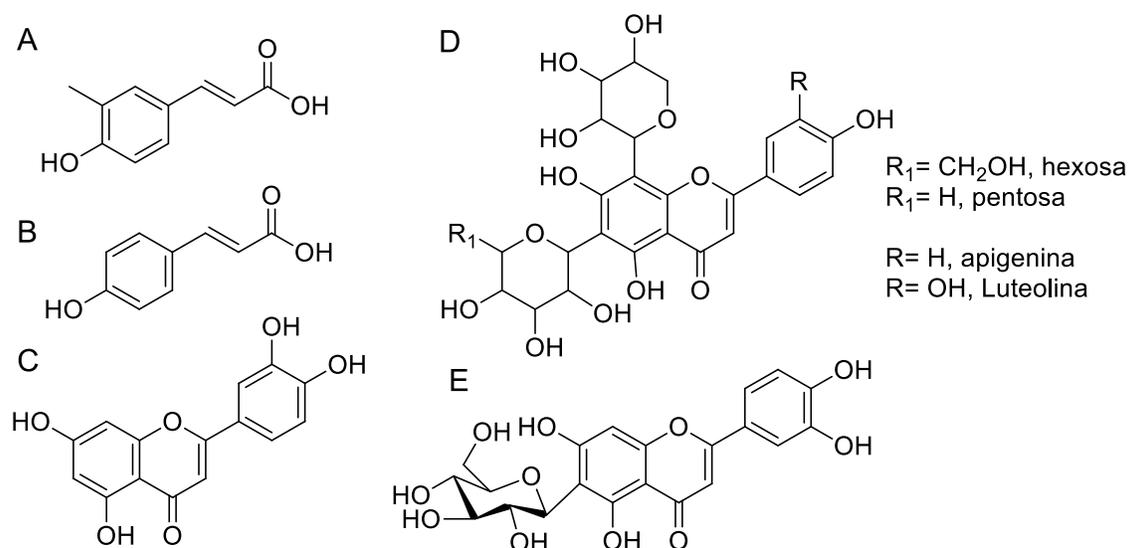


Figura 4. Compuestos fenólicos presentes en infusiones de *C. citratus* **A.** Ácido caféico, **B.** Trans p-ácido cumárico, **C.** Luteolina, **D.** Glicosilflavonas, **E.** Isoorientina.

2.4 Aceite esencial

Los aceites esenciales (A.E) son mezclas de lipófilos volátiles y compuestos terpenoides generalmente.

Se han reportado más de 30 componentes del A.E de *C. citratus*, en general el aceite de diferentes especies de *Cymbopogon* comparten perfiles similares. En la figura 5 se ilustran algunos de los compuestos principales del A.E como: citral (A), mirceno (B) y linalol (C)³⁶, los cuales generalmente son los responsables de la alta actividad biológica que este presenta .

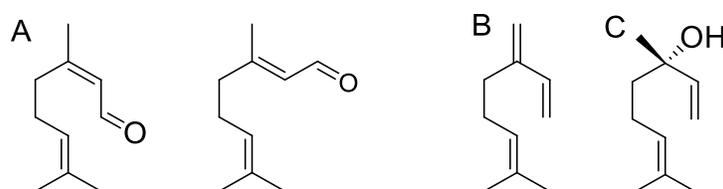


Figura 5. Estructuras de los componentes mayoritarios del A.E de *C. citratus*. **A.** Isómeros del citral, **B.** Mirceno, **C.** Linalol.

2.5 Extracción por ultrasonido

La extracción por ultrasonido de metabolitos de las plantas es una técnica muy utilizada, debido a que se generan ondas de una frecuencia de 20000 Hz que facilitan la extracción de los compuestos bioactivos del material vegetal esto gracias al fenómeno llamado cavitación³⁷, esto genera una alta energía alrededor de las moléculas de disolvente y formación de microburbujas asimétricas, causando la disrupción celular y a su vez una mejor penetración del disolvente en las célula facilitando la liberación de los compuestos celulares en disolvente³⁸⁻⁴⁰. Como consecuencia de esto se obtienen altos porcentajes de rendimientos de extracción con un enriquecido contenido de metabolitos de la planta en estudio, y con menor tiempo que al utilizado por las técnicas convencionales⁴¹.

Estudios recientes reportan las bondades de la extracción de xantonas y compuestos fenólicos, destacando otras ventajas de este método como, bajo consumo de disolventes, proceso de extracción directa y extracción de moléculas de bajo peso molecular y baja volatilidad^{40,42}.

2.6 Estrés oxidativo

Los organismos aeróbicos necesitan de oxígeno para llevar a cabo su metabolismo, por lo cual al interior de la célula se producen un gran número de reacciones en las cuales se genera ATP y el oxígeno finalmente se reduce a agua, pero así como se logra la producción de moléculas esenciales para la vida, también se generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Tabla 3), subproductos altamente tóxicos que producen un desequilibrio al interior de la célula trayendo como consecuencias daño de las proteínas, lípidos o incluso del ADN, generando necrosis, apoptosis o reacciones en cadena que pueden llegar a producir enfermedades como cáncer, diabetes, artritis entre otras⁴³.

El estrés oxidativo puede ser también la consecuencia de exposición constante a diferentes fuentes de radiación y contaminación y las especies generadas pueden tener o no naturaleza radicalaria o iónica. En la tabla 3 se muestran las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) causantes del estrés oxidativo⁴⁴.

Tabla 3. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

	ERO		ERN	
Radicales	Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Óxido nítrico	NO^{\cdot}
	Hidroxilo	$\cdot OH$	Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\cdot}
	Alcoxilo	RO^{\cdot}		
	Hidroperoxilo	HOO^{\cdot}		
No radicales	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Peroxinitrito	$ONOO^-$
	Ácido hipocloroso	$HClO$	Ácido nitroso	HNO_2^+
	Ozono	O_3	Catión nitrilo	NO_2^+
	Oxígeno singlete	1O_2	Anión nitroxilo	NO^-
			Alquil	$ROONO$

El cuerpo humano ha creado estrategias para mitigar los efectos causados por los ERO y ERN, entre los cuales se encuentran los antioxidantes endógenos, son enzimas que mantienen el equilibrio oxidativo en las células, sin embargo, cuando este sobrepasa los límites en los que pueden ser controlados, el cuerpo puede sufrir lesiones irreversibles, por lo que el consumo exógeno de antioxidantes es vital para la protección celular⁴⁴.

2.7 Antioxidantes

Un antioxidante se define como "cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo a una molécula biológica" o también es la capacidad que tiene un compuesto para neutralizar los radicales libres⁴⁵. Los antioxidantes se pueden clasificar teniendo en cuenta los criterios de solubilidad, mecanismos de defensa y origen^{46,47} (Tabla 4):

Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes.

Criterio	Clasificación	Ejemplos
Solubilidad	Hidrofílicos	Vitamina C
	Hidrofóbicos	Carotenoides y vitamina E
Mecanismo de defensa	Preventivos	Glutación peroxidasa, catalasa
	Atrapadores de radicales	Flavonoides, BHT
	Reparadores	Enzimas proteolíticas o reparadoras
Origen	Natural	Quercetina, pinocembrina
	Sintético	BHA, TBHQ

2.8 Métodos de evaluación de capacidad antioxidante

Para poder determinar si una molécula o sustancia tiene capacidad antioxidante o no, existen diferentes experimentos que miden la capacidad antirradicalaria, estos ensayos se basan en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno, de electrones y en algunos casos el mecanismo puede ser mixto, es decir que incluye las dos reacciones. Según el mecanismo que siga la reacción se pueden establecer diferencias entre los métodos existentes. En tabla 5 se presentan algunos de los métodos y el tipo de reacción que se lleva a cabo.

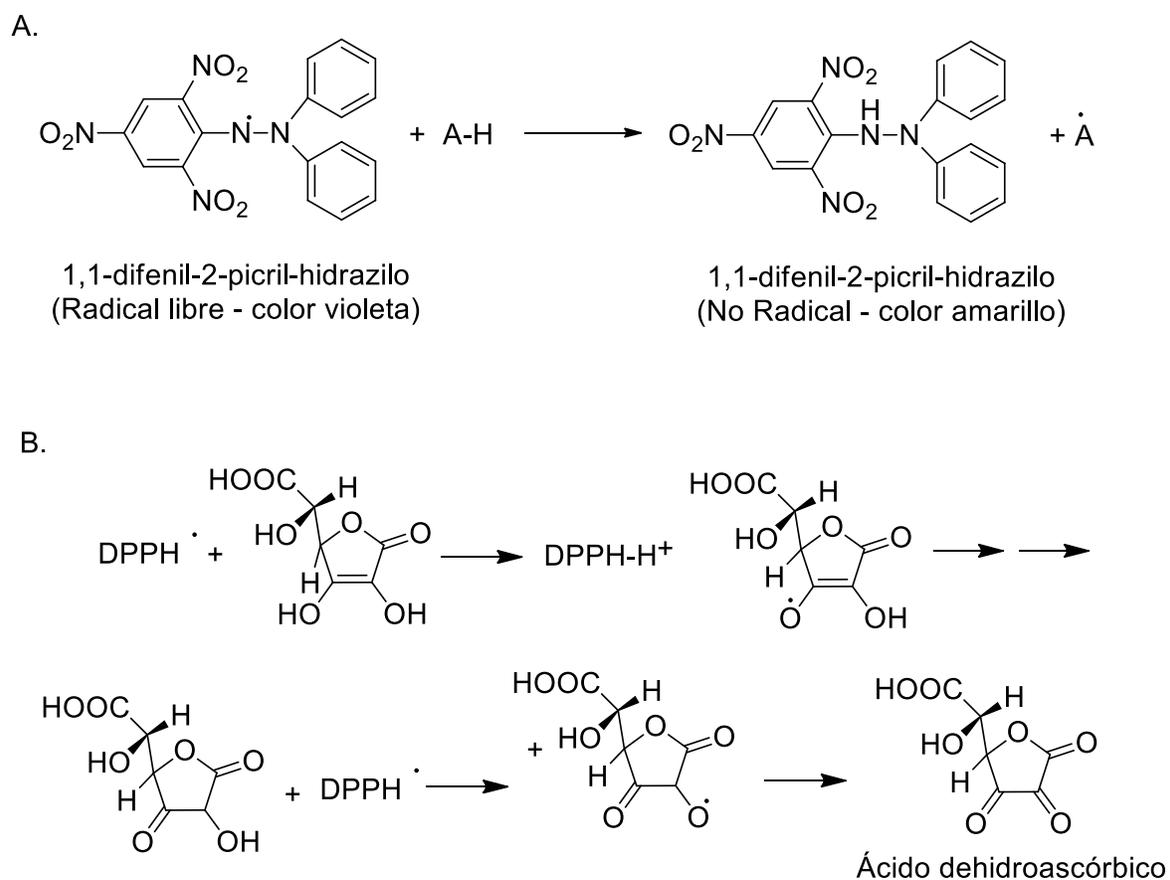
2.8.1 Determinación de la capacidad antioxidante por el método del radical DPPH·

Este método es ampliamente usado para la determinación de actividad antioxidante no solo en extractos vegetales, sino también en semillas, aceites, verduras, cereales y harinas. A pesar de que el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo no tiene mucha similitud con los radicales

generados fisiológicamente en los organismos, es muy estable en solución metanólica o etanólica. Además, por la facilidad y corta duración del ensayo, se considera un método de barrido para determinar moléculas antioxidantes. La reacción principal del radical y el antioxidante es la aceptación y donación de un átomo de hidrogeno o de un electrón⁴⁸.

La determinación de actividad antioxidante es un método colorimétrico en el cual se mide el cambio de color de morado intenso a amarillo en presencia de un antioxidante y se monitorea espectrofotométricamente. La reacción del radical con el antioxidante se presenta en el esquema 1.

En la reacción de neutralización del DPPH[·] con ácido ascórbico, en la primera etapa, el antioxidante, cede un hidrógeno, produciéndose una transferencia de electrones de doble enlace, seguido a esto ocurre una segunda pérdida de hidrogeno. De acuerdo a esta reacción, el ácido ascórbico cede dos hidrógenos, explicando así su eficiencia como un excelente antioxidante⁴⁹.



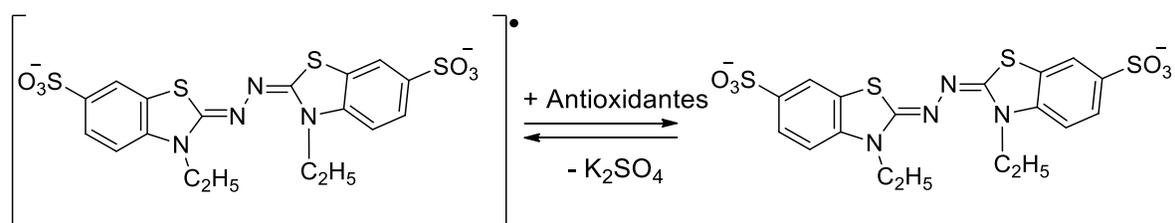
Esquema 1. Reacción del DPPH[·] y **A.** Antioxidante, **B.** Ácido ascórbico.

Tabla 5. Clasificación de algunos ensayos de actividad antioxidante según su mecanismo HAT, SET o mixto^{43,44}.

Ensayos que implican reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
ORAC (capacidad de absorber radicales de oxígeno)
TRAP (parámetro antioxidante de captura radical total)
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico
Ensayos que implican una reacción de transferencia de electrones (SET)
FRAP (parámetro antioxidante reductor de iones férricos)
CUPRAC (Potencia reductora de cobre (II))
Ensayos mixtos SET y HAT
DPPH [•] (radical difenil - 1 - picrilhidracil)
ABTS ^{•+} (radical 2,2 - azinobis, 3 - etilbenzotiazolina - 6 - sulfónico)

2.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante por el método del catión radical ABTS^{•+}

El ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) es una molécula orgánica la cual se oxida para generar ABTS^{•+}, un catión radical estable en soluciones acuosas y orgánicas, es un método muy utilizado por su simplicidad y reproducibilidad, pero debido a que su estructura es poco similar a los radicales o especies reactivas generadas en organismos biológicos bajo estrés oxidativo, la estimación de la capacidad antioxidante se ve de forma muy generalizada⁴⁵. Este método mide el atrapamiento del radical por parte de las moléculas antioxidantes con lo que se observa una variación de color azul a tonos más claros o incluso a la decoloración total la cual se mide en un espectrofotómetro. La reacción entre el radical y un antioxidante se observa en el esquema 2:



Esquema 2. Reacción del ABTS^{•+} en presencia de un antioxidante.

2.8.3 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo ORAC

Este método evalúa la capacidad de una muestra para consumir radicales peroxilo, los cuales se generan por la descomposición térmica del AAPH (cloruro de 2,2'- azobis (2-amidinopropano)), en el ensayo se emplea fluoresceína (3',6'-dihidroxi-spiro (isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanteno)-3-ona), la pérdida de esta mide el daño causado por los radicales peroxilo por lo que se considera un método indirecto para evaluar capacidad antioxidante.

El efecto inhibitorio de radicales se mide con el área neta bajo la curva (AUC neta) de intensidad de fluoresceína de la muestra comparada con el blanco, la cual se determina combinando el porcentaje de inhibición y el tiempo de inhibición¹⁹ (Figura 6).

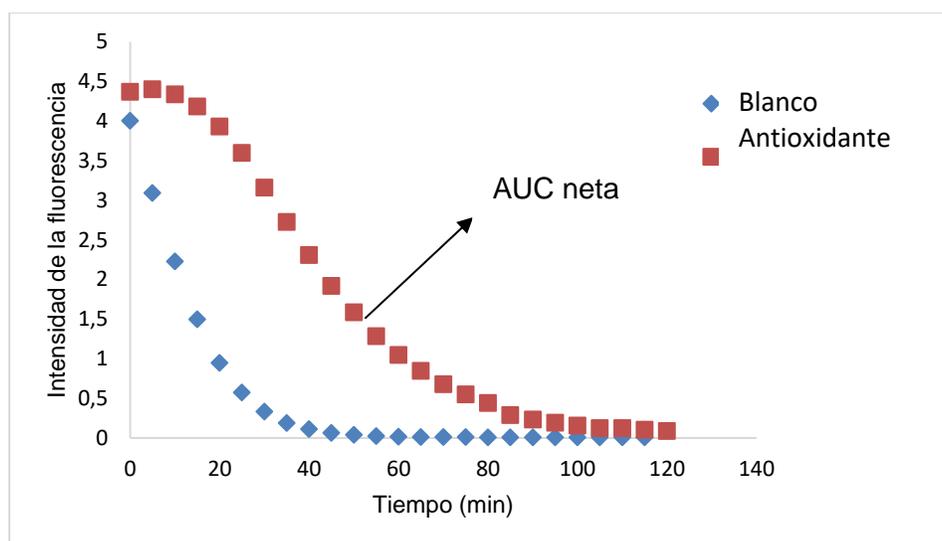
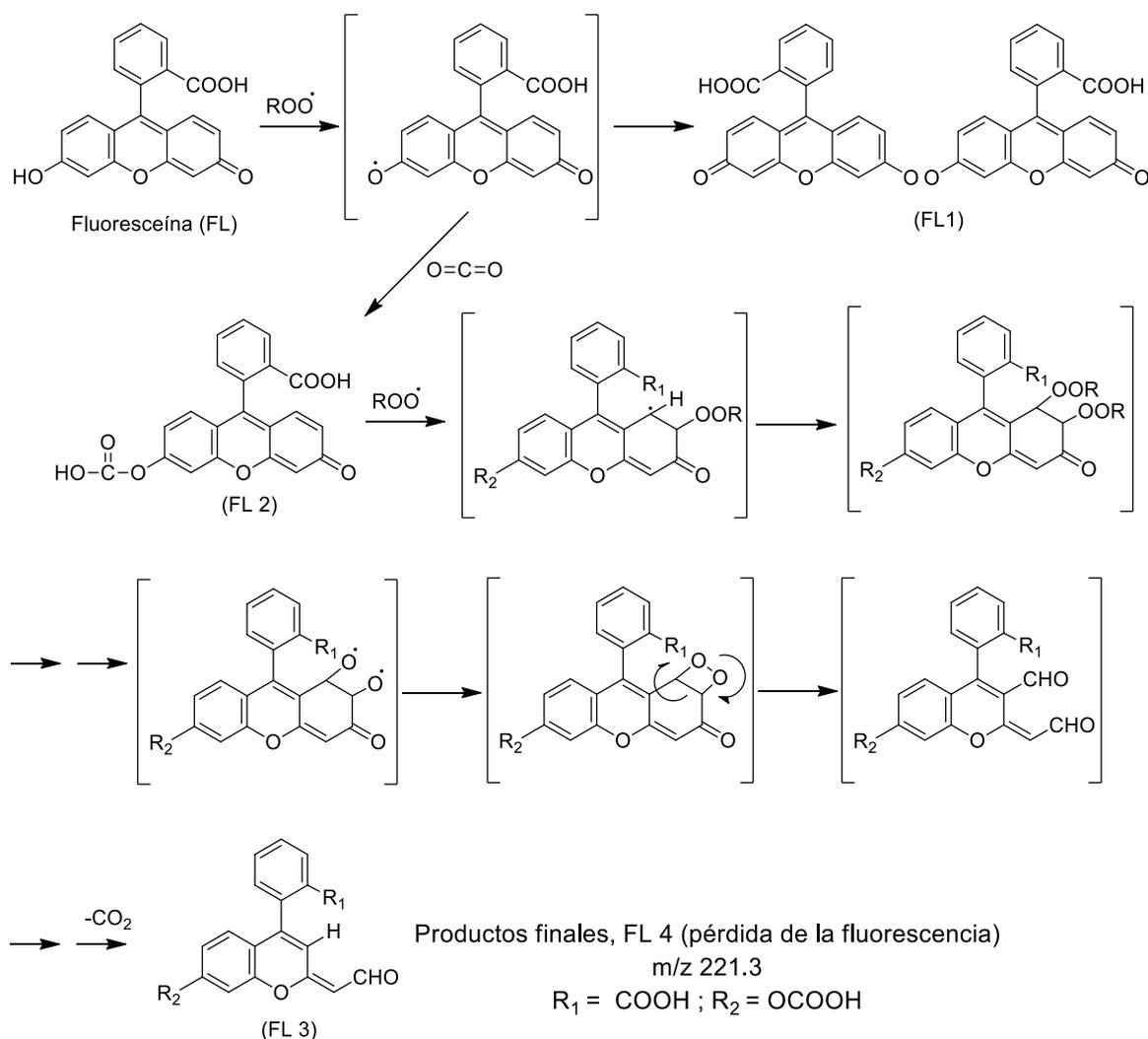


