

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y FARMACOLÓGICA EN EL  
EXTRACTO ETANÓLICO EN HOJAS DE *Hymenocallis acutifolia* (Amaryllidaceae)**

**MARÍA ALEJANDRA MUÑOZ TORRES**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)  
POPAYÁN  
2017**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y FARMACOLÓGICA EN EL  
EXTRACTO ETANÓLICO EN HOJAS DE *Hymenocallis acutifolia* (Amaryllidaceae)**

**MARÍA ALEJANDRA MUÑOZ TORRES**

**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 DARIO BERMUDEZ Mg.**  
PROFESOR DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)  
POPAYÁN  
2017**

## Nota de aceptación

---

---

---

---

Director

---

Fabio Antonio Cabezas Fajardo Ph. D.

Jurado

---

Paola Andrea Gómez Buitrago Ph. D.

Jurado

---

Danny Alejandro Arteaga Fuertes Ph. D.

## ***Dedicatoria***

*A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.*

*A mis padres, Faiber y Lesly, por darme la vida y amarme incondicionalmente, por darme una carrera para mi futuro y ayudarme a levantar cada vez que tuve un tropiezo durante este proceso, por la motivación constante y valores inculcados que me han permitido ser una persona de bien, por sus oraciones y siempre recordarme que hay un Dios de amor que hace posibles los sueños cuando ve la intención del corazón.*

*A mis hermanas Luisa, Catalina y Juliana, por su compañía, paciencia y por ayudarme a superar las dificultades.*

*A mi abuela Nelly Laso quien con su amor incondicional, oraciones y enseñanzas me han acompañado siempre.*

*A Julián Rojas por creer en mí, por su constante apoyo durante este importante paso y por los consejos que ayudaron a culminar esta etapa.*

*Al profesor Fabio Antonio Cabezas quien dirigió con paciencia y dedicación este trabajo, por compartir conmigo su conocimiento y por brindarme su confianza.*

## **Agradecimientos**

A mi director Fabio Antonio Cabezas Fajardo Ph.D, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Al M.Sc. Oscar Darío Bermúdez Zambrano, por colaboración y dedicación prestada, especialmente en la parte de conservación y propagación del material vegetal.

Al Dr. Juan Carlos Argoti Burbano, por su disposición, asesoría y constante colaboración sobre la actividad antioxidante, también por la confianza depositada en mí durante el trabajo en el laboratorio.

A los profesores del grupo QCB, Dr. Fernando Hernández y Dra. Andrea Carolina Cabanzo, por su tiempo y colaboración prestada.

Al Dr. Germán Cuervo Ochoa por los servicios prestados por parte de la Unidad de Análisis Industriales, especialmente para el análisis UV-vis de algunos ensayos y por la colaboración de cada uno de sus monitores.

Al Dr. Oscar Marino Mosquera, por permitirme trabajar en su grupo de investigación en la Universidad Tecnológica de Pereira, quienes me recibieron amablemente y me brindaron su colaboración en el desarrollo de algunos ensayos.

A la profesora Diana Muñoz quien con su constante seguimiento y apoyo, se logró completar la actividad citotóxica.

Al Dr. Danny Alejandro Arteaga, por su asesoría y tiempo dedicado.

Al Dr. Philip Artur Silverstone Sopkin, por la clasificación de la planta investigada.

Al Dr. Bernardo Ramírez, por su ayuda en la clasificación de la especie estudiada.

Al profesor Jaume Bastida y Laura Torras, por toda la colaboración en la identificación de compuestos en la Universidad de Barcelona.

A la Universidad del Cauca por la formación profesional.

A los profesores del departamento de Química de la Universidad del Cauca, por contribuir en mi formación personal y profesional.

Al grupo de Investigación en Biotecnología-Productos Naturales, quienes me acogieron y colaboraron durante la estadía en la Universidad Tecnológica de Pereira.

A mi grupo de Investigación QCB (Química de Compuestos Bioactivos), por abrirme las puertas del laboratorio y por hacerme parte del mismo brindándome todo el apoyo y confianza necesarios para culminar esta etapa, por enseñarme a trabajar en grupo en especial a mis compañeros Lina Trujillo, Anuar Caldon, Vanessa Bastidas, Diana Correa, Hamilton Martinez y Angie Rengifo, gracias por tantos recuerdos.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a toda mi familia, quienes me han acompañado durante toda mi vida y me han dado las herramientas suficientes para afrontar las dificultades, me han inculcado el valor de las cosas y siempre me alentaron a conseguir las metas propuestas.

A Julián Rojas por mostrarme que nada es imposible con trabajo, dedicación y carácter, por su incondicional apoyo y paciencia durante todo este proceso.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible este sueño, amigos y compañeros que de una u otra forma pusieron su grano de arena en este trabajo. GRACIAS!

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>AAPH</b>	.....	Cloruro de 2,2' – azobis (2 – amidinopropano)
<b>ABTS</b>	.....	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina) 6 – sulfonato
<b>Acu</b>	.....	Acuosa
<b>AcOEt</b>	.....	Acetato de etilo
<b>BHT</b>	.....	Butilhidroxitolueno
<b>BSTFA</b>	.....	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
<b>BuOH</b>	.....	Butanol
<b>CL<sub>50</sub></b>	.....	Concentración letal 50
<b>CYTED</b>	.....	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
<b>DMSO</b>	.....	Dimetilsulfóxido
<b>DPPH</b>	.....	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
<b>Eq</b>	.....	Equivalente
<b>EET</b>	.....	Extracto etanólico total
<b>F-C</b>	.....	Folin ciocalteu
<b>FRAP</b>	.....	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante
<b>G</b>	.....	Gramos
<b>HAT</b>	.....	Hydrogen atom transfer (Transferencia de átomo de hidrógeno)
<b>Hex</b>	.....	Hexano
<b>IC<sub>50</sub></b>	.....	Concentración capaz de inhibir 50% de la actividad
<b>IM</b>	.....	Índice mitótico
<b>MeOH</b>	.....	Metanol
<b>mL</b>	.....	Mililitro
<b>mg</b>	.....	Miligramo
<b>ORAC</b>	.....	Capacidad Absorbancia de Radicales Libres de Oxígeno
<b>OH</b>	.....	Radical Hidroxilo
<b>PBS</b>	.....	Solución de buffer fosfato
<b>ppm</b>	.....	Partes por millón
<b>QCB</b>	.....	Química de Compuestos Bioactivos
<b>R<sup>2</sup></b>	.....	Coeficiente de correlación
<b>RT</b>	.....	Tiempo de retención
<b>RI</b>	.....	Índice de Kovats
<b>SET</b>	.....	Single electron transfer (Transferencia de un solo electrón)
<b>SD</b>	.....	Desviación Estándar
<b>TPTZ</b>	.....	(2, 4, 6 – tripiridil – s – triazina)

<b>Trolox</b>	.....	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 – tetrametilcroman-2-carboxilo
<b>Tungsteno</b>	.....	W
<b>TPC</b>	.....	Contenido de fenoles totales
<b>UV</b>	.....	Ultravioleta
<b>Uv-VIS</b>	.....	Ultravioleta-Visible
<b>%A.A</b>	.....	Porcentaje de actividad antioxidante
<b>A-T</b>	.....	Tocoferol
<b>µg</b>	.....	Microgramo
<b>µL</b>	.....	Microlitro

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1.    QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES .....	3
2.2.    METABOLITOS SECUNDARIOS.....	3
2.2.1. Compuestos fenólicos.....	5
2.2.2. Alcaloides.....	6
2.3.    FAMILIA Amaryllidaceae .....	8
2.3.1. Género <i>Hymenocallis</i> .....	8
2.3.2. Taxonomía <i>Hymenocallis acutifolia</i> .....	8
2.4.    ANTIOXIDANTES.....	9
2.5.    MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	9
2.5.1. Contenido de Fenoles Totales por el método Folin-Ciocalteu.....	10
2.5.2. Determinación del contenido de Flavonoides Totales.....	11
2.5.3. Actividad antioxidante determinada por el ensayo (DPPH).....	12
2.5.4. Actividad antioxidante determinada por el método (ABTS <sup>+</sup> ).....	13
2.5.5. Determinación del Potencial Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP) .....	13
2.5.6. Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC) .....	14
2.6.    BIOENSAYOS DE TOXICIDAD.....	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
4. OBJETIVOS .....	18
4.1.    OBJETIVO GENERAL .....	18
4.2.    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
5.1.    REACTIVOS Y MATERIALES.....	19
5.2.    MATERIAL VEGETAL.....	20
5.2.1. Hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> .....	20
5.2.2. Hojas de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	21

5.3.	<b>EXTRACCIÓN</b> .....	21
5.4.	<b>TAMIZAJE FITOQUÍMICO</b> .....	21
5.5.	<b>IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS</b> .....	22
5.5.1.	Preparación del material .....	23
5.5.2.	Extracción de alcaloides.....	23
5.5.3.	Derivatización.....	24
5.5.4.	Análisis GC/MS .....	24
5.6.	<b>FRACCIONAMIENTO</b> .....	24
5.7.	<b>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	26
5.7.1.	Contenido de Fenoles Totales por el método Folin-Ciocalteu.....	26
5.7.2.	Determinación del contenido de Flavonoides Totales.....	26
5.7.3.	Actividad antioxidante determinada por el ensayo (DPPH') .....	26
5.7.4.	Actividad antioxidante determinada por el método (ABTS <sup>+</sup> ).....	27
5.7.5.	Determinación del Potencial Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP) .....	27
5.7.6.	Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC) .....	28
5.8.	<b>DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA</b> .....	29
5.8.1.	Ensayo de letalidad sobre <i>Artemia franciscana</i> .....	29
5.8.2.	Ensayo de toxicidad por <i>Allium cepa</i> .....	29
5.9.	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	30
5.10.	<b>DATOS LOGÍSTICOS</b> .....	30
6.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	31
6.1.	<b>PORCENTAJE DE HUMEDAD, EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO</b> .....	31
6.2.	<b>TAMIZAJE FITOQUÍMICO</b> .....	33
6.3.	<b>IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS</b> .....	34
6.4.	<b>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	36
6.4.1.	Contenido de Fenoles Totales por el método Folin-Ciocalteu.....	36
6.4.2.	Determinación del contenido de Flavonoides Totales.....	38
6.4.3.	Actividad antioxidante determinada por el ensayo (DPPH') .....	40

6.4.4.	Actividad antioxidante determinada por el método (ABTS <sup>+</sup> ).....	42
6.4.5.	Determinación del Potencial Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP) .....	44
6.4.6.	Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC) .....	46
6.4.7.	Correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales.	48
6.5.	<b>ACTIVIDAD CITOTÓXICA</b> .....	49
6.5.1.	Ensayo de letalidad sobre <i>Artemia franciscana</i> .....	49
6.5.2.	Ensayo de toxicidad por <i>Allium cepa</i> .....	51
7.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	56
8.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	58
9.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	59
10.	<b>ANEXOS</b> .....	67



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Biogénesis de metabolitos secundarios. ....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Estructuras generales de diferentes grupos de compuestos fenólicos. ....	<b>6</b>
<b>Figura 3.</b> Tipos de alcaloides sintetizados por plantas de la familia <i>Amaryllidaceae</i> . ....	<b>7</b>
<b>Figura 4.</b> <i>Hymenocallis acutifolia</i> . ....	<b>8</b>
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de reacción para determinación de flavonoides por el método tricloruro de aluminio. ....	<b>11</b>
<b>Figura 6. A)</b> Estructura DPPH color morado e incoloro. <b>B)</b> Mecanismo de reacción del DPPH. ....	<b>12</b>
<b>Figura 7. A.</b> Producción del radical ABTS. <b>B.</b> Mecanismo de reacción del ABTS. ....	<b>13</b>
<b>Figura 8.</b> Reacción para ensayo de FRAP. ....	<b>14</b>
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de reacción ORAC. ....	<b>14</b>
<b>Figura 10.</b> Curva de decaimiento de fluoresceína en presencia de antioxidante. ....	<b>15</b>
<b>Figura 11.</b> Diagrama del protocolo utilizado para la obtención de extracto crudo de alcaloides de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> . ....	<b>23</b>
<b>Figura 12.</b> Diagrama de protocolo utilizado en fraccionamiento del extracto etanólico total de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> . ....	<b>25</b>
<b>Figura 13.</b> Diagrama de protocolo utilizado en la determinación de actividad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>H. acutifolia</i> por FRAP. ....	<b>28</b>
<b>Figura 14.</b> Diagrama de protocolo utilizado para determinación de actividad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>H. acutifolia</i> por ORAC. ....	<b>28</b>
<b>Figura 15.</b> Raíces de <i>Allium cepa</i> (cebolla) expuestas 168 horas a concentración baja, media y alta de EET de hojas de <i>H. acutifolia</i> disuelto en agua y control de agua. ....	<b>54</b>
<b>Figura 16.</b> Fotografía de células meristemáticas apicales de raíces de bulbos de <i>Allium cepa</i> utilizadas en la evaluación citotóxica del EET de hojas de <i>H.acutifolia</i> por medio	

de la técnica squash con tinción de orceina acética. (centro interfase). **A.** Interfase **B.** Profase **C.** Metafase **D.** Metafase **E.** Anafase **F.** Telofase. .... **55**

**Figura 17.** **A.** Reactivo Dragendorff **B.** Reactivo Mayer **C.** Reactivo Wagner. .... **67**

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Porcentajes de extracción de EET y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> y extracto etanólico total de Romero ( <i>R. officinalis</i> ).....	<b>32</b>
<b>Gráfica 2.</b> Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu de extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>H. acutifolia</i> y extracto etanólico total de Romero ( <i>R. officinalis</i> ).....	<b>37</b>
<b>Gráfica 3.</b> Determinación de contenido de flavonoides totales del extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>H. acutifolia</i> y del extracto etanólico total de Romero ( <i>R. officinalis</i> ).....	<b>39</b>
<b>Gráfica 4.</b> Valores de IC <sub>50</sub> (mg/L) para extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> , extracto etanólico total de Romero ( <i>R. officinalis</i> ), patrones BHT y $\alpha$ -Tocoferol por el método DPPH'.....	<b>41</b>
<b>Gráfica 5.</b> Valores de IC <sub>50</sub> (mg/L) para extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> , extracto etanólico total de Romero ( <i>R. officinalis</i> ), patrones BHT y $\alpha$ -Tocoferol por el método ABTS*.....	<b>43</b>
<b>Gráfica 6.</b> Actividad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> determinada por el método FRAP.....	<b>45</b>
<b>Gráfica 7.</b> Intensidad de fluorescencia para extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>H. acutifolia</i> a diferentes concentraciones.....	<b>47</b>
<b>Gráfica 8.</b> Actividad antioxidante determinada por el método ORAC en extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> .....	<b>47</b>
<b>Gráfica 9.</b> Toxicidad (aguda y crónica) para EET y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> y patrón de dicromato de potasio.....	<b>51</b>
<b>Gráfica 10.</b> Efecto fitotóxico en raíces de bulbos de <i>Allium cepa</i> causado por el extracto etanólico total de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> disuelto en agua.....	<b>52</b>
<b>Gráfica 11.</b> Curva de calibración de ácido gálico por el método Folin-Ciocalteu.....	<b>68</b>
<b>Gráfica 12.</b> Curva de calibración de quercetina para cuantificación de flavonoides....	<b>68</b>
<b>Gráfica 13.</b> Curva de calibración Trolox por el ensayo de DPPH'.....	<b>68</b>

<b>Gráfica 14.</b> Curva de calibración Trolox por el ensayo de ABTS <sup>+</sup> .....	<b>69</b>
<b>Gráfica 15.</b> Curva de calibración Trolox por el ensayo de FRAP .....	<b>69</b>
<b>Gráfica 16.</b> Curva de calibración Trolox por el ensayo de ORAC .....	<b>69</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de antioxidantes según su función. ....	<b>9</b>
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de ensayos para medir capacidad antioxidante según mecanismo de reacción. ....	<b>10</b>
<b>Tabla 3.</b> Reactivos y solventes usados en la experimentación. ....	<b>19</b>
<b>Tabla 4.</b> Equipos de laboratorio usados en la experimentación. ....	<b>20</b>
<b>Tabla 5.</b> Pruebas cualitativas para detección de metabolitos secundarios.....	<b>22</b>
<b>Tabla 6.</b> Peso del material y porcentaje de humedad de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> . .....	<b>31</b>
<b>Tabla 7.</b> Rendimientos de obtención del extracto total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> y extracto etanólico total de Romero ( <i>R. officinalis</i> ).....	<b>32</b>
<b>Tabla 8.</b> Compuestos determinados por tamizaje fitoquímico en el extracto etanólico total de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> .....	<b>338</b>
<b>Tabla 9.</b> Compuestos identificados en el extracto metanólico y alcaloideo de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> . ....	<b>35</b>
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de capacidad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> por el método DPPH'. ....	<b>41</b>
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de actividad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> por el método ABTS <sup>+</sup> . ....	<b>43</b>
<b>Tabla 12.</b> Correlación de Pearson entre los métodos de determinación de actividad antioxidante y la cuantificación de fenoles y flavonoides totales para el extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> .....	<b>48</b>
<b>Tabla 13.</b> Clasificación CYTED para toxicidad.....	<b>50</b>
<b>Tabla 14.</b> Índices mitóticos y de fase de células meristemáticas apicales de raíces de bulbos de <i>Allium cepa</i> expuestos a concentraciones baja, media y alta de EET de hojas de <i>H.acutifolia</i> disuelto en agua y control de agua. ....	<b>55</b>

<b>Tabla 15.</b> Contenido de fenoles y flavonoides del extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> , del extracto etanólico total de hojas de <i>Rosmarinus officianalis</i> (Romero) y patrones BHT y $\alpha$ -Tocoferol. ....	<b>70</b>
<b>Tabla 16.</b> Actividad antioxidante del extracto etanólico total y fracciones (activas) de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> , del extracto etanólico total de hojas de <i>Rosmarinus officianalis</i> (Romero) y patrones BHT y $\alpha$ -Tocoferol, por los método DPPH $\cdot$ y ABTS $\cdot^+$ . .	<b>70</b>
<b>Tabla 17.</b> Actividad antioxidante del extracto etanólico total y fracciones de hojas de <i>Hymenocallis acutifolia</i> por los métodos FRAP $\cdot$ y ORAC. ....	<b>71</b>
<b>Tabla 18.</b> Toxicidad aguda y crónica evaluada por el ensayo de <i>Artemia franciscana</i> de EET y fracciones de hojas <i>Hymenocallis acutifolia</i> y control positivo dicromato de potasio. ....	<b>72</b>
<b>Tabla 19.</b> Fitotoxicidad del extracto etanólico total de <i>Hymenocallis acutifolia</i> . ....	<b>73</b>

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Fotografía tamizaje fitoquímico, pruebas para alcaloides en extracto etanólico total de <i>Hymenocallis acutifolia</i> .....	<b>67</b>
<b>Anexo 2.</b> Curvas de calibración Actividad Antioxidante.....	<b>68</b>
<b>Anexo 3.</b> Actividad Antioxidante.....	<b>70</b>
<b>Anexo 4.</b> Actividad Biológica.....	<b>72</b>



## RESUMEN

La obtención de medicamentos a través de compuestos sintéticos tiene desventajas como las reacciones adversas en el consumidor y el efecto terapéutico reducido, las cuales hacen creciente el interés por los productos naturales para la obtención de estructuras biológicamente activas. Teniendo en cuenta esto, con este trabajo se pretende contribuir a dicha problemática mediante la caracterización fitoquímica de la planta *Hymenocallis acutifolia* la cual pertenece a la familia de las *Amaryllidaceae*, conocida por su alto contenido de alcaloides típicos. Para esto se realizó la identificación cualitativa de metabolitos secundarios por medio del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia*. También se determinó la actividad antioxidante mediante los ensayos DPPH, ABTS, FRAP y ORAC del extracto etanólico total y fracciones. De igual forma, se llevó a cabo la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides. Se utilizó un extracto etanólico total de *Rosmarinus officinalis* (Romero) como referente para la actividad antioxidante determinada por DPPH y ABTS, al igual que para la cuantificación de fenoles y flavonoides totales, con el objetivo de comparar la muestra de *H. acutifolia* con otro extracto común y conocido por su excelente actividad antioxidante. Se realizaron dos bioensayos, la concentración letal por *Artemia franciscana* y el *Allium* test al extracto etanólico total de *H. acutifolia*. Entre los resultados obtenidos se determinó que el 25% de la muestra metanólica de hojas de *H. acutifolia* está compuesta por 6 alcaloides tipo licorina (licorina, Homolicorina, Pseudolicorina, 8-O-demetilhomolicorina, acetato de dihidrolicorina y 2-Hidroxihomolicorina). La fracción butanol tiene una actividad antioxidante considerable determinada por el ensayo de ABTS ( $IC_{50}$  107.210  $\pm$  5.197 ppm), FRAP (95.008  $\pm$  4.516  $\mu$ mol Trolox/ g Extracto) y ORAC (956.917  $\pm$  40.767  $\mu$ mol Trolox/ g Extracto) y cantidad de fenoles totales mayor respecto al extracto de romero (62.297 mg GAE/g Extracto seco). Así como la clasificación del extracto etanólico de hojas de *H. acutifolia* como potencial antifúngico, antibacterial y/o antiviral.

**Palabras clave:** *Amaryllidaceae*, *Hymenocallis acutifolia*, DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, compuestos fenólicos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional según la OMS (2000) (1) es definida como:

*La suma total de conocimientos, habilidades y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias oriundos de diferentes culturas, sean o no explicables, y usados en el mantenimiento de la salud, así como en la prevención, diagnóstico o tratamiento de las enfermedades físicas o mentales.*

En algunos países de Asia y África el 80% de la población usa como agentes terapéuticos principalmente remedios tradicionales, donde la mayoría son extractos crudos de plantas que a pesar de considerarse seguros, carecen de dosis estandarizadas y no hay investigación a fondo que soporte el uso del mismo sin efectos colaterales (2). Estudios sugieren que solo en la India hay alrededor de 20.000 plantas registradas, de las cuales se utilizan para medicina cerca de 7.000 en diversos tratamientos de enfermedades. Una cifra menor a la mitad de lo que la naturaleza ofrece a la población (3).

Colombia es un país conocido por su riqueza en flora y fauna. El 40% de la población sufre sus necesidades de atención primaria de salud con medicina tradicional (4), por lo tanto es de vital importancia investigar y analizar plantas comunes y desconocidas, con el objetivo de manejar correctamente el suministro.

Dentro de dichas plantas se encuentran algunas *Amaryllidaceae*, las cuales son una familia de plantas conocidas por su alto contenido de alcaloides tóxicos. Concretamente el género *Hymenocallis* tiene de 70 a 80 especies aproximadamente y son plantas bulbosas ornamentales utilizadas tradicionalmente por sus propiedades medicinales (5).

Algunas de las propiedades medicinales del género *Hymenocallis* son utilizadas para la fiebre, hígado y paludismo, específicamente la especie *Hymenocallis amancaes* es usada para el tratamiento de contusiones y desgarres musculares, en cosmetología para quitar pecas y manchas de la cara. Otra especie es la *Hymenocallis littoralis* la cual se ha demostrado que tiene actividad anticancerígena y antiviral. Las especies *H. caribee*, y *H. americana* son activas contra la malaria y varias especies de este género contienen alcaloides con propiedades citotóxicas (6). Sin embargo, específicamente la especie *Hymenocallis acutifolia* carece de soporte fitoquímico y citotoxicológico integral que cualifique sus componentes, razón por la que fue seleccionada para el presente trabajo donde se pretende aportar conocimiento sobre la misma. Esta especie es clasificada como venenosa, se caracteriza por sus flores blancas y se conoce vulgarmente como lirio araña, nombre utilizado para varias especies del género *Hymenocallis*.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

La química de productos naturales es una rama de la orgánica, los productos naturales corresponden a todos los compuestos provenientes del metabolismo secundario de organismos vivos como las plantas, que son de vital importancia para la industria farmacéutica por su actividad biológica en seres humanos. El estudio de estas estructuras ha tomado fuerza en los últimos años gracias a los avances en las técnicas analíticas para el aislamiento y determinación estructural, sin embargo el éxito de esta ciencia interdisciplinaria depende no solo de pruebas químicas, sino que debe ser complementada con ensayos biológicos y clínicos, altamente útiles para el descubrimiento de nuevos medicamentos (7).

Alrededor del mundo el 60% de la población recurre a las plantas medicinales, sin embargo no todas han sido evaluadas en su totalidad por tanto es apremiante el estudio de las mismas, usando métodos de estandarización que permitan el consumo adecuado con total aprovechamiento de las propiedades benéficas que ofrecen (8).

