

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO
TOTAL (EET) DE FLORES Y HOJAS DE *Calea sessiliflora* Less



JORGE LUIS PARRA MUÑOZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2019

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO
TOTAL (EET) DE FLORES Y HOJAS DE *Calea sessiliflora* Less

JORGE LUIS PARRA MUÑOZ

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

Director

JUAN CARLOS ARGOTI BURBANO, Ph.D.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS
(QCB)

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2019

Nota de aceptación

Director

Juan Carlos Argoti Burbano, Ph.D.

Jurado

Danny Alejandro Arteaga Fuertes, Ph.D.

Jurado

Luis Alberto Lenis Velásquez, Ph.D.

Fecha de sustentación: Popayán, 16 de Diciembre de 2019

Dedicatoria

Dedico este trabajo de tesis A. Dios y a la Virgen de Milagros de Almaguer, quienes inspiraron mi espíritu para la conclusión de esta investigación en actividad biológica. A mi madre Lucina Parra Muñoz quien me dio la vida, educación, apoyo económico y emocional, consejos y sobre todo mucho amor y comprensión. A mi abuelita Hortensia Muñoz en su memoria, la vida nos separó, pero sé que desde el cielo está mirando como escribo estas palabras, a ella muchas gracias por enseñarme tanto de la vida, sus consejos y amor incondicional. A mis tías Derly, Adiela, Aleja, Delfa, Sandra, Celina y tío Edier gracias por su apoyo. A mis hermanas Daniela, Luisa María, mi hermano Andres que de una u otra forma estuvieron ahí para apoyarme, A mi ahijado Santiago Cerón quien fue una de las personas que recargaba y renovaba mi energía. A mi novia Yesicamila por acompañarme y comprenderme en todo este proceso. A mis Prim@s y demás familiares. A mis compañeros de estudio, a mis maestros y amigos, quienes sin su ayuda no hubiera podido culminar esta tesis. A todos ellos se los agradezco desde lo más profundo de mi corazón por enseñarme y ayudarme a ser mejor cada día y por creer y apoyarme siempre en todos mis proyectos. Para todos y cada uno de ellos hago esta dedicatoria.

“No hay necesidad de apresurarse. No
hay necesidad de brillar. No es necesario
ser nadie más que uno mismo”

Virginia Woolf

Agradecimientos

Al profesor Juan Carlos Argoti Ph.D., por la dirección en el trabajo de grado, por la enseñanza y motivación para concluir con éxito la investigación. Agradezco su confianza, apoyo y su dedicación en el aporte de mi formación como investigador.

Al profesor Fabio Antonio Cabezas Ph.D., por ser el director del grupo de investigación y darme la oportunidad de aprender hacer investigación dentro del grupo, quien se ha convertido en un amigo que enseña y me ha motivado para culminar mi carrera con éxito.

Al profesor Fernando Hernández Ph.D., por las propuestas e ideas para llevar a cabo el trabajo de tesis, por su tiempo dedicado en la asesoría en el análisis estadístico y sobre todo por su buena energía para realizar las cosas con un rigor científico.

A los profesores del grupo de investigación Andrea Cabazo, Emerson Rengifo por todos sus aportes en el trabajo.

A los profesores German Cuervo, Tania Gutiérrez, Fernando Hernandez por facilitarnos y colaborarnos en el uso de equipos de la Unidad de Análisis de Aguas.

A la Profesora Diana María Chito por el préstamo de material, equipos e instalaciones de los laboratorios de Química, como también por sus ideas y aportes que conllevaron al cumplimiento de la investigación.

Al profesor Luis A. Vargas por su apoyo y motivación para concluir con el trabajo de grado.

A la Universidad del Cauca. Al Departamento de Química y profesores por contribuir en mi formación como profesional y como persona.

A mis compañeros de grupo de investigación Arley Jimenes, Yesica Zuñiga, Edith Muñoz, Juan Carlos Ortiz, Sebastián López, Gabriel Ramírez, Patricia Ramírez por tantas tardes de café, cumpleaños, almuerzos, despedidas, música y alegría compartidas.

A mis compañeros de carrera Santiago Pabón, Andrés Parra, Wilson Viveros, Javier Fuli, Andrés Delgado, Lina Idrobo, Lina Ortiz, Alejandra Sarasty, Santiago Salamanca, Sebastián López, Luis Campo, Luis Enríquez y demás compañeros que se me salen del listado, pero sé que en algún momento de mi estadía en la universidad compartí con ustedes, gracias por tantas risas, recochas, lágrimas y trasnochadas.

A la familia Pabón Guerrero por brindarme su apoyo y ayuda incondicional.

Finalmente, a mi familia quienes han sido mi motor, mi apoyo incondicional y mi ayuda en todo momento.