Figura 6. Curva de decaimiento de fluorescencia en presencia de un antioxidante.

El mecanismo de reacción de la pérdida de fluoresceína por oxidación se presenta en el esquema 3 y fue elucidado por Ou *et al.*⁵⁰ el cual es explicado por la transferencia de átomos de hidrógeno, donde se muestra la oxidación de la fluoresceína en presencia de radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), el cual ataca el fenol y le sustrae un hidrogeno, con lo que se forma un radical fenóxilo ($\text{FLO}\cdot$) que podría reaccionar de la siguiente manera: dimerizarse para dar FL 1 ó atacar trazas de CO_2 del buffer, y producir FL 2 el cual puede ser atacado nuevamente por el $\text{ROO}\cdot$ uniéndose a los dobles enlaces $\text{C}=\text{C}$ para formar un radical estable, que puede reaccionar con otro radical peroxilo, formando un intermediario

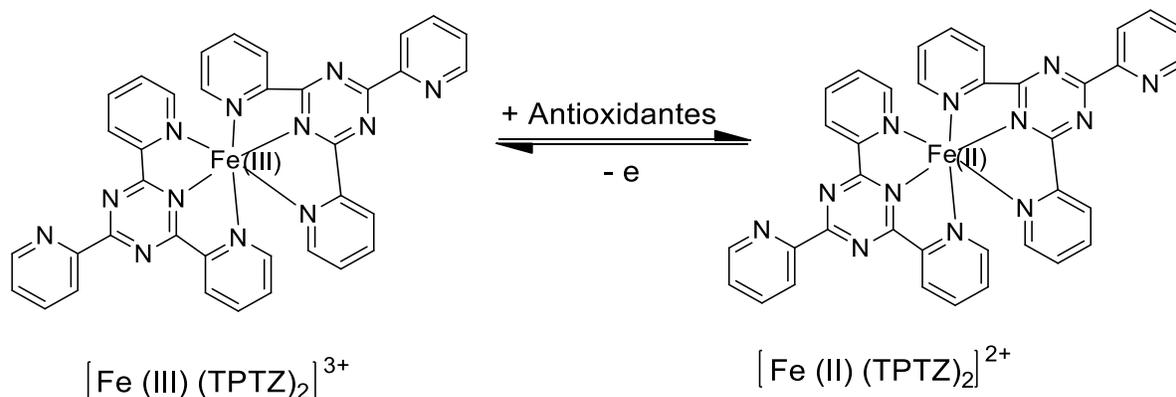
endoperóxido, el cual se descompone para dar el producto FL 3 y FL 4 (derivado de FL 3), producto mayoritario de la reacción que no presenta fluorescencia⁵⁰.



Esquema 3. Mecanismo para la oxidación de la fluoresceína.

2.8.4 Determinación de la capacidad de reducción del ion férrico FRAP

FRAP por sus siglas en inglés (Ferric Reducing/Antioxidant Power), es un ensayo colorimétrico, que se basa en la formación de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ)-Fe(II) en presencia de un agente reductor (antioxidantes) a pH ácido la reacción se ilustra en el esquema 4, la reducción del hierro Fe³⁺ a Fe²⁺ en el complejo, genera cambio de color de incoloro a azul-violeta, es uno de los métodos más aceptado para definir la capacidad antioxidante^{51,52}.



Esquema 4. Reacción del método de FRAP.

2.8.5 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (FC)

Numerosos estudios resaltan la influencia que tienen los fenoles totales sobre la actividad antioxidante y variadas actividades biológicas, con las cuales se puede ver beneficiada la salud humana^{29,53}. La determinación de fenoles totales por FC es colorimétrica, en esta ocurre una reacción de óxido-reducción en donde se mide la capacidad de fenoles y polifenoles, para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico, en el cual el molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferencia de electrones entre el Mo^{6+} y el agente reductor, lo que genera óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23})^{52,54}. A continuación, se presenta la reacción de transferencia de electrones.

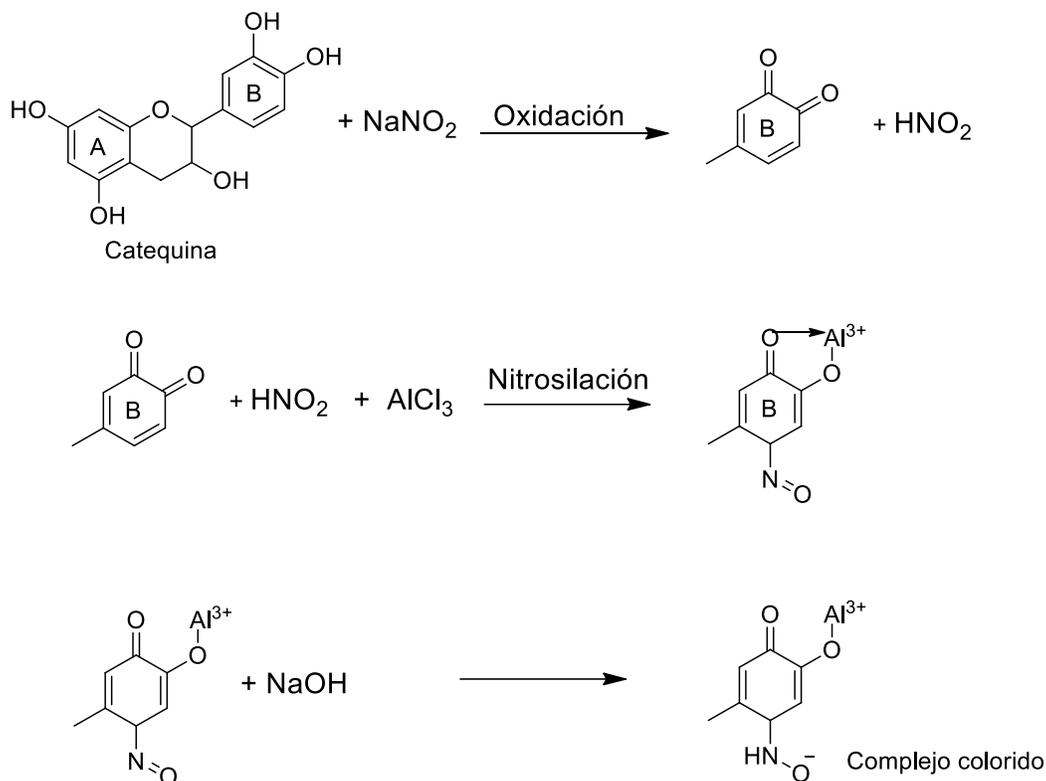


2.8.6 Determinación de flavonoides totales por el método del tricloruro de aluminio.

Los flavonoides así como los compuestos polifenólicos son responsables de la actividad antioxidante en alimentos y extractos⁵⁵, por lo que esta determinación es de importancia para correlacionar los resultados obtenidos con los diferentes métodos antioxidantes.

La determinación de flavonoides totales, es un método colorimétrico, en el que se forma un complejo de aluminio-flavonoide en medio básico de coloración rosa. En el esquema 5, se muestran las reacciones que ocurren en esta determinación.

La primera etapa de reacción implica la oxidación de los grupos hidroxilo del anillo B en las posiciones C2' y C3', en presencia de NaNO_2 obteniéndose como subproducto HNO_2 , en la segunda etapa el HNO_2 promueve la nitrosilación del anillo B en C5' en presencia de AlCl_3 , finalmente el aluminio se enlaza con el oxígeno en C4' y se coordina con el grupo carbonilo del C3', la adición de NaOH reduce el oxígeno del grupo nitrosilo y la muestra adquiere el color rojo o salmón característico de esta prueba⁵⁶



Esquema 5. Reacciones que ocurren en la cuantificación de flavonoides.

2.9 Determinación de toxicidad sobre *Artemia salina*

Artemia salina es un crustáceo minúsculo (Figura 7), que responde a un amplio espectro de compuestos activos y tóxicos, el ensayo de letalidad consiste en exponer nauplios del crustáceo a la sustancia interés en las condiciones que más asemejen a su hábitat natural, este ensayo ha sido probado con micotoxinas⁵⁷, extractos vegetales, agroquímicos, pesticidas, anestésicos y en la actualidad es muy usado en la búsqueda de nuevos metabolitos con actividad citotóxica, es un ensayo económico, fácil, rápido, práctico y reproducible⁵⁸⁻⁶¹.

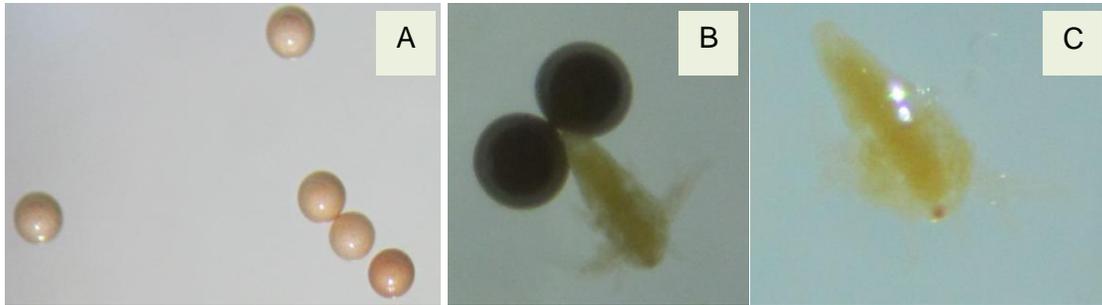


Figura 7. *Artemia Salina* **A.** Huevos, **B.** Nauplio en eclosión, **C.** Nauplio. Fuente: Fotografía tomada por Diana Correa. Lugar: Laboratorios docencia Biología, Universidad del Cauca. Fecha: 22/02/2017.

2.10 Ensayo de toxicidad en células meristemáticas de *Allium cepa*

Allium test es un bioensayo basado en el crecimiento de la raíz de bulbos de *Allium cepa*, en diferentes medios y bajo condiciones controladas, en las que según el medio en el que crezca se pueden observar variaciones anormales del ciclo celular de los meristemos de las raíces. Los efectos de toxicidad pueden ser a nivel de crecimiento de raíz, de estado de la célula y su ciclo e incluso a nivel cromosómico⁶².

Este ensayo es muy utilizado para el análisis de contaminantes, pesticidas, residuos industriales, disolventes orgánicos entre otros, como un modelo simple y eficaz para monitorear daño a nivel celular en organismos vegetales superiores⁶³.

Las propiedades farmacológicas de compuestos bioactivos presentes en extractos vegetales pueden ser estudiados según pruebas de toxicidad, para evaluar diferentes actividades como fitotóxicos, citotóxicos o genotóxicos en organismos vivos y para hacer aproximaciones de las diferentes actividades que puedan presentar como posibles fármacos inhibidores celulares en un futuro^{64,65}.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Enfermedades como el cáncer y patologías neurodegenerativas han tenido un aumento sustancial debido al alto contacto con factores de riesgo como lo son la radiación emitida por equipos tecnológicos, la polución causada por la industria, uso indiscriminado de agroquímicos en los cultivos, entre otros, por tanto los investigadores están en la continua búsqueda de productos naturales como una fuente importante de nuevos medicamentos¹. En los últimos años se ha visto un incremento sustancial en el estudio y formulación de proyectos enfocados al uso de las plantas como posibles tratamientos a enfermedades de todo tipo, ha sido tal el incremento que según lo reportado por Soto y Leiva⁶⁶ el 80% de las personas confían en las plantas para resolver problemas de salud.

El *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf es una planta conocida por su gran cantidad de usos en medicina tradicional. Esta planta contiene aceite esencial, el cual es de gran valor en el mercado por su alto contenido de citral, y la presencia de flavonoides, alcaloides, vitaminas, taninos, fenoles, saponinas y esteroides en diferentes extractos e infusiones de hojas de la planta, le confieren a los extractos de *C. citratus* un alto potencial antioxidante y actividad biológica, sin embargo, las propiedades de cada extracto dependen en gran medida de los métodos de obtención de los metabolitos.

Las técnicas de extracción existentes como percolación y soxhlet demandan gran cantidad de energía que en algunos casos generan degradación de los principios activos del extracto por los largos periodos de extracción y altas temperaturas, por lo que los investigadores están reemplazando las antiguas técnicas, incorporando en ellas equipos de ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos, los cuales presentan ventajas sobre los métodos percolación y soxhlet.

Aun no hay reportes de actividad antioxidante y toxicidad de extractos etanólicos obtenidos por ultrasonido a partir de hojas de *C. citratus* por lo que, en este trabajo se plantea realizar la extracción etanólica de las hojas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf por ultrasonido y obtener el aceite esencial por destilación agua vapor. Posterior a esto se pretende fraccionar el extracto etanólico realizando extracciones líquido-líquido con disolventes para separar los compuestos por polaridad, evaluar la actividad antioxidante por los métodos DPPH[•], ABTS^{•+}, ORAC y FRAP y la actividad citotóxica del extracto etanólico total, de las

diferentes fracciones y del aceite esencial. Cuantificar los fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico y sus fracciones y correlacionarlos con la actividad antioxidante.

En este contexto se plantea también realizar un ensayo de toxicidad en células meristemáticas de *Allium cepa* y la identificación de los compuestos del aceite esencial.

De esta manera se contribuye en la búsqueda de productos con antioxidantes naturales y actividad tóxica en diferentes organismos, los cuales puedan ser utilizados a futuro en la prevención y tratamiento de distintas enfermedades.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar la actividad antioxidante y citotóxica del aceite esencial, el extracto etanólico y de fracciones obtenidas a partir de hojas de *Cymbopogon citratus*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar por los métodos DPPH y ABTS⁺ la actividad antioxidante del aceite esencial, el extracto etanólico y sus fracciones obtenidos de hojas de *C. citratus*.
- Cuantificar por el método de Folin-Ciocalteu los fenoles totales presentes en el extracto etanólico y sus fracciones, provenientes de hojas de *C. citratus*.
- Determinar mediante el bioensayo con *Artemia salina* la actividad citotóxica del aceite esencial, el extracto etanólico y sus fracciones obtenidos de hojas de *C. citratus*.

Además de los objetivos planteados se lograron cumplir objetivos adicionales como complemento de la investigación, los cuales se mencionan a continuación:

- Determinar cualitativamente metabolitos secundarios de *C. citratus* por tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total.
- Cuantificar por el método del tricloruro de aluminio los flavonoides totales presentes en el extracto etanólico y fracciones de *C. citratus*.
- Determinar la actividad antioxidante por los ensayos ORAC y FRAP, del aceite esencial, el extracto etanólico y sus fracciones obtenidos de hojas de la planta en estudio.
- Identificar los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *C. citratus* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Determinar la actividad fitotóxica y citotóxica mediante *Allium test* del extracto etanólico de *C. citratus*.

5. METODOLOGÍA

5.1 REACTIVOS Y MATERIALES

Tabla 6. Reactivos, materiales y equipos de laboratorio utilizados.