### **2.2. METABOLITOS SECUNDARIOS**

A través de la historia se han logrado grandes avances en la industria farmacológica y un sucesivo aporte de medicamentos obtenidos a partir de plantas, gracias a la diversidad estructural y al amplio rango de actividad biológica de los metabolitos secundarios, como los alcaloides y compuestos fenólicos, los cuales tienen propiedades farmacológicas activas.

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas que no cumplen ningún rol de desarrollo en los vegetales y se encuentran en cantidades relativamente pequeñas; su producción depende de la familia, género o especie en particular (9). Los compuestos fenólicos son los más comunes y cumplen variadas funciones que no son vitales pero ayudan a la supervivencia como el fortalecimiento de la pared celular, la actividad antioxidante y la defensa de la planta en el caso de los alcaloides que son neurotóxicos (10).

La figura 1 resume la biogénesis de los metabolitos secundarios y muestra la relación con los metabolitos primarios (11).

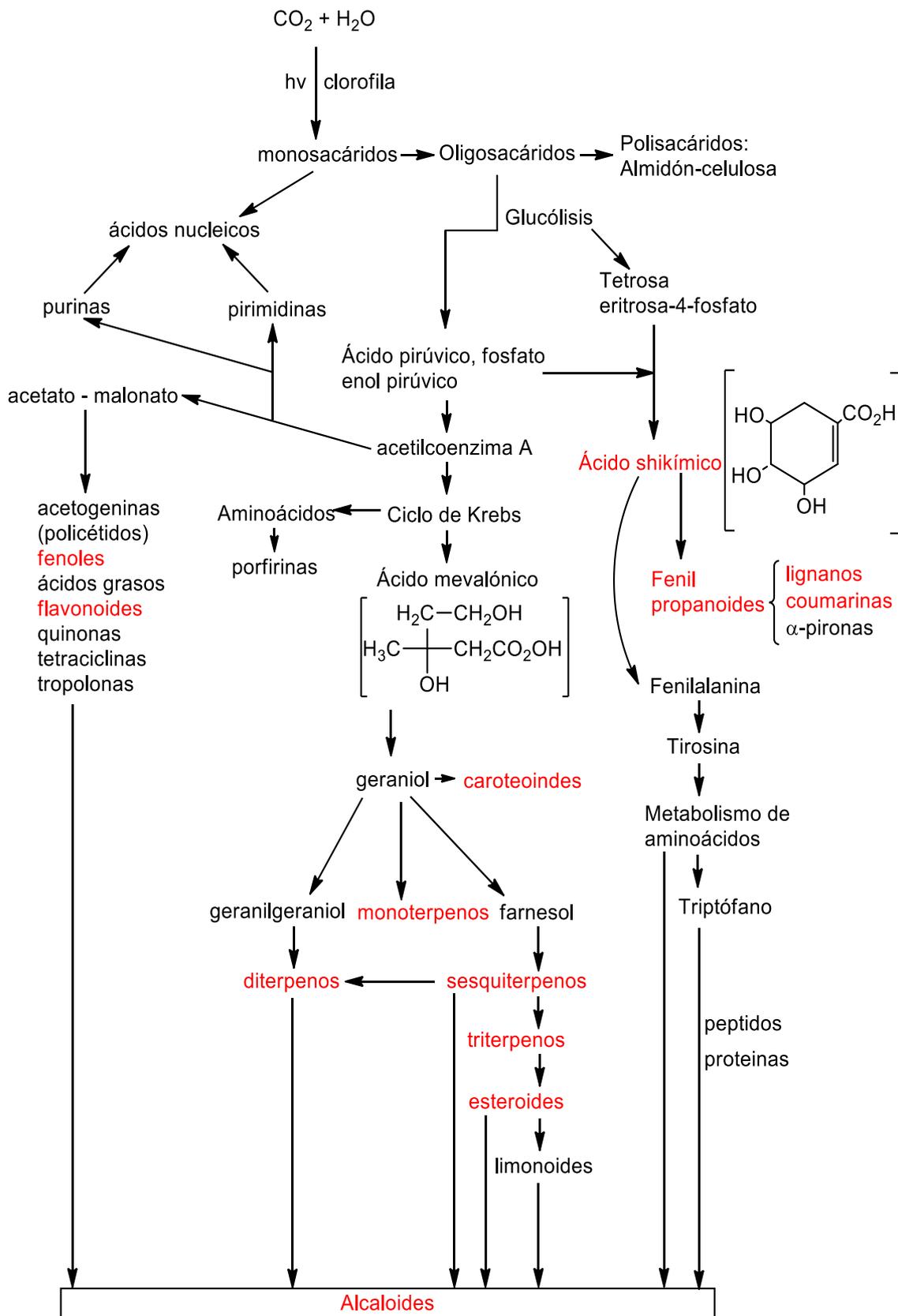


Figura 1. Biogénesis de metabolitos secundarios (11).

### 2.2.1. Compuestos fenólicos

Uno de los grupos más amplios dentro de los metabolitos secundarios son los compuestos fenólicos (12), los cuales biológicamente provienen de dos vías metabólicas: el ácido shikímico y el acetato-malonato; principalmente los productos de la primera vía están formados por fenilpropanoides y los de la segunda son fenoles simples (figura 1). La mayoría de los compuestos fenólicos son sintetizados a través de la ruta de fenilpropanoides. La combinación de ambas rutas permite la existencia de flavonoides, los más abundantes dentro de los compuestos fenólicos en la naturaleza en general (11).

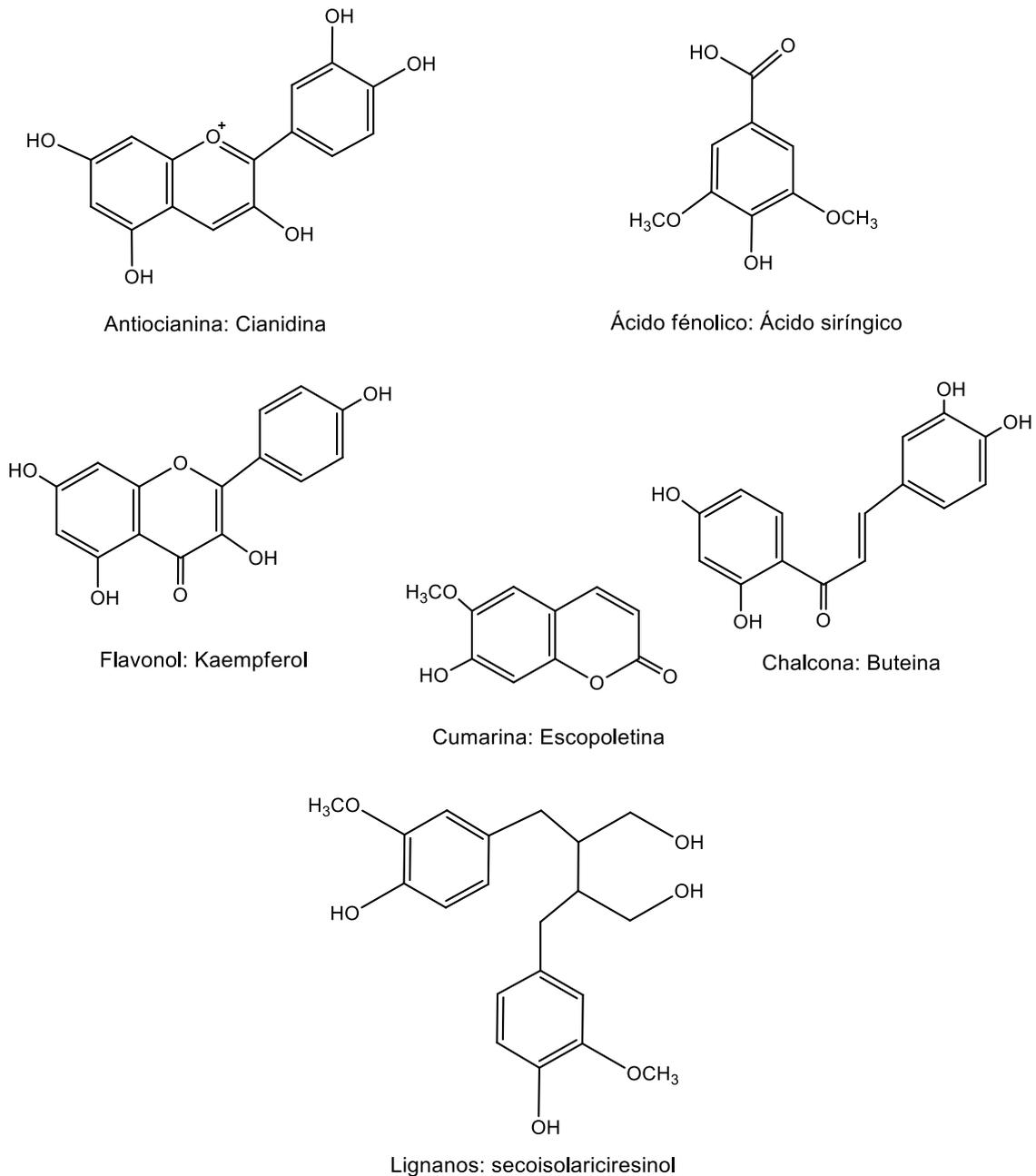
Por lo tanto los fenoles tienen características comunes como la presencia de un anillo aromático hidroxil-sustituido o también enlaces a otras moléculas, frecuentemente azúcares y proteínas. En tejidos de la planta es posible la existencia de compuestos fenólicos libres. Sin embargo su forma libre es menos habitual porque son más tóxicos incluso que cuando están enlazados (10).

Estas estructuras juegan un rol de protección contra insectos y otros animales. Los diferentes tipos de enlace entre el residuo glicosil y los flavonoides, como antiocianinas, también permite a diferentes derivados conferir color a las flores. La figura 2 muestra algunas estructuras de los compuestos fenólicos de tipo antiocianina, flavonol, ácido fenólico, chalcona, cumarina y lignanos.

Las antocianinas han demostrado capacidad antioxidante y dan a las plantas colores violetas (11), la cianidina es una de ellas (figura 2). Los ácidos fenólicos son componentes de bálsamos, resinas y esencias que confieren a la planta aromas que atraen insectos para favorecer la polinización o repeler herbívoros, también tienen propiedades antisépticas.

Los flavonoides actúan en la planta como: agentes antioxidantes, protectores de animales fitófagos, también participan en reacciones enzimáticas, ejercen efectos antagónicos en el crecimiento y proporcionan colores llamativos para atraer insectos. Las cumarinas actúan como disuasorios nutritivos y confieren protección ante infecciones provocadas por hongos (13).

Los lignanos son grandes polímeros que componen la pared celular de varios tipos de células vegetales como fibras, dan rigidez y protección ante patógenos y se encuentran en todas las plantas terrestres excepto en los musgos, en la figura 2 se muestra la estructura del secoisolariciresinol que es un antioxidante fitoestrógeno.



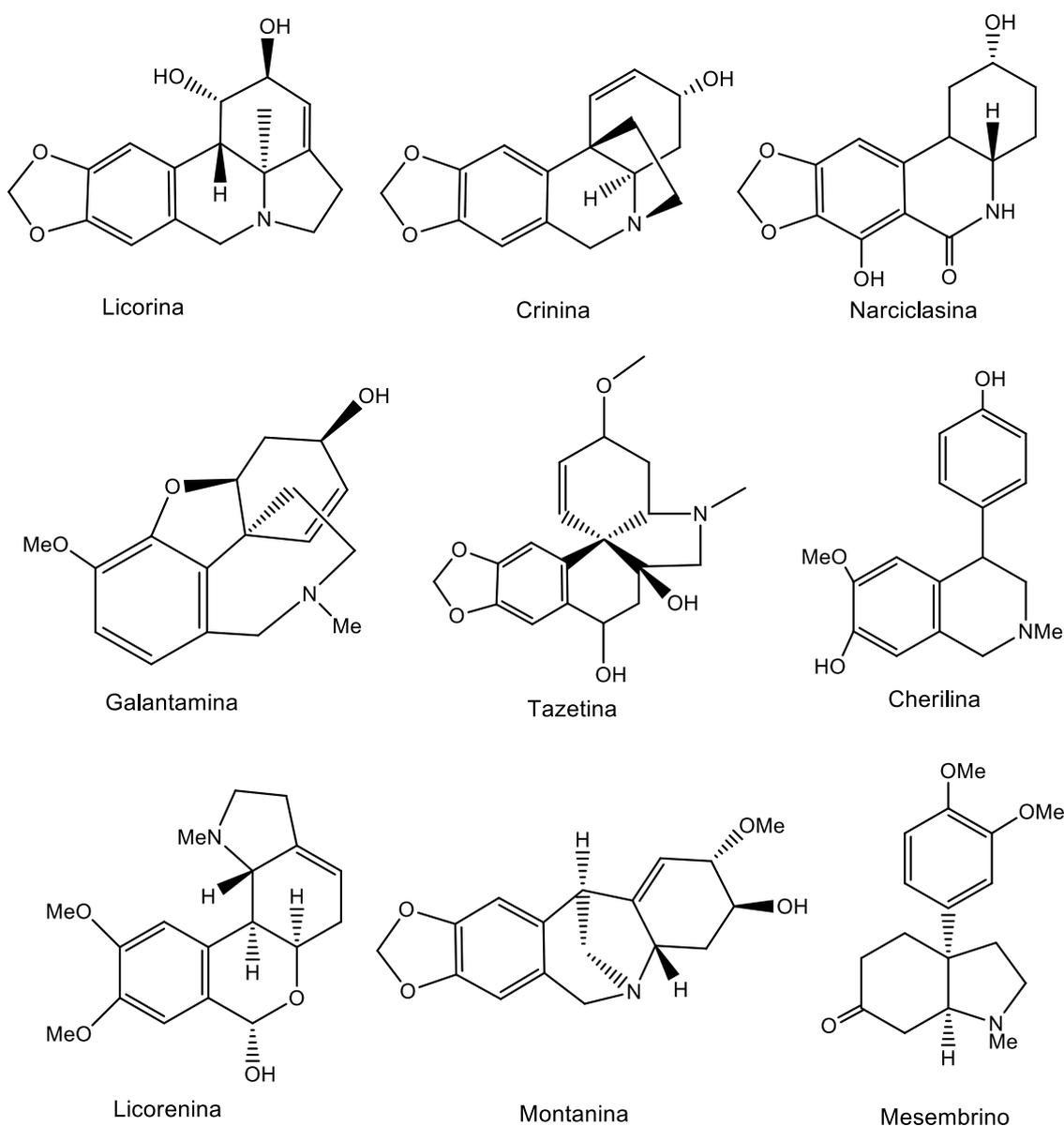
**Figura 2.** Estructuras generales de diferentes grupos de compuestos fenólicos.

### 2.2.2. Alcaloides

Son compuestos producidos y almacenados por la planta como mecanismo de defensa, los cuales varían en cantidad y estructura según la taxonomía de cada individuo (género, especie, familia etc) (14). Su clasificación varía según el autor y ensayos biológicos demuestran diferentes actividades como repelente, protectora, tóxica, inhibitoria, estimulante entre otras (14).

Los alcaloides sintetizados por especies de la familia *Amaryllidaceae* son típicos en su estructura y han sido estudiados debido a sus diferentes tipos de actividad biológica antiviral, antitumoral e inhibitoria de la acetilcolinesterasa, enzima asociada al mal de Alzheimer. Estos han sido aislados a partir de diferentes géneros de *Amaryllidaceae*, elucidados estructuralmente y clasificados en 9 tipos distintos: licorina, crinina, narciclasina, galantamina, tazetina, licorenina, montanina entre otros (Figura 3) (15).

La licorina y pseudolicorina han demostrado inhibición ante diferentes tipos de virus entre ellos HIV-1 (16), actividad antitumoral (17) y antiinflamatoria (18).



**Figura 3.** Tipos de alcaloides sintetizados por plantas de la familia *Amaryllidaceae*.

### 2.3. FAMILIA Amaryllidaceae

Esta es una familia botánica considerablemente distribuida en todo el mundo, contiene aproximadamente 90 géneros y 1310 especies (18). Las *Amaryllidaceae* son plantas herbáceas, vivaces, bulbosas en su mayoría, con flores de colores vistosos y bulbos subterráneos, usadas como ornamentos, en prácticas tradicionales indígenas o fuente de ingresos (19).

Colombia posee abundante diversidad en flora, donde respecto a las *Amaryllidaceae*, se encuentran los géneros *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyrantes*, *Hippeastrum* y *Crinum*. Sin embargo las *Eucharis* y *Caliphruria subedentata* se encuentran en vía de extinción (20).

#### 2.3.1. Género *Hymenocallis*

Uno de los géneros de la familia *Amaryllidaceae* es *Hymenocallis*, el cual cuenta con aproximadamente 50 especies que contienen una variedad de metabolitos secundarios, que podrían ser empleados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer e infecciones virales (21), sin embargo no todas han sido estudiadas integralmente. La especie más estudiada es *Hymenocallis littoralis*, para la que se reporta actividad antiviral, antiparasitaria, anticancerígena, antibacteriana, antioxidante y promotora de cicatrización en heridas (21), razón por la cual se hace importante ampliar el conocimiento de *Hymenocallis acutifolia* perteneciente a este género que es el objetivo de este trabajo.

#### 2.3.2. Taxonomía de *Hymenocallis acutifolia*

Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Orden: Asparagales  
Familia: Amaryllidaceae  
Género: *Hymenocallis*  
Especie: *acutifolia*



Figura 4. *Hymenocallis acutifolia*.

## 2.4. ANTIOXIDANTES

La constante producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) lesionan estructuras biológicas, por tanto se hace necesario que los organismos atenúen estos efectos mediante la acción de sistemas antioxidantes. Halliwell y Gutteridge definieron los antioxidantes como cualquier sustancia que estando presente a baja concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato. Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (22).

Según su modo de acción en el organismo los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de antioxidantes según su función.

Clasificación	Función	Tipo de antioxidantes
<b>Primarios</b>	Impiden la formación de radicales libres (quelantes de metales de transición).	Superoxido Dismutasa (SOD) Peroxidasa Catalasa Glutarredoxina
<b>Secundarios</b>	Interrumpen reacción de propagación por inactivación.	$\alpha$ -Tocoferol Ácido ascórbico Ácido úrico Selenio Compuestos fenólicos
<b>Terciarios</b>	Reparan el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que se han estropeado.	Fosfolipasa A2 y C DNA glicosilada Metionina sulfoxido reductasa Endo y exonucleasas

## 2.5. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Actualmente existen distintos métodos para la evaluación de actividad antioxidante, ya sea por medio de ensayos *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos *in vitro* más utilizados para la medida de la capacidad antioxidante se hacen utilizando sustancias cromógenas de naturaleza radical, ya sea para compuesto, mezcla, alimento, muestra biológica o extracto vegetal.

Estas pruebas se basan en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o electrones (SET), en algunos casos ambos (mixtos). Según el mecanismo que siga la reacción se pueden establecer diferencias entre los métodos existentes. La tabla 2 muestra algunos de los métodos según el mecanismo de reacción (23).

**Tabla 2.** Clasificación de ensayos para medir capacidad antioxidante según mecanismo de reacción.

Mecanismo	Ensayo
<b>HAT- transferencia de átomos de hidrogeno</b>	ORAC (capacidad de absorbanca de radicales oxigeno)
	Trap (parámetro antioxidante de captura radical total)
	Inhibición de la oxidación de ácido linoleico
<b>SET – transferencia de electrones</b>	FRAP (parámetro antioxidante reductor de iones férricos)
	CUPRAC (potencia reductora de cobre (II))
<b>HAT y SET - mixto</b>	DPPH (radical difenil – 1 – picrilhidracil) ABTS (radical 2,2 – azinobis, 3 – etilbenzotiazolina – 6 – sulfónico)

### 2.5.1. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

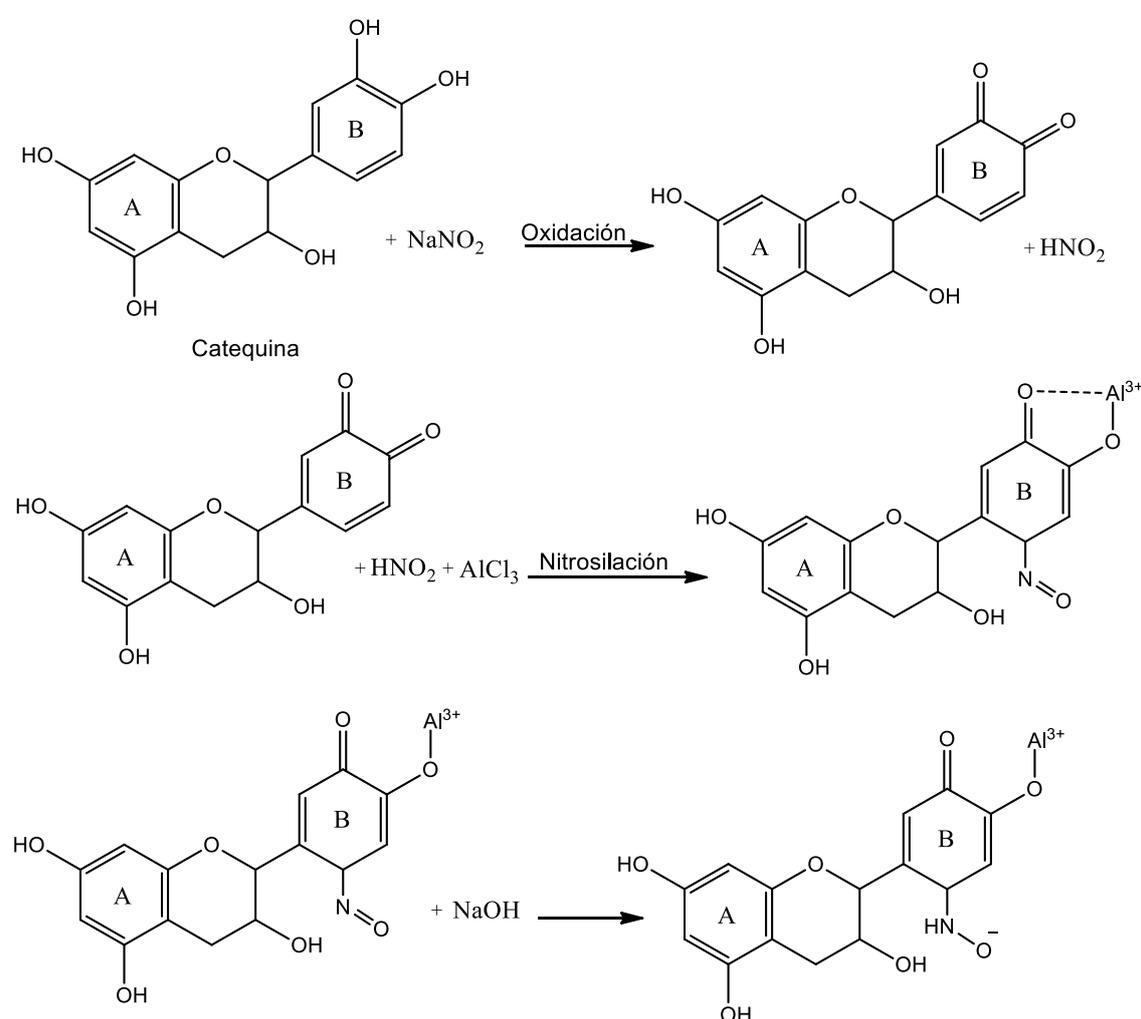
La cuantificación de fenoles totales por F-C se hizo a partir de una reacción de óxido-reducción colorimétrica, donde se midió la capacidad de polifenoles para reducir el reactivo ácido fosfotungstico-molibdico. El molibdeno es reducido por la transferencia de electrones entre el  $\text{Mo}^6$  y el agente reductor generando óxidos azules de wolframio ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) y molibdeno ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). La siguiente reacción muestra la transferencia de electrones (24).



## 2.5.2. Determinación del contenido de Flavonoides Totales

La cuantificación de flavonoides se da por medio de la reacción de un complejo de coloración rosa (aluminio-flavonoide) en medio básico.

Inicialmente hay una oxidación de los grupos hidroxilo del anillo B en las posiciones C2' y C3', obteniendo  $\text{HNO}_2$  en presencia de  $\text{NaNO}_2$ . Seguido, el  $\text{HNO}_2$  promueve la nitrosilación del anillo B en C5' en presencia de  $\text{AlCl}_3$  y finalmente el aluminio se enlaza con el oxígeno C4', coordinándose con el grupo carbonilo (25). La adición de  $\text{NaOH}$  reduce el oxígeno del grupo nitrosilo y la muestra adquiere el color rosa característico de la prueba. La figura 5 muestra el mecanismo para la catequina (26).