Reactivos y disolventes	Especificaciones
Etanol, hexano, acetato de etilo, butanol, dimetilsufóxido, dicromato de potasio	J.T. Baker (Xalostoc, México)
Ácido clorhídrico (37%), ácido acético glacial, ácido pícrico, acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, tricloruro de antimonio	Merck (Darmstadt, Alemania)
Nitrato de bismuto III pentahidratado, ácido cítrico, persulfato de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, yoduro de potasio, ácido bórico, cloruro de sodio, fosfato dihidrógeno de potasio, fosfato de sodio dibásico, cloruro de potasio	Carlo Erba (Val de Reuil, Francia)
Ácido sulfúrico concentrado, cloruro férrico anhidro, sulfato ferroso heptahidratado	Fisher Scientific (Nueva York, USA)
Cloroformo	Mallinckrodt (Xalostoc, México).
Gelatina	Difco (Le Point de Claix, Francia).
Ácido 3,5- dinitrobenzoico	Alfa Aesar (Nueva York, USA)
DPPH [•] , ABTS, BHT (Butilhidroxitolueno), α -Tocoferol, Trolox, AAPH, fluoresceína, acetato de sodio trihidratado, TPTZ, quercetina, Nitrito de sodio, tricloruro de hierro hexahidratado, tricloruro de aluminio	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ácido ascórbico, carbonato de sodio	Mol Labs (Bogotá, Colombia)
Helio	Gas AP, Linde (Bogotá, Colombia)
Folin-Ciocalteu	Panreac (Barcelona, España).
Ácido gálico	Panreac (Barcelona, España).
Fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, bicarbonato de sodio, tartrato de sodio y potasio, bisulfito de sodio	Synth (Sao Paulo, Brasil)
Acetato de plomo (II)	Laboratorios Biocroma (Cali, Colombia)
Huevos de <i>Artemia salina</i>	Cali, Colombia
Sal marina	Quimpo (Popayán, Colombia)

Tabla 6. Continuación

Equipos de laboratorio

Micropipetas unicanal LabGnienius de volúmenes 10-100 µL; 100-1000 µL, Torino, Italia.
Espectrofotómetro UV-Vis GENESIS. Thermo Scientific (Vantaa, Finlandia)
Cubetas de plástico desechables, Brand. (Wertheim, Alemania)
Ultrasonido Fisher Scientific (Hampton, Nuevo Hampshire, EE. UU)
Cámara de Ambiente controlado, Biotronette Mark III, (Melrose Park, IL, USA)
Micropipetas multicanal Fisher Brand Elite 0,5-10 µL; 30-300 µL.
Lector de microplacas Multiskan Go, Thermo Scientific Multiskan GO (Vantaa, Finlandia)
Rotaevaporador Laborota 4003, *Heidolph* Instruments GmbH & Co. (Schwabach, Alemania)
Fluoroskan Ascent FL. Luminoskan Ascent. Thermo Scientific. Ascent Software 2.6.
Cromatografo de gases Agilent Technologies 6890 Plus y detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD 5973 Network (Palo Alto, California, EE. UU)
Microplacas transparentes y negras de poliestireno de 96 pozos ThermoFisher Scientific (Massachusetts, EE.UU.)
Columna capilar DB-5MS y DB-WAX J & W Scientific (Folsom, CA, EE. UU)
Microscopio Leyca DM 500 (Wetzlar y Mannheim, Alemania)

5.2 MATERIAL VEGETAL

La recolección de las hojas de *Cymbopogon citratus* se realizó en la vereda Barro Blanco (Municipio de Timbío-Cauca) con las coordenadas 2°20'20.11"N y 76°41'54.67"O. La especie fue clasificada en el herbario de la Universidad del Cauca, (número especie 1710). El material vegetal fue llevado al grupo de Investigación Química de Compuestos Bioactivos donde se lavó, se secó y se cortó en pequeños trozos de aproximadamente 1 cm.

5.3 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

5.3.1 Extracción por ultrasonido

Se pesaron aproximadamente 180 g de material vegetal fresco y se llevaron a un baño de ultrasonido en un balón fondo plano con aproximadamente 250 mL de etanol, la extracción se realizó por 8 horas en ciclos de 1 hora con cambio de disolvente y reposo de 30 minutos, además se hicieron cambios continuos de agua al baño maría para evitar el calentamiento. El extracto se secó en un rotaevaporador Heidolph a presión reducida y se llevó a un desecador.

5.3.2 Extracción del aceite esencial

La extracción del aceite esencial se realizó en un equipo de destilación agua-vapor (capacidad para 10 kg de material vegetal) a partir de hojas frescas de *C. citratus* finamente picadas, el aceite se separó del agua en un embudo de decantación por diferencia de densidades, se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para evitar su daño por oxidación y fue almacenado a 4 °C en un frasco ámbar.

5.4 Tamizaje Fitoquímico

Se realizaron una serie de pruebas cualitativas para determinar la presencia de algunos metabolitos secundarios, las pruebas se realizaron al extracto etanólico el cual se obtuvo macerando 30 g de material fresco por 48 horas según la metodología planteada por Domínguez⁶⁷, las pruebas realizadas se muestran en la tabla 7:

Tabla 7. Reacciones empleadas para la determinación cualitativa de metabolitos.

Metabolito	Prueba en tubo de ensayo
Alcaloides	Dragendorff, Mayer, Wagner
Cardiotónicos	Reactivo de Baljet, Kedde, Raymond-Marthoud, Keller-Killiani, Liebermann-Burchard, Salkowski
Cumarinas	Volátiles en papel impregnado con NaOH (Observación UV)
Taninos	Cloruro férrico, Solución de gelatina y sal.
Saponinas	Formación de espuma
Triterpenos	Liebermann-Burchard, Salkowski
Flavonoides	Reacción de Shinoda
Quinonas	Reacción de Borntrager
Carotenoides	Reacción de Carl Price

5.5 Fraccionamiento

El fraccionamiento se refiere a la separación de metabolitos según su polaridad y es un protocolo establecido en el grupo de investigación QCB, por lo que se realizaron extracciones líquido-líquido sucesivas partiendo del extracto etanólico disuelto en agua

(extracto crudo), las extracciones se realizaron con los disolventes de menor a mayor polaridad en su orden: *n*-hexano, acetato de etilo y *n*-butanol.

Se pesó de 1 g de extracto seco, y se redisolvió en 30 mL de agua desionizada con la ayuda de ultrasonido, se llevó a un embudo de separación y se agregaron 10 mL de hexano. Se agitó vigorosamente y se dejó reposar para separar las dos fases, se realizaron entre 3 y 4 extracciones sucesivas con cada disolvente, al obtener todas las fracciones se llevaron a sequedad a presión reducida en un rotaevaporador Heidolph. El diagrama del proceso de fraccionamiento se ilustra en la figura 8.

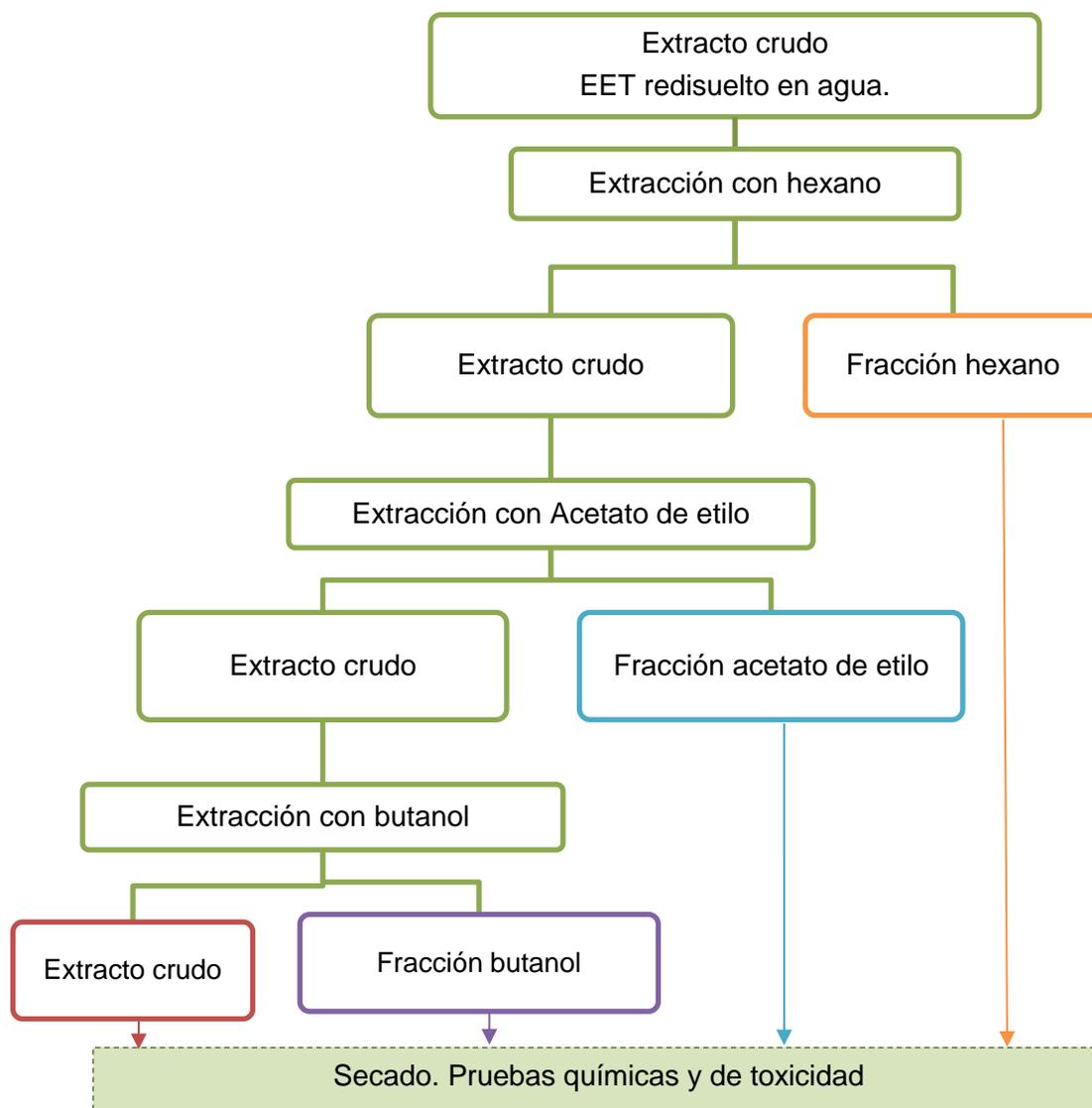


Figura 8. Diagrama del proceso de fraccionamiento del extracto etanólico total de *C. citratus* (EET).

5.6 Determinación de la actividad antioxidante

5.6.1 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH[•]

Este ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de QCB y la Unidad de Análisis de Aguas de la Universidad del Cauca siguiendo la metodología planteada por Brand *et al.*⁶⁸ con algunas modificaciones. Para realizar el ensayo se disolvieron 3,0 mg de DPPH[•] en 100 mL de metanol con ayuda del ultrasonido y se midió la absorbancia agregando metanol hasta obtener un valor de absorbancia $0,800 \pm 0,030$ a $\lambda=515$ nm en un espectrofotómetro UV-Vis GENESIS 6. Una vez preparado el radical, se procedió a agregar en una celda 600 μ L de muestra y 1200 μ L de DPPH[•] se incubó por 15 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia, el proceso se realizó por triplicado. La muestra se preparó en metanol en un rango de concentraciones de 20 -1000 μ g/mL para determinar el rango óptimo de linealidad y posterior a esto realizar el ensayo en un rango de concentraciones más pequeño y específico para cada muestra, además se utilizó ácido ascórbico, α -tocoferol y BHT como antioxidantes de referencia y Trolox para la curva de calibración en un rango de concentraciones de 10 - 60 μ M. Los resultados se expresaron en μ mol trolox/ g extracto seco, además se determinó el IC₅₀.

5.6.2 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS^{•+}

Este ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de QCB y la Anidad de Análisis Aguas de la Universidad del Cauca siguiendo la metodología descrita por Re *et al.*⁶⁹, con algunas modificaciones, el catión radical ABTS^{•+} fue generado a partir de 18 mg de ABTS disueltos en 54 mL de PBS (pH 7,4) el cual se hizo reaccionar con 6 mL de K₂S₂O₈ (2 mM), la mezcla se dejó reaccionar por 16 horas, teniendo en cuenta que el radical es estable por 36 horas. Una vez obtenido el radical se diluyó hasta obtener una absorbancia de $0,700 \pm 0,020$ en un UV-Vis GENESIS 6.

La medición en celda se realizó de la siguiente forma: se agregaron 1520 μ L de solución de ABTS^{•+} y 80 μ L de la muestra disuelta en metanol en un rango de concentraciones de 20-1000 μ g/g para determinar el rango óptimo de linealidad y posterior a esto realizar el ensayo en un rango de concentraciones más pequeño y específico para cada muestra incubando en oscuridad por 5 minutos, la lectura fue a $\lambda=734$ nm. Se realizaron también curvas con BHT, ácido ascórbico y α -tocoferol.

5.6.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo FRAP

Esta determinación se realizó en el laboratorio de Biotecnología - Productos Naturales, de la Universidad Tecnológica de Pereira, según el protocolo descrito por Benzie y Strain⁷⁰. La medición se llevó a cabo en un lector de microplaca Multiskan Go, en placa de poliestireno. Para poder llevar a cabo el método se prepararon los siguientes reactivos: buffer acetato (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazina) 10 mM, solución de FeCl₃.6H₂O 20 mM y el reactivo FRAP, previo al ensayo (buffer acetato: TPTZ: FeCl₃ 10:1:1). Las muestras se disolvieron en metanol. Los resultados se expresan en $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extracto. El llenado de la placa se realiza de la siguiente forma (Figura 10):

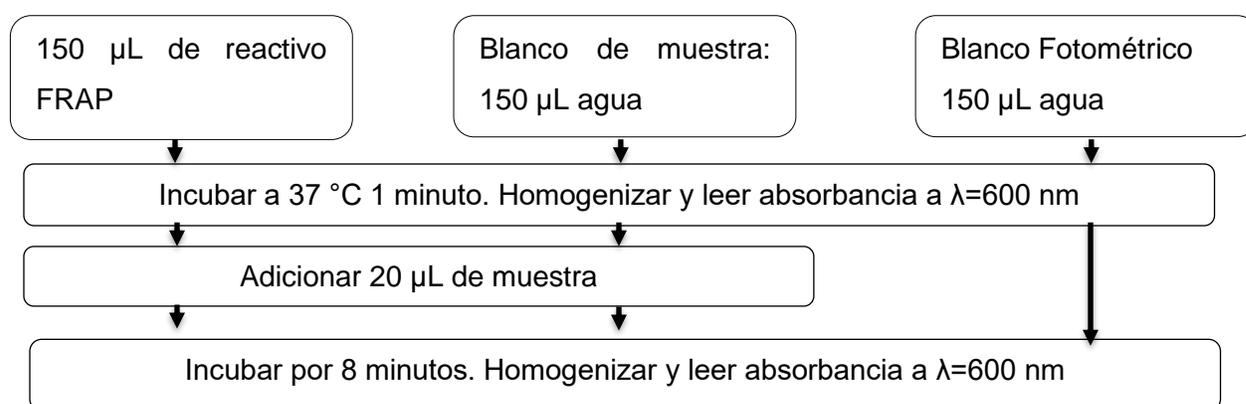


Figura 10. Diagrama que ilustra el protocolo para la determinación de la capacidad reductora de hierro.

5.6.5 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de los fenoles se realizó mediante una curva de ácido gálico en un intervalo de concentraciones de 15 - 75 $\mu\text{g/g}$ siguiendo el protocolo descrito por Li *et al.*⁷¹. Para obtener los valores de absorbancia a $\lambda=760$ nm se realizó el siguiente procedimiento: en una cubeta plástica de 3 mL se agregó 1 mL de solución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu (0,2 eq/L) y 0,2 mL de solución metanólica de las muestras (250 ppm). Se homogenizaron y en ausencia de luz se incubaron por 5 minutos, pasado este tiempo se agregó 0,8 mL de solución acuosa de carbonato de sodio (75 g/L), se homogenizaron y se incubaron en ausencia de luz por 60 minutos. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/g muestra seco.

5.6.6 Cuantificación de flavonoides por el método de tricloruro de aluminio

Esta determinación se realizó en el laboratorio de Biotecnología - Productos Naturales, de la Universidad Tecnológica de Pereira, siguiendo el protocolo descrito por Kim *et al.*⁷², en un lector de microplaca y placa de poliestireno.

Para esta cuantificación se utilizó una curva de calibración de quercetina. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente forma: se agregaron 7,5 µL de NaNO₂ (5%) en cada pozo y se adicionan 20 µL de extracto disuelto en metanol con 115 µL de agua. Se homogenizó y dejó reaccionar por 5 minutos en oscuridad, una vez transcurrido el tiempo se agregaron 30 µL de AlCl₃ (2,5%). Se homogenizó de nuevo la mezcla dejando incubar por 6 minutos. Posterior a esto se agregaron 50 µL de NaOH y 50 µL de agua, se homogenizó e incubó por 5 minutos, la absorbancia se midió a $\lambda=500$ nm. Los resultados se expresan en µg quercetina/ g muestra seca.

5.7 Ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina*

Este ensayo se llevó cabo siguiendo el protocolo descrito por Sanabria⁷³ con algunas modificaciones de Syahmi *et al.*⁷⁴, la metodología fue desarrollada de la siguiente forma:

Preparación agua de mar: se preparó agua de mar sintética al 3,6% y se filtró hasta obtener una solución homogénea.

Eclosión del crustáceo: se pesaron 50 mg de huevos de *A. salina* y se agregaron a un beaker el cual contenía 500 mL de agua de mar previamente preparada, se dejaron por 48 horas en una cámara ambiental con luz blanca constante a 25 °C.

Preparación muestras: se prepararon concentraciones de extracto en dimetilsulfóxido (DMSO) de 40000 µg/g, de la cual se partió para preparar soluciones de menor concentración.

Ensayo de letalidad: 10 nauplios fueron transferidos a viales con capacidad para 5 mL, se procedió a agregar los volúmenes respectivos para obtener concentraciones entre 20-1000 µg/g y se aforó a un volumen final de 5 mL, se incubaron en una cámara ambiental con las mismas condiciones en las que fueron eclosionados, finalmente se realizaron conteos de nauplios muertos a las 6 horas (dosis aguda) y a las 24 horas (dosis crónica).

Control positivo: se realizó el ensayo de letalidad en las condiciones anteriormente mencionadas, a diferentes concentraciones con dicromato de potasio para la toxicidad aguda (5-25 µg/g) y para la toxicidad crónica (31-900 µg/g).

Control negativo: se realizó el ensayo con el máximo volumen de DMSO agregado en el ensayo de letalidad (250 µL en 5 mL de agua de mar) y un segundo control solo con agua de mar.

5.8 Ensayo de toxicidad en células meristemáticas de *Allium cepa*

La metodología se llevó a cabo según el protocolo descrito por Fiskejöö⁷⁵ con algunas modificaciones. Se seleccionaron 30 bulbos de *Allium cepa* con diámetros entre $4,25 \pm 0,25$ cm a las cuales se les retiró el catáfilo externo, posterior a esto se lavaron y se cortaron los restos del área radicular sin dañar las raíces primordiales. Se colocaron en agua desionizada por 48 h para promover el crecimiento de nuevas raíces.

Se prepararon soluciones acuosas partiendo del extracto etanólico seco de *C. citratus* de 500, 300, 125 y 60 mg/L. Del grupo de 30 cebollas se escogieron 16 individuos sanos y con mayor número de raíces nuevas, las cuales fueron cortadas y sometidas a los diferentes tratamientos de extracto.

El montaje se realizó en frascos ámbar con capacidad de 200 mL y de 11 cm de altura, utilizando 3 réplicas para cada tratamiento y control. El periodo de exposición fue de 216 horas en oscuridad, a temperatura ambiente y protegidas de corrientes de aire en una cámara ambiental.

Para el análisis de las células se cortaron raíces entre 2-4 cm, los meristemas se colocaron en un vidrio reloj y se cubrieron con una solución de orceína acético-clorhídrica, se flamearon hasta obtener vapores por tres veces consecutivas. Una vez se obtuvo el tejido teñido se puso en un portaobjetos, se cubrió con una laminilla y se realizó el extendido o "squash". La observación de las placas se realizó en un microscopio Leica 500 en el objetivo 40x y se escogieron los campos con mayor número de células. Se contaron entre 1500 y 2000 células para el análisis de índice mitótico y de fases.

5.9 Análisis por GC-MS

El análisis de los compuestos del aceite esencial del *C. citratus* se realizó en el CENIVAM en la Universidad Industrial de Santander, en un cromatógrafo de gases Agilent

Technologies 6890 Plus, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD 5973 Network. La separación de los metabolitos secundarios se realizó en dos columnas capilares DB-5MS (fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) y DB-WAX (fase estacionaria polar de poli(etilenglicol), los parámetros cromatógrafos se encuentran en la tabla 8.

Tabla 8. Parámetros cromatográficos empleados en el análisis del A.E de *C. citratus*

Parámetro	Valor
Inyector	split/splitless
Gas de arrastre	Helio
Flujo de gas de arrastre	1 mL/min
Relación de <i>Split</i>	30:1
Volumen de inyección	2 µL
Rampa de temperatura	45°C → 150°C (v= 4°C/min) 150°C → 250°C (v= 5°C/min) (5 min) 250°C → 275°C (v= 10°C/min)
Temperatura de fuente de ionización	230 °C
Temperatura de cuadrupolo	150°C
Energía de ionización	70 eV

La identificación de los compuestos se realizó con base en los índices de retención lineales (IRL), los cuales fueron calculados teniendo en cuenta los tiempos de retención de *n*-patrones de parafinas (C₁₀-C₂₅) con la siguiente ecuación:

$$IRL = 100n + 100 \left[\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right]$$

Donde

n y N: Número de átomos de carbonos de los *n*-alcanos que eluyen antes (*n*) y después (*N*) del compuesto de interés.

t_{RX}: Tiempo de retención del compuesto de interés.

t_{RN} y t_{Rn}: Tiempos de retención de *n*-alcanos que eluyen antes (*n*) y después (*N*) del compuesto *x*.

Los espectros de masas experimentales de cada compuesto fueron comparados con las bases de datos Adams, NIST y Wiley y los datos se procesaron en el software MSDChemStation de Agilent Technologies G1701DA.

5.10 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio de tres valores \pm desviación estándar. Se realizaron las siguientes pruebas: Normalidad (Shapiro-Wilk), Varianza (ANOVA), comparaciones múltiples (prueba de Tukey), todas las pruebas con un valor de confianza del 95%, el contenido de fenoles y flavonoides se correlaciono con los valores de actividad antioxidante determinados por los diferentes métodos mediante el coeficiente de correlación de Pearson. El análisis se realizó en el software SPSS 11.5 y todos los elementos gráficos se realizaron en GraphPad Prism 6.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Rendimientos de extracción

Los porcentajes de rendimientos de extracción etanólica, de aceite esencial y de fraccionamiento con los disolventes hexano, acetato de etilo, butanol y acuosa, se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentajes de rendimiento de extracción y fraccionamiento.

Extracto o fracción	Rendimiento de extracción (%p/p), % (\pm SD, n=2)
Extracto total etanólico	9,28 \pm 0,11
Fracción Hexano	41,56 \pm 0,57
Fracción acetato de etilo	7,56 \pm 0,26
Fracción butanol	9,73 \pm 0,12
Fracción acuosa	41,10 \pm 0,67
Aceite esencial	0,37 \pm 0,06

El extracto etanólico total presento un rendimiento de 9,28%, en la literatura no se encontraron reportes del rendimiento de la extracción etanólica el *C. citratus* sin embargo Obando y Ortega *et al.*⁷⁶ reportan porcentajes de extracción etanólica en un total de 18 muestras de pulpa y pericarpio de *Garcinia mangostana* L. entre 5-15% empleando metodologías como ultrasonido, microondas y maceración pasiva, por lo que el rendimiento conseguido aplicando la tecnología de ultrasonido empleado en este trabajo se encuentra dentro del rango de extracción generalmente obtenido, cabe resaltar que *G. mangostana* L no pertenece a la familia de las Poaceae y es una fruta carnosa. Mesa-Vanegas *et al.*⁷⁷ reportó porcentajes de extracción menores al 8% en algunas especies de *Calophyllum* por percolación en disolventes como metanol, diclorometano, hexano y acetato de etilo.

En cuanto a las fracciones las que presentaron mayor rendimiento en la extracción fueron hexano (Hex) y acuosa (Acu), las cuáles no presentaron diferencias significativas entre ellas, la suma de los dos rendimientos se encuentra por encima del 80% de lo que corresponde al extracto etanolico total (EET), con lo que se puede inferir que la composición del extracto contiene cantidades similares tanto de moléculas apolares como de moléculas polares y en menor proporción moléculas de polaridad media, como las que se pueden

presentar en las fracciones acetato de etilo (AcOEt) y butanol (BuOH) las cuales estuvieron por debajo del 10% de extracción.

El porcentaje de rendimiento del aceite esencial (0,37 %) fue mayor al reportado por Cimanga *et al.*⁷⁸ (0,30%) pero menor al reportado por Rodríguez *et al.*⁷⁹ (0,48 %), lo que se atribuye a que la extracción se realizó con material fresco con el fin de conservar y evitar la degradación de volátiles por efectos de la luz, presencia de hongos u otros patógenos que puedan interferir en la composición del A.E.

6.2 Tamizaje fitoquímico

En el análisis fitoquímico cualitativo se obtuvieron resultados positivos para diferentes grupos de metabolitos secundarios, los cuales se fundamentan en la posibilidad que algunas moléculas presentan para reaccionar según su grupo funcional principal y como evidencia observar diferentes coloraciones, precipitados entre otros cambios, los resultados se registran en la tabla 10.

Tabla 10. Compuestos presentes en el extracto etanólico proveniente de hojas de *C. citratus* determinados por tamizaje fitoquímico.

Grupo Funcional	Ensayo (Reacción en tubo)	Observación
Cumarinas Volátiles	Papel Impregnado con NaOH	Fluorescencia a la observación con luz UV
Flavonoides	Reacción de Shinoda	Coloración roja
Taninos	Ensayo con cloruro férrico	Coloración azul intenso
Saponinas	Disolución en agua tibia	Formación de espuma
Triterpenos y esteroides	Liebermann-Burchard, Salkowski	Coloración azul - verde
Carotenoides	Reactivo de Carl Price	Coloración azul - verde

Teniendo en cuenta que el extracto etanólico presentó metabolitos como flavonoides, taninos, cumarinas y carotenoides es probable que presente actividad antioxidante, sin embargo al ser pruebas cualitativas no se puede hacer una extrapolación a las cantidades reales de los metabolitos⁶⁶, compuestos como triterpenos, esteroides y saponinas pueden otorgar a los extractos propiedades bactericidas, antifúngicas y citotóxicas⁸⁰, por lo que el EET contiene metabolitos de gran importancia y con actividad biológica.

6.3 Actividad Antioxidante

6.3.1 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH·

Los resultados de actividad antioxidante determinados por este método se encuentran en la tabla 11 y la curva de calibración para la cuantificación de los μmol trolox se encuentra en el anexo 1, figura 1.

Tabla 11. Actividad antioxidante de extractos y fracciones de *C. citratus* por DPPH· y ABTS⁺.

	DPPH· (\pm SD, n=3)		ABTS ⁺ (\pm SD, n=3)	
	$\mu\text{mol Trolox}^*$	IC ₅₀ (mg/L)	$\mu\text{mol Trolox}^*$	IC ₅₀ (mg/L)
EET	262,83 \pm 3,61	135,06 \pm 1,89	783,85 \pm 20,80	373,57 \pm 3,56
Ac	126,76 \pm 1,09	286,08 \pm 4,83	292,06 \pm 1,41	1029,71 \pm 7,21
BuOH	906,19 \pm 5,99	42,30 \pm 0,56	2053,16 \pm 3,41	147,30 \pm 0,60
AcOEt	444,82 \pm 7,74	84,20 \pm 0,76	1268,19 \pm 24,65	250,80 \pm 3,03
Hex	47,12 \pm 2,18	753,39 \pm 3,28	486,42 \pm 10,04	624,54 \pm 11,08
A.E	12,03 \pm 1,26	> 1000	58,59 \pm 1,45	> 1000
A.A	6373,63 \pm 65,03	5,49 \pm 0,11	5331,50 \pm 62,22	56,93 \pm 1,00
BHT	1905,95 \pm 78,90	19,38 \pm 1,63	5553,18 \pm 105,84	50,16 \pm 1,31
A-T	2181,61 \pm 39,69	17,11 \pm 0,18	2384,88 \pm 52,29	125,16 \pm 0,14

* $\mu\text{mol Trolox/ g}$ muestra seca

El análisis estadístico mostró que todas las muestras presentaron diferencias significativas. La fracción con mayor actividad fue BuOH (906,19 $\mu\text{mol Trolox/ g}$ muestra seca) con un IC₅₀=42,30 ppm que equivale casi a la mitad de la actividad que presentó el butilhidroxitolueno (BHT) analizado bajo las mismas condiciones (1905,95 $\mu\text{mol Trolox/ g}$ muestra seca) con un IC₅₀=19,38 ppm (Figura 11), así mismo BuOH presentó 2 veces la actividad antioxidante de AcOEt. De menor a mayor los valores de IC₅₀ (Figura 11) de las fracciones se encuentran en el siguiente orden: BuOH > AcOEt > Acu > Hex. Sin tener en cuenta la fracción acuosa la actividad antioxidante se presenta principalmente en las fracciones de mayor polaridad (BuOH y AcOEt) y menor en la fracción apolar, esto puede ser debido a que las extracciones sucesivas con los disolventes de diferente polaridad del extracto disuelto en agua permite que se separen exitosamente las moléculas, por lo que

en la fracción acuosa estarían compuestos de elevada polaridad como azúcares entre otros los cuales por si solos no presentan actividad biológica. El extracto etanólico presentó un valor de IC₅₀ intermedio entre AcOEt y Acu, lo que es de esperar ya que al ser un extracto total contiene moléculas tanto polares como apolares.

Los resultados obtenidos muestran el alto potencial antioxidante que tiene la fracción de butanol frente a DPPH[•], sin embargo hay que tener en cuenta que este radical orgánico nitrogenado es estable, característica que no comparten los radicales generados en el cuerpo humano⁸¹, por lo que este método no es muy representativo en cuanto actividad antirradicalaria en organismos vivos.

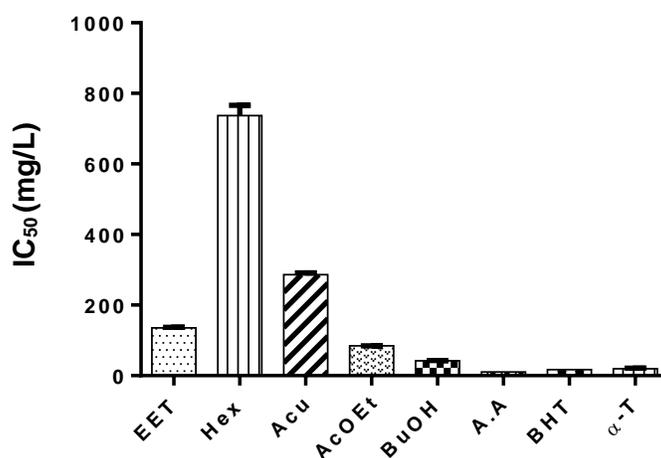


Figura 11. Valores de IC₅₀ (mg/L) obtenidos para el extracto etanólico de *C. citratus*, sus fracciones y los patrones ácido ascórbico (A.A), BHT y α-Tocoferol (α-T) por DPPH[•].

En cuanto a los patrones el que presentó mayor capacidad antioxidante fue el ácido ascórbico (IC₅₀ = 5,49 ppm). En la literatura se encontraron IC₅₀ similares como el reportado por Kanimozhi y Prased⁸² (IC₅₀ = 5,85 ppm), el α-tocoferol con un IC₅₀ 3 veces mayor que el de A.A (IC₅₀ = 17,11 ppm), lo cual representa una importante actividad antioxidante en sistemas biológicos, pero al ser un compuesto hidrofóbico las interacciones con el radical pueden estar impedidas, por lo que no se obtienen los resultados esperados⁴⁵.

El IC₅₀ para el BHT (IC₅₀=19,38 ppm) determinado en esta investigación es similar con el valor reportado por Guangrong *et al.*⁸³ (IC₅₀=19,40 ppm) y por sökmen *et al.*⁸⁴ (IC₅₀=19,80 ppm), lo cual indica que, aunque las metodologías para evaluar capacidad antioxidante son tan variadas los resultados son reproducibles. Sin embargo Sharma y Bhat⁸⁵ reportaron un

IC₅₀ más bajo (IC₅₀=9,70 ppm) preparando el radical en una mezcla metanol-buffer, lo que incrementa la transferencia de electrones por consiguiente mejorando la actividad antioxidante, además mencionan que este método puede verse afectado por el pH, la polaridad del disolvente y la estructura química del antioxidante.

6.3.2 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS^{•+}

En este ensayo todas las fracciones presentaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre ellas y con los patrones A.A, BHT y α -T (Figura 12). Los valores se registran en la tabla 11 y la curva de calibración del estándar trolox se encuentra en el anexo 1, figura 2.

Ordenando los valores de mayor a menor actividad antioxidante las fracciones se encuentra que BuOH > AcOEt > Hex > Acu. El IC₅₀ del BuOH (IC₅₀=147,30 ppm) aunque fue significativamente mayor al patrón α -T (IC₅₀=125,16 ppm), la diferencia de concentraciones inhibitorias es pequeña por lo que, por este ensayo, así como en DPPH[•] BuOH muestra su potencial como antioxidante, además se puede observar que la actividad de esta fracción respecto de EET es mucho mayor, por lo que al fraccionar y extraer metabolitos de diferentes polaridades se pueden optimizar algunas propiedades como la actividad antioxidante o disminuir como ocurre con la fracción acuosa.

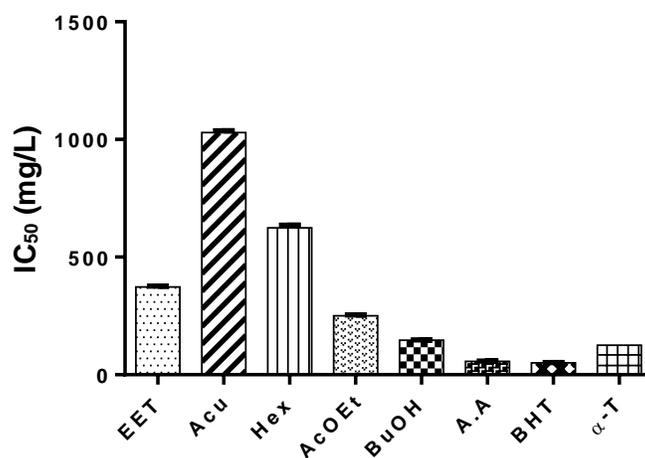


Figura 12. Valores de IC₅₀ obtenidos para el extracto etanólico de *C. citratus*, sus fracciones y los patrones ácido ascórbico, BHT y α -Tocoferol por el método ABTS^{•+}.

Una de las ventajas de este método es que es aplicable tanto a antioxidantes hidrofóbicos como hidrofílicos, ya que la reacción entre antioxidante y radical ocurre en buffer, por lo que puede ocurrir transferencia de protones como de electrones más fácilmente, lo que hace que moléculas con dobles enlaces de baja polaridad puedan donar electrones con mayor eficiencia para estabilizar el ABTS^{•+}. Los $\mu\text{mol Trolox/g}$ muestra seca obtenidos por este método también son un reflejo de lo anteriormente dicho, ya que al compararlos con los $\mu\text{mol Trolox/g}$ muestra obtenidos por DPPH[•] son superiores tanto en el EET, fracciones y A.E.

La fracción Hex por este método tuvo mejor respuesta antirradicalaria que por DPPH[•], lo que puede ser explicado por la transferencia de electrones que en buffer se hace mucho más fácil que en metanol.