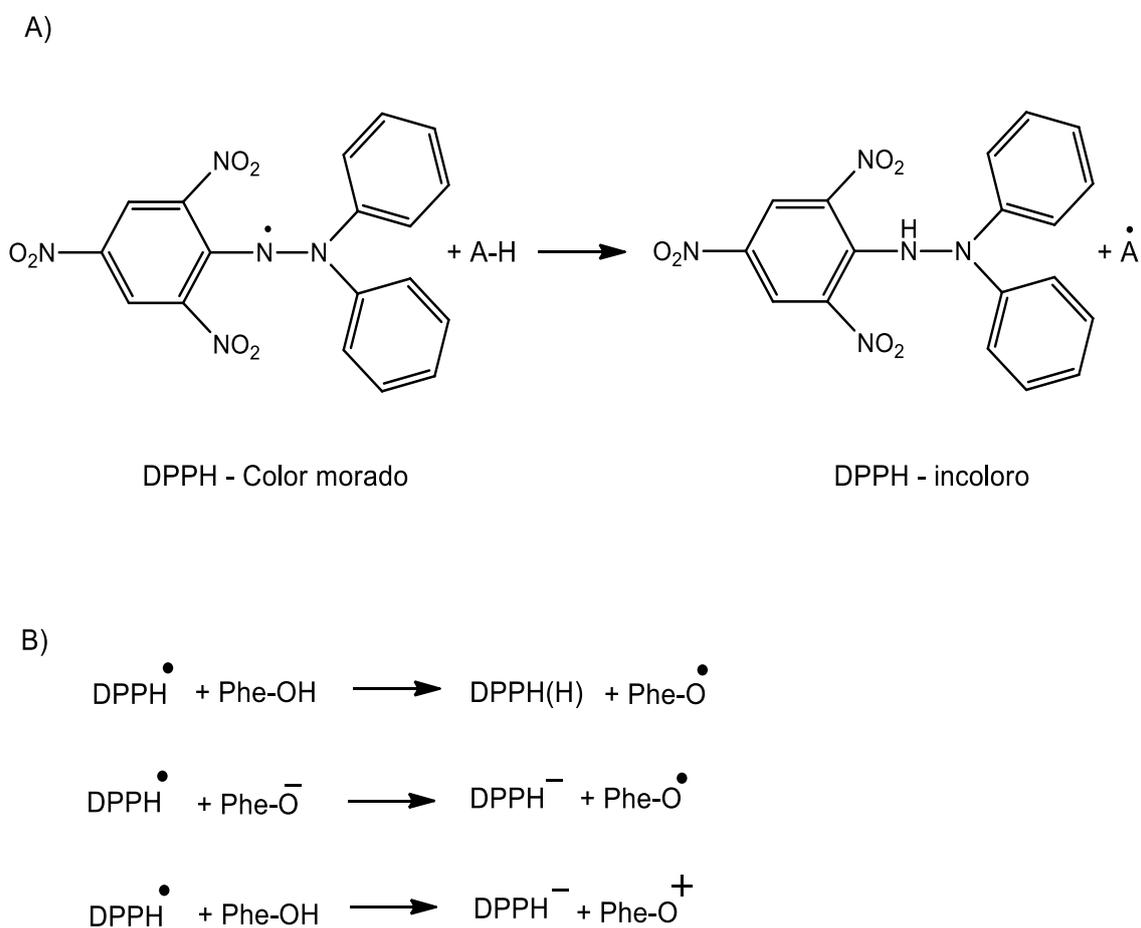


**Figura 5.** Mecanismo de reacción para determinación de flavonoides por el método triclورو de aluminio.

### 2.5.3. Actividad antioxidante determinada por el ensayo (DPPH)

El ensayo de DPPH es un método colorimétrico que mide la capacidad antioxidante por medio de la variación del color intenso morado al amarillo, según la actividad antioxidante que presente la muestra. Es un método mixto donde inicialmente se da la transferencia de hidrógeno y luego la transferencia electrónica (27).

DPPH (2,2 – difenilpicril hidrazil radical libre) es un radical estable que reacciona con otros radicales, electrones o átomos de hidrógeno que permiten la pérdida de color (Figura 6).

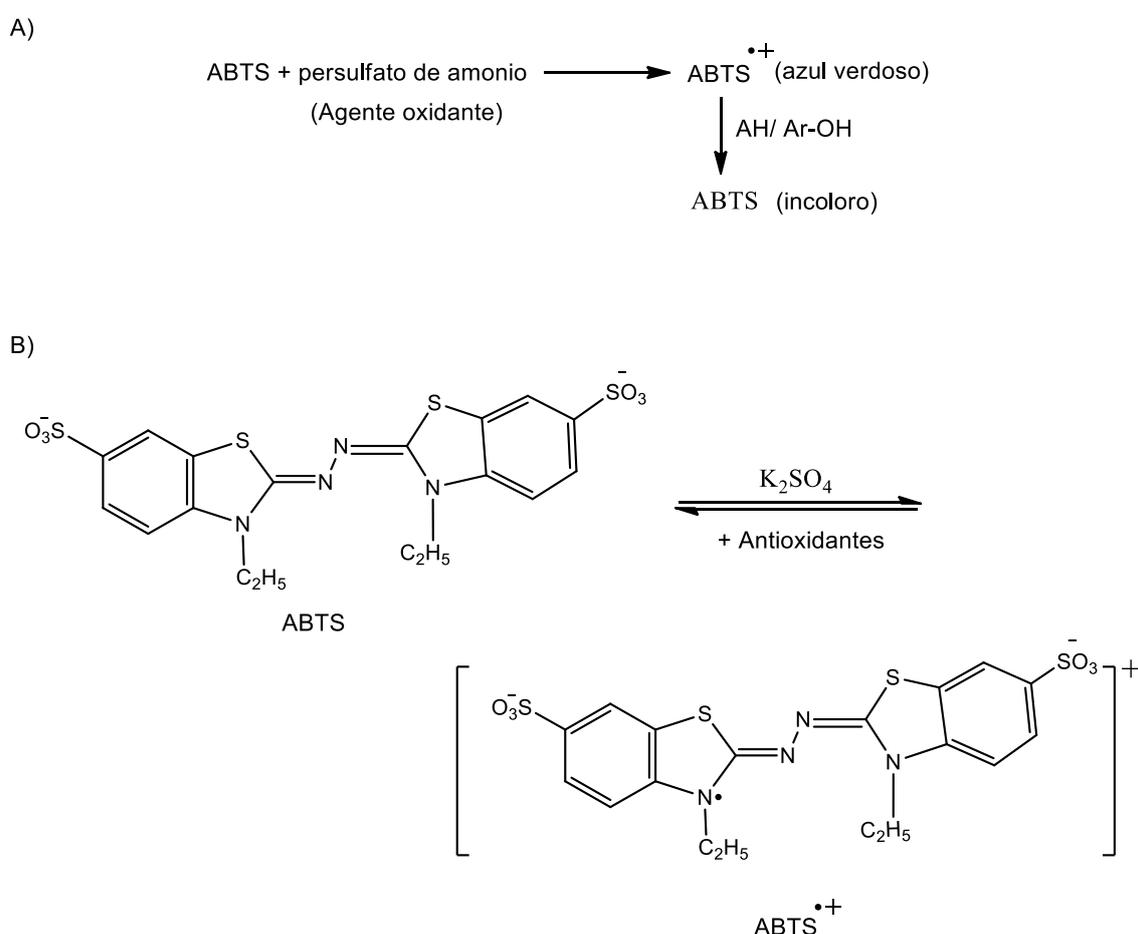


**Figura 6. A)** Estructura DPPH color morado e incoloro. **B)** Mecanismo de reacción del DPPH.

### 2.5.4. Actividad antioxidante determinada por el método (ABTS<sup>•+</sup>)

Este es un método colorimétrico mixto que estima la actividad antioxidante, es simple y reproducible utilizado generalmente por laboratorios alrededor del mundo.

El ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) genera directamente el radical ABTS<sup>•+</sup> usando el persulfato de potasio como agente oxidante. Por tanto los antioxidantes reaccionan solo con el radical ABTS y el color va disminuyendo (azul a incoloro) a medida que avanza la reacción según la capacidad antioxidante de la muestra (27) (figura 7).



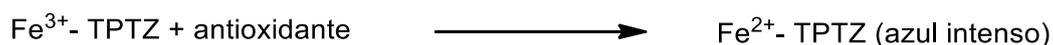
**Figura 7. A.** Producción del radical ABTS. **B.** Mecanismo de reacción del ABTS.

### 2.5.5. Determinación del Potencial Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP)

FRAP es el nombre del ensayo por sus siglas en inglés (Ferric Reducing Antioxidant Power), cuyo mecanismo es únicamente mediante transferencia de electrones, que

combinado con otros ensayos de capacidad antioxidante, es muy útil para distinguir el mecanismo dominante en la muestra a investigar.

El método fue desarrollado inicialmente para medir el poder reductor en plasma, sin embargo fue adaptado y usado para evaluar antioxidantes en muestras botánicas. La reacción mide la reducción del hierro ( $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ ) en (2,4,6-tri(2-piridil)triazina) TPTZ-Fe(II) por la formación de un complejo azul-violeta a pH ácido (28) (figura 8).

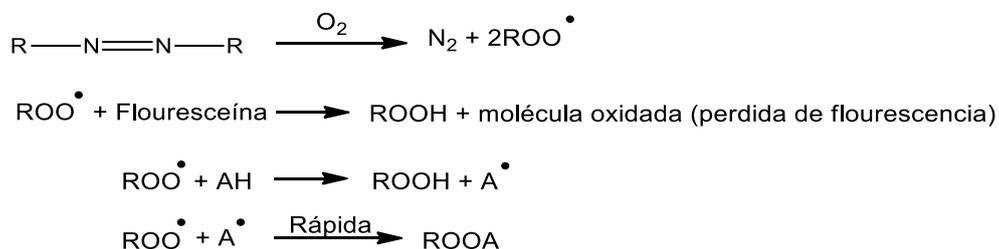


**Figura 8.** Reacción para ensayo de FRAP.

### 2.5.6. Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)

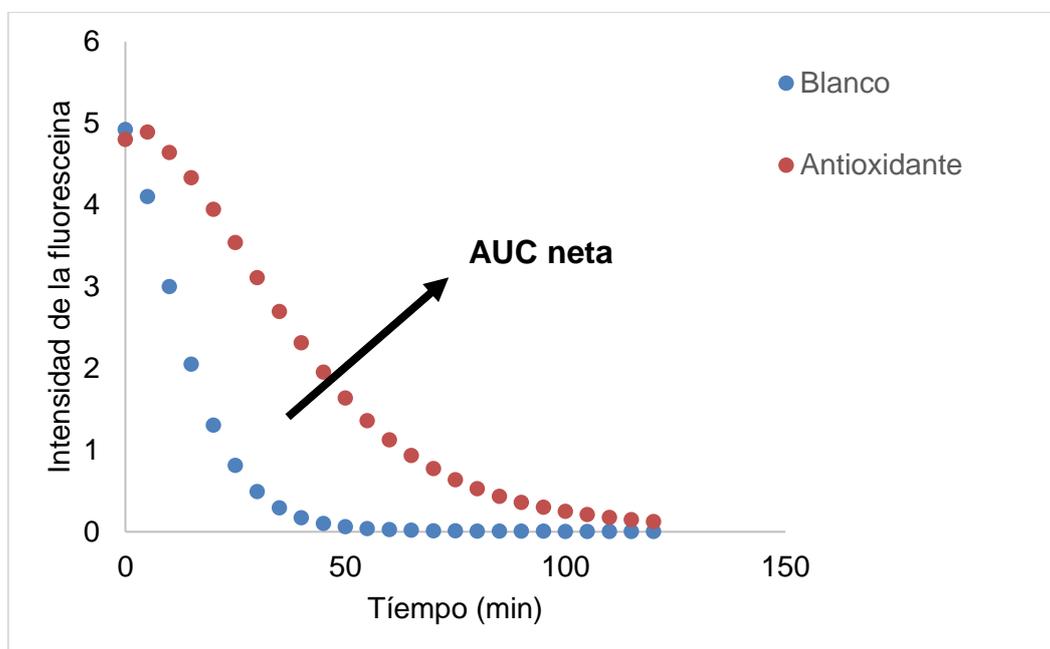
El ensayo ORAC mide la inhibición de la muestra ante oxidaciones inducidas por radicales peroxilo, por tanto refleja la actividad antioxidante debida a la ruptura de la cadena radical por transferencia de átomos de hidrogeno.

Básicamente el radical peroxilo generado por la descomposición térmica del AAPH (cloruro de 2,2' – azobis (2- amidinopropano)), reacciona con la fluoresceína para formar un producto que puede ser cuantificado fácilmente por fluorescencia. La capacidad antioxidante es determinada por la velocidad de disminución del producto formado (peroxilo - fluoresceína) a través del tiempo (figura 9) convirtiéndolo en un método indirecto.



**Figura 9.** Mecanismo de reacción ORAC.

Se deja reaccionar por tiempos largos para obtener una gráfica de la decaída de la fluoresceína completa, donde el área neta integrada bajo la curva (AUC) (figura 10) arroja un valor en  $\mu\text{mol}$  Trolox según la concentración.



**Figura 10.** Curva de decaimiento de fluoresceína en presencia de antioxidante.

## 2.6. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

Los bioensayos son fundamentales para la industria farmacéutica, los principales propósitos son evaluación preliminar, escaneo, monitoreo y evaluación secundaria de la muestra. Un bioensayo con propósito de evaluación preliminar, es usado para establecer inicialmente si una muestra presenta actividad biológica según el tipo de prueba que aplique, mientras que un escaneo requiere ensayos que reúnan información de actividad biológica cuantificada; el monitoreo requiere la obtención del extracto crudo y fracciones que permitan el aislamiento de los componentes activos puros, y por último la evaluación secundaria que consiste en probar los compuestos en múltiples condiciones, seleccionarlos y llevar a cabo con ellos pruebas clínicas (29).

Deben ser ensayos de bajo costo, rápida respuesta y reproducibles. Dentro de la evaluación preliminar se encuentra el ensayo de *Artemia franciscana* y *Allium test*.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obtención de medicamentos a través de compuestos sintéticos tiene desventajas como las reacciones adversas en el consumidor y el efecto terapéutico reducido, razones por las cuales constantemente crece el interés por los productos naturales para la obtención de compuestos biológicamente activos para uso terapéutico.

El reino vegetal cuenta con una amplia diversidad de plantas usadas en la medicina tradicional, sin embargo los estudios científicos completos sobre ellas son escasos. Dentro de esta diversidad se encuentra la familia de las *Amaryllidaceas* que tienen una amplia gama de géneros y especies que han aportado a la medicina, debido al grupo de alcaloides únicos y distintos metabolitos secundarios que exhiben diferente actividad biológica como: antiviral, antitumoral entre otras (19).

*Hymenocallis* es un género de plantas ornamentales perteneciente a la familia *Amaryllidaceae*, que tienen componentes tipo alcaloide como la licorina que se caracteriza por su actividad antiviral, antiparasitaria, anticancerígena, antioxidante, antibacterial y como inhibidor enzimático. Sin embargo la especie *Hymenocallis acutifolia* carece de soporte fitoquímico y citotxicológico integral que evalúe sus componentes.

El presente trabajo de investigación pretende incentivar el interés en la comunidad científica por esta especie y aportar conocimiento sobre la misma. Por tanto se plantea la determinación cualitativa de metabolitos secundarios por medio de tamizaje fitoquímico, la actividad antioxidante por los métodos de DPPH, ABTS, FRAP y ORAC junto con la cuantificación de fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

Como referente para la actividad antioxidante determinada por los radicales DPPH y ABTS, al igual que para la cuantificación de fenoles y flavonoides totales, se utilizó el extracto etanólico total de *Rosmarinus officinalis* (Romero), con el objetivo de comparar la muestra de *H.acutifolia* con otro extracto común y conocido dentro de las plantas medicinales especialmente por su actividad antioxidante.

La química de productos naturales no solo abarca los estudios fitoquímicos, también los bioensayos son de suma importancia para un perfil completo que enriquezca el estudio de las plantas medicinales, ya que no es suficiente identificar, aislar y probar

compuestos químicos, también es necesaria la evaluación del extracto en conjunto frente a organismos vegetales o animales para determinar la dependencia concentración – efecto a través de respuestas biológicas dadas en condiciones controladas. Por esta razón, para este trabajo se plantea la realización de dos ensayos, por un lado: *Artemia franciscana* y *Allium test* con el objetivo de evaluar la toxicidad, fitotoxicidad y citotoxicidad del extracto etanólico total de hojas de *H.acutifolia*, lo cual permite identificar las diferentes actividades farmacológicas presentes.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante y la actividad farmacológica del extracto etanólico de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar cualitativamente los metabolitos secundarios del extracto etanólico total de hojas de *Hymenocallis acutifolia* por tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad citotóxica del extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia* mediante el bioensayo de letalidad en *Artemia franciscana*.
- Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones y el extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia* mediante las técnicas colorimétricas DPPH Y ABTS.
- Determinar el contenido total de fenoles en el extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia* empleando el método de Folin-Ciocalteu.

Se lograron cumplir objetivos adicionales además de los planteados previamente, son complemento de la investigación y se mencionan a continuación:

- Cuantificar flavonoides presentes en el extracto etanólico total y fracciones de hojas de *H. acutifolia* por medio del método de tricloruro de aluminio.
- Comparar la actividad antioxidante determinada por DPPH y ABTS, al igual que la cuantificación de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico total y fracciones de *H. acutifolia* con un extracto etanólico total de *Rosmarinus officinalis* (Romero).
- Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones y el extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia* mediante los métodos de FRAP y ORAC.
- Identificar compuestos de hojas de *H. acutifolia* en extracto crudo de alcaloides y derivatizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Mediante *Allium test*, evaluar la actividad fitotóxica y citotóxica del extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. REACTIVOS Y MATERIALES

Los reactivos necesarios para el desarrollo de esta investigación fueron adquiridos en distintas casas comerciales tal y como se especifica en la tabla 3.

Los equipos utilizados durante la investigación y las respectivas especificaciones se muestran en la tabla 4.

**Tabla 3.** Reactivos y solventes usados en la experimentación.

Reactivos y solventes	Especificaciones
Etanol, hexano, acetato de etilo butanol, dimetilsulfoxido, dicromato de potasio	J.T. Baker (Xalostoc, México)
Ácido clorhídrico (37%), ácido acético glacial, ácido pícrico, ácido fórmico, 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)
Acido 3,5- dinitrobenzoico	Alfa Aesar (Nueva York, USA)
DPPH, ABTS, BHT, $\alpha$ -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)
Folin-Ciocalteu, Acido 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 <i>Artemia franciscana</i>	Cali, Colombia
Sal marina sintética	Quimpo (Popayán, Colombia)

**Tabla 4.** Equipos de laboratorio usados en la experimentación.

<b>Equipos de laboratorio</b>	<b>Especificaciones</b>
Micropipetas unicanal	Volúmenes 10-1000 µL; 100- 1000 µL LabGnienius (Torino, Italia)
Espectrofotómetro	UV-vis GENESIS Thermo Scientific (Vantaa, Finlandia)
Cubetas de plástico desechables	Brand (Wertheim, Alemania)
Ultrasonido	Fisher Scientific (Hampton, Nuevo Hampshire, Estado Unidos)
Cámara de ambiente controlado	Biotronette Mark III, Environmental Chamber (Melrose Park, IL, USA)
Micropipetas unicanal	Eppendorf (Hamburgo, Alemania)
Micropipetas multicanal	Volúmenes 0.5-10 µL; 30-300 µL Fisher Brand Elite
Balanza analítica	Ohaus Adventure (EEUU)
Lector de microplacas	Thermo Scientific Multiskan GO (Vantaa, Finlandia)
Rotaevaporador	Laborota 4003, Heidolph Instruments GmbH & Co. (Schwabach, Alemania)
Cromatógrafo de gases	Hewlett Packard 6890
Detector selectivo de masas	Hewlett Packard 5975 (Palo Alto, CA, USA)
Columna capilar	HP-5 MS (30m x 0.25mm i.d., 0.25 µm)
Microscopio	Leyca DM (Wetzlar y Mannheim, Alemania)

## **5.2. MATERIAL VEGETAL**

### **5.2.1. Hojas de *Hymenocallis acutifolia***

Las hojas de *H. acutifolia* se colectaron en la ciudad de Cali, Valle del Cauca (Colombia) en el barrio los Cambulos de la comuna 19 con coordenadas 3°25'13" N y 76°32'13" W. Un espécimen se depositó en el herbario de la Universidad del Valle donde fue clasificado taxonómicamente (Herbario Luis Sigifredo Espinal Tascón CUVC Silverstone-Sopkin, Philip Arthur) y otro en el herbario de la Universidad del Cauca (Muñoz Torres, María Alejandra. 001 Herbario CAUP).

El material vegetal fue trasladado al laboratorio de Química de Compuestos Bioactivos, se pesó, lavó y cortó en pedazos pequeños para facilitar el secado. Posteriormente las hojas cortadas se dejaron secar a temperatura ambiente por un mes y fueron

almacenadas en bolsas con cierre hermético para garantizar el buen estado de la muestra.

### **5.2.2. Hojas de Romero (*Rosmarinus officinalis* L)**

Las hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) fueron adquiridas de forma deshidratada en un establecimiento comercial de la ciudad de Popayán. El material vegetal seco de romero, fue trasladado al laboratorio de Química de Compuestos Bioactivos, donde se pesó y se almacenó en bolsas de cierre hermético para posteriores ensayos.

El extracto etanólico total de hojas de *R. officinalis* fue utilizado como referente para la actividad antioxidante determinada por los ensayos DPPH y ABTS, al igual que para la cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales, con el objetivo de comparar la muestra de *H. acutifolia* no solamente con patrones puros como es el caso del BHT y  $\alpha$ -Tocoferol, sino también con otro extracto común y conocido dentro de las plantas medicinales especialmente por su actividad antioxidante como el romero (*R. officinalis*) debido a que los extractos a diferencia de las sustancias puras presentan sinergismo o antagonismo debido a que son matrices complejas.

Los protocolos para la extracción, las actividades antioxidantes y cuantificación de fenoles y flavonoides totales, fueron los mismos utilizados para las hojas de *H. acutifolia* a continuación descritos.

## **5.3. EXTRACCIÓN**

El material seco fue pesado ( $40.448 \pm 0.144$  g) y se calculó el porcentaje de humedad; cartuchos de papel filtro fueron rellenos con el material seco y se realizó una extracción Soxhlet por 24 horas utilizando etanol al 96% previamente rectificado. El extracto etanólico total se llevó a sequedad a presión reducida mediante un rotaevaporador y al culminar este proceso, las muestras se conservaron para los análisis en un refrigerador a 4°C.

## **5.4. TAMIZAJE FITOQUIMICO**

El análisis fitoquímico preliminar se realizó al extracto etanólico total de hojas de *Hymenocallis acutifolia*, para evaluar la presencia de algunos de los principales grupos de metabolitos secundarios asociados a diferentes actividades por medio de pruebas cualitativas.

La metodología utilizada en cada prueba fue determinada por Domínguez (30) y se hizo a partir del extracto etanólico seco ( $2.589 \pm 0.002$  g). La tabla 5 muestra los ensayos que se llevaron a cabo.

**Tabla 5.** Pruebas cualitativas para detección de metabolitos secundarios.

Metabolito secundario	Ensayo en tubo	Resultado positivo
<b>Alcaloides</b>	Dragendorf, Mayer, Wagner	Precipitado anaranjado, crema y café,
<b>Cardiotónicos</b>	Reactivo de Baljet, Keede, Raymond-Marthoud, Keller-Killiani, Liebemann-Burchard, Salkowski	Naranja – rojiza, rosa o azul – violeta, anillo lactónico, colores intensos, azul – verdoso y amarillo – rojo sangre
<b>Cumarinas</b>	Volátiles en papel impregnado con NaOH (Luz UV)	Puntos fluorescentes amarillos - verdosos
<b>Flavonoides</b>	Reaccion de Shinoda	Color marrón intenso
<b>Taninos</b>	Cloruro férrico, solución de gelatina y sal, solución salina	Color café con el cloruro férrico y precipitado blanco con el resto de pruebas
<b>Saponinas</b>	Formación de espuma	Formación de espuma
<b>Triterpenos y esteroides</b>	Liebermann-Burchard, Salkowski	Color verde intenso y rojo
<b>Derivados antracénicos libres</b>	Reaccion Borntrager (NaOH 5%), acetato de magnesio	Coloración roja

### 5.5. IDENTIFICACION DE COMPUESTOS

El grupo de investigación Química de Compuestos Bioactivos (QCB) adscrito al departamento de química de la Universidad del Cauca, pertenece a la red CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), gracias a la cual se hizo posible llevar a cabo la evaluación del extracto metanólico derivatizado y alcaloideo de hojas de *Hymenocallis acutifolia* por medio de GC/MS, debido al gran interés surgido por los resultados de tamizaje fitoquímico y toxicidad de las hojas.