Este método, tiene varias ventajas como la alta estabilidad del radical, y control del pH los cuales son factores importantes para la obtención de resultados reproducibles.

6.3.3 Determinación de la capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)

En esta investigación se determinó la actividad antioxidante teniendo en cuenta la capacidad del extracto, aceite esencial y fracciones de *C. citratus* para proteger la fluoresceína de la oxidación por radicales peroxilo.

Este método se caracteriza por ser muy sensible, comparado con métodos que utilizan radicales sintéticos por lo que es de suma importancia hallar los rangos óptimos de concentración, esto se logró mediante ensayos previos encontrando una variación drástica en la concentración incluso entre fracciones, otro parámetro importante es la total solubilización de la muestra⁸⁶. Las concentraciones usadas para calcular los $\mu\text{mol trolox}$ se presentan en la figura 13.

El análisis estadístico mostró que todas las muestras son significativamente diferentes a excepción del A.E y Hex, los cuales fueron estadísticamente iguales.

Al obtener la curva y por consiguiente el área para cada muestra, se calcularon los valores ORAC los cuales se encuentran consignados en la tabla 12, la curva de calibración del estándar trolox se encuentra en el anexo 1, figura 3. En la figura 14 se observa que la actividad antioxidante en fracciones se encuentra en el siguiente orden BuOH > AcOEt >

Acu > Hex, por lo que cabe resaltar la importante actividad que presentó la fracción butanol no solo frente a los radicales sintéticos DPPH[•] y ABTS^{•+}, sino también frente a radiales biológicos como los peroxilo.

Tabla 12. Valor ORAC y FRAP para los extractos de extractos y fracciones de *C. citratus*.

	ORAC (\pm SD, n=3)	FRAP (\pm SD, n=3)	
	Trolox ⁺	Trolox ⁺	Fe ^{2+*}
EET	9623,78 \pm 202,57	478,48 \pm 24,52	988,61 \pm 25,29
Ac	4780,56 \pm 115,68	219,30 \pm 16,82	500,12 \pm 11,45
BuOH	10993,49 \pm 248,06	1788,13 \pm 7,48	3468,73 \pm 23,64
AcOEt	6603,28 \pm 815,28	500,19 \pm 21,19	1017,45 \pm 2,27
Hex	470,99 \pm 169, 28	265,27 \pm 11,87	561,09 \pm 15,74
A.E	672,28 \pm 66,23	96,06 \pm 16,20	58,61 \pm 3,98

* μ mol Fe²⁺ / g muestra seca ; ⁺ μ mol Trolox / g muestra seca

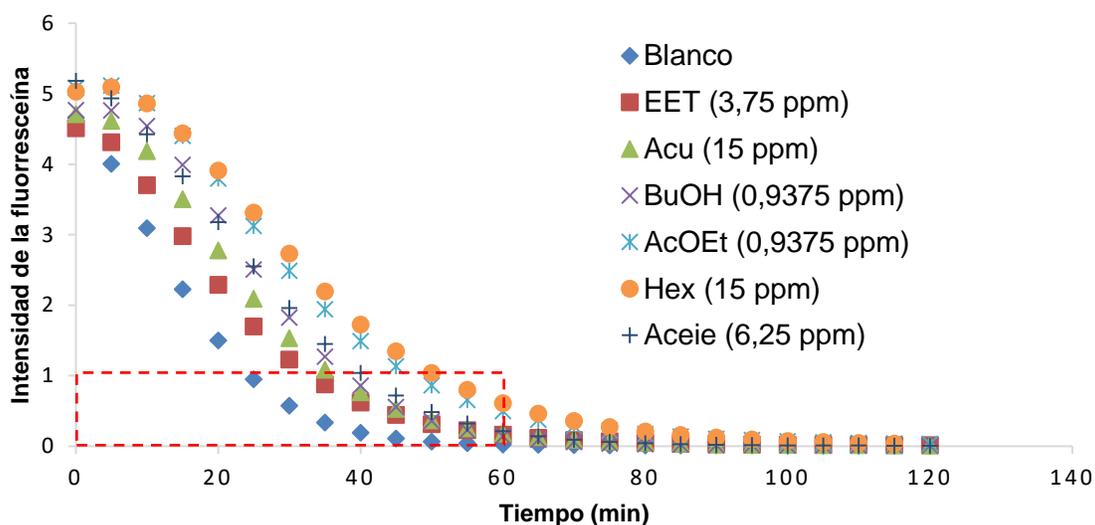


Figura 13. Intensidad de fluorescencia para extractos y fracciones de *C. citratus*.

El A.E por DPPH[•] y ABTS^{•+} no mostró acción antirradicalaria, sin embargo, por este método presentó actividad antioxidante igual a la fracción de hexano.

El extracto etanólico también exhibió una importante actividad antioxidante después de BuOH.

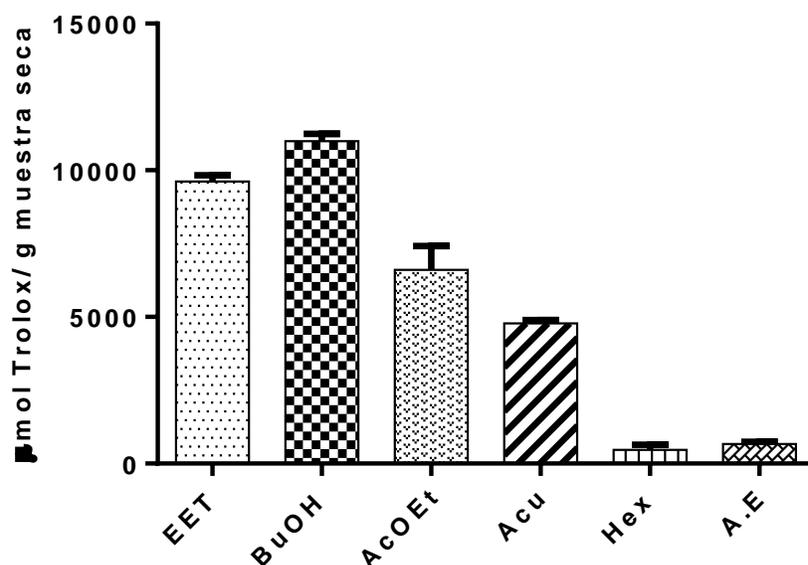


Figura 14. Valores ORAC del extracto etanólico, fracciones y aceite esencial de hojas de *C. citratus*.

Los valores ORAC encontrados para cada una de las muestras por este ensayo sobrepasan por mucho los μmol trolox encontrados por DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{\bullet}$, esto debido a que en este método se generan radicales altamente reactivos a pH 7,4 a 37°C en una escala de tiempo realista obteniendo mejores modelos para la oxidación de lípidos, alimentos e *in vivo*⁸⁷.

6.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo FRAP

Este es un método indirecto para determinar la capacidad antioxidante, tiene una característica particular ya que solo mide la transferencia de electrones para producir la reducción del Fe $^{3+}$. Los resultados se expresan en μmol trolox/ g muestra seca y en μmol Fe $^{2+}$ / g muestra seca según las curvas de calibración que se presentan en el anexo 1, figura 4 y 5 respectivamente, los resultados se encuentran consignados en la tabla 12.

El análisis estadístico mostró que AcOEt y EET presentaron la misma actividad mientras que las demás muestras fueron significativamente diferentes.

La fracción con mayor actividad fue BuOH (Figura 15), esto coincide con los resultados obtenidos en los métodos DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{\bullet}$ y ORAC, cabe resaltar que al obtener estos resultados esta fracción presenta capacidad tanto de donar hidrógenos como en el método

ORAC, así como donar electrones los cuales son medidos por este método, se observó también que la fracción Hex presentó mayor actividad que la fracción Acu, lo que indica que además de los compuestos fenólicos, las moléculas de tipo apolar también tienen la capacidad de donar electrones en este grupo se incluirían carotenos y tocoferoles.

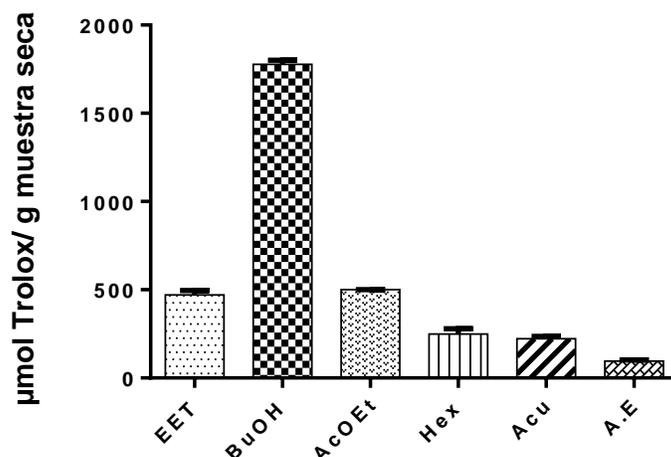


Figura 15. Actividad antioxidante determinada por el método FRAP del extracto etanólico, fracciones y aceite esencial de *C. citratus*.

6.3.5 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

La cuantificación de fenoles totales y flavonoides en extracto etanólico y fracciones de *C. citratus* se realizó debido al importante papel que cumplen dichas moléculas como antioxidantes naturales⁷², las curvas de calibración de los estándares ácido gálico y quercetina se encuentran en el anexo 1, figura 6 y 7 respectivamente. En la tabla 13 se registran los valores obtenidos.

La fracción que presentó mayor contenido en ambos casos fue BuOH, seguido de AcOEt, es decir que los compuestos fenólicos presentan mayor afinidad con disolventes polares, debido a los enlaces O-H,⁸⁸ a excepción de Acu.

Los contenidos de fenoles para las fracciones Acu y Hex no presentaron diferencias significativas (Figura 16) y en cuanto al contenido de flavonoides mientras que la fracción Acu fue menor, esto posiblemente a que Acu es el resultado de varias extracciones L-L con

disolventes de diferente polaridad por lo que la mayoría de los fenoles y flavonoides se encontrarían en otras fracciones.

Tabla 13. Contenido de fenoles y flavonoides en extracto y fracciones de *C. citratus*

Fracción	mg* / g muestra seca (\pm SD, n=3)	
	Fenoles *(Ácido gálico)	Flavonoides *(Quercetina)
EET	88,55 \pm 3,08	74,20 \pm 0,90
Ac	58,59 \pm 4,33	13,07 \pm 2,51
BuOH	196,22 \pm 6,73	131,07 \pm 7,85
AcOEt	139,92 \pm 7,73	58,93 \pm 2,78
Hex	59,53 \pm 0,88	22,07 \pm 3,61

En cuanto a la fracción de Hex se debe mencionar que, aunque existen flavonoides y fenoles de baja polaridad, no son tan comunes y abundantes como los de alta polaridad, razón por la que Hex presenta concentraciones tan bajas.

En esta investigación se encontró un alto valor del contenido de fenoles en EET, obtenido por ultrasonido (88,55 mg ácido gálico/ g material seco) que lo reportado por *Tangkanakul et al.*⁸⁹ en un extracto metanólico obtenido por agitación mecánica (1,53 mg ácido gálico/ g material seco) y por *Javanmardi et al.*⁹⁰ en 23 extractos de *Ocimum basilicum* L (máximo 65,50 mg ácido gálico / g material seco), lo que se puede inferir que con la extracción etanólica de hojas de *C. citratus* por ultrasonido se obtienen extractos con alto contenido de fenoles, la fracción BuOH presentó 196,218 mg ácido gálico/ g material por lo que el fraccionamiento es efectivo en la separación de metabolitos de interés, en este caso fenoles según la polaridad.

En cuanto a los flavonoides se encontraron contenidos mayores que los reportados por *Lobo Roriz et al.*⁹¹ (37.66 \pm 1.07 mg/g infusión seco) con un valor de 74,200 mg quercetina/g extracto seco para EET y 131,067 mg quercetina/g extracto seco para la fracción BuOH.

Según la correlación encontrada entre fenoles y flavonoides ($R^2 = 0,915$), se puede inferir que estas dos variables son directamente proporcionales y se relacionan linealmente por lo que posiblemente el contenido de fenoles es en su mayoría de tipo flavonoide, *Figueirinha et al.*²⁹ reportó resultados similares en infusiones y extractos hidroalcohólicos de *C. citratus*, además caracterizó 13 flavonoides presentes en una fracción proveniente de una infusión de hojas de la planta en estudio.

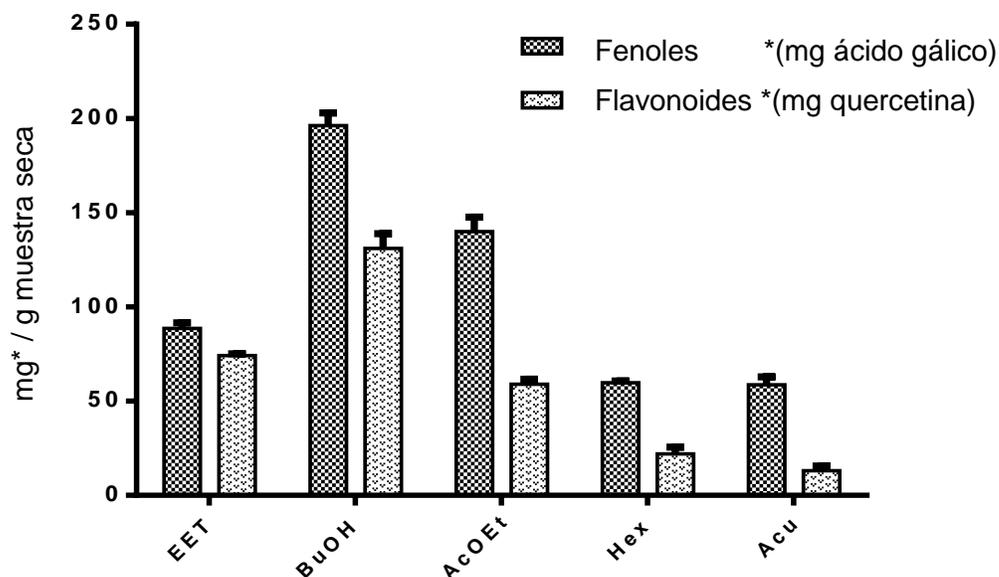


Figura 16. Cuantificación de fenoles y flavonoides en el extracto etanólico y fracciones de *C. citratus*.

6.3.6 Correlaciones

Los coeficientes de correlación se calcularon debido a que el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides generalmente puede estar asociado a la actividad antioxidante, sin embargo el mecanismo de acción de los metabolitos es complejo y variable y puede verse afectado por diferentes variables como medio de reacción, pH, tipo de radical, estructura del antioxidante entre otros, por lo que el coeficiente de Pearson es una herramienta útil para determinar cómo se ve afectada la actividad antioxidante por el contenido de fenoles y flavonoides. Los valores de R^2 se en la tabla 14.

Según los valores obtenidos el método que mejor se correlaciona linealmente con el contenido total de fenoles es ABTS^{•+} seguido por DPPH[•], FRAP y finalmente ORAC, esto indica que la actividad antioxidante que se presenta en ABTS^{•+} es casi en su totalidad por el contenido de los fenoles mientras que en ORAC además de los fenoles las muestras presentan compuestos de otra naturaleza que aportan actividad antioxidante, una de la razones más probables es que este es un método más sensible y el radical que se genera es biológico, por lo que la explicación a la actividad captadora de radicales no es expresada en su totalidad por los fenoles.

Tabla 14. Coeficientes de correlación de Pearson entre el contenido de fenoles, flavonoides totales, y la actividad antioxidante encontrada por los métodos DPPH^{*}, ABTS^{**}, ORAC y FRAP de fracciones, aceite esencial y extracto etanólico total de hojas de *C. citratus*.

Métodos de evaluación de capacidad antioxidante	Coeficiente de correlación (R ²)	
	Fenoles	Flavonoides
DPPH [*]	0,987	0,933
ABTS ^{**}	0,995	0,933
ORAC	0,735	0,857
FRAP	0,915	0,930

Las correlaciones con flavonoides fueron iguales para los métodos ABTS^{**} y DPPH^{*}, sin embargo aunque fueron altas, son menores a los valores de correlación con los fenoles, por lo que además de los flavonoides hay otras moléculas de tipo fenólico que aportan actividad antioxidante aunque en menor proporción, los cuales pueden ser taninos, ácidos fenólicos entre otros, FRAP y ORAC se correlacionaron mejor con flavonoides que con fenoles, posiblemente porque son métodos más selectivos de moléculas con capacidad antioxidativa por lo tanto los flavonoides influyen en mayor medida que compuestos fenólicos de naturaleza no flavonoide, ya que por su estructura la capacidad de donar hidrógenos y electrones aumenta.

6.4 Determinación de los compuestos del aceite esencial de *C. citratus*

Los compuestos se identificaron mediante los índices de retención lineal por columna apolar y polar, además los espectros de los compuestos se compararon con los de las bases de datos Adams, NIST y Wiley, teniendo en cuenta que los compuestos experimentales se identificaron con porcentajes de similitud iguales o superiores al 95% de las bases de datos. En la figura 17 se presenta el perfil cromatográfico del A.E de *C. citratus*, en el que se observan solo los compuestos identificados por la columna apolar DB-5 con una fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), el cromatograma obtenido por la columna polar DB-WAX con fase estacionaria de poli(etilenglicol), se encuentra en el anexo 2, figura 1, en él se observan algunos compuestos que por su naturaleza no se lograron identificar por la columna apolar.

En el análisis cromatográfico se encontraron un total de 21 compuestos los cuales se reportan en la tabla 15.