Esta identificación de compuestos se desarrolló en el laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Barcelona dirigido por el profesor Jaume Bastida.

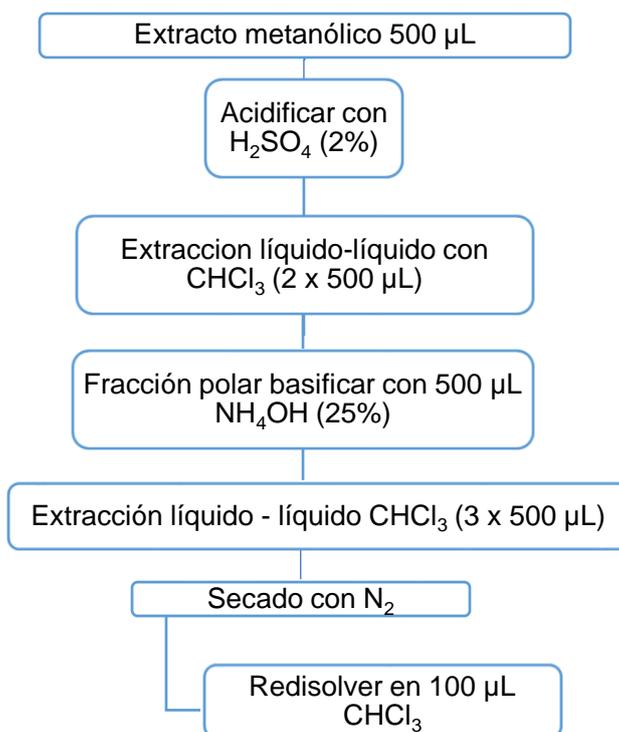
### 5.5.1. Preparación del material

A partir de material seco se tomaron 50 mg de hojas de *Hymenocallis acutifolia*, las cuales fueron maceradas y durante 2 horas dejadas en 1 mL de metanol y codeína (0.05mg) como alcaloide estándar de referencia. Consecutivamente 500µL del extracto metanólico fueron utilizados para hacer extracción ácido-base y así se obtuvo alcaloides, mientras que 300 µL se secaron y derivatizaron.

### 5.5.2. Extracción de alcaloides

500 µL del extracto metanólico inicial se acidificaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2%), luego los compuestos apolares se removieron con CHCl<sub>3</sub> (2 x 500 µL). La fracción polar se basificó con 500 µL de NH<sub>4</sub>OH (25%) y los alcaloides se extrajeron con CHCl<sub>3</sub> (3 x 500 µL). Finalmente, el extracto crudo de alcaloides se secó con N<sub>2</sub> y se redisolvió en 100 µL CHCl<sub>3</sub>.

La figura 11 muestra el esquema de la metodología.



**Figura 11.** Diagrama del protocolo utilizado para la obtención de extracto crudo de alcaloides de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

### 5.5.3. Derivatización

A partir del extracto metanólico se tomaron 300 µL, se secaron al vacío y el residuo seco se disolvió en 200 µL de piridina junto con 100 µL de BSTFA, luego se derivatizaron por 2 horas a 70°C. El extracto derivatizado fue evaporado a sequedad con gas N<sub>2</sub> y disuelto en 300 µL de cloroformo.

### 5.5.4. Análisis GC/MS

Cada uno de los extractos (crudo de alcaloides y derivatizado), fueron inyectados directamente en el GC/MS. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 acoplado a un equipo MSD 5975 (Hewlett Packard Palo Alto, CA, USA) el cual operó en modo de impacto electrónico a 70eV. La columna usada fue HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 25 µm) y la rampa de temperatura utilizada fue la siguiente:

- a) Aumento inicial de 100°C a 180°C (15°C/min)
- b) Aumento de 180° a 300°C (5°/min)
- c) 10 minutos a 300°C

La temperatura del inyector fue de 250°C, flujo del gas acarreador (He) 0.8mL/min. Se utilizó modo Split, con una relación de 1:20 y se inyectó 1 µL de solución por muestra.

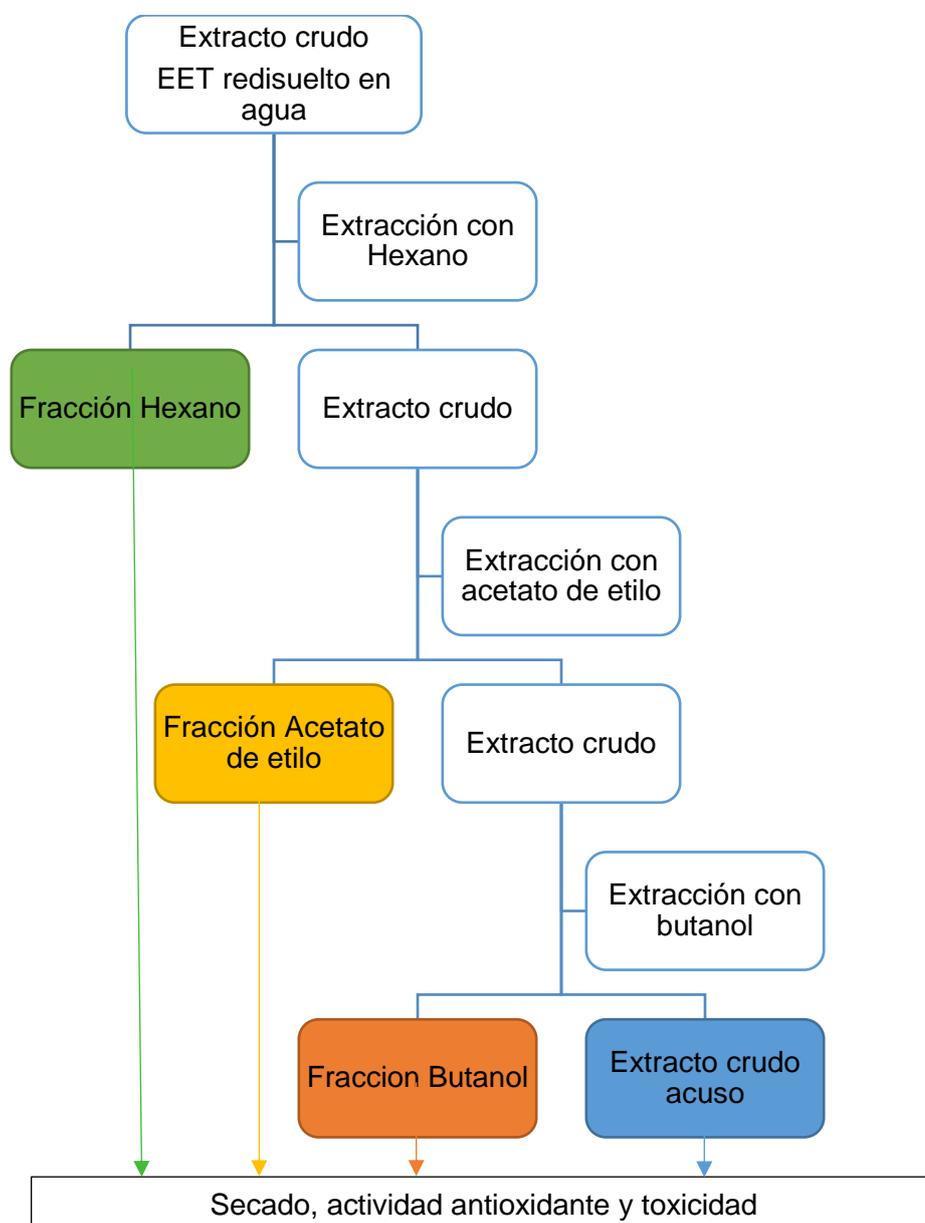
Los compuestos del extracto metanólico fueron identificados en el laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Barcelona, gracias a la base de datos NIST 05 (NIST Mass Spectral Database, PC-Version 5.0, 2005, National Institute of Standardisation and Technology, Gaithersburg, MD, USA) y la base de datos Golm Metabolome Databasel. El compuesto no identificado se determinó con base a la fragmentación de masa espectral específica comparada con los espectros de metabolitos conocidos.

## 5.6. FRACCIONAMIENTO

Se utiliza la extracción líquido-líquido para separar los metabolitos por polaridades y fraccionar el extracto complejo inicial. La metodología fue establecida por el grupo Química de Compuestos Bioactivos (QCB) y consistió en tomar el extracto acuoso de hojas de *Hymenocallis acutifolia* y hacer extracciones sucesivas con solventes de menor a mayor polaridad; hexano, acetato de etilo y butanol.

Se pesaron 2 gramos de extracto etanólico total de *H. acutifolia* seco, se disolvió en 50 mL de agua y fue llevado a un embudo de decantación para extracciones consecutivas

con cada solvente (5 x 10 mL), primero con hexano, luego acetato de etilo y por ultimo butanol. Cada fracción se llevó a sequedad a presión reducida en un rotaevaporador. En la figura 12 se muestra el proceso detallado del fraccionamiento.



**Figura 12.** Diagrama de protocolo utilizado en fraccionamiento del extracto etanólico total de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

## 5.7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

### 5.7.1. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

Esta determinación se hizo mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. A partir de disoluciones metanólicas se preparó una curva de calibración del patrón de ácido gálico variando la concentración en un rango de 15 a 75 µg/mL; la absorbancia fue medida en el espectrofotómetro a 760 nm siguiendo el protocolo descrito por Li *et al.* (31).

Las muestras se prepararon de la siguiente forma: se mezclaron 2 mL de solución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu (0,2 equivalentes/L) y 0,4 mL de solución etanólica del extracto, a diferentes concentraciones de 100 a 1000 µg/mL, luego se incubaron por 5 minutos. Consecutivamente se adicionaron 1,6 mL de solución acuosa de carbonato de sodio (75 g/L), se agitó y se incubó en la oscuridad por una hora y se registró el valor de absorbancia. El contenido de componentes fenólicos presentes se expresó como miligramos de ácido gálico por gramos en peso seco de la planta.

### 5.7.2. Determinación del contenido de Flavonoides Totales

La cuantificación de flavonoides se hizo según la metodología descrita por Kim *et al.* (32), por el método de tricloruro de aluminio en un lector de microplaca y placa de poliestireno.

Se utilizó una curva de calibración de quercetina para la cuantificación, donde las concentraciones estaban dadas en un rango de 3.1 a 200 µg/mL. El EET y fracciones de *H. acutifolia* se disolvieron en metanol y se procedió de la siguiente manera: a cada pozo se le adicionó 20 µL de muestra y 115µL de agua junto con 7.5 µL de NaNO<sub>2</sub> (5%), se dejó homogenizar y reaccionar por 5 minutos; luego se agregó el tricloruro de aluminio (2.5%), se dejó reaccionar por 6 minutos, y por último se agregó 50 µL de NaOH 1M y 50µL de agua. La absorbancia se midió a 500 nm después de 5 minutos de haber agregado el NaOH.

### 5.7.3. Actividad antioxidante determinada por el ensayo (DPPH')

En esta técnica colorimétrica se disolvió 3 mg de DPPH' en 100 mL de metanol, se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis ajustando el valor en 0.800±0.03 (λ= 515 nm). Se calculó la concentración exacta de la disolución por medio de la interpolación del valor de la absorbancia en una recta de calibración preparada a partir de la disolución del radical DPPH', desde 2x10<sup>-5</sup> M a 8x10<sup>-5</sup> M. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente y en la oscuridad. La medida de las absorbancias para la muestra fueron efectuadas así: se construye una curva de calibración del extracto metanólico con concentraciones de 10 hasta 1000 µg/mL. Posteriormente se

tomó 0.8 mL de las mismas y se adicionó a diferentes celdas, por último se agregó 1.6 mL de solución de DPPH a cada punto y se contabilizó 15 minutos para iniciar la medición, de acuerdo con la metodología descrita por Brand – Williams *et al.* (32) con modificaciones de Trujillo *et al* (33).

#### **5.7.4. Actividad antioxidante determinada por el método (ABTS<sup>•+</sup>)**

Este ensayo colorimétrico se llevó a cabo en la oscuridad y a temperatura ambiente. El catión radical ABTS<sup>•+</sup> se disolvió en buffer fosfato (pH 7,4) por reacción de 50 mL de una disolución de ABTS en persulfato potásico (2 mM) más 200 µL de solución de persulfato de potasio en agua desionizada (70 mM); la mezcla se dejó en reposo durante 17 horas. La disolución de ABTS<sup>•+</sup> previamente preparada se diluyó en buffer hasta que la absorbancia medida fue  $0.800 \pm 0.03$  ( $\lambda=734$  nm). La determinación de la absorbancia de las muestras se hizo así: 950 µL de solución buffer de fosfatos (PBS) (pH = 7.4) del catión radical ABTS<sup>•+</sup> se mezcló en una celda con 50 µL de solución metanólica de la muestra variando las concentraciones desde 10 a 500 µg/mL de cada fracción, se agitó, se puso a temperatura ambiente y en la oscuridad por un tiempo de 5 minutos y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis Genesys.

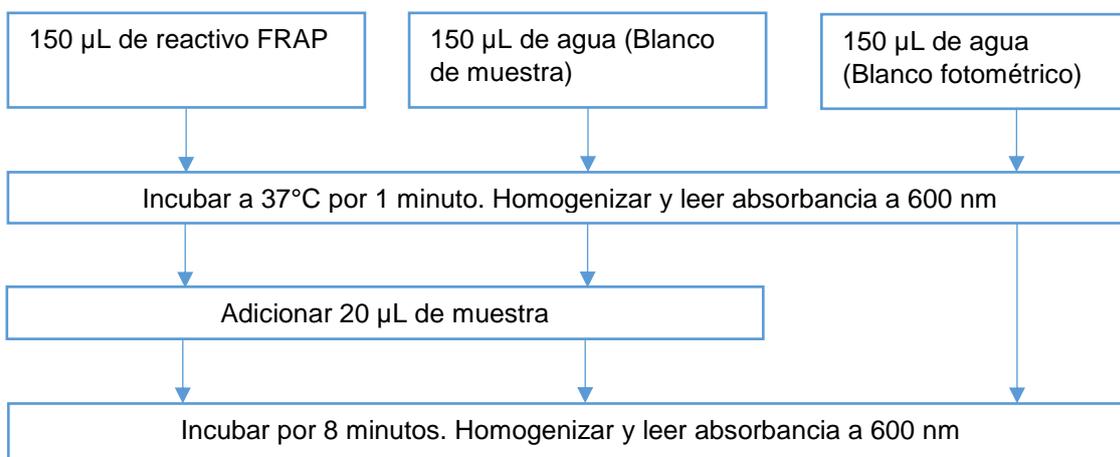
La curva de calibración se realizó con una solución estándar de Trólox (5 mM) y las concentraciones para la curva fueron de 0 a 1.5 µM; se mezclaron 950 µL del reactivo catión radical ABTS<sup>•+</sup> con 50 µL de las soluciones preparadas, se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5 minutos; se midió la absorbancia a 734 nm, de acuerdo con la metodología descrita por Re *et al* (34) con modificaciones de Trujillo *et al* (33).

#### **5.7.5. Determinación del Potencial Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP)**

La determinación de actividad antioxidante por el método FRAP se realizó siguiendo el protocolo descrito por Benzie *et al* (35). Inicialmente se tuvo en cuenta una curva de calibración de soluciones metanólicas del patrón Trolox que varía de 30 a 100 µM. La medición se hizo en un espectrofotómetro lector de microplaca Multiskan GO en placa de poliestireno. Los resultados se expresan como µmol Trolox/g extracto seco.

Para el ensayo se emplearon los siguientes reactivos: buffer de acetato (pH 3.6), TPTZ (2, 4, 6 – tripiridil – s- triazina) 10 mM, solución de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 20 mM y el reactivo FRAP; previo al ensayo se debe tener (buffer acetato: TPTZ: FeCl<sub>3</sub> 10:1:1).

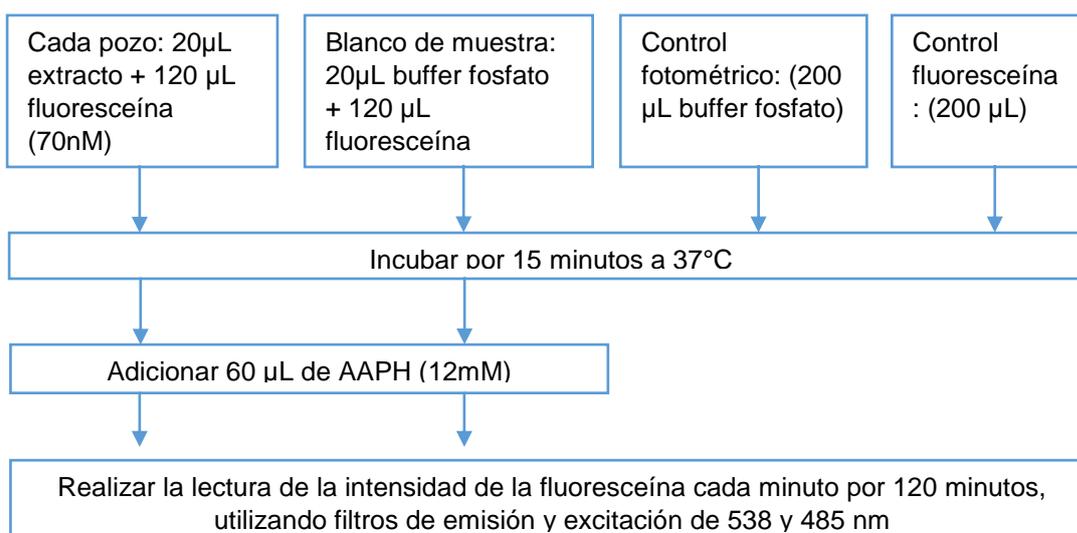
Las muestras de EET y fracciones de *H. acutifolia* se disolvieron en metanol y el llenado de placa se hizo de la siguiente forma (Figura 13):



**Figura 13.** Diagrama de protocolo utilizado en la determinación de actividad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de *H. acutifolia* por FRAP.

#### 5.7.6. Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)

Esta metodología se realizó según el protocolo descrito por OU *et al* (36). La medición se realizó en una placa de poliestireno en un equipo Fluoroskan Acsent y los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol Trolox/ gramo}$  de extracto. La figura 14 muestra el protocolo seguido.



**Figura 14.** Diagrama de protocolo utilizado para determinación de actividad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de *H. acutifolia* por ORAC.

## 5.8. DETERMINACION DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA

### 5.8.1. Ensayo de letalidad sobre *Artemia franciscana*

Se agregaron 70 mg de huevos de *Artemia franciscana* a 400 mL de solución de sal marina al 3,7% preparada en agua destilada, donde permanecieron por 48 horas en una cámara de ambiente controlado. En tubos de ensayo se adicionaron 10 nauplios y se completaron con 5 mL de solución salina al 3,7% y a cada uno se le agregaron diferentes concentraciones del extracto disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), al final se obtuvieron concentraciones de 10 a 1000 mg/mL. Se realizaron controles positivo y negativo, como control negativo se utilizó DMSO y como control positivo una curva de calibración con dicromato de potasio, el cual se disolvió en agua destilada; se probó un rango de concentraciones de 5 a 25 mg/L a partir de una solución madre de 1000 mg/L. Se hizo grupos de 10 nauplios y se establecieron 3 réplicas por tratamiento. El tiempo de exposición fue de 24 h. Se contaron las sobrevivientes a las 6 y 24 horas de exposición, de acuerdo con la metodología descrita por Sanabria *et al* (37) con algunas modificaciones de Syahmi *et al*. (38).

### 5.8.2. Ensayo de toxicidad por medio de *Allium cepa*

Este bioensayo se llevó a cabo según la metodología descrita por Fiskejö (39). Se escogieron 24 bulbos orgánicos de *Allium cepa* con aproximadamente el mismo diámetro ( $4.67 \pm 0.25$  cm), los cuales fueron lavados, secados y con ayuda de una cuchilla se les retiró el catáfilo externo para exponerlos a agua destilada en frascos ámbar con capacidad de 200 mL y 11 cm de altura, por un periodo de 48 horas con el objetivo de promover el crecimiento inicial de raíces nuevas.

Según el crecimiento de los bulbos de *Allium cepa*, se escogieron 3 de ellos para cada concentración acuosa de *H. acutifolia*: alta (56 ppm), media (24 ppm) y baja (4.8 ppm) junto con un control de solo agua. El periodo total de exposición fue de 168 horas en oscuridad, a temperatura ambiente y en cámara ambiental controlada; las mediciones se hicieron cada 24 horas exactas desde el momento de exposición al extracto.

Cada medición consiste en el conteo, medida de longitud y anotaciones del aspecto de las raíces. También se realizó muestreo del ápice de las raíces, donde eran cortados 2 a 4 cm de raíz, se ubicaban en un vidrio reloj, se cubrían con una solución de orceína acética clorhídrica y se flameaban hasta obtener tres vapores consecutivos. Una vez el meristemo estaba teñido, se puso en un portaobjetos, luego el cubreobjetos y se realizó el extendido o "squash".

La observación de las placas se ejecutó en un microscopio Leica 500 en el objetivo 40x. Se contaron entre 900 y 1000 células por campo para el cálculo de índice mitótico y de fases.

### **5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Cada análisis tuvo replicas por triplicado y fue realizado un análisis estadístico de la siguiente forma: Inicialmente se realizó una prueba de Shapiro – wilk para evaluar la distribución de los datos, luego la homogeneidad de varianza por medio de la prueba de Levene y finalmente se aplica un Anova. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Tukey. Las correlaciones de fenoles y flavonoides con los métodos de determinación de actividad antioxidante, se hicieron con el coeficiente de Pearson (Valor de confianza del 95%). El software utilizado fue SPSS 11.5 y todos los elementos gráficos se realizaron en GraphPad Prism 6.0.

### **5.10. DATOS LOGÍSTICOS**

Los ensayos de actividad antioxidante por FRAP y ORAC junto con la cuantificación de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio, fueron realizados en el laboratorio de Biotecnología – Productos Naturales dirigido por el profesor Oscar Marino Mosquera, de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Los ensayos de actividad antioxidante por DPPH y ABTS junto con la cuantificación de fenoles totales por el método Folin – Ciocalteu, fueron llevados a cabo en el laboratorio del grupo de investigación Química de Compuestos Bioactivos, adscrito al Departamento de Química de la Universidad del Cauca. Las mediciones por UV-Vis se realizaron en la Unidad de Análisis Industriales de la Universidad del Cauca.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. PORCENTAJE DE HUMEDAD, EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO

El porcentaje de humedad del material vegetal se determinó por la diferencia de peso del material fresco y seco, las hojas de *Hymenocallis acutifolia* recolectadas se pesaron dos veces: la primera cuando las hojas frescas llegaron al laboratorio y la segunda cuando terminó el proceso de secado; con estos datos se determinó el porcentaje de humedad (Ver tabla 6).

**Tabla 6.** Peso del material y porcentaje de humedad de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

Material	Peso material(g)*	Humedad (%)**
Fresco	436.475 ± 1.414	90.726 ± 0.694
Seco	40.447 ± 0.145	

\*=Resultados expresados g ± desviación estándar; \*\*=Resultados expresados % ± desviación estándar

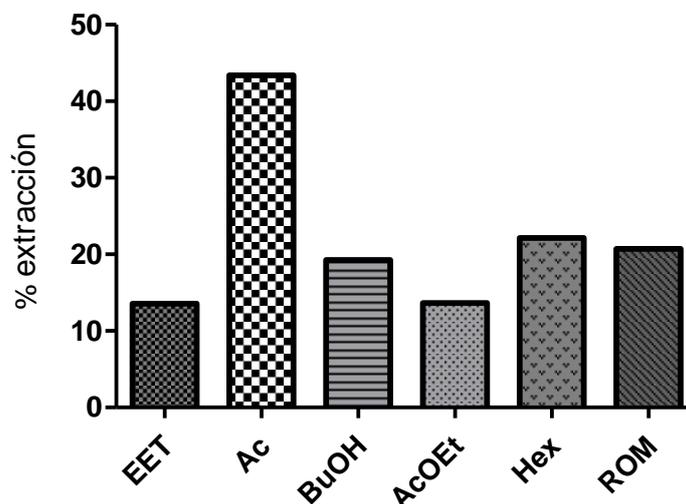
A partir de 40.4 g de material seco y haciendo uso de un método Soxhlet se obtuvo el extracto etanólico total de *Hymenocallis acutifolia* de color verde oscuro y olor fuerte, el cual presentó un rendimiento de extracción de (EET 13,567%); sin embargo el fraccionamiento proporcionó el mayor porcentaje de obtención (Ac 43,387%) para la fracción acuosa, seguida de la fracción de n-hexano (Hex 22,163%), 1-butanol (BuOH 19,256%) y por último la fracción de acetato de etilo (AcOEt 13,658%). En la tabla 7 y en la gráfica 1 se muestran los rendimientos de extracción.