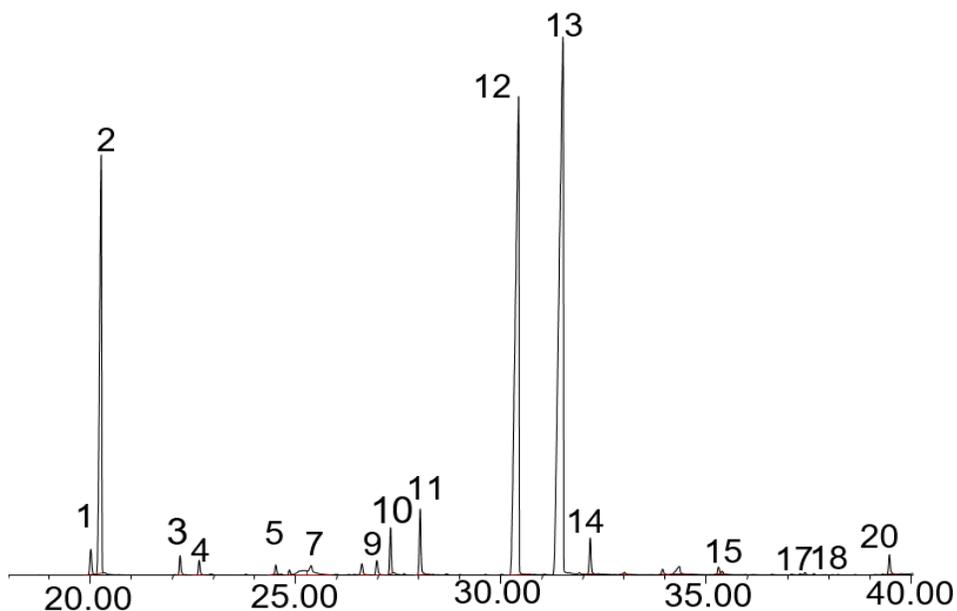


Figura 17. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *C. citratus*. Columna DB-5.

El A.E del *C. citratus* presentó alto contenido de geranial (**13**, 44,59 %), neral (**12**, 30,81 %), mirceno (**2**, 11,26 %) y linalol (**7**, 2,75 %) (Figura 18) y es clasificado como un aceite monoterpenoide, dado que el 90,476 % de los compuestos identificados son de este prototipo.

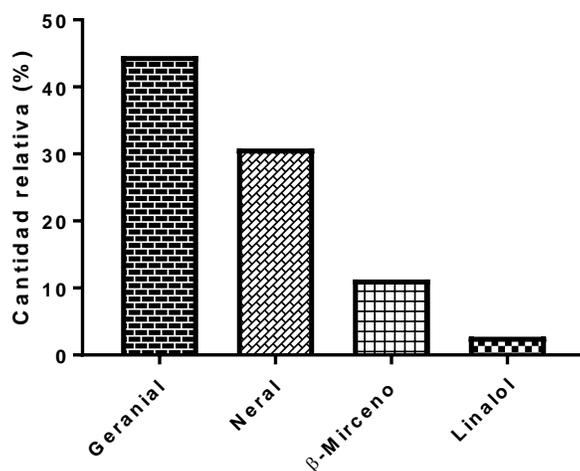


Figura 18. Componentes mayoritarios presentes en el AE de *C. citratus*

En general los aceites esenciales que contienen más del 75 % de citral se consideran como de alta calidad⁹², en este caso se encontró que contiene el 75,40 %, por lo que puede tener

gran cantidad de usos como en la industria de perfumes, cosméticos, productos de aseo, como materia prima para aislamiento del compuesto y como inhibidor de crecimiento de microorganismos.

Tabla 15. Composición química y cantidad relativa del A.E de *C. citratus*.

#	Compuesto	Tipo	IRL _{exp}		IRL _{teórico}		C. R ⁺	S [*]
			DB-5	DB-WAX	DB-5	DB-WAX		
1	6-Metil-5-hepten-2-ona	MO	983	1342	981	1338	0,84	95
2	β-Mirceno	HM	989	1156	988	1163	11,26	97
3	Cis-β-Ocimeno	HM	1033	1237	1032	1245	0,46	95
4	Trans-β-Ocimeno	HM	1047	1255	1044	1251	0,38	95
5	6,7-Epoximirceno	MO	1091	1416	1090	-----	0,38	96
6	Citronelal	MO	-----	1485	-----	1485	0,25	95
7	Linalol	MO	1108	1549	1095	1551	2,75	96
8	Piperitona	MO	1261	1742	1249	1743	0,08	95
9	Cis-isocitral	MO	1160	1579	1160	-----	1,28	98
10	Epóxido de Rosefurano	MO	1171	1610	1173	163	0,09	96
11	Trans-Isocitral	MO	1181	-----	1177	-----	1,28	95
12	Neral	MO	1245	1692	1235	1960	30,81	98
13	Geranial	MO	1279	1740	1264	1744	44,59	99
14	2-Undecanona	MO	1292	1605	1293	-----	1,08	96
15	Acetato de geranilo	MO	1379	1759		1750	0,38	95
16	Citronelol	MO	-----	1768	-----	1771	0,43	95
17	trans-β-Cariofileno	HS	1417	1613		1611	0,18	96
18	trans-α-Bergamoteno	HS	1432	-----	1434	-----	0,08	95
19	2-Tridecanona	MO	1495	1816	1495	-----	1,15	98
20	Geraniol	MO	-----	1854	-----	1850	2,01	98
21	Nerol	MO	1227	1753	-----	1753	0,28	96

HM = Hidrocarburos monoterpénicos, MO = Monoterpenos oxigenados, HS = Hidrocarburos sesquiterpénicos, # número de pico en cromatograma; + Cantidad relativa (%), * Similitud con la base de datos (%), ---- ILR, no reportado o no identificado.

6.5 Ensayo de determinación de toxicidad sobre *Artemia salina*

El ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* permite hacer un barrido general sobre la posible toxicidad que puede presentar un extracto. Los resultados se encuentran consignados en el anexo 3, tabla 1.

El análisis estadístico mostró que los valores de CL₅₀ del extracto etanólico, fracciones y A.E de *C. citratus* fueron significativamente diferentes entre muestras, a excepción de EET el cual no presentó diferencias con el control positivo a las 6 horas.

La toxicidad de las muestras se clasificó a las 6 horas para expresar toxicidad aguda y a las 24 horas para expresar toxicidad crónica según el CYTED (Tabla 16).

La muestra que presentó mayor toxicidad fue el aceite esencial (Figura 19) el cual fue extremadamente tóxico a las 24 horas y altamente tóxico a las 6 horas, la identificación de los compuestos del A.E por CG/MS reveló una alta composición de compuestos monoterpénicos los cuales tienen un efecto altamente nocivo sobre los nauplios de *Artemia salina*. En algunos casos, autores plantean que estos compuestos pueden ser inhibidores enzimáticos de proteasas, causando la muerte del animal rápidamente⁹³.

En cuanto a las fracciones, Hex fue la fracción que presentó mayor toxicidad, siendo altamente tóxico a las 6 y 24 horas de exposición, el EET tuvo un comportamiento similar pero los valores de CL₅₀ son mayores a los obtenidos con Hex.

Las fracciones de mayor polaridad presentaron una baja toxicidad, siendo la fracción Acu la menos tóxica, seguida de BuOH y finalmente AcOEt, el hecho de que la fracción BuOH que ha presentado tan buena actividad antioxidante por diferentes métodos, así como un alto contenido de fenoles y flavonoides, sea ligeramente tóxica es un resultado muy positivo y con un futuro muy promisorio como antioxidante de origen vegetal.

Tabla 16. Clasificación toxicidad según el CYTED⁹⁴.

Categoría	CL ₅₀ (µg/mL)	Categoría	CL ₅₀ (µg/mL)
Extremadamente tóxico	1-10	Ligeramente tóxico	500-1000
Altamente tóxico	10-100	Prácticamente no tóxico	1000-1500
Moderadamente tóxico	100-500	Relativamente inocuo	>1500

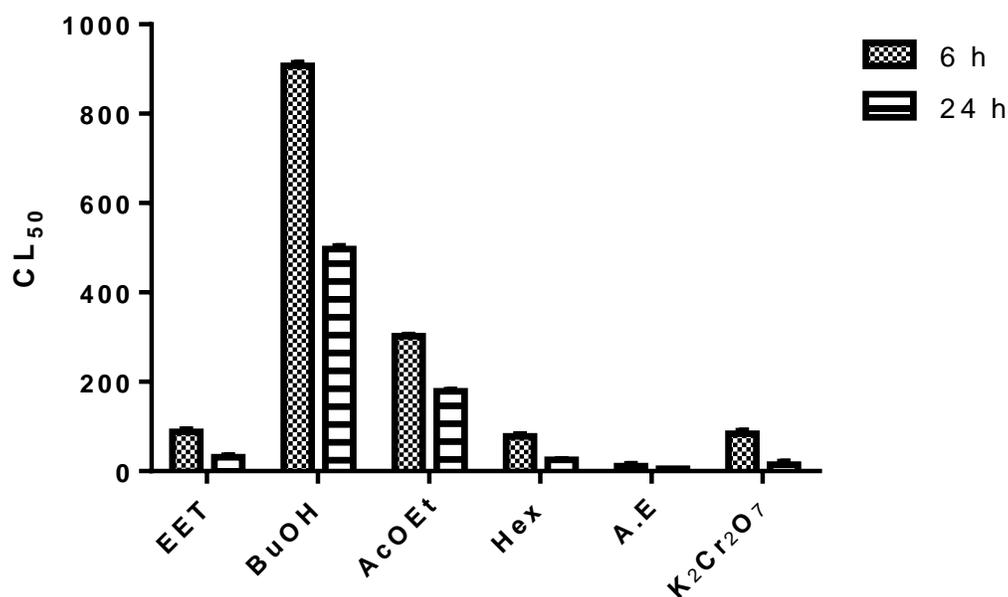


Figura 19. Toxicidad expresada en CL₅₀ del extracto etanólico, fracciones y aceite esencial de *C. citratus* frente *Artemia salina*.

6.6 Ensayo de toxicidad en células meristemáticas de *Allium cepa*

Con este ensayo se evaluaron dos parámetros de toxicidad: fitotóxicidad y citotóxicidad. En la figura 20 se puede observar el efecto del extracto etanólico sobre el crecimiento de la raíz frente al control de agua a diferentes horas de exposición en las concentraciones 60, 125, 300 y 500 ppm, con estos valores se logró calcular el IC₅₀ para cada tiempo de exposición, los valores se reportaron en el anexo 3, tabla 2 y se definió como la concentración que inhibe el 50% del crecimiento de las raíces respecto del grupo control. Este valor evidencia que el efecto de toxicidad aumenta entre las 72 y las 114 horas en las que el IC₅₀ decae en más de 100 unidades y se observa que el valor de concentración inhibitoria disminuye significativamente a mayor tiempo de exposición, por lo que el EET induce un efecto de inhibición crónico en el crecimiento radicular.

La fitotóxicidad es un efecto nocivo o dañino de una sustancia química que se puede expresar en distintos órganos en la planta. En la figura 20 además se observa como las raíces de bulbos expuestos a 500 mg/L tienen una inhibición de crecimiento superior al 75% después de las 114 horas. Los bulbos en la concentración de 60 mg/L, aunque presentaron

inhibición del crecimiento este efecto no fue muy pronunciado y a las 216 h de estar expuestas se observó un mayor crecimiento, por lo que probablemente el bulbo pudo crear mecanismos de defensa contra los metabolitos del EET de *C. citratus*. Algunos reportes mencionan la presencia de metales en extractos de plantas los cuales también probablemente pueden ser los posibles inhibidores del crecimiento de las raíces⁹⁵.

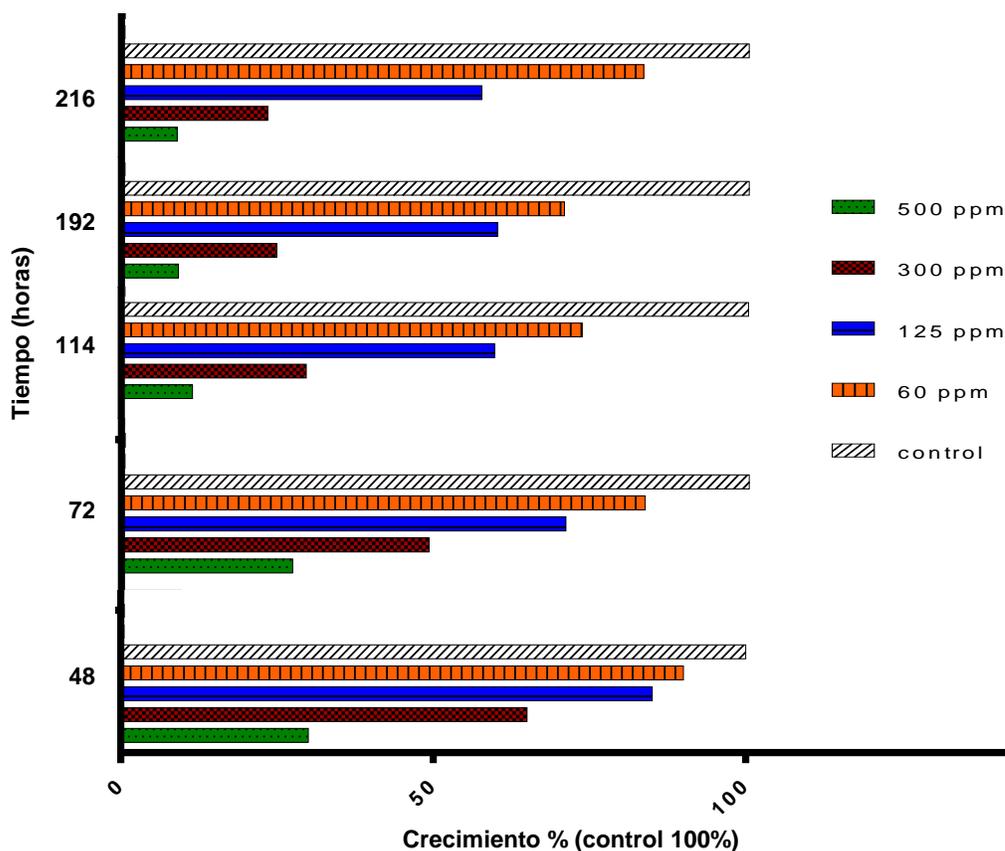


Figura 20. Fitotóxicidad en raíces de *Allium cepa* causado por extracto etanólico de *C. citratus*.

En general se puede observar que la concentración del extracto y la inhibición del crecimiento de la raíz están relacionados directamente.

En el ensayo también se observa como las cebollas en las concentraciones 300 y 500 mg/L presentaban lesiones y cambios (Figura 21) de color de blanco a pardo, además las raíces eran débiles, quebradizas y de color café.

Estos resultados son favorables y sugieren una expectativa sobre el uso del EET como un agente que presenta toxicidad y es de origen natural, para futuros fármacos inhibidores de crecimiento de agentes patógenos o células malignas.

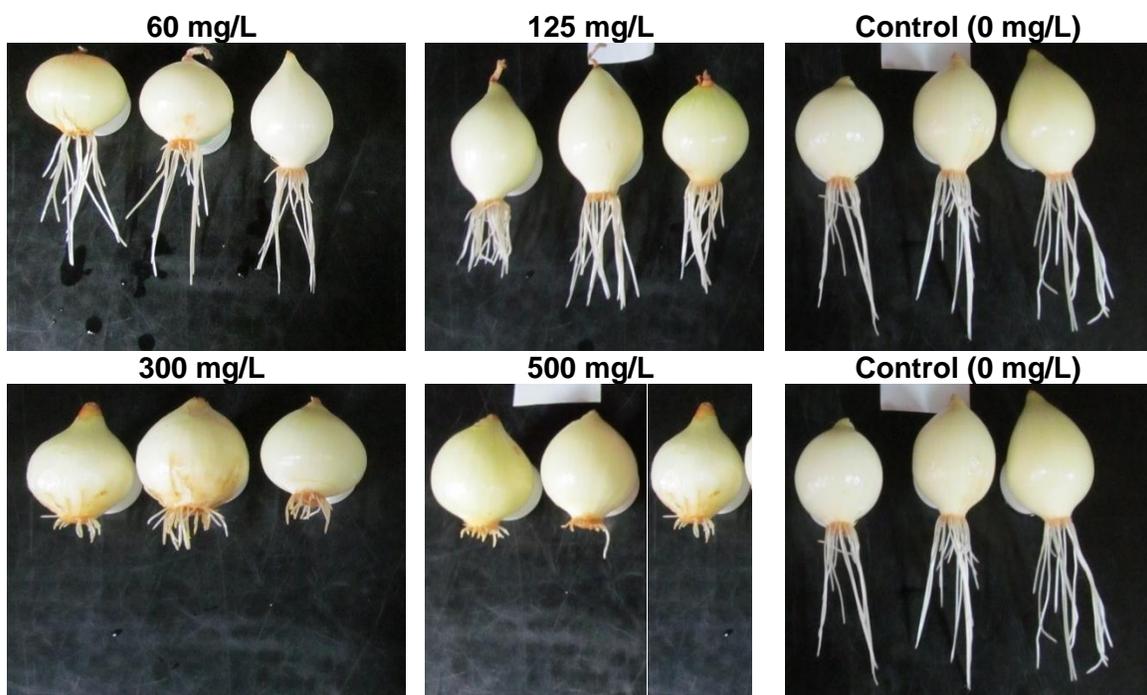


Figura 21. Inhibición en el crecimiento radicular de bulbos de *Allium cepa*, causado por extracto etanólico de *C. citratus* a diferentes concentraciones

Los resultados de índices mitóticos y de fase para el análisis de actividad citotóxica se encuentran en la tabla 17.

Tabla 17. Índices mitóticos y de fase para las células meristemáticas de *Allium cepa* expuesta a diferentes concentraciones de extracto etanólico de *C. citratus*.