Como referente de actividad antioxidante se empleó el extracto de hojas de romero *Rosmarinus officinalis L.* debido a que es reconocida como fuente de una amplia gama de polifenoles (40). Como se detalla en la sección de materiales y métodos, se adquirió hojas secas y se extrajo de la misma forma que la muestra por medio del método soxhlet. Se obtuvo un extracto etanólico total de color verde oscuro y aroma agradable característico del romero. En la tabla 7 y gráfica 1 se encuentran los datos de rendimiento de obtención del romero.

**Tabla 7.** Rendimientos de obtención del extracto total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia* y extracto etanólico total de romero (*R. officinalis*).

Extracto o fracción	Peso extracto (g)*	Rendimiento de extracto (%)**
<b>Extracto Etanólico total</b>	5.488 ± 0.0014	13.567 ± 0.049
<b>Fracción Acuosa</b>	0.869 ± 0.0001	43.387 ± 0.005
<b>Fracción Butanol</b>	0.386 ± 0.0003	19.256 ± 0.150
<b>Fracción Acetato de etilo</b>	0.274 ± 0.0003	13.658 ± 0.015
<b>Fracción Hexano</b>	0.444 ± 0.0001	22.163 ± 0.005
<b>Extracto Romero</b>	21.772 ± 0.017	20.735 ± 0.170

\*=Resultados expresados g ± desviación estándar; \*\*=Resultados expresados % ± desviación estándar



**Gráfica 1.** Porcentajes de extracción de EET y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia* y extracto etanólico total de romero (*R. officinalis*).

Como se observa en la gráfica el mayor porcentaje de extracción se obtuvo con la fracción acuosa; siguiente en orden descendente la fracción de hexano con un valor cercano a la mitad de la fracción acuosa. Las moléculas de polaridad media se encuentran en la fracción de butanol y acetato de etilo, al sumarlas representan el 32% del extracto etanólico total. Por lo tanto se puede deducir que el extracto está compuesto en su mayoría por moléculas polares (fracción acuosa 43%), seguidas por moléculas de polaridad media (fracción butanol y acetato de etilo 32%) y moléculas apolares (fracción hexano 22%).

## 6.2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Las hojas de *Hymenocallis acutifolia* no son aptas para el consumo humano porque se consideran venenosas (41), siendo este un indicio frecuente de actividad biológica (42). Al llevarse a cabo el tamizaje fitoquímico se trató de corroborar esta característica de la planta.

En la tabla 8 se muestran los resultados de las diferentes pruebas cualitativas realizadas al extracto etanólico total de hojas de *Hymenocallis acutifolia* para detectar metabolitos secundarios empleando métodos colorimétricos (Tabla 2).

**Tabla 8.** Compuestos determinados por tamizaje fitoquímico en el extracto etanólico total de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

Prueba	Ensayo en tubo
Alcaloides	+
Cardiotónicos	-
Cumarinas	-
Flavonoides	+
Taninos	+
Saponinas	-
Triterpenos y esteroides	+
Derivados antracénicos libres	-

**Interpretación de resultados:** (+) Metabolito presente (-) Metabolito ausente

Los resultados de la tabla 8 indican que las hojas de *Hymenocallis acutifolia* cuentan con la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides. Estos grupos de moléculas le confieren a la planta toxicidad como mecanismo de defensa (43) y propiedades como la actividad antiviral, antiparasitaria, anticancerígena, antioxidante y antibacteriana (44). Altas cantidades de estos compuestos hacen a la planta tóxica para el consumo humano, por consiguiente se comprueba inicialmente su carácter venenoso, no obstante es necesario realizar pruebas específicas para las distintas actividades.

En las pruebas colorimétricas realizadas para la determinación de alcaloides (Dragendorff, Mayer y Wagner) se obtuvo un intenso color amarillo y alta cantidad de precipitado (Anexo 1), por lo tanto se concluye que en las hojas hay presencia significativa de alcaloides. Es un resultado esperado debido a que este género *Hymenocallis* pertenece a las *Amaryllidaceae*, plantas identificadas por producir alcaloides típicos que han sido aislados a partir de todos los géneros que conforman esta familia (45).

Karthikeyan R *et al.* (21) realizaron tamizaje fitoquímico a flores de *Hymenocallis littoralis* el cual evidencia dos puntos importantes: el primero que el extracto etanólico es el mejor para la evaluación de metabolitos secundarios frente a extracciones con otros solventes y segundo la presencia de alcaloides; en el caso de la *Hymenocallis littoralis* son de tipo licorina (46,47). Esto corrobora que la especie *Hymenocallis acutifolia* contiene alcaloides, sin embargo al ser un ensayo cualitativo es necesario integrar otros estudios (como la identificación de compuestos por GC/MS en este caso) para conocer la cantidad y el tipo de los mismos. Actualmente en la literatura se encuentra poca información al respecto.

### **6.3. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS**

El análisis GC/MS del extracto metanólico y alcaloideo de hojas de *Hymenocallis acutifolia* determinó 25 componentes, entre ellos compuestos tipo sacáridos, ácidos grasos y algunos alcaloides de *Amaryllidaceae* entre otros (Tabla 9).

Los constituyentes mayoritarios son disacáridos y monosacáridos (48%), seguidos por alcaloides (25%) y ácidos grasos (9%) fueron encontrados en menor cantidad.

El alto contenido (48%) de glúcidos disacáridos tipo sacarosa y monosacáridos tipo fructosa y glucosa se debe a diferentes factores, como por ejemplo: la fase de crecimiento en que se encontraba la planta, debido a que en época de floración o crecimiento de fruto la demanda de glúcidos varía afectando la cantidad de los mismos en las hojas, o también la exposición a la luz de cada hoja, porque son las encargadas de la fotosíntesis y de almacenar carbohidratos para el metabolismo (48), siendo la principal fuente de azúcares libres para toda la planta (49,50).

**Tabla 9.** Compuestos identificados en el extracto metanólico y alcaloideo de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

	<b>Compuesto</b>	<b>Tipo</b>	<b>RT</b>	<b>RI</b>	<b>Cantidad Relativa%</b>
1	Licorina <sup>a</sup>	Alcaloide	23,616	2613,5	5.0274
2	D-Fructosa 1 <sup>a</sup>	Monosacárido	12,437	1886,6	0.278
3	D-Fructosa 2 <sup>a</sup>	Monosacárido	12,555	1894,6	4.254
4	D-Fructosa 3 <sup>a</sup>	Monosacárido	12,657	1902,1	18.972
5	Galactopiranos <sup>a</sup>	Monosacárido	13,762	1976,1	10.730
6	Talosa <sup>a</sup>	Monosacárido	15,172	2067,3	12.682
7	Ácido hexadecanoico <sup>a</sup>	Ácido graso	24,296	2661,4	3.208
8	a-D-Glucopiranos <sup>a</sup>	Monosacárido	25,817	2769,1	44.849
9	D – Fructosa	Monosacárido	12,538	1893,6	1.246
10	D – Fructosa	Monosacárido	12,649	1900,9	10.814
11	Galactopiranos	Monosacárido	13,745	1975,1	3.065
12	Ácido hexadecanoico <sup>a</sup>	Ácido graso	24,296	2661,3	4.804
13	D-Glucosa <sup>a</sup>	Monosacárido	15,163	2066,4	3.896
14	Sacarosa <sup>a</sup>	Disacárido	25,816	2769,1	74.833
15	Ácido Monoesteárico <sup>a</sup>	Ácido graso	27,044	2811,2	1.343
16	UK (335)	Alcaloide	24,730	2448,1	7.924
17	Licorina	Alcaloide	26,376	2808,8	0.440
18	UK (335) <sup>b</sup>	Alcaloide	24,755	2693,8	51.278
19	Licorina <sup>b</sup>	Alcaloide	26,335	2806,1	14.853
20	Homolicorina <sup>b</sup>	Alcaloide	26,547	2821,3	11.186
21	Pseudolicorina <sup>b</sup>	Alcaloide	27,141	2818,0	0.199
22	8-O- Demetilhomolicorina <sup>b</sup>	Alcaloide	27,363	2882,7	5.879
23	Acetato de Dihidrolícorina <sup>b</sup>	Alcaloide	27,872	2921,1	2.514
24	2-Hidroxihomolicorina <sup>b</sup>	Alcaloide	28,174	2890,9	0.052
25	Erucilamida <sup>b</sup>	Otro*	26,785	2839,5	14.039

<sup>a</sup>Derivatizado, <sup>b</sup> Sin derivatizar \*Se refiere a compuestos tipo éster, ftalato y amida grasa.

Jaume Bastida, Laura Torras, Universidad de Barcelona (España) 2013

Los metabolitos secundarios alcaloides, son sintetizados por la planta para su protección (51). La cantidad de alcaloides producidos depende de la edad y nutrición de la planta, la temperatura en la que se encuentra y la cantidad de agua que recibe (52,53). En este caso el 25% de contenido del extracto está constituido por seis alcaloides tipo licorina y uno sin identificar (**16, 21**, UK 335).

Cabe resaltar que el alcaloide sin identificación, se debe a que en algunos casos el barrido de la muestra por GC/MS revela compuestos con espectros de masas desconocidos y probablemente sea una nueva molécula bioactiva aislada en el extracto alcaloideo.

El componente erucilamida (**28**) tiene propiedades antifúngicas e insecticidas (54–56), se encuentra clasificado como “otro” (Tabla 9).

Los ácidos grasos (9%) están representados en el extracto de *Hymenocallis acutifolia* principalmente por el ácido palmítico. La cantidad de ácidos grasos en hojas depende del clima, la fase de desarrollo de la planta y la nutrición (57).

## **6.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

### **6.4.1 Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu**

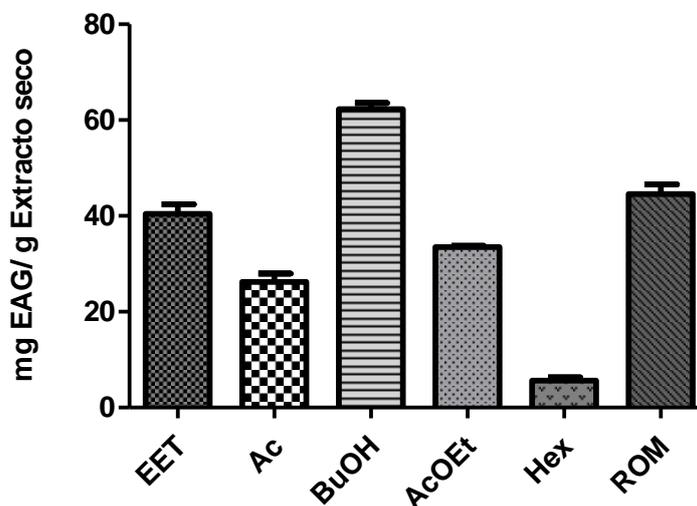
Se le atribuye a los compuestos fenólicos la actividad antioxidante de las plantas (58), por tanto es fundamental realizar este ensayo en el extracto etanólico total y las fracciones provenientes de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

La cuantificación de fenoles totales (TPC) por medio del reactivo Folin-Ciocalteu es un método ampliamente utilizado alrededor del mundo. A pesar de ser una prueba frecuente presenta variaciones en su metodología, dificulta la comparación entre resultados de distintas fuentes (59); sin embargo la información que proporciona cada análisis, sirve para obtener un indicio de la actividad antioxidante presente en el extracto a investigar.

Los resultados para este experimento fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/ g Extracto Seco), empleando una curva de calibración del patrón ácido gálico (gráfica 11, Anexo 2).

En la gráfica 2 se presentan los resultados obtenidos para el extracto etanólico total de hojas de *Hymenocallis acutifolia* y el extracto etanólico total de romero (*Rosmarinus officinalis* L), antioxidante conocido que será utilizado como parámetro de comparación,

no solo para esta experimentación, también es un aporte referente para los trabajos futuros dentro del grupo de investigación QCB.



**Gráfica 2.** Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu de extracto etanólico total y fracciones de hojas de *H. acutifolia* y extracto etanólico total de romero (*R. officinalis*).

La fracción que presentó mayor contenido de fenoles totales fue butanol ( $62.297 \pm 1.246$  mg EAG/g Extracto seco), la cual es el doble de la fracción acetato de etilo y dos veces mayor que la acuosa respectivamente ( $33.526 \pm 0.263$ ,  $26.246 \pm 1.752$  mg EAG/g Extracto seco); por último la fracción de hexano con el valor más bajo ( $5.632 \pm 0.696$  mg EAG/g Extracto seco). El extracto etanólico total (EET) se encuentra en medio de butanol y acetato de etilo con un valor de  $40.457 \pm 1.995$  mg EAG/g Extracto seco. Todas presentan diferencia significativa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los compuestos fenólicos del extracto de *Hymenocallis acutifolia* son de origen medianamente polar a polar. En orden descendente el comportamiento respecto a TPC de fracciones y extracto etanólico total es BuOH > EET > AcOEt > Ac > Hex; la interacción de todas las moléculas en el extracto etanólico total puede provocar un efecto antagónico y es claro que la fracción de BuOH durante el fraccionamiento extrae y potencializa la cantidad de polifenoles.

El extracto etanólico total de romero tuvo un TPC de  $44.596 \pm 1.993$  mg EAG/g Extracto seco, el cual comparado con el extracto etanólico total de *Hymenocallis acutifolia*

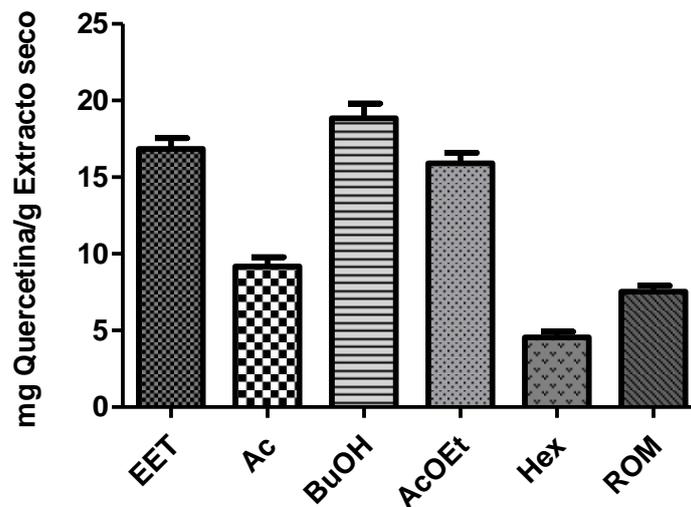
(40.457 ± 1.995 mg EAG/g Extracto seco) es mayor; a pesar de tener diferencia significativa son cercanos, por lo tanto se puede inferir una actividad antioxidante considerable de las hojas de *H. acutifolia*. Diferentes estudios muestran que el TPC de extracto de romero puede variar en un rango de 147.3 a 34.1 mg EAG/g Extracto seco según el sitio de recolección con excelente actividad antioxidante (60,61); para el extracto de *H. acutifolia* no hay reportes en la literatura, sin embargo Sundarasekar *et al.* (62) obtienen TPC para el extracto metanólico de *Hymenocallis littoralis* (Amaryllidaceae) de hojas, flores, raíces, bulbos, anteras y tallo, donde las hojas tienen 8.62 ± 1.52 mg EAG/g Extracto seco, un valor muy por debajo del hallado en las hojas de *H. acutifolia*.

#### **6.4.2 Determinación del contenido de Flavonoides Totales**

Los compuestos fenólicos están divididos en subgrupos como taninos, flavonoides, antiocianinas, ácidos fenólicos, entre otros, pueden analizarse individualmente para comparar los resultados con la cuantificación de fenoles totales y correlacionarlos; el objetivo es descubrir la especie predominante y atribuirle las diferentes propiedades que presente la muestra evaluada.

Para este estudio se realizó la cuantificación de flavonoides, los resultados son expresados en mg quercetina por gramo de extracto seco, utilizando una curva de calibración de patrón quercetina (gráfica 12, Anexo 2).

La fracción con mayor contenido de flavonoides como lo muestra la gráfica 3, es butanol (18.840 ± 0.969 mg quercetina/g extracto seco), sucesivamente en orden descendente el extracto etanólico total (16.847 ± 0.706 mg quercetina/g extracto seco) con diferencia significativa; entre el acetato de etilo (15.907 ± 0.685 mg quercetina/g extracto seco) y el EET no hay diferencia significativa. Los valores más bajos fueron para la fracción acuosa y la de hexano respectivamente (9.173 ± 0.611, 4.553 ± 0.367 mg quercetina/g extracto seco). Al comparar los valores de flavonoides con el TPC, se observa el mismo orden descendente BuOH > EET > AcOEt > Ac > Hex. Es un resultado esperado, debido a que los flavonoides pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, sin embargo los valores de flavonoides no fueron representativos por tanto, otra familia de compuestos como taninos (tamizaje fitoquímico tabla 8) podría predominar.



**Gráfica 3.** Determinación de contenido de flavonoides totales del extracto etanólico total y fracciones de hojas de *H. acutifolia* y del extracto etanólico total de romero (*R. officinalis*).

También se deduce de los resultados, que la mayoría de flavonoides del extracto *H. acutifolia* son de carácter polar como los compuestos fenólicos en general. La solubilidad depende de las características de los sustituyentes presentes como su posición, tipo y cantidad; las agliconas flavonoides altamente sustituidas con hidroxilos son solubles en alcohol en este caso butanol, los poco hidroxilados en acetato de etilo mientras que la fracción de hexano incluye clorofilas y agliconas altamente metoxiladas (63,64). La fracción acuosa es afín con azúcares, péptidos, enzimas y flavonoides ocluidos en cloroplastos (64) por lo general es muy pobre en compuestos fenólicos.

Respecto al extracto etanólico total que contiene todos los compuestos nombrados, se ve un efecto antagónico y al igual que en TPC, la fracción butanol se destaca por encima del EET.

Entre extractos etanólicos *H. acutifolia* y romero (*Rosmarinus officinalis*) ( $7.536 \pm 0.383$  mg quercetina/g extracto seco) hay diferencia significativa, sin embargo el EET de *H. acutifolia* tiene mayor cantidad de flavonoides. Hendel *et al.* (61) reportan bajo contenido de flavonoides para el extracto de romero confirmando los resultados obtenidos en el presente estudio; el extracto de *H. acutifolia* no tiene reportes hasta la fecha en la literatura, sin embargo para el extracto metanólico de *H. littoralis* una **Amaryllidaceae**

del mismo género, Sundarasekar *et al.* (62) obtuvieron  $1.55 \pm 0.68$  mg catequina/g extracto seco que comparado con el EET de *H. acutifolia* es menor.

### 6.4.3 Actividad antioxidante determinada por el ensayo (DPPH<sup>•</sup>)

Una vez realizada la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides, se determinó la actividad antioxidante por distintos métodos: DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>+</sup>, FRAP Y ORAC para correlacionarlos y definir si los polifenoles son responsables de dicha actividad. Los resultados de cada ensayo se muestran en el Anexo 3.

Inicialmente en el ensayo de DPPH<sup>•</sup> se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (% A.A) a una concentración de 1000 ppm para cada fracción, con el objetivo de hacer la siguiente clasificación: ACTIVA si era mayor al 50% A.A o INACTIVA si era menor al 50% A.A (Tabla 10). Este parámetro fue definido específicamente para este trabajo debido a que una actividad antioxidante con IC<sub>50</sub> mayor a 1000 ppm es una actividad muy baja, considerando que el romero a esa concentración ya ha alcanzado un 100% de la actividad antioxidante, otros trabajos previamente utilizan el mismo método de clasificación (65).

En la tabla 10 se observa que el EET y la fracción de BuOH se catalogaron como activas, por lo tanto se realizó una curva de calibración para cuantificar la capacidad antioxidante expresada en  $\mu\text{mol Trolox/g}$  extracto seco (gráfica 13, Anexo 2) y correspondiente IC<sub>50</sub>. Las fracciones inactivas no continuaron el proceso debido a que su IC<sub>50</sub> es mayor a 1000 ppm; quiere decir que se necesita más de 1000 ppm para alcanzar la concentración necesaria que inhiba en un 50% las reacciones de oxidación, una cantidad considerada alta y se traduce en actividad antioxidante baja, cuando lo esperado es que a menor concentración el % A.A sea mayor.

Una vez determinado el IC<sub>50</sub> del EET y fracción butanol (Tabla 16, Anexo 3), se graficaron junto con el IC<sub>50</sub> del EET de romero y los patrones puros BHT y  $\alpha$ -Tocoferol, antioxidantes sintéticos utilizados comúnmente en la investigación de actividad antioxidante e industria alimentaria (Gráfica 4).

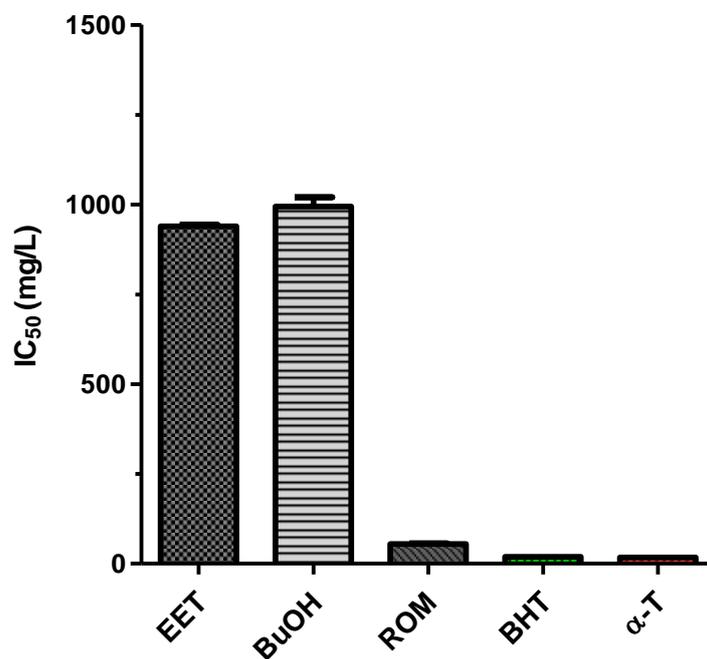
En la gráfica 4 se observa que los patrones puros BHT y  $\alpha$ -Tocoferol tienen un bajo IC<sub>50</sub> respectivamente ( $19.460 \pm 0.046$ ,  $17.115 \pm 0.177$  ppm), por consiguiente una excelente actividad antioxidante sin diferencia significativa entre ellos. Este resultado es esperado porque las sustancias puras en contraste con matrices complejas como los extractos, presentan menos impedimento estérico que dificulte las interacciones con el radical, por lo tanto son más efectivos que cualquier extracto vegetal. El IC<sub>50</sub> del BHT ( $19.460 \pm$

0.046 ppm) concuerda con el hallado por Sökmen *et al.* (66) ( $IC_{50} 19.80 \pm 0.5$  ppm); esto comprueba que la metodología utilizada es reproducible.

**Tabla 10.** Porcentaje de capacidad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia* por el método DPPH'.

Extracto / fracción	%A.A* DPPH'	± SD, n=3	
EET	52.359	0.826	<b>ACTIVA</b>
Ac	29.110	1.416	<b>INACTIVA</b>
BuOH	50.307	1.668	<b>ACTIVA</b>
AcOEt	28.798	1.424	<b>INACTIVA</b>
Hex	39.276	0.846	<b>INACTIVA</b>

\*%Actividad antioxidante



**Gráfica 4.** Valores de  $IC_{50}$  (mg/L) para extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia*, extracto etanólico total de romero (*R. officinalis*), patrones BHT y  $\alpha$ -Tocoferol por el método DPPH'.

Para el extracto etanólico total y fracción de butanol de hojas de *H. acutifolia* se encontraron valores de IC<sub>50</sub> de 939.062 ± 4.521 y 994.177 ± 25.549 ppm respectivamente, presentan diferencia significativa y al compararlos con el IC<sub>50</sub> de extracto de hojas de romero (54.641 ± 1.132 ppm) son altos (Gráfica 4), por tanto presentan una actividad antioxidante regular; mientras se necesita 54.641 ppm de extracto de romero para inhibir el 50%, del extracto de *H. acutifolia* se necesitan 939.062 ppm de EET y 994.177 ppm en el caso de butanol.

Actualmente no hay reportes de IC<sub>50</sub> para *H. acutifolia*, sin embargo para el extracto de romero El-Naggar *et al.* (67) reportaron un IC<sub>50</sub> de 55 ppm un valor cercano al hallado en este estudio (54.641 ± 1.132 ppm).

El ensayo de DPPH<sup>·</sup> confirma la tendencia sobresaliente de la fracción butanol y el EET ya descrita en la cuantificación de fenoles y flavonoides, sin embargo el radical no tiene en cuenta parámetros relevantes involucrados en ambientes biológicos, por consiguiente no es un método representativo de inhibición de radicales en seres vivos.

#### **6.4.4 Actividad antioxidante determinada por el método (ABTS<sup>·+</sup>)**

Considerando la complejidad del mecanismo de acción *in vivo* de los antioxidantes, un solo método *in vitro* no es suficiente para describir el comportamiento de un extracto con relación a la posible actividad antioxidante, por lo tanto se realizaron otros experimentos que complementen la información y así llegar a una conclusión acertada.

El segundo ensayo realizado para la determinación de la capacidad antioxidante del extracto *H. acutifolia* fue llevado a cabo utilizando el catión radical ABTS<sup>·+</sup>. Primero se hizo la clasificación de las fracciones y extracto etanólico total según el porcentaje de actividad antioxidante de igual forma que en DPPH<sup>·</sup> (Tabla 11).

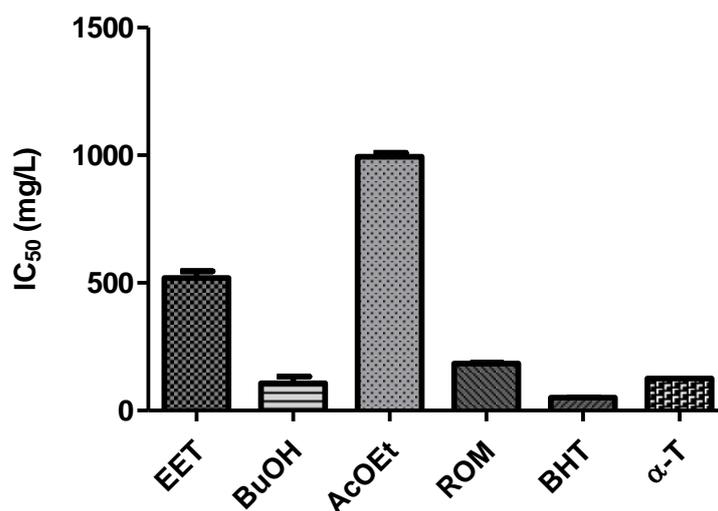
Las fracciones activas fueron BuOH, AcOEt junto con el EET, esto indica que el IC<sub>50</sub> correspondiente tiene un valor por debajo de 1000 ppm y probablemente la actividad antioxidante sea significativa. Las fracciones inactivas como la Ac y Hex se descartan porque la concentración necesaria para inhibir el 50% de las reacciones de oxidación, supera los 1000 ppm indicando que la actividad antioxidante es regular para este estudio.

Se realizó una curva de calibración para cuantificar la capacidad antioxidante en μmol Trolox/g extracto seco (gráfica 14, Anexo 2) al igual que para la determinación del IC<sub>50</sub> de fracciones activas. En el Anexo 3 se encuentra la tabla 16 de resumen de resultados y a continuación la gráfica 5 muestra los IC<sub>50</sub> de las fracciones activas, el extracto etanólico total de romero y los patrones puros BHT y α-Tocoferol.

**Tabla 11.** Porcentaje de actividad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia* por el método ABTS<sup>+</sup>.

Extracto / fracción	%A.A* ABTS <sup>+</sup>	± SD, n=3	
EET	67.760	0.980	<b>ACTIVA</b>
Ac	43.548	1.955	<b>INACTIVA</b>
BuOH	96.007	0.193	<b>ACTIVA</b>
AcOEt	50.736	1.313	<b>ACTIVA</b>
Hex	14.040	0.635	<b>INACTIVA</b>

\* %Actividad antioxidante



**Gráfica 5.** Valores de IC<sub>50</sub> (mg/L) para extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia*, extracto etanólico total de romero (*R. officinalis*), patrones BHT y α-Tocoferol por el método ABTS<sup>+</sup>.

En la gráfica se observa que la fracción acetato de etilo se destaca por tener el mayor IC<sub>50</sub> (994.673 ± 14.826 ppm), esto indica que la fracción tiene la menor capacidad antioxidante; seguido está el extracto etanólico total de *H. acutifolia* (IC<sub>50</sub> 519.446 ± 12.916 ppm) con aproximadamente la mitad del valor de AcOEt y la fracción butanol (IC<sub>50</sub>107.210 ± 5.197 ppm) presenta potencial antioxidante mayor al acetato de etilo y

EET. El análisis estadístico muestra diferencia significativa entre las dos anteriores fracciones y EET.

La actividad antioxidante relevante está dada por la fracción de butanol, debido a que el resultado obtenido de  $IC_{50}$  se encuentra en medio de los dos patrones puros ( $\alpha$ -Tocoferol  $125.164 \pm 0.154$  y BHT  $50.451 \pm 1.014$ ), donde la estadística demuestra que no hay diferencia significativa entre  $\alpha$ -Tocoferol y la fracción de butanol siendo la última una matriz compleja. Respecto al BHT si hay diferencia significativa pero las concentraciones inhibitorias no están tan alejadas. Esto demuestra la importancia del fraccionamiento, porque la separación de metabolitos según la polaridad ayuda a superar las barreras del antagonismo presentado en el EET.

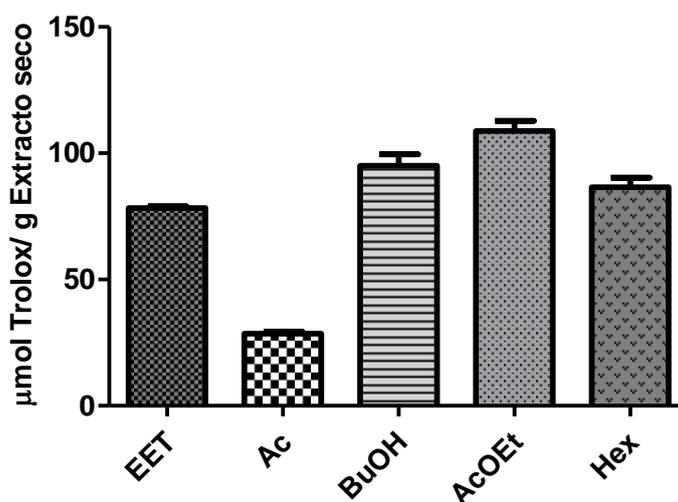
El extracto etanólico total de romero tiene un  $IC_{50}$  de  $184.273 \pm 2.597$  ppm, comparado con el  $IC_{50}$  del extracto etanólico total de *H. acutifolia* ( $519.446 \pm 12.916$  ppm) el romero es mayor en cuanto a la capacidad antioxidante. No obstante, al compararlo con la fracción butanol de *H. acutifolia* es inferior, reiterando el alto potencial antioxidante que la fracción presenta, donde el extracto de romero y la fracción butanol son estadísticamente diferentes.

El método de evaluación antioxidante ABTS<sup>+</sup> muestra resultados mucho más relevantes que los hallados con el radical DPPH<sup>·</sup>, lo cual se aprecia no solamente con los valores de  $IC_{50}$ , también los calculados para  $\mu$ mol trolox (Tabla 16, Anexo 3) son superiores a los reportados para DPPH<sup>·</sup>. Este comportamiento se debe a que el radical DPPH<sup>·</sup> al presentar impedimento estérico puede afectar las reacciones de transferencia de hidrógeno volviéndolas lentas. Como consecuencia algunas especies compiten por el sitio activo del DPPH<sup>·</sup>, mientras que con el catión radical ABTS<sup>+</sup> reaccionan inmediatamente dando como resultado para la misma muestra (en este caso el extracto de *H. acutifolia*) una actividad antioxidante baja con DPPH<sup>·</sup> y una alta con ABTS<sup>+</sup> (68).

#### **6.4.5 Determinación del Potencial Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP)**

Este método determina el potencial antioxidante de la muestra *H. acutifolia* según su capacidad para reducir el hierro ( $Fe^{+3}$ ) hasta la forma ferrosa ( $Fe^{+2}$ ) presente en el complejo tripiridiltriazina férrica. Tiene una característica especial y es que a diferencia de los dos ensayos anteriores (DPPH<sup>·</sup> y ABTS<sup>+</sup>), solo detecta radicales que proceden por medio de la transferencia de electrones, subestimando los compuestos fenólicos que transfieran hidrógeno como mecanismo de acción. Sin embargo, es un excelente complemento que permite obtener información acerca del comportamiento del extracto investigado (28).

La gráfica 6 muestra que la fracción con mayor actividad es acetato de etilo ( $108.754 \pm 4.071 \mu\text{mol Trolox/g extracto seco}$ ) y presenta diferencia significativa respecto al resto de fracciones. Seguidas en orden descendente están butanol ( $95.008 \pm 4.516 \mu\text{mol Trolox/g extracto seco}$ ), hexano ( $86.556 \pm 3.698 \mu\text{mol Trolox/g extracto seco}$ ) y el extracto etanólico total ( $78.317 \pm 0.603 \mu\text{mol Trolox/g extracto seco}$ ); analíticamente no hay diferencia entre butanol – hexano y hexano – EET, pero si hay diferencia entre butanol-EET. Por último la fracción acuosa con inferior actividad antioxidante ( $28.532 \pm 0.754 \mu\text{mol Trolox/g extracto seco}$ ) tiene diferencia significativa respecto a las anteriores fracciones. En general la serie es AcEOt>BuOH>Hex>EET>Ac, un resultado inesperado debido a los resultados de las anteriores pruebas que mostraron la fracción de butanol como la más activa y la de hexano inactiva, sin embargo en el actual ensayo no hay diferencia significativa entre ellas cambiando radicalmente el orden de la serie.



**Gráfica 6.** Actividad antioxidante de extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia* determinada por el método FRAP.

Este comportamiento pudo darse por varias razones: primero, teóricamente los tiempos de reacción son cortos para este ensayo (4 – 6 min), porque la transferencia de electrones es rápida debido a que la mayoría de extractos de plantas están altamente compuestos por flavonoides, estructuras de bajo peso molecular que reaccionan fácil si se compara con otros compuestos fenólicos voluminosos como los taninos que necesitarían más tiempo para lograr una reacción completa (30 min) (69); lo que

evidencia que es de suma importancia definir el tiempo, debido a que el impuesto en las metodologías no siempre es equivalente al punto final de la reacción.

En la cuantificación de flavonoides se estimó que estas estructuras no son las más abundantes del extracto de *H. acutifolia* y estos resultados lo corroboran, ya que al tener posiblemente compuestos como taninos u otros de mayor peso molecular se necesita tiempo más prolongado de reacción y la serie no tendría un cambio tan drástico; al mismo tiempo la fracción de hexano puede estar sobreestimada por diferentes interferencias como moléculas con un potencial redox menor a 0.77 V (potencial de FRAP) que reducen el Fe(III) y no son específicamente antioxidantes (70). En la fracción butanol y EET podría haber antioxidantes que no lleven a cabo la reacción, esto genera una subestimación que no permite observar el comportamiento sobresaliente de los resultados en pruebas anteriores (71).

Segundo, la reacción ocurre en condiciones ácidas poco favorables para la oxidación de compuestos fenólicos, provocando a menudo que los resultados de FRAP no sean fácilmente correlacionados con otras medidas de antioxidantes (28,72).

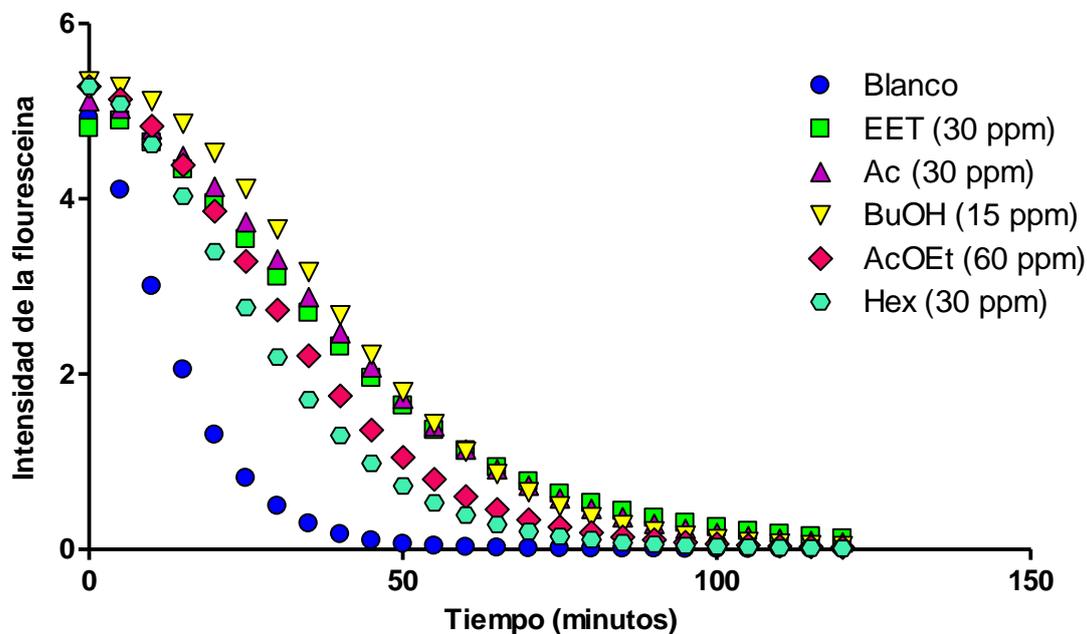
#### **6.4.6 Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)**

Uno de los ensayos con mayor relevancia biológica es ORAC. La capacidad antioxidante por este método *in vitro* puede reflejar más estrechamente la acción *in vivo* y una de las ventajas es que a diferencia de todas las pruebas anteriores, no hay que elegir un porcentaje de inhibición (DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup> 50% de inhibición) o tiempo (9 min FRAP) sin tener en cuenta el punto exacto de finalización de la reacción y cinética; debido a que ambos parámetros están contemplados porque la reacción es completa y se cuantifica la capacidad antioxidante mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC) (gráfica 7).

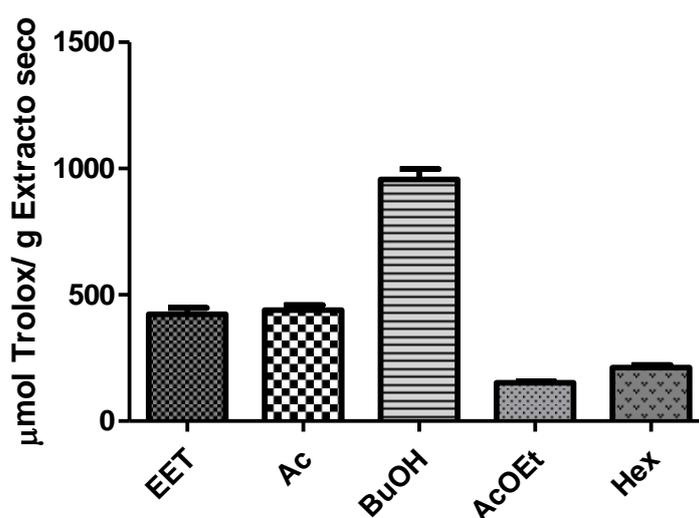
En este experimento se midió la protección a la fluoresceína por parte del extracto total de *H. acutifolia* y fracciones, frente a la oxidación del radical peroxilo. Ensayos previos son necesarios para determinar la concentración apropiada de fracción y extracto etanólico total que permita el cálculo de la AUC y  $\mu\text{mol trolox/ g}$  Extracto seco (gráfica 7).

Una vez el área bajo la curva ideal fue elegida para cada fracción, se calculó el valor de capacidad antioxidante expresado en  $\mu\text{mol Trolox/ g}$  extracto seco (Tabla 17, Anexo 3) y se hizo el análisis estadístico. Entre el EET y la fracción Ac no hay diferencia significativa al igual que AcOEt y Hexano (gráfica 8). Sin embargo la fracción BuOH tiene diferencia significativa respecto a todas las fracciones y es la más relevante por su alto valor  $\mu\text{mol Trolox/ g}$  Extracto seco tal y como lo muestra la gráfica 8. Este resultado

confirma la actividad antioxidante de la fracción butanol, debido a que es activa tanto en DPPH' como ABTS<sup>+</sup>, donde este último ensayo revela un IC<sub>50</sub> cercano a los patrones puros e indica que es efectiva no solo contra radicales sintéticos como los nombrados, sino también frente a radicales biológicos como el peroxilo.



**Gráfica 7.** Intensidad de fluorescencia para extracto etanólico total y fracciones de hojas de *H. acutifolia* a diferentes concentraciones.



**Gráfica 8.** Actividad antioxidante determinada por el método ORAC en extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

Los valores de actividad antioxidante ORAC hallados en fracciones y extracto total de *H. acutifolia* comparados con los de ABTS\* (clasificados como activos) son similares (Tabla 16 y 17, Anexo 3).

#### 6.4.7 Correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales

El método Folin-Ciocalteu contrastado con otros métodos para determinar el contenido de fenoles totales es el mejor, tiene un comportamiento apropiado para extractos vegetales y proporciona resultados directamente comparables con otros ensayos de actividad antioxidante en distintas muestras siempre y cuando estas no difieran entre sí, es claro que un extracto vegetal es una mezcla compleja de compuestos y este método es sensible a cualquier cambio (24).

Sin embargo considerando la heterogeneidad de los fenoles naturales en extractos vegetales y la posibilidad de interferencias de otras sustancias que son fácilmente oxidables, no es sorprendente que algunas metodologías empleadas para determinar la capacidad antioxidante se correlacionen muy poco con la cuantificación de fenoles y/o flavonoides.

Se calculó el coeficiente de correlación Pearson entre los ensayos de determinación de actividad antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP y ORAC) vs cuantificación de fenoles y flavonoides totales. Los valores  $R^2$  se presentan en la tabla 12.

**Tabla 12.** Correlación de Pearson entre los métodos de determinación de actividad antioxidante y la cuantificación de fenoles y flavonoides totales para el extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia*.

Métodos de evaluación capacidad antioxidante	Valores de $R^2$	
	Fenoles	Flavonoides
DPPH	0.925	0.597
ABTS	0.994	0.883
FRAP	0.241	0.421
ORAC	0.803	0.528

Respecto al contenido de fenoles totales vs. métodos de evaluación de capacidad antioxidante, la correlación lineal más alta es para el método ABTS, seguida por DPPH,

ORAC y por último FRAP; esto significa que la actividad antioxidante está directamente relacionada con compuestos fenólicos contenidos en el extracto *H. acutifolia*, a pesar del bajo coeficiente para FRAP debido a la metodología y la poca correlación de este ensayo con otros resultados ya mencionados.

En general las correlaciones entre flavonoides totales vs. métodos de evaluación antioxidante son bajos exceptuando ABTS, resultado esperado debido a que no son los componentes mayoritarios antes mencionados. Posiblemente sean los taninos quienes sean responsables puntalmente de la actividad antioxidante de este extracto.

## **6.5 ACTIVIDAD CITOTÓXICA**

La química de productos naturales no solo utiliza técnicas cromatográficas y espectrométricas para caracterizar, elucidar y adquirir conocimiento de estructuras en matriz compleja como extractos vegetales, también integra bioensayos fundamentales para la industria farmacéutica porque permiten de manera fácil y económica clasificar extractos como activos o inactivos y como futuras fuentes de compuestos con actividad biológica (73).

Los bioensayos *in vitro* específicos utilizan técnicas avanzadas de laboratorio que son costosas, sin embargo la realización de ensayos preliminares en los que se emplean técnicas básicas contribuye a definir qué tipo de experimentos son apropiados en una investigación. A continuación se muestran los resultados de dos bioensayos básicos utilizados en la industria farmacéutica: letalidad en *Artemia franciscana* y toxicidad en *Allium cepa*.

### **6.5.1 Ensayo de letalidad en *Artemia franciscana***

Los compuestos activos de una planta son tóxicos en dosis elevadas; un biomodelo animal general como la *Artemia franciscana* posibilita la evaluación de estas sustancias en investigación fitoquímica preliminar(74) para la detección de actividad antitumoral (75), anticancerígena (76) y antifúngica (77); posteriormente técnicas avanzadas y sofisticadas de análisis farmacológico y espectrofotométrico, permiten la confirmación y elucidación de las estructuras responsables de dicha actividad.

Los nauplios de *Artemia franciscana* fueron expuestos a extracto etanólico total y sus fracciones para determinar la concentración crítica a las 6 y 24 horas de exposición (toxicidad aguda y crónica respectivamente).

Los resultados obtenidos se clasificaron según la toxicidad (tabla 13), suministrada por el programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (78).

**Tabla 13.** Clasificación CYTED para toxicidad.

N°	Categoría	CL <sub>50</sub> (µg/mL)
I	Extremadamente tóxico	1-10
II	Altamente tóxico	10-100
III	Moderadamente tóxico	100-500
IV	Ligeramente tóxico	500-1000
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500
VI	Relativamente inocuo	1500

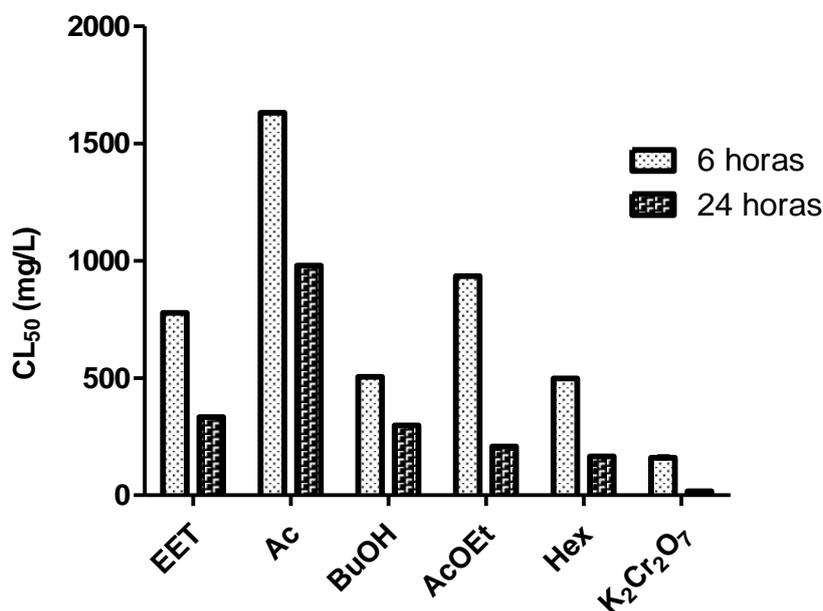
En la gráfica 9 se muestran los resultados del extracto etanólico total, fracciones y control positivo de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) expresados en concentración letal  $CL_{50}$  (µg/mL), el cual se define como la concentración necesaria para que el 50 % de la población muera a causa de la exposición tóxica a la muestra en estudio, de modo que a menor concentración necesaria mayor es la toxicidad.

De acuerdo con los valores de la tabla 13 el EET de hojas de *Hymenocallis acutifolia* tiene una toxicidad aguda ligera ( $CL_{50} 778.07 \pm 0.14$ ) y crónica moderada ( $CL_{50} 333.61 \pm 0.01$ ). En el caso del control positivo se obtuvo toxicidad aguda moderada ( $CL_{50} 160.86 \pm 0.14$ ) y toxicidad crónica clasificada como altamente tóxica ( $CL_{50} 16.92 \pm 0.20$ ).

Al comparar ambos resultados es evidente que el control positivo es más letal que el EET de las hojas de *H. acutifolia* tanto en toxicidad aguda como crónica (gráfica 9); sin embargo los valores encontrados de  $CL_{50}$  a las 6 y 24 horas para el EET son menores a 1000 µg/mL, lo cual se interpreta como actividad potencial citotóxica significativa (74), indica que los metabolitos secundarios poseen diferentes actividades biológicas.