(mg/L)	Índice mitótico	Fases mitóticas % (\pm SD, n=3)			
		Profase	Metafase	Anafase	Telofase
Control	61,31 \pm 1,12 ^b	71,74 \pm 5,50 ^o	13,00 \pm 0,76 ^j	7,97 \pm 2,63 ^l	7,31 \pm 0,74 ^m
60	49,10 \pm 1,43 ^a	88,72 \pm 2,13 ^c	4,22 \pm 1,36 ^d	5,52 \pm 0,96 ^k	1,59 \pm 2,54 ⁿ
125	27,74 \pm 2,27 ^p	83,19 \pm 1,45 ^e	7,54 \pm 1,67 ^q	3,13 \pm 1,59 ^{k,l}	6,14 \pm 1,73 ^r
300	9,58 \pm 2,73 ^f	98,84 \pm 1,16 ^h	0,38 \pm 0,04 ⁱ	0,33 \pm 0,06 ^e	0,45 \pm 0,08 ^m
500	28,99 \pm 0,70 ^g	99,11 \pm 0,94 ^h	0,22 \pm 0,01 ⁱ	0,22 \pm 0,03 ^e	0,00 ^t

Las letras pequeñas indican grupos estadísticamente diferentes según la prueba de comparación múltiple de Tukey entre valores de un mismo grupo ($p < 0,05$)

Los índices mitóticos (IM) de todos los tratamientos fueron menores al encontrado en el control por lo que en general se observa que la mitosis fue afectada por compuestos activos

en el extracto etanólico ya que el IM y la actividad de fase dan una estimación de posibles sustancias potencialmente citotóxicas⁹⁶.

Se observó que en las concentraciones 300 y 500 mg/L los índices profase son bastante altos, probablemente el envenenamiento de las células ocurre en la etapa en que las células entran en mitosis, siendo detenidos en la profase, por tanto, los resultados muestran la disminución en los índices de metafase, anafase y telofase con el aumento de la concentración, debido a una prolongada profase que no permite seguir el ciclo adecuadamente.

Los índices de profase de 60 y 125 mg/L no presentaron diferencias significativas, mientras que los índices de metafase, anafase y telofase presentan variaciones entre el 13 y el 1,5 %. La figura 22 muestra las fotografías capturadas en las diferentes placas de células meristemáticas de *Allium cepa* obtenidas durante el test de toxicidad, en las cuales se puede observar un desarrollo normal de la mitosis, sin embargo, es necesario realizar estudios de genotoxicidad los cuales permiten llegar a conclusiones más precisas sobre el daño que pudo sufrir el material genético de las células de prueba.

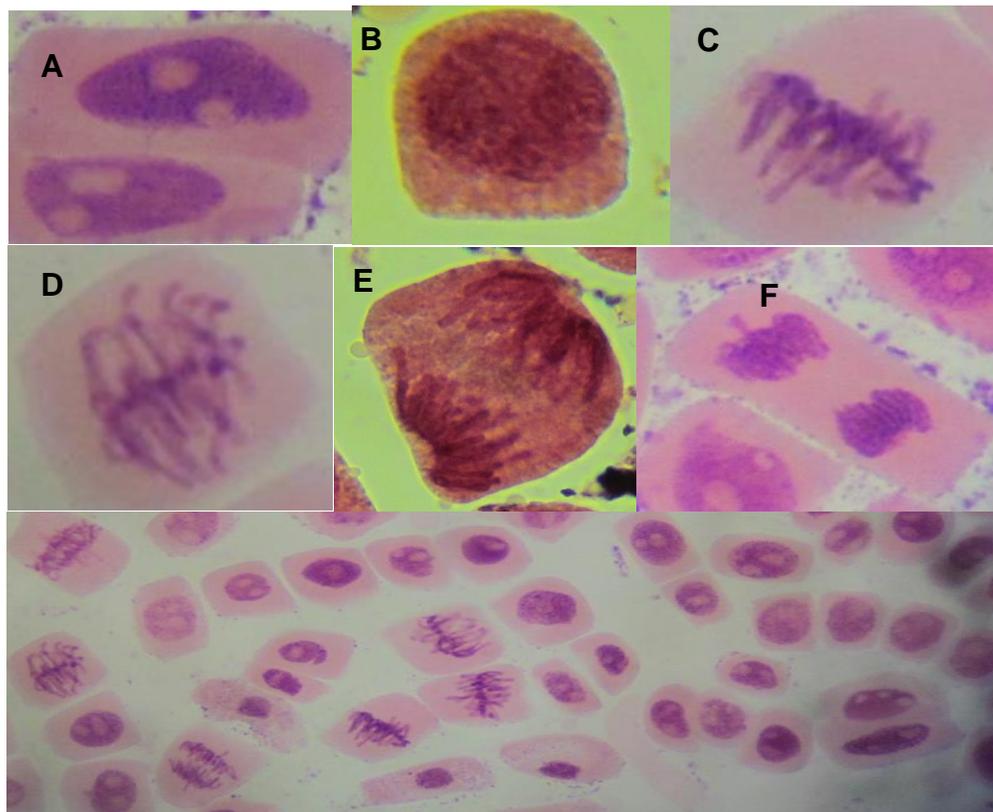


Figura 22. Células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas al extracto etanólico de *C. citratus*. **A.** Interfase **B.** Profase **C.** Metafase temprana **D.** Metafase tardía **E.** Anafase **F.** Telifase **G.** Panorámica de células meristemáticas

7. CONCLUSIONES

Mediante el tamizaje fitoquímico, se realizó la determinación cualitativa de metabolitos como flavonoides, taninos, cumarinas, triterpénos, saponinas y carotenoides los cuales son de alto valor biológico por la actividad que presentan.

El extracto etanólico obtenido de hojas de *Cymbopogon citratus* por ultrasonido y las fracciones presentaron alta actividad antioxidante, destacando la fracción de butanol, ya que en los 4 ensayos de actividad antioxidante fue la que mejores resultados presentó, demostrando que esta fracción es buen antioxidante llevando a cabo diferentes mecanismos con radicales sintéticos y biológicos.

El contenido de fenoles y flavonoides del extracto etanólico y fracciones de *C. citratus* es alto, lo que explica su gran actividad biológica, y además se encontró una relación directa entre la polaridad del disolvente y el contenido de estos compuestos haciendo excepción de la fracción acuosa.

El extracto etanólico de hojas de *C. citratus* obtenido por ultrasonido presentó un alto contenido de compuestos fenólicos comparados con infusiones y extractos acuosos obtenidos por maceración, lo que indica que la técnica además de extraer buena cantidad de metabolitos, conserva inalterados los compuestos activos de los extractos.

La mayor toxicidad frente *Artemia salina* la presentó el aceite esencial, el cual tiene altos contenidos de citral. La fracción de hexano y el extracto etanólico también presentaron una mayor toxicidad frente a este crustáceo que las fracciones butanol, acetato y acuosa.

La fracción butanólica presentó una alta actividad antioxidante y es ligeramente tóxica sobre *Artemia salina* por lo que tiene un futuro promisorio como fuente natural de antioxidantes en la industria cosmética y farmacéutica.

El análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permitió identificar 21 compuestos, de los cuales el 90,5% corresponde a compuestos monoterpénicos.

El aceite esencial obtenido de hojas de *C. citratus* obtenido por destilación agua-vapor se puede considerar como una esencia de alta calidad ya que contiene más del 75% de citral, por lo que puede ser usado en la industria como materia prima para fabricación de productos de belleza, cosméticos, perfumería o aislamiento del compuesto.

El extracto etanólico de hojas de *C. citratus* mostró actividad fitotóxica en bulbos de *Allium cepa* la cual se evidencia en la disminución en la concentración del IC_{50} después de las 72 horas de exposición, por lo que con estudios más avanzados y especializados puede tener varias aplicaciones como inhibidor de crecimiento de origen natural.

Los índices mitóticos de las células meristemáticas de *Allium cepa* fueron menores en todas las concentraciones de extracto etanólico de *C. citratus* a las que fueron expuestas, además se encontró que en las concentraciones 300 y 500 ppm, los índices de fase haciendo excepción de profase, fueron casi nulos, con lo que se infiere una posible inhibición de la mitosis en la primera etapa.

8. RECOMENDACIONES

Realizar estudios de actividad antioxidante por métodos lipofílicos como rancimat, ORAC lipofílico o peroxidación lipídica, con el fin de observar el comportamiento del extracto etanólico, fracciones y aceite esencial de hojas de *C. citratus* y de esta forma tener una visión más detallada de las aplicaciones futuras en la que podría ser usado.

Realizar un análisis nivel celular de la toxicidad en *Artemia salina*, para tener más claridad del mecanismo de acción de los metabolitos secundarios del extracto etanólico, fracciones y aceite esencial de hojas de *C. citratus* sobre el crustáceo

Realizar la determinación de genotoxicidad en *Allium cepa* no solo de extracto etanólico, sino de fracciones y aceite provenientes de *C. citratus*, con el fin de evidenciar si los compuestos bioactivos de esta planta además de tener efectos fitotóxicos y citotóxicos pueden causar daño a nivel cromosómico y de esta forma tener un mayor soporte científico en el uso y aplicación de los extractos y sobre los efectos que estos podría causar.

Realizar actividades farmacológicas como antifúngica, bactericida y citotóxico en líneas celulares tumorales y del extracto, fracciones y aceite esencial de *C. citratus* para determinar posibles aplicaciones en diferentes organismos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ekpenyong C, Akpan E, Nyoh A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chin J Nat Med*. 2015;13(5):321-337.
2. Balachandar B, Sadayan P, Abimanan A. Evaluation of the lemongrass plant (*Cymbopogon citratus*) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2014;4(S1):134-139.
3. Negrelle R, Gomes E. *Cymbopogon citratus* (DC .) Stapf : chemical composition and biological activities. *Rev Bras Pl Med Botucatu*. 2007;9(1):80-92.
4. Bahmani M, Golshahi H, Saki K, Rafieian M, Delfan B, Mohammadi T. Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2014;4(S2):S687-S692.
5. Cordell G. Biodiversity and drug discovery - A symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 2000;55(6):463-480.
6. Gorelick J, Bernstein N. Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. In: *Advances in Agronomy*. Vol 124. 1st ed. Elsevier Inc.; 2014:201-230.
7. Verpoorte R, Alfermann A. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Boston, London: Kluwer; 2000.
8. Zhong J, Tong S. Plant Secondary Metabolites. *Compr Biotechnol (Second Ed)*. 2011;Volume 3:299-308.
9. Azcón J, Talón M. *Fisiología Y Bioquímica Vegetal*. MCGRAW-HILL. INTERAMERICANA DE ESPAÑA; 1993.
10. Leicach S, Chludil H. Plant Secondary Metabolites: Structure–Activity Relationships in Human Health Prevention and Treatment of Common Diseases. In: *Synthesis*. Vol 42. 1st ed. Elsevier B.V.; 2007:267-304.
11. Sandoval C, Ferreira J, Speisky H. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Arch Biochem Biophys*. 2014;559:75-90.
12. Carratù B, Sanzini E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Ann Ist Super Sanita*. 2005;41(1):7-16.
13. Thichanpiang P, Wongprasert K. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate attenuates TN - α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression and

- monocyte adhesion to retinal pigment epithelial cells. *Am J Chin Med.* 2015;43(1):103-119.
14. Francisco V, Costa G, Figueirinha A, et al. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2011;133(2):818-827.
 15. Francisco V, Costa G, Figueirinha A, et al. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor-kB pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. *J Ethnopharmacol.* 2013;148(1):126-134.
 16. Bhattacharya U, Mukhopadhyay S, Giri A. Comparative antimutagenic and anticancer activity of three fractions of black tea polyphenols thearubigins. *Nutr Cancer.* 2011;63(7):1122-1132.
 17. Sahpazidou D, Geromichalos G, Stagos D, et al. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicol Lett.* 2014;230(2):218-224.
 18. Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev.* 2012;11(2):329-345.
 19. Reglodi D, Renaud J, Tamas A, et al. Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease : Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol.* 2015.
 20. Lopez M, Dempsey R, Vemuganti R. Resveratrol neuroprotection in stroke and traumatic CNS injury. *Neurochem Int.* 2015;89:75-82.
 21. Fraga C, Galleano M, Verstraeten S, Oteiza P. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med.* 2010;31(6):435-445.
 22. Perez F, Duarte J. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med.* 2010;31(6):478-494.
 23. Crozier A, Del Rio D, Clifford M. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med.* 2010;31(6):446-467.
 24. Siow R, Mann G. Dietary isoflavones and vascular protection: Activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis?. *Mol Aspects Med.* 2010;31(6):468-477.
 25. Sierra J. *Fundamentos Para El Establecimiento de Pasturas Y Cultivos Forrajeros.* Segunda ed. Editorial Universidad de Antioquia; 2005.
 26. Cárdenas. D, Castaño. N CJ. *Plantas Introducidas, Establecidas E Invasoras En Amazonia Colombiana.* Bogotá, Colombia: Instituto amazónico de investigaciones científicas; 2011.

27. León J. *Botánica de Los Cultivos Tropicales*. Segunda ed. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura; 1987.
28. Soto R, Vega G, Tamajón A. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Rev Cuba Plantas Med*. 2002;7(2):89-95.
29. Figueirinha A, Paranhos A, Pérez- J, Santos C, Batista M. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chem*. 2008;110(3):718-728.
30. Naik M, Fomda B, Jaykumar E, Bhat J. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pac J Trop Med*. 2010;3(7):535-538.
31. Sagradas J, Costa G, Figueirinha A, et al. Gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* infusion on acute ethanol-induced gastric lesions in rats. *J Ethnopharmacol*. 2015;173:134-138.
32. Hanifah A, Awang S, Ming H, Abidin S, Omar M. Acaricidal activity of *Cymbopogon citratus* and *Azadirachta indica* against house dust mites. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(5):365-369.
33. Nguefack J, Dongmo J, Dakole C, et al. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *Int J Food Microbiol*. 2009;131(2-3):151-156.
34. Lee LY, Lee XJ, Chia PC, Tan KW, Gan S. Utilisation of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) as biosorbent for the sequestration of nickel ions from aqueous solution: Equilibrium, kinetic, thermodynamics and mechanism studies. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2014;45(4):1764-1772.
35. Roriz C, Barros L, Carvalho A, Santos C, Ferreira I. *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Res Int*. 2014;62:684-693.
36. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. *Biological Effects of Essential Oils - A Review*. Vol 46.; 2008.
37. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem*. 2001;8(3):303-313.
38. Chua S, Tan C, Mirhosseini H, Lai O, Long K, Baharin B. Optimization of ultrasound extraction condition of phospholipids from palm-pressed fiber. *J Food Eng*. 2009;92(4):403-409.

39. Dong J, Liu Y, Liang Z, Wang W. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. *Ultrason Sonochem.* 2010;17(1):61-65.
40. Rodríguez-Riera Z, Robaina-Mesa M, Jáuregui-Haza U, Blanco-González A, Rodríguez-Chanfrau JE. Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Rev CENIC Ciencias Químicas.* 2014;45(September 2015):139-147.
41. Jadhav D, B.N. R, Gogate PR, Rathod VK. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *J Food Eng.* 2009;93(4):421-426.
42. Cheok C, Chin N, Yusof Y, Talib R, Law C. Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments. *Ind Crops Prod.* 2013;50:1-7.
43. Craft B, Kerrihard A, Amarowicz R, Pegg R. Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2012;11(2):148-173.
44. Prior R. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods.* 2015;18:797-810.
45. López C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* 2013;763:1-10.
46. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cuba Med Mil.* 2002;31(2):126-133.
47. Cordoba Y. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos y aceites esenciales de seis especies de *Lippia* spp. (familia verbenaceae), por diferentes métodos (ABTS, ORAC y Monitoreo de peroxidación lipídica). 2014.
48. Mishra K, Ojha H, Chaudhury N. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical review and results. *Food Chem.* 2012;130(4):1036-1043.
49. Villanueva-Tiburcio JE, Condezo-Hoyos LA, Asquieri ER. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Ciência e Tecnol Aliment.* 2010;30(1):151-160.
50. Ou B, Hampschl M, Prior R. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe

- Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent. *J Agric Food Chem.* 2001;49:4619-4626.
51. Bolanos De La Torre A, Henderson T, Nigam P, Owusu R. A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chem.* 2015;174:119-123.
 52. Pérez J, Saura F. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. efecto de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. 2011.
 53. Wootton P, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Res Int.* 2011;44(1):217-224.
 54. Tovar J. Determinación de la actividad antioxidante DPPH Y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera. 2013.
 55. Hossain A, Hamood A, Humaid M. Comparative evaluation of total phenols, flavonoids content and antioxidant potential of leaf and fruit extracts of *Omani ziziphus jujuba* L. *Pacific Sci Rev A Nat Sci Eng.* 2016;(November):6-11.
 56. Cruz J. Relación Flavonoides Totales-Actividad Antidiabética (in Vitro Por Difusión De Glucosa) En Extractos De *Colubrina elliptica*. 2012.
 57. González A, Presa M, Lurá M. Ensayo de toxicidad a *Artemia salina*: Puesta a punto y aplicación a micotoxinas. *Rev FABICIB.* 2003;7:117-122.
 58. Pino O, Lazo F. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev Protección Veg.* 2010;22(1):34-43.
 59. Diaz SLC. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. *Pontif Univ Javeriana.* 2006.
 60. Koutsaftis A, Aoyama I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Sci Total Environ.* 2007;387(1-3):166-174.
 61. Parra A, Yhebra R, Sardiñas I, Buela L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine.* 2001;8(5):395-400.
 62. Andrioli N, Wulff A, Mudry M. *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y geotoxicidad de metronidazol. *Theoria.* 2006;15(2):9-16.

63. Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res.* 2009;682(1):71-81.
64. Muñoz DM, Guerrero N. *Allium* test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de *Allium cepa*.
65. Asare G, Bugyei K, Sittie A, et al. Genotoxicity, cytotoxicity and toxicological evaluation of whole plant extracts of the medicinal plant *Phyllanthus niruri* (Phyllanthaceae). *Genet Mol Res.* 2012;11(1):100-111.
66. Soto M, Leiva M. Estudio exomorfológico y fitoquímico de los bulbos de dos especies endémicas del Perú de Amaryllidaceae. *Arnaldoa.* 2015;22(1):269 – 288.
67. Domínguez X. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa; 1979.
68. Brand W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28(1):25-30.
69. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9):1231-1237.
70. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1998;299(1995):15-27.
71. Li A, Li S, Li H, Xu D, Xu X, Chen F. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *J Funct Foods.* 2014;6(1):319-330.
72. Kim DO, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 2003;81(3):321-326.
73. Sanabria A. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia Salina* de plantas Colombianas. *Univ Nac Colomb.* 1997;26:15-19.
74. Syahmi A, Vijayarathna S, Sasidharan S, et al. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Elaeis guineensis* jacq., (oil palm leaf) methanol extract. *Molecules.* 2010;15(11):8111-8121.
75. Fiskesjö G. The *Allium*-test as a standard in environmental monitoring,. *Hereditas.* 1985;102:99-112.
76. Obando A, Ortega N. Evaluación de las actividades antioxidante y de acetilcolinesterasa de extractos alcohólicos del pericarpio, pedúnculo y pulpa del mangostino (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) cultivado en Montenegro, Quindío. 2016.

77. Mesa A, Gaviria C, Cardona F, Sáez J, Trujillo V S, Rojano B. Antioxidant activity and total phenols content from some species of *Calophyllum* genus. *Rev Med Cubana*. 2009.
78. Cimanga K, Kambu K, Tona L, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(2):213-220.
79. Rodríguez R, Carlos R, Arias G, Castro H, Martínez J, Stashenko E. Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia . *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas*. 2012;11(1):77-85.
80. Carvajal L, Hata Y, Sierra N, Rueda D. Preliminary phytochemical analysis of Cupatá (*Strychnos schultesiana* krukoff) stems and seeds. *Rev Colomb For*. 2009;12:161-170.
81. Wu X, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior R. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. 2004:4026-4037.
82. Kanimozhi P, Prasad NR. Antioxidant potential of sesamol and its role on radiation-induced DNA damage in whole-body irradiated Swiss albino mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;28(2):192-197.
83. Guangrong H, Jiabin J, Dehui D. Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African J Biotechnol*. 2008;7(9):1335-1338.
84. Sökmen M, Serkedjieva J, Daferera D, et al. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J Agric Food Chem*. 2004;52(11):3309-3312.
85. Sharma O, Bhat T. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem*. 2009;113(4):1202-1205.
86. Zulueta A, Esteve M, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem*. 2009;114(1):310-316.
87. Schaich K, Tian X, Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J Funct Foods*. 2015;18:782-796.
88. Radhi Z, Abdullah A, Abd S. Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. *J Med Plants Res*. 2013;7(47):3354-3359.

89. Tangkanakul P, Auttaviboonkul P, Niyomwit B, Lowvitoon N, Charoenthamawat P, Trakoontivakorn G. Antioxidant capacity, total phenolic content and nutritional composition of Asian foods after thermal processing. *Int Food Res J*. 2009;16(4):571-580.
90. Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum accessions*. *Food Chem*. 2003;83(4):547-550.
91. Roriz CL, Barros L, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. *Food Chem*. 2015;185:16-24.
92. Vargas A, Bottia E. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el Peñón. 2008.
93. López M. Toxicidad volátil de monoterpenoides y mecanismos bioquímicos en insectos. 2008.
94. Sánchez L, Neira A. Bioensayo General de la letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw. *Cult Cient*. 2005:40-45.
95. Akinboro A, Bakare A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *J Ethnopharmacol*. 2007;112(3):470-475.
96. Özkara A, Akyil D, Eren Y, Erdogmus F, Konuk M, Sałlam E. Assessment of cytotoxic and genotoxic potential of pyracarbolid by *Allium* test and micronucleus assay. *Drug Chem Toxicol*. 2015;38(3):337-341.

ANEXOS

ANEXO 1. CURVAS DE CALIBRACIÓN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

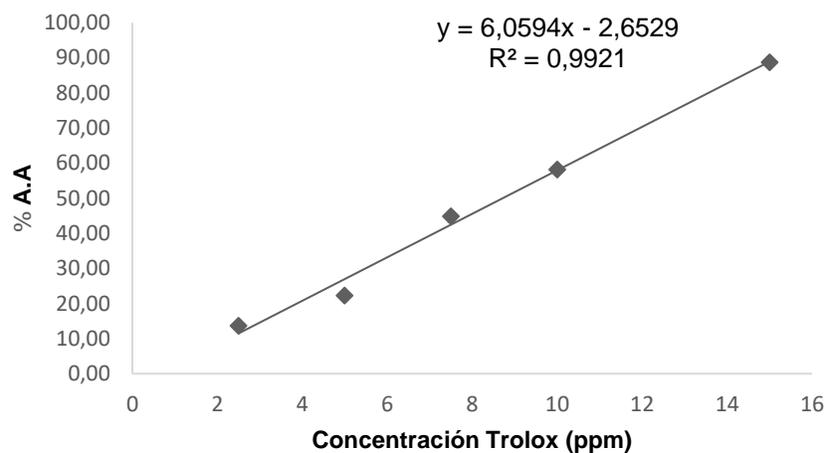


Figura 1. Curva de calibración del Trolox para la capacidad antioxidante por DPPH

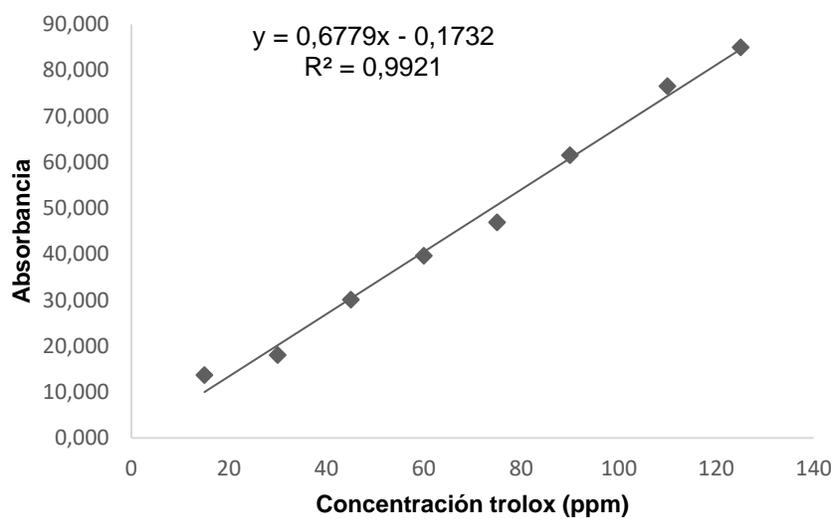


Figura 2. Curva de calibración del Trolox para la capacidad antioxidante por ABTS⁺

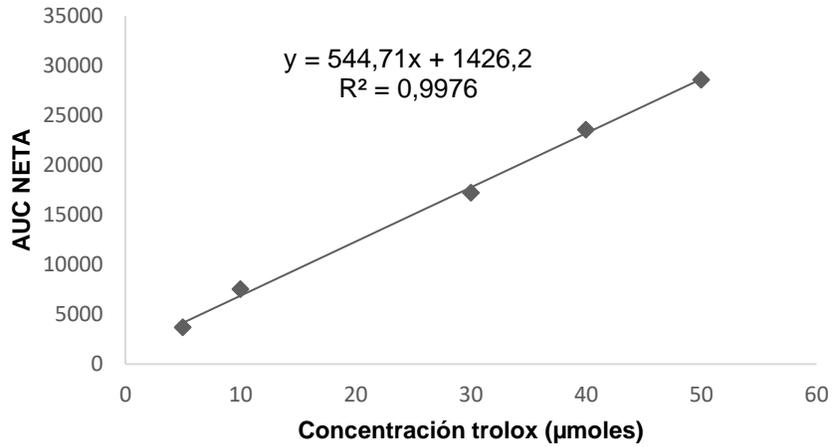


Figura 3. Curva de calibración del Trolox para la capacidad antioxidante por ORAC

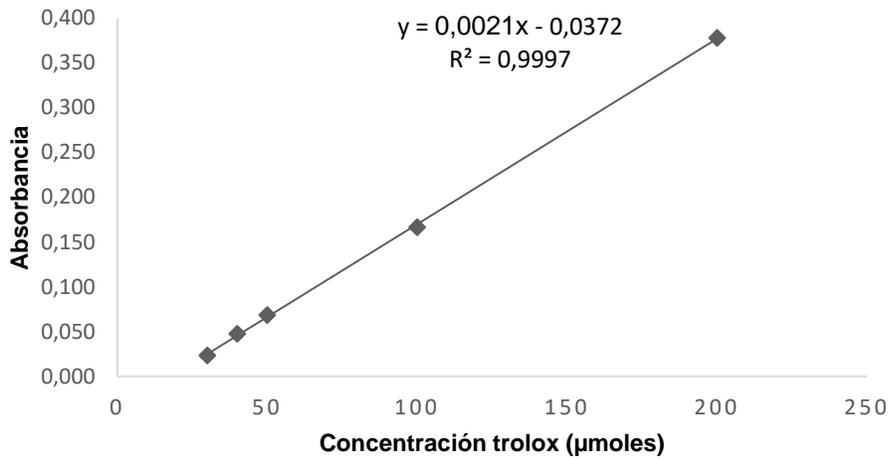


Figura 4. Curva de calibración de Trolox para la capacidad antioxidante por FRAP

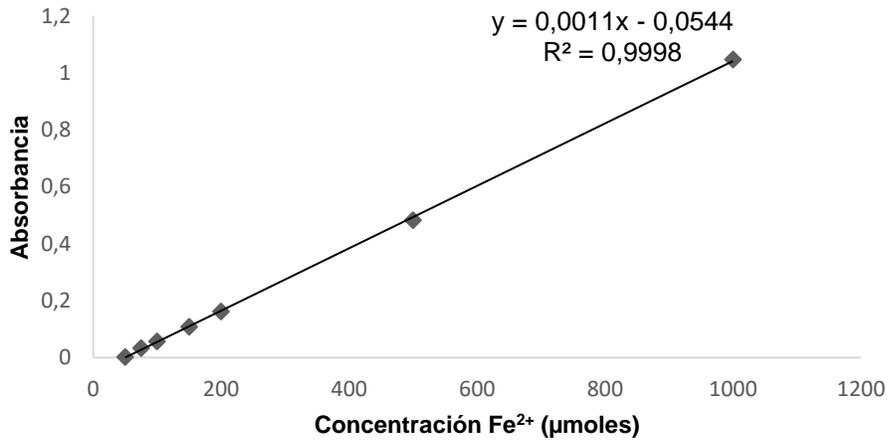


Figura 5. Curva de calibración de Fe^{2+} para la capacidad antioxidante por FRAP

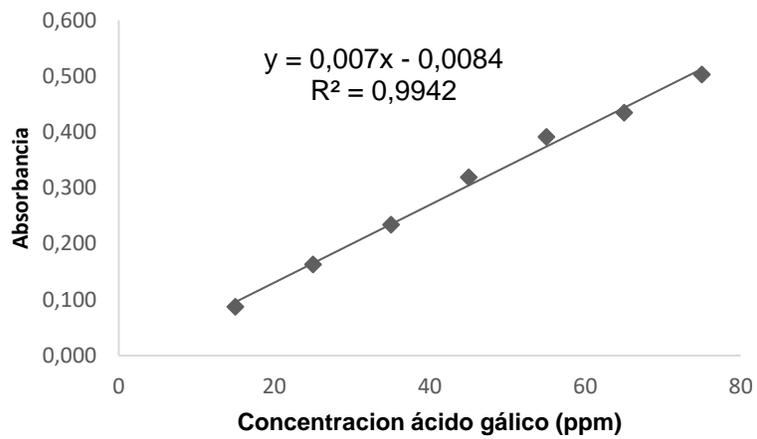


Figura 6. Curva de calibración de ácido gálico empleada para la cuantificación de fenoles

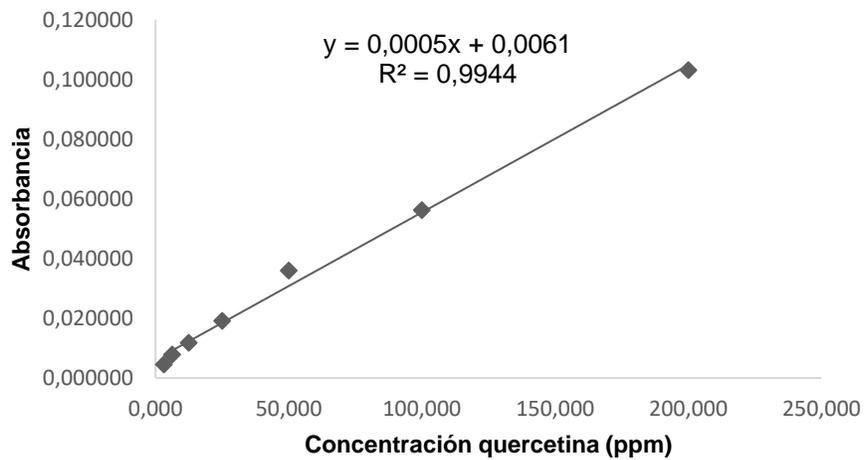


Figura 7. Curva de calibración de quercetina empleada para la cuantificación de flavonoides

ANEXO 2. CROMATOGRAFÍA DE GASES

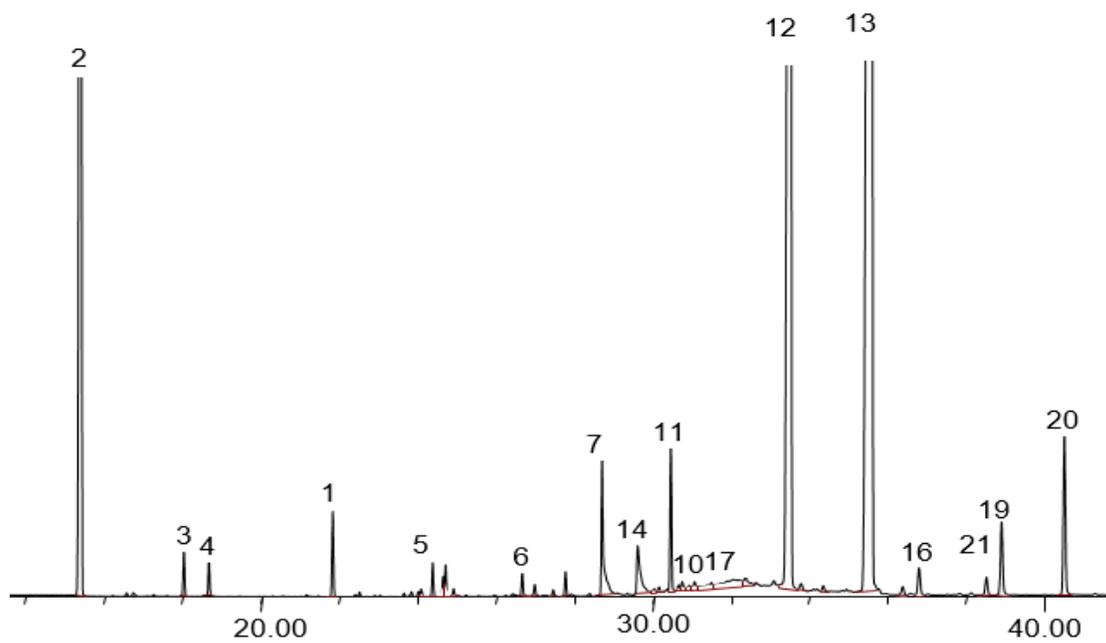


Figura 1. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *C. citratus*. Columna DB-WAX

ANEXO 3. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

Tabla 1. Concentración letal sobre *A. salina* extracto etanólico, fracciones y A.E de *C. citratus*

Fracción	CL ₅₀ (mg/L) (\pm SD, n=3)	
	6 horas	24 horas
EET	87.90 \pm 4,8	31,16 \pm 3,7
Ac	N.T	997,00 \pm 4,0
BuOH	906,70 \pm 5,9	497.20 \pm 5,7
AcOEt	301.80 \pm 2,4	178.60 \pm 2,8
Hex	77,94 \pm 3,9	25,23 \pm 1,1
A.E	11,238 \pm 4,4	5.23 \pm 0,2
K ₂ Cr ₂ O ₇	83,76 \pm 5,6	14,99 \pm 5,6

N.T: no tóxico

Tabla 2. Fitotoxicidad del extracto etanólico de *C. citratus* frente a raíces de *Allium cepa*

Concentración (mg/L)	Longitud de raíces (cm), (\pm SD, n=3)	Crecimiento de raíz (% de control)	IC ₅₀ (mg/L)
24 h			
500	0,284 \pm 0,131	52,469	N.D
300	0,416 \pm 0,202	77,160	
125	0,401 \pm 0,050	78,296	
60	0,427 \pm 0,064	79,012	
Control	0,540 \pm 0,157	100,00	
48 h			
500	0,4 \pm 0,002	30,007	357,18
300	0,866 \pm 0,058	65,016	
125	1,000 \pm 0,230	75,187	
60	1,2 \pm 0,200	90,022	
Control	1,333 \pm 0,289	100,00	
72 h			
500	0,466 \pm 0,047	27,274	294,28
300	0,838 \pm 0,183	49,029	
125	1,211 \pm 0,359	70,783	
60	1,427 \pm 0,294	83,446	
Control	1,711 \pm 0,305	100,00	
114 h			
500	0,48 \pm 0	11,374	155,71
300	1,244 \pm 0,608	29,489	
125	3,288 \pm 0,659	59,863	
60	3,1 \pm 0,174	73,459	
Control	4,222 \pm 0,173	100,00	
192 h			
500	0,500 \pm	9,100	154,23
300	1,361 \pm 0,493	24,774	
125	2,51 \pm 0,295	59,478	
60	3,877 \pm 0,150	70,582	
Control	5,494 \pm 0,395	100,00	
216 h			
500	0,6 \pm	8,911	146,82
300	1,566 \pm 0,602	23,268	
125	3,866 \pm 0,757	57,428	
60	5,6 \pm 0,100	83,172	
Control	6,733 \pm 0,251	100,00	

*ND: no determinado