Entre las fracciones, la más tóxica es Hexano catalogada como moderadamente tóxica ( $CL_{50} 498.53 \pm 0.16$ ,  $CL_{50} 165.40 \pm 0.15$ ), seguidas están butanol ( $CL_{50} 505.2 \pm 0.10$ ,  $CL_{50} 297.49 \pm 0.10$ ) y acetato de etilo ( $CL_{50} 934.81 \pm 0.12$ ,  $CL_{50} 207.63 \pm 0.16$ ) que tienen la misma clasificación que el EET (ligera y moderadamente tóxica), y por último la fracción acuosa ( $CL_{50} 1631.67 \pm 0.13$ ,  $CL_{50} 979.98 \pm 0.14$ ) que es inocua, se considera sin toxicidad. Estos resultados se relacionan con los ya obtenidos a lo largo de la experimentación, donde EET, BuOH y AcOEt, se destacan y muestran diferentes actividades antioxidantes con las distintas pruebas, sin embargo esta toxicidad indica

también posible actividad antifúngica o antibacteriana que ya ha sido reportada en plantas del mismo género (79), junto con actividad antiinflamatoria (21).



**Gráfica 9.** Toxicidad (aguda y crónica) para EET y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia* y patrón de dicromato de potasio.

### 6.5.2 Ensayo de toxicidad en *Allium cepa*

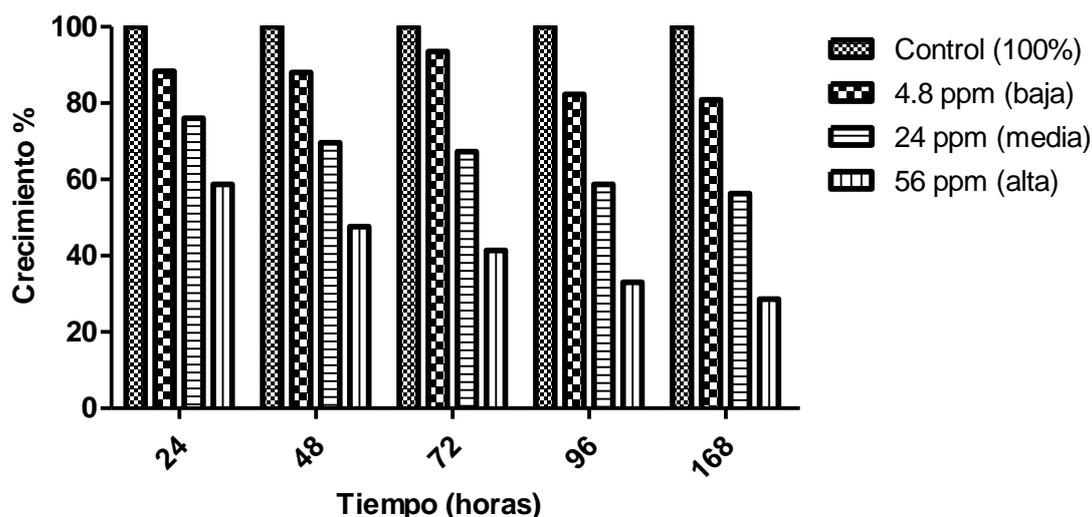
El bioensayo *Allium* test como biomodelo vegetal es utilizado por varios laboratorios para estudios, tanto macroscópicos como microscópicos de plantas que normalmente son usadas en la medicina tradicional, y pueden causar efectos adversos o interacciones con otros medicamentos. Las células del *Allium cepa* (cebolla), son adecuadas para la evaluación de daño cromosómico y alteraciones en el ciclo mitótico debido a la presencia de cromosomas largos y un número reducido manejable (80).

Las plantas medicinales no tienen indicaciones especiales para evaluar su toxicidad, por lo tanto deben ser sometidas a las regulaciones que rigen a los fármacos en general, y *Allium* test hace parte de ese grupo de pruebas. Se destaca por ser un método fácil, reproducible y barato, que permite evaluar no solamente la toxicidad, sino también la genotoxicidad y citotoxicidad en células vegetales, lo que ayuda a los investigadores a tomar mejores decisiones frente al destino de la muestra (81).

El objetivo fue evaluar los efectos fitotóxicos y citotóxicos del extracto etanólico total de *Hymenocallis acutifolia* en las células meristemáticas de raíz de la cebolla durante 7

días. Las mediciones fitotóxicas (longitud y número de raíces) y anotaciones sobre el aspecto de las raíces se tomaron a las 24, 48, 72, 96 y 168 horas desde el momento del montaje, mientras que el muestreo de ápice se realizó únicamente a las 72 y 96 horas, por medio de un corte de 2 a 4 cm de raíz posteriormente teñida con orceina para luego realizar un extendido o squach que fue observado a través de un microscopio. Se tuvo en cuenta para el daño fitotóxico no solamente la medición del crecimiento de raíces (Tabla 19, Anexo 4), también su aspecto, grosor y fortaleza; para el daño citotóxico se observaron las alteraciones en el ciclo celular. La gráfica 10 muestra los resultados para 3 concentraciones establecidas (baja, media y alta) durante los 7 días, expresados en porcentaje de crecimiento.

En la gráfica 10 se observa que para todas las concentraciones a medida que van pasando las horas el porcentaje de crecimiento va disminuyendo, de una forma más drástica para la concentración media y alta. Probablemente los meristemas apicales muestren reducción de células en mitosis lo que indica inhibición en el crecimiento de la raíz por daños en células. Este efecto se ve más acentuado en la concentración alta porque a las 24 horas tiene un porcentaje de crecimiento de 58.678% y a las 168 horas solo alcanza el 28.639%, se reduce casi a la mitad mientras la concentración media se reduce tan solo una cuarta parte del porcentaje inicial a las 24 horas (76.058% a 56.303%). Es un resultado esperado debido a que mayor concentración, mayor toxicidad se presenta en las células.



**Gráfica 10.** Efecto fitotóxico en raíces de bulbos de *Allium cepa* causado por el extracto etanólico total de hojas de *Hymenocallis acutifolia* disuelto en agua.

Esto lo comprueba Akinboro y Barake (2007), quienes al evaluar 5 plantas medicinales (*Azadirachta indica* (A. Juss), *Morinda lucida* (Benth.), *Cymbopogon citratus* (DC Stapf.), *Mangifera indica* (Linn.) y *Carica papaya* (Linn.)) obtuvieron resultados parecidos a los del presente trabajo, ya que observaron una reducción en el porcentaje de crecimiento a medida que aumentaba la concentración. La exposición de las cebollas a los extractos de cada planta fue de 72 horas, catalogando tóxico cualquier tipo de restricción en el crecimiento (82).

Las raíces expuestas a la concentración media eran algunas blancas, otras traslucidas muy débiles y quebradizas, con raíces nacientes abundantes mientras las de concentración alta eran de color café o traslucido, débiles y quebradizas, con reducido número de raíces nacientes y abultadas en la parte del ápice (figura 15). Anotaciones similares hicieron Freyre *et al.* (83), donde las cebollas expuestas por 48 horas mostraron cambios en la forma y estructura comparadas con el control.

La concentración baja por el contrario comparada con las otras (media y alta), aumenta el porcentaje de crecimiento al tercer día, y mantiene un promedio de 81% de crecimiento, lo que indica que los bulbos pudieron crear un mecanismo de adaptación al medio y las raíces no se vieron tan afectadas. Estas raíces siempre tuvieron un aspecto fuerte, color blanco y similar a las raíces del control muy abundantes. Este efecto positivo también lo obtienen Eren y Özata (2014), al evaluar extractos acuosos de hojas, tallo y raíz de *Limonium globuliferum*, donde las bajas concentraciones de los 3 extractos, tienen efectos positivos en el crecimiento de las raíces de las cebollas expuestas.

La figura 15 muestra las cebollas a las 168 horas de exposición a concentración baja, media, alta y control.

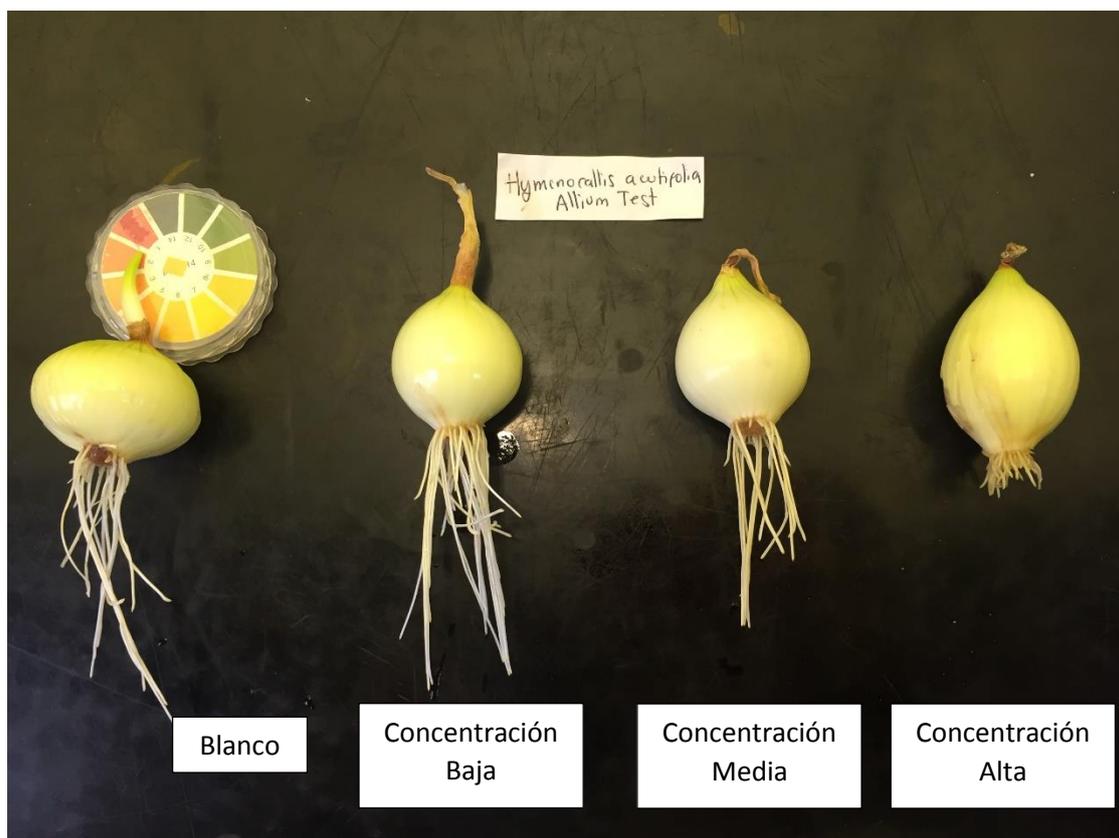
Estos resultados son favorables, debido a que la toxicidad del extracto *H. acutifolia* puede ser aprovechada contra patógenos utilizando bajas cantidades del mismo.

En la tabla 14 se exponen los índices mitóticos y de fase de las células evaluadas, el primero indica el porcentaje de células que en general están en mitosis dependiendo la concentración mientras el segundo indica el porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular.

En general hay un descenso en el índice mitótico a media que aumenta la concentración (tabla 14), esto indica que a mayor concentración mayor número de células se encuentran en interfase y no continúan el ciclo celular normal, señal de inhibición causada por el extracto de *H. acutifolia* aunque cabe resaltar que no es un cambio

drástico. Este fenómeno es común, Adegbite y Sanyaolu (2009) investigaron el extracto acuoso de hojas de *Vernonia amigdalina* Del., el cual provoca toxicidad mayor a medida que aumenta la concentración y se ve reflejado en la disminución de los índices mitóticos (84), al igual que otros extractos vegetales investigados por Chukwujekwu y Van Staden (2014) (85), Prajitha y Thoppil (2016) (86) y Renjana y Thoppil (2013) (87).

A medida que aumenta la concentración los índices de fase van disminuyendo su porcentaje, debido a que: a mayor concentración mayor es el número de células que no continúan el ciclo celular normal por envenenamiento, causado por exposición al extracto de *H. acutifolia*. La concentración alta tiene índice de profase significativo, mientras metafase, anafase y telofase tienen los índices más bajos comparados con los porcentajes de las concentraciones media y baja, indicando que el extracto no permite que las células pasen de la profase (tabla 14).

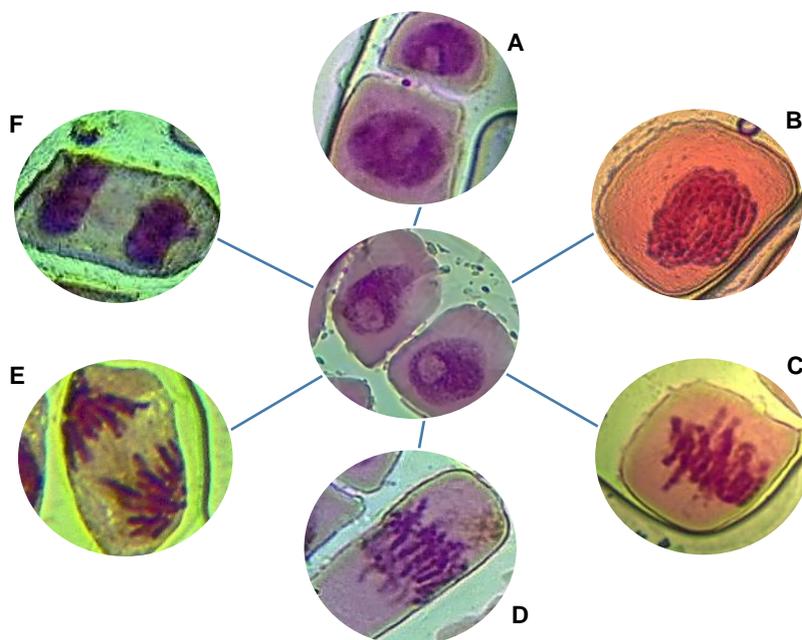


**Figura 15.** Raíces de *Allium cepa* (cebolla) expuestas 168 horas a concentración baja, media y alta de EET de hojas de *H. acutifolia* disuelto en agua y control de agua.

**Tabla 14.** Índices mitóticos y de fase de células meristemáticas apicales de raíces de bulbos de *Allium cepa* expuestos a concentraciones baja, media y alta de EET de hojas de *H.acutifolia* disuelto en agua y control de agua.

(mg/L)	Índice mitótico % ( $\pm$ SD, n=3)	Índice de fase % ( $\pm$ SD, n=3)			
		Profase	Metafase	Anafase	Telofase
<b>Control</b>	50.614 $\pm$ 2.73	90.256 $\pm$ 1.15	6.909 $\pm$ 0.30	1.032 $\pm$ 0.06	0.989 $\pm$ 0.05
<b>4.8</b>	47.667 $\pm$ 1.65	83.808 $\pm$ 0.46	9.583 $\pm$ 0.57	4.735 $\pm$ 0.28	1.874 $\pm$ 0.10
<b>24</b>	45.105 $\pm$ 2.61	83.306 $\pm$ 0.17	8.839 $\pm$ 0.33	5.050 $\pm$ 0.28	2.806 $\pm$ 0.13
<b>56</b>	45.940 $\pm$ 2.52	90.414 $\pm$ 1.78	4.592 $\pm$ 0.22	2.645 $\pm$ 0.12	1.241 $\pm$ 0.06

La figura 16 muestra las fotografías tomadas a las células meristemáticas apicales de raíces de bulbos de *Allium cepa* expuestos a concentraciones baja, media y alta de EET de hojas de *H.acutifolia* disuelto en agua y control de agua en placas, vista en microscopio Leyca DM con objetivo 40x.



**Figura 16.** Fotografía de células meristemáticas apicales de raíces de bulbos de *Allium cepa* utilizadas en la evaluación citotóxica del EET de hojas de *H.acutifolia* por medio de la técnica squash con tinción de orceina acética. (centro interfase). **A.** Interfase **B.** Profase **C.** Metafase **D.** Metafase **E.** Anafase **F.** Telofase.

## 7. CONCLUSIONES

El tamizaje fitoquímico reveló que en el extracto de *Hymenocallis acutifolia* están presentes los metabolitos secundarios tipo alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos y esteroides que le confieren actividad biológica y confirman el alto grado de toxicidad, debido principalmente a los alcaloides.

La identificación de compuestos de hojas de *H. acutifolia* en extracto crudo de alcaloides y derivatizado por cromatografía de gases, confirmó la presencia del alcaloide licorina y derivados, responsables de la alta toxicidad y un contenido alto en azúcares.

La determinación del contenido total de fenoles en el extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia* empleando el método de Folin-Ciocalteu, confirma la presencia de estas estructuras responsables de la actividad antioxidante.

La cuantificación de flavonoides presentes en el extracto etanólico total y fracciones de hojas de *H. acutifolia* por medio del método de tricloruro de aluminio, permitió revelar que a pesar de generalmente ser un grupo de estructuras abundantes en un extracto vegetal, en este caso no serían los compuestos directos responsables de la actividad antioxidante ni los más abundantes, por lo tanto el grupo de fenoles como taninos podrían ser los responsables de proporcionar la actividad biológica.

La evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones y el extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia* mediante las técnicas colorimétricas DPPH y ABTS demuestran que las fracciones hexano y acuosa son inactivas, lo que quiere decir que los compuestos activos son más de carácter polar, destacándose la fracción de butanol con valor de IC<sub>50</sub> comparable con valores de patrones puros conocidos antioxidantes.

Evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones y el extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia* mediante los métodos de FRAP y ORAC confirman que el butanol es la fracción con mejor actividad antioxidante, por lo tanto el extracto es rico en moléculas polares activas.

La evaluación de la actividad citotóxica del extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia* y fracciones mediante el bioensayo de letalidad en *Artemia franciscana* destaca EET, BuOH y AcOEt, como las fracciones con potenciales CL<sub>50</sub>, indicando que en las tres están la mayoría de compuestos activos responsables de diferentes actividades biológicas.

La evaluación de la actividad fitotóxica y citotóxica mediante *Allium test* del extracto etanólico total de hojas de *H. acutifolia* reitera la alta toxicidad que tiene posibles actividades antifúngicas, antibacteriales o antivirales.

No siempre los tiempos estipulados en las metodologías de actividad antioxidante se acomodan a las necesidades de las muestra en particular, el comportamiento no siempre es el mismo y puede llevar a un error ya sea de sobrestimación o subestimación, por lo tanto hacer pruebas preliminares que evalúen el comportamiento del extracto.

## 8. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de la actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral y antitumoral como complemento a las actividades realizadas en este trabajo.
- Complementar el *Allium test* con la evaluación de la genotoxicidad del extracto de *H. acutifolia* y otras especies de *Amaryllidaceae*.
- Incentivar la propagación de la especie *Hymenocallis acutifolia* porque es una planta con alto valor fitoquímico que cuenta con pocos individuos en la población vegetal y aún tiene mucho más por investigar.
- Evaluar las diferentes actividades biológicas en bulbos.
- Continuar con el romero (*Rosmarinus officinalis* L) como referente en los trabajos futuros donde se evalúe la actividad antioxidante en el grupo de investigación QCB (Química de Compuestos Bioactivos).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. WHO-Geneva [Internet]. 2000;1:1–74. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66783/1/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2000.1.pdf%0Ahttp://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jwhozip42e/](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66783/1/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf%0Ahttp://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jwhozip42e/)
2. Santé O. WHO global atlas of traditional, complementary and alternative medicine: World Health Organization. 2005. p. 60.
3. Rawat P, Singh PK, Kumar V. Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. J Herb Med [Internet]. 2016;6(3):107–18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2016.06.001>
4. Organización Mundial de la salud (OMS). Medicina tradicional Informe de la Secretaría. 56ª Asam Mund La Salud [Internet]. 2003;A/56(18):1–5. Disponible en: [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
5. Rafael Ocampo, Michael J. Balick PHR. Plants of Semillas Sagradas : Garden. 2009. 64-66 p.
6. Blair S, Madrigal B. Plantas antimaláricas de Tumaco: costa pacífica colombiana [Internet]. Editorial Universidad de Antioquia; 2005. 23-25 p. (Ciencia y Tecnología). Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=8a7CKa3yXr0C>
7. Pomilio BA. Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. Acta bioquímica clínica Latinoam. 2012;46(1):73–82.
8. Bankova V. Commentary: Natural products chemistry in the third millennium. Chem Cent J. 2007;1(1):1–2.
9. Zhong JJ. Plant Secondary Metabolites [Internet]. Second Edi. Vol. 3, Comprehensive Biotechnology. Elsevier B.V.; 2011. 299-308 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00190-2>
10. Sepúlveda Jiménez G, Porta Ducoing H, Rocha Sosa M. La participación de los Metabolitos Secundarios en la defensa de las Plantas. Rev Mex Fitopatol [Internet]. 2003;21(3):355–63. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx>
11. Paul M D. Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach. Segunda Ed.

- Sons JW&, editor. *Pharmaceutical Sciences*. Nottingham, UK; 2002. 486 p.
12. Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Med Food*. 2000;3(2):121–5.
  13. Azcón-Bieto J, Talón M. *Fisiología y bioquímica vegetal*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.; 1993. 255-265 p.
  14. Brown K, Trigo JR. The ecological activity of alkaloids. Academic Press Inc, editor. Vol. 47, *The Alkaloids*. Departamento de Ecología Química, Departamento de Zoología. Instituto de Biología, UNICAMP; 1995. 227-354 p.
  15. Jin Z. Review Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Reports*. 2013;28:1126–42.
  16. Hoshino O. THE AMARYLLIDACEAE ALKALOIDS. Vol. 51, *The Alkaloids*. 1998. 323-424 p.
  17. Liu J, Li Y, Tang L, Zhang G, Hu W. Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells. *Biomed Pharmacother*. 2007;61(4):229–34.
  18. Yui S, Mikami M, Mikami Y, Sashida Y, Yamazaki M. Inhibition effect of Amaryllidaceae alkaloids, lycorine and lycoricidinol on macrophage TNF-alfa production (Japans). *Yakugaku Zasshi*. 2001;121(2):167–71.
  19. Nair JJ, Bastida J, Codina C, Viladomat F, van Staden J. Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: a review. *Nat Prod Commun*. 2013;8(January):1335–50.
  20. Cabezas F, Ramirez A, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subdentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. *Sci Tech*. 2002;51:3.
  21. Karthikeyan R, Sai K, Srinivasa B, Chunduru J. Anti-Inflammatory Activity of Ethanolic Extract of Flowers *Hymenocallis littoralis* ( Jacq .) Salisb . By HRBC Membrane Stabilization Method. *iMedPub [Internet]*. 2016;7(2:60):1–5. Disponible en: <http://www.transbiomedicine.com/>
  22. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;105–25.
  23. 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):148–73.
  24. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventós R. Analysis of total phenols and other

- oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1998;299(1974):152–78.
25. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods.* 2014;7(9):1776–82.
  26. Nijveldt RJ, Nood E van, Horn D, Boelens P, Norren K, Leeuwen P. Review Article Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and. *Am J Clin Nutr.* 2001;418–25.
  27. Schaich KM, Tian X, Xie J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays.” *J Funct Foods* [Internet]. 2015;18:782–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.024>
  28. L.Ronald P, Xianli W, Karen S. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem.* 2005;53(10):4290–302.
  29. Bohlin L, Bruhn JG. *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development.* Springer Netherlands; 2012. (Proceedings of the Phytochemical Society of Europe).
  30. Domínguez S. XA. *Métodos de investigación en fitoquímica.* México: Limusa; 1973.
  31. Li A-N, Li S, Li H-B, Xu D-P, Xu X-R, Chen F. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *J Funct Foods* [Internet]. 2014;6:319–30. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464613002508>
  32. Kim D-O, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem* [Internet]. 2003;81(3):321–6. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814602004235>
  33. Trujillo L. Evaluación de la actividad antioxidante y cototóxica del extracto etanólico de las hojas y bulbos de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae), colectada en el departamento del Cauca. 2015;
  34. 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* [Internet]. 1999;26(9):1231–7. Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998003153>

35. Benzie IFF, Strain JJ. [2] 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* [Internet]. 1999;299:15–27. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999990055>
36. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2001;49(10):4619–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jf010586o>
37. Sanabria-Galindo A, López SI, Gualdrón R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Syst Naturae* 2000 [Internet]. 1997;26:15–9. Disponible en: <http://taxonomicon.taxonomy.nl/ProjectDescription.aspx>
38. Syahmi ARM, Vijayarathna S, Sasidharan S, Latha YL, Kwan YP, Lau YL, et al. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *elaeis guineensis* jacq., (oil palm leaf) methanol extract. *Molecules*. 2010;15(11):8111–21.
39. Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985;102(1):99–112.
40. Berdahl DR, McKeague J. Rosemary and sage extracts as antioxidants for food preservation [Internet]. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Kalsec Inc, Kalamazoo, MI, USA: Elsevier Ltd; 2015. 177-217 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00008-7>
41. Els DE. Spider Lilies: Plant Care and Collection of Varieties [Internet]. National Gardening Association. 2012. Disponible en: [www.garden.org](http://www.garden.org)
42. Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. *J Pharm Sci*. 1966;55(3):225–76.
43. Levin DA, York Jr. BM. The toxicity of plant alkaloids: anecogeographic perspective. *Biochem Syst Ecol*. 1978;6(January 1977):1–76.
44. Osorio EJ. *Farmacognosia*. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.: Facultad de Química Farmacéutica; 2014. 177 p.
45. Osorio EJ, Robledo SM, Bastida J. Chapter 2 Alkaloids with Antiprotozoal Activity

- [Internet]. Vol. 66, Alkaloids: Chemistry and Biology. Elsevier; 2008. 113-190 p. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1099-4831\(08\)00202-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1099-4831(08)00202-2)
46. Rivero N, Gómez M, Medina JD. Search for Bioactive Alkaloids in *Hymenocallis* Species. *Pharm Biol.* 2004;42:280–5.
  47. Gorter K. Über die verteilung des lycorins in der familie der Amaryllidaceen. *Chem Zentr III.* 1920;846–857.
  48. Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC. A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves. *Science (80- )*. 2004;303(5654):87–9.
  49. Ainsworth EA, Bush DR. Carbohydrate Export from the Leaf: A Highly Regulated Process and Target to Enhance Photosynthesis and Productivity. *Plant Physiol* [Internet]. 2011;155(1):64–9. Disponible en: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.167684>
  50. Halford NG, Curtis TY, Muttucumaru N, Postles J, Mottram DS. Sugars in crop plants. *Ann Appl Biol.* 2011;158(1):1–25.
  51. Wink M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor Appl Genet.* 1988;75(2):225–33.
  52. Murphy DJ. Alkaloids. *Encycl Appl Plant Sci.* 2017;2:118–24.
  53. Fuchs B, Krischke M, Mueller MJ, Krauss J. Plant age and seasonal timing determine endophyte growth and alkaloid biosynthesis. *Fungal Ecol.* 2017;29:52–8.
  54. Bhuiyan MNI, Begum J, Sardar PK, Rahman MS. Constituents of Peel and Leaf Essential Oils of *Citrus Medica* L. *J Sci Res.* 2009;1(2):6–11.
  55. Essien EP, Essien JP, Ita BN, Ebong GA. Physicochemical properties and fungitoxicity of the essential oil of *Citrus medica* L. against groundnut storage fungi. *Turk J Botany.* 2008;32(2):161–4.
  56. Sen M, Dash B. A review on phytochemical and pharmacological aspects of *Cissus quadrangularis* L. *Int J Green Pharm* [Internet]. 2012;6(3):169. Disponible en: <http://www.greenpharmacy.info/text.asp?2012/6/3/169/104924>
  57. Chu H, Tso TC. Fatty Acid composition in tobacco I. Green tobacco plants. *Plant Physiol* [Internet]. 1968;43(3):428–33. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1086856&tool=pmc>

trez&rendertype=abstract

58. Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš A, Simonič M, Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* 2005;89(2):191–8.
59. Cicco N, Lanorte M, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J* [Internet]. 2009;91(1):107–10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.011>
60. Yesil-Celiktas O, Girgin G, Orhan H, Wichers HJ, Bedir E, Vardar-Sukan F. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *Eur Food Res Technol.* 2007;224(4):443–51.
61. Hendel N, Larous L, Belbey L. Antioxidant activity of rosemary ( *Rosmarinus officinalis* L .) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. *Int Food Res.* 2016;23(4):1725–32.
62. Sundarasekar J, Sahgal G, Mubbarakh SA, Subramaniam S. Potential antioxidant activities of methanolic extracts of spider lily (*Hymenocallis littoralis*). *Aust J Crop Sci.* 2013;7(5):625–31.
63. Cartaya O, Reynaldo I. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultiv Trop.* 2001;22(2):5–14.
64. Marcano D, Hasegawa M. *Fitoquímica Orgánica*. Segunda ed. Torino, editor. Caracas, Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico Universidad Central de Venezuela; 2002. 138-140 p.
65. Tovar del Rio J. Determinación De La Actividad Antioxidante Por DPPH Y ABTS De 30 Plantas Recolectadas En La Ecoregion Cafetera. Vol. 53, Escuela de Tecnología Química. Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.
66. Sökmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B, 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):3309–12.
67. El-Naggar SA, Abdel-Farid IB, Germoush MO, Elgebaly HA, Alm-Eldeen AA. Efficacy of *Rosmarinus officinalis* leaves extract against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity. *Pharm Biol* [Internet]. 2016;54(10):2007–16. Disponible

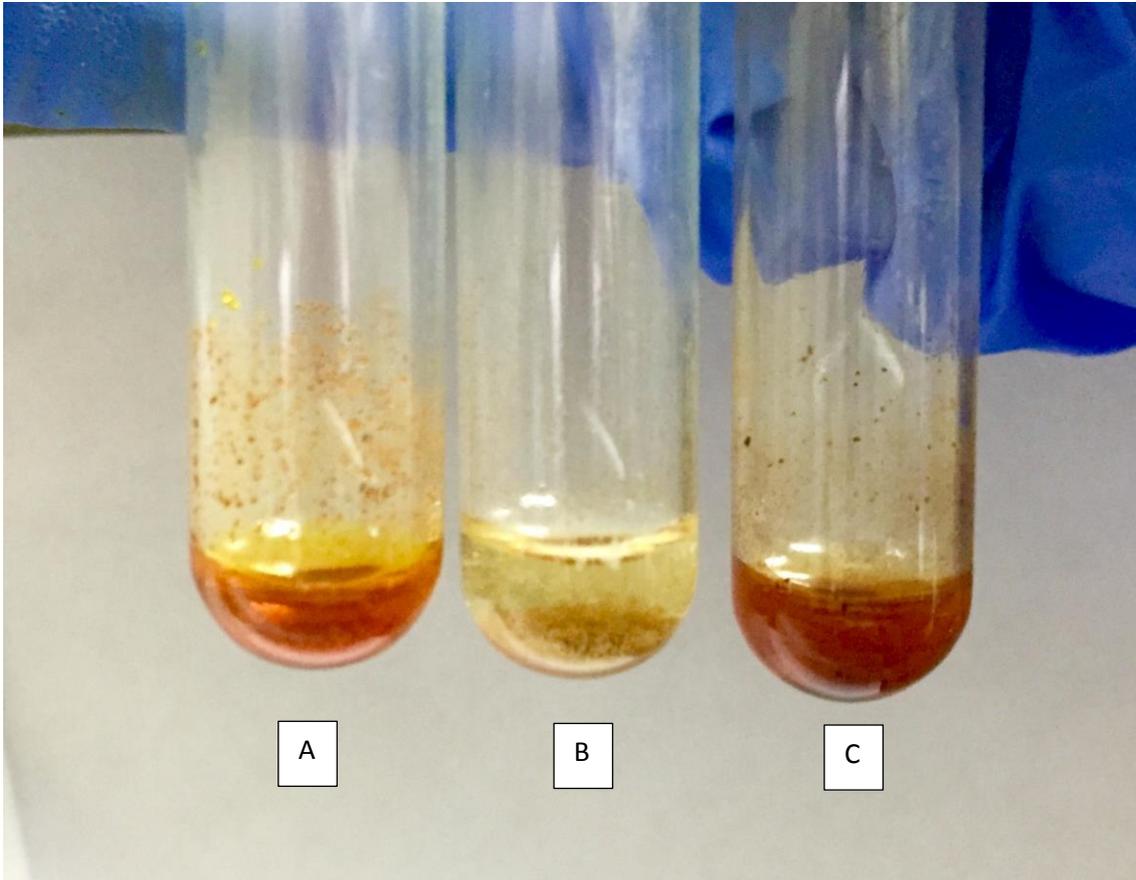
en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2015.1137954>

68. Schaich KM, Tian X, Xie J. Reprint of "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays." *J Funct Foods* [Internet]. 2015;18:782–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.024>
69. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem*. 2000;48(8):3396–402.
70. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J Agric Food Chem*. 2002;50(11):3122–8.
71. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 1999;27(11–12):1173–81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10641708>
72. Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, et al. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1998;46(5):1887–92. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970975b>
73. Ogers LILR. The Use Of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Inf J*. 1998;32:513–24.
74. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, Mclaughlin J. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *J Med Plant Res*. 1982;45:31–4.
75. Mclaughlin J, Chang C, Smith D. Simple Bench-Top Bioassays ( Brine Shrimp and Potato Discs ) for the Discovery of Plant Antitumor Compounds. *Discovery of Plant Antitumor Compounds*. 1993. 112-137 p.
76. Muthukrishnan S, Kumar TS, Rao M V. Anticancer activity of biogenic nanosilver and its toxicity assessment on *Artemia salina*- evaluation of mortality, accumulation and elimination: An experimental report. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2017; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.03.004>
77. González A, Presa M, Latorre M. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Rev Iberoam Micol* [Internet].

- 2007;24(1):59–61. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70015-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70015-3)
78. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. 1995. 61-2, 214-25 p.
79. Sundarasekar J, Sahgal G, Subramaniam S. Anti-candida activity by *Hymenocallis littoralis* extracts for opportunistic oral and genital infection *Candida albicans*. *Bangladesh J Pharmacol*. 2012;7(3):211–6.
80. Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2009;682(1):71–81.
81. Sánchez A, Fonseca G, Trujillo N, Fernandez D. Plantas Medicinales. *Rev Cuba Farm*. 2000;34(1):34–43.
82. Akinboro A, Bakare AA. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *J Ethnopharmacol*. 2007;112(3):470–5.
83. Freyre S, Estrada M, Bolaños H. Preliminary study of the cytotoxicity and genotoxicity of a vegetable extract known as pink palm meristematic cells of *Allium cepa*. *Rev Nac Investig*. 2010;5:12–7.
84. Adegbite a E, Sanyaolu EB. Cytotoxicity testing of aqueous extract of bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del .) using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Young*. 2009;4(11):1311–4.
85. Chukwujekwu JC, Van Staden J. Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn. *South African J Bot* [Internet]. 2014;92(1):147–50. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025462991400043X>
86. Prajitha V, Thoppil JE. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. *South African J Bot* [Internet]. 2016;102:18–25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2015.06.018>
87. Renjana PK, Thoppil JE. Toxicological Evaluation of Root Methanolic Extract of *Strobilanthes heyneanus* Nees Using *Allium* Test. 2013;5(3):125–8.

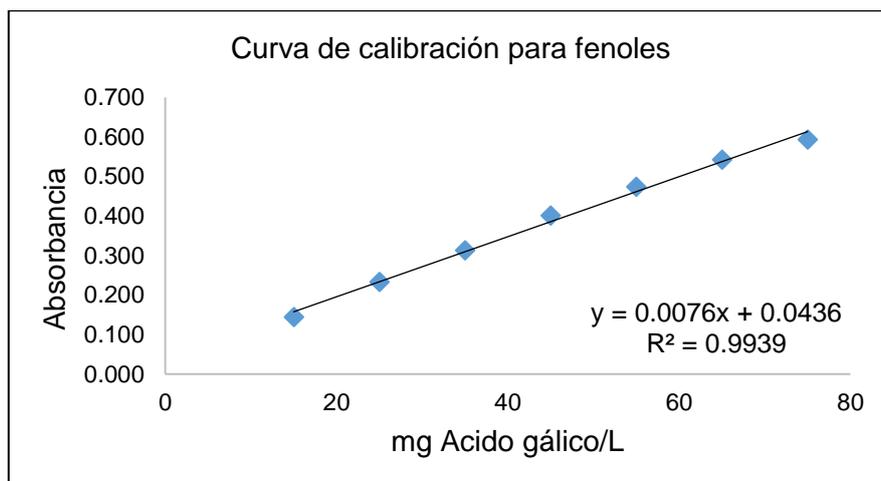
## 10. ANEXOS

**Anexo 1:** Fotografía tamizaje fitoquímico, pruebas para alcaloides en extracto etanólico total de *Hymenocallis acutifolia*.

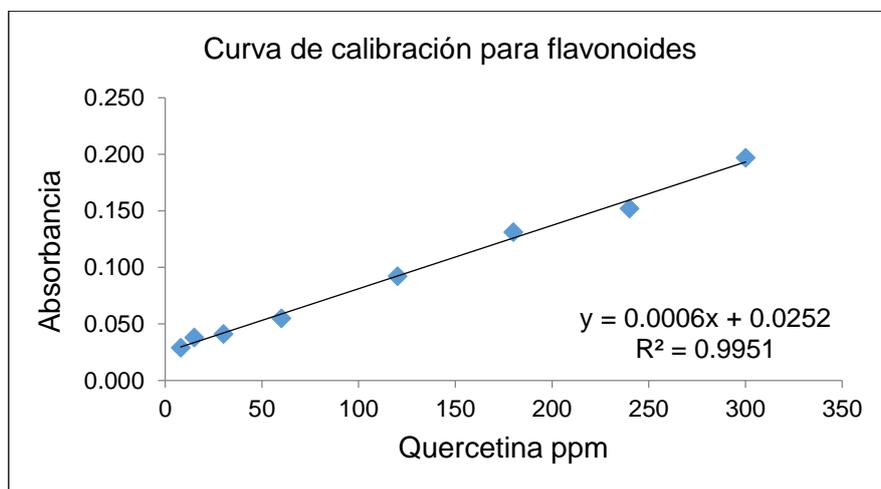


**Figura 17.** A. Reactivo Dragendorff B. Reactivo Mayer C. Reactivo Wagner.

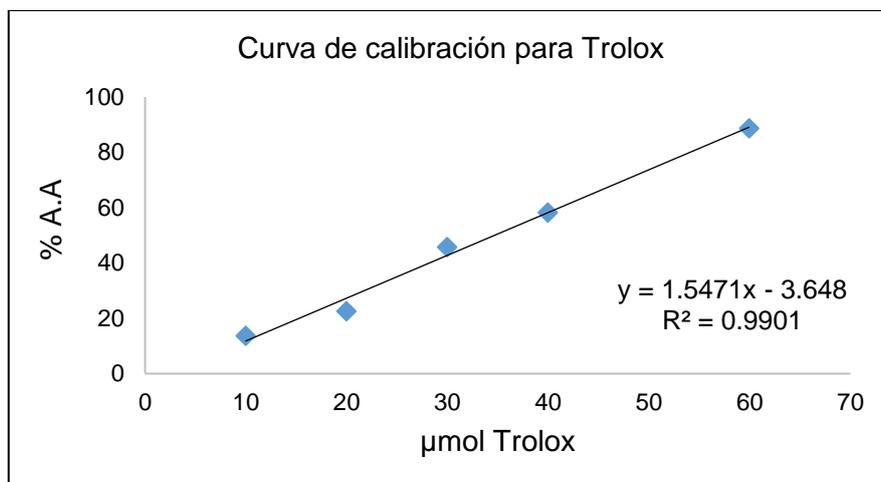
**Anexo 2:** Curvas de calibración Actividad Antioxidante.



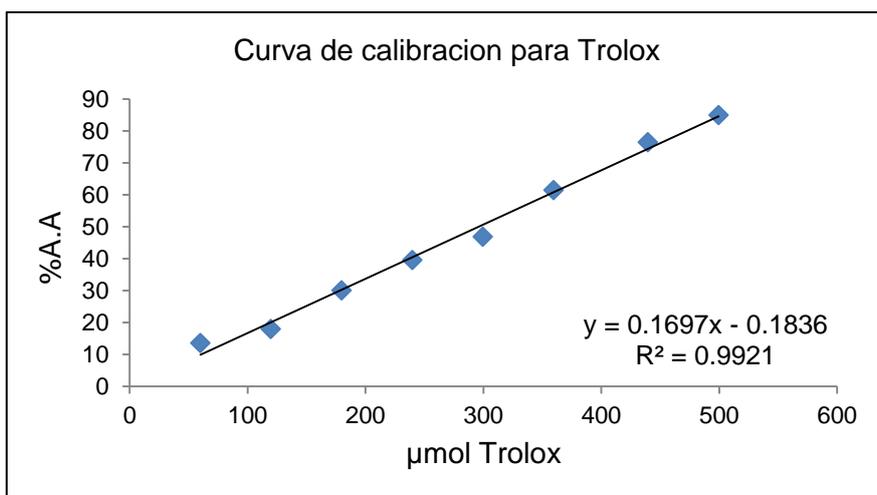
**Gráfica 11.** Curva de calibración de ácido gálico por el método Folin-Ciocalteu.



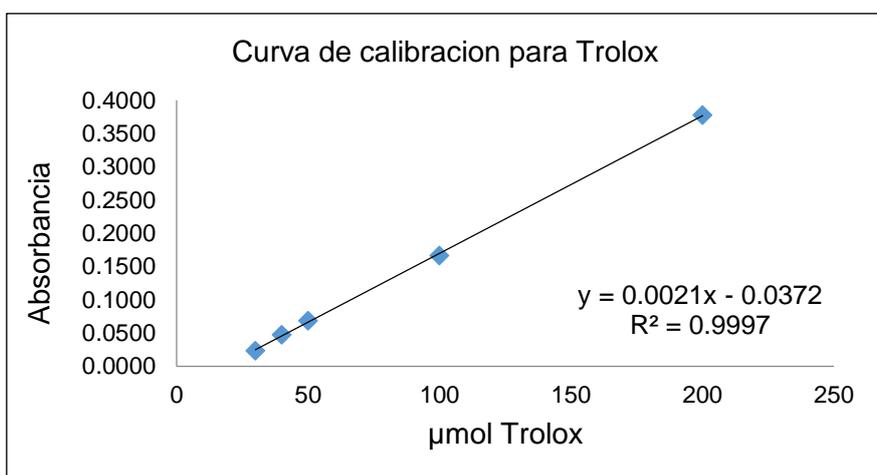
**Gráfica 12.** Curva de calibración de quercetina para cuantificación de flavonoides.



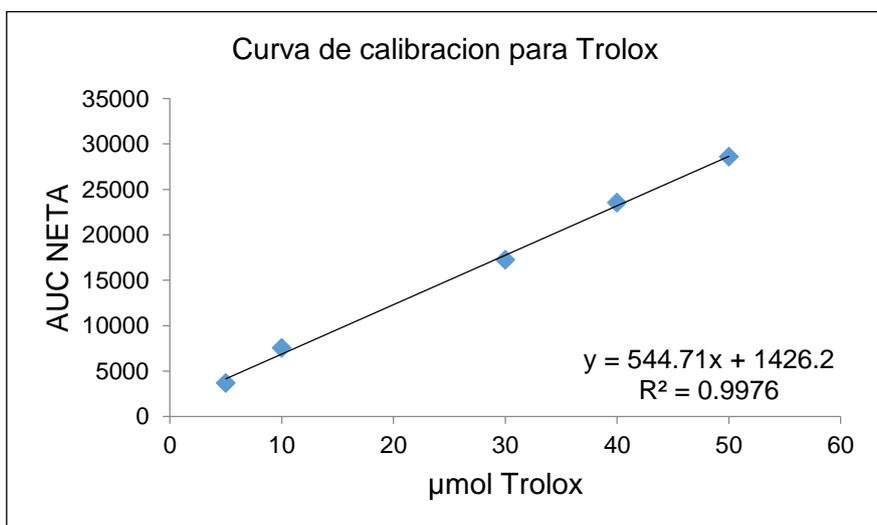
**Gráfica 13.** Curva de calibración Trolox por el ensayo de DPPH'.



**Gráfica 14.** Curva de calibración Trolox por el ensayo de ABTS<sup>+</sup>.



**Gráfica 15.** Curva de calibración Trolox por el ensayo de FRAP.



**Gráfica 16.** Curva de calibración Trolox por el ensayo de ORAC.

### Anexo 3: Actividad antioxidante

**Tabla 15.** Contenido de fenoles y flavonoides del extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia*, del extracto etanólico total de hojas de *Rosmarinus officianlis* (Romero) y patrones BHT y  $\alpha$ -Tocoferol.

Extracto/ fracción	TPC		Flavonoides	
	mg GAE/g Extracto seco	$\pm$ SD (n=3)	mg Quercetina/g Extracto seco	$\pm$ SD (n=3)
ETT	40.457	2.00	16.847	0.71
Ac	26.246	1.75	9.173	0.61
BuOH	62.297	1.25	18.840	0.97
AcOEt	33.526	0.26	15.907	0.69
Hex	5.632	0.70	4.553	0.37
ROM	44.596	1.99	7.536	0.38

**Tabla 16.** Actividad antioxidante del extracto etanólico total y fracciones (activas) de hojas de *Hymenocallis acutifolia*, del extracto etanólico total de hojas de *Rosmarinus officianlis* (Romero) y patrones BHT y  $\alpha$ -Tocoferol, por los método DPPH $\cdot$  y ABTS $^{+}$ .

Extracto/ fracción	DPPH $\cdot$		ABTS $^{+}$	
	$\mu$ mol Trolox/ g Extracto seco*	IC <sub>50</sub> (mg/L)	$\mu$ mol Trolox/ g Extracto seco*	IC <sub>50</sub> (mg/L)
ETT	38.273 $\pm$ 0.80	939.062 $\pm$ 4.52	515.820 $\pm$ 7.07	519.446 12.92
Ac	ND	ND	ND	ND
BuOH	34.336 $\pm$ 1.25	994.177 $\pm$ 25.54	963.083 $\pm$ 13.52	107.210 5.120
AcOEt	ND	ND	315.469 $\pm$ 10.76	994.673 14.83
Hex	ND	ND	ND	ND
ROM	560.310 $\pm$ 20.11	54.641 $\pm$ 1.13	1671.038 $\pm$ 10.46	184.273 $\pm$ 2.60
BHT	1948.249 $\pm$ 67.83	19.460 $\pm$ 0.046	8299.945 $\pm$ 702.7	50.451 $\pm$ 1.014
$\alpha$ -T	2041.17 $\pm$ 70.48	17.115 $\pm$ 0.18	2568.216 $\pm$ 92.49	125.164 $\pm$ 0.154

\* $\pm$  SD, n=3

ND = No Determinado, fracción inactiva.

**Tabla 17.** Actividad antioxidante del extracto etanólico total y fracciones de hojas de *Hymenocallis acutifolia* por los métodos FRAP y ORAC.

Extracto/ fracción	FRAP	ORAC
	$\mu\text{mol Trolox/ g Extracto seco}^*$	$\mu\text{mol Trolox/ g Extracto seco}^*$
<b>ETT</b>	78.317 $\pm$ 0.603	423.383 $\pm$ 24.732
<b>Ac</b>	28.532 $\pm$ 0.754	439.702 $\pm$ 19.806
<b>BuOH</b>	95.008 $\pm$ 4.516	956.917 $\pm$ 40.767
<b>AcOEt</b>	108.754 $\pm$ 4.071	152.180 $\pm$ 5.477
<b>Hex</b>	86.556 $\pm$ 3.698	211.874 $\pm$ 10.359

\*  $\pm$  SD, n=3

#### Anexo 4: Actividad biológica

##### *Artemia franciscana*

**Tabla 18.** Toxicidad aguda y crónica evaluada por el ensayo de *Artemia franciscana* de EET y fracciones de hojas *Hymenocallis acutifolia* y control positivo dicromato de potasio.

Extracto/fracciones de hojas <i>H. acutifolia</i> y patrón	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	
	6 horas * (Aguda)	24 horas* (Crónica)
EET	778.071 ± 0.140	333.606 ± 0.010
Acuosa	1631.667 ± 0.131	979.976 ± 0.139
Butanol	505.198 ± 0.095	297.487 ± 0.098
Acetato de etilo	934.811 ± 0.123	207.631 ± 0.159
Hexano	498.525 ± 0.157	165.397 ± 0.154
Dicromato de potasio (control)	160.862 ± 0.142	16.917 ± 0.196

\*=Resultados CL<sub>50</sub> ± desviación estándar

*Allium cepa*

Tabla 19. Fitotoxicidad del extracto etanólico total de *Hymenocallis acutifolia*.

Concentración (mg/L)	Longitud raíces (cm)	± SD, n=3	Crecimiento raíz (% de control)
<b>24 h</b>			
control	3.206	0.134	100.000
4.8	2.833	0.032	88.388
24	2.438	0.141	76.058
56	1.881	0.071	58.678
<b>48 h</b>			
control	3.856	0.213	100.000
4.8	3.396	0.211	88.083
24	2.686	0.068	69.658
56	1.836	0.076	47.606
<b>72 h</b>			
control	4.072	0.228	100.000
4.8	3.808	0.182	93.515
24	2.739	0.121	67.258
56	1.686	0.094	41.402
<b>96 h</b>			
control	4.756	0.246	100.000
4.8	3.916	0.196	82.333
24	2.793	0.060	58.724
56	1.573	0.057	33.071
<b>168 h</b>			
control	5.150	0.250	100.000
4.8	4.166	0.189	80.899
24	2.900	0.109	56.303
56	1.475	0.068	28.639