En fin, GRACIAS a todos los que contribuyeron en mi formación y a que este trabajo de investigación se haya podido concluir.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 FAMILIA <i>Asteraceae</i>	2
2.2 GÉNERO <i>Calea</i>	2
2.2.1 <i>Calea sessiliflora</i> Less.....	2
2.2.2 Clasificación Taxonómica.....	3
2.3 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	4
2.4 ESTRÉS OXIDATIVO	4
2.5 ANTIOXIDANTES	5
2.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	6
2.6.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH	6
2.6.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS	7
2.6.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método RANCIMAT	8
2.6.4 Determinación del contenido total de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu.....	9
2.6.5 Determinación del contenido total de flavonoides por el método de tricloruro de aluminio.....	10
2.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA	10
2.7.1 Actividad citotóxica frente <i>Artemia franciscana</i>	10
2.7.2 Actividad Fitotóxica en <i>Allium cepa</i>	11
2.7.3 Actividad Fitotóxica en microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	11
2.7.4.1 Determinación de la actividad anticoagulante de los extractos de <i>C. sessiliflora</i> Less sobre el veneno de serpiente de <i>Bothrops asper</i>	12
2.8 ESTADO DEL ARTE	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. OBJETIVOS	17
4.1 OBJETIVO GENERAL	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1 Recolección del material vegetal de <i>Calea sessiliflora</i> Less.....	18
5.2 Obtención de los extractos etanólicos totales de hojas, flores y raíz de <i>C. sessiliflora</i> Less.....	18

5.3 Tamizaje Fitoquímico.....	19
5.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	19
5.4.1 Determinación de la actividad antioxidante del EET <i>Calea sessiliflora</i> Less por el método DPPH	20
5.4.2 Determinación de la actividad antioxidante del EET de <i>Calea sessiliflora</i> Less por el método ABTS**	20
5.4.3 Determinación de la actividad antioxidante del EET de <i>Calea sessiliflora</i> Less por el método de Rancimat.	21
5.4.4 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	22
5.4.5 Determinación del contenido de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio.....	22
5.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA	23
5.5.1 Determinación de la actividad citotóxica frente <i>Artemia franciscana</i>	23
5.5.2 Determinación de la fitotoxicidad mediante el Ensayo en <i>Allium cepa</i>	24
5.5.3 Determinación de la fitotoxicidad en microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	24
5.5.4 Determinación de la actividad anticoagulante de los extractos de <i>C. sessiliflora</i> Less sobre el veneno de serpiente de <i>Bothrops asper</i>	25
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	27
6.1 Porcentajes de rendimiento.....	27
6.2 Tamizaje Fitoquímico.	27
6.2.1 Alcaloides.....	28
6.2.2 Cardiotonicos.....	29
6.2.3 Cumarinas Volátiles.....	30
6.2.4 Taninos.	30
6.2.5 Saponinas.....	30
6.2.6 Triterpenos y/o Esteroides.	30
6.2.7 Flavonoides.	30
6.2.8 Derivados antracenicos libres.....	31
6.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES, FLAVONOIDEOS TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	31
6.3.1 Determinación del contenido de Fenoles Totales por el ensayo Folin-Ciocalteu.....	33
6.3.2 Determinación de flavonoides totales por el método de tricloruro de Aluminio.....	36

6.3.3 Determinación de la actividad antioxidante de <i>Calea sessiliflora</i> Less por el método DPPH.....	38
6.3.4 Determinación de la actividad antioxidante de <i>Calea sessiliflora</i> Less por el método ABTS**	41
6.3.5 Determinación de la actividad antioxidante de por el ensayo de RANCIMAT de <i>Calea sessiliflora</i> Less.....	44
6.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVAD CITOTÓXICA	45
6.4.1 Ensayo de toxicidad sobre <i>Artemia franciscana</i>	46
6.4.2 Ensayo de Fitotoxicidad sobre <i>Allium cepa</i>	49
6.4.3 Determinación de la fitotoxicidad en microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	52
6.4.4 Determinación de la actividad anticoagulante de los extractos de <i>C. sessiliflora</i> Less sobre el veneno de serpiente de <i>Bothrops asper</i>	53
7. CONCLUSIONES	56
8. BIBLIOGRAFÍA	58
9. ANEXOS	65

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA: Ácido ascórbico
ABTS: Ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)
Ac: Acuosa
BHT: Butilhidroxitolueno
CL₅₀: Concentración letal media
CUPRAC: Potencia reductora de cobre (II)
CYTED: Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo
DMSO: Dimetilsulfoxido
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EC₅₀: Concentración efectiva media
ECAT: Equivalente de catequina
EET: Extracto etanólico total
ERN: Especies reactivas de nitrógeno
ERO: Especies reactivas de oxígeno
ET: Transferencia de electrones
FP: Factor de protección
FRAP: parámetro antioxidante reductor de iones férricos
GAE: Equivalente de ácido gálico
HAT: Reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno
mL: mililitro
mg: miligramo
ms: Muestra seca
m.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar
nm: Nanómetros
ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
ppm: Partes por millón
QCB: Química de Compuestos Bioactivos
TRAP: Parámetro antioxidante de captura radical total
UV-Vis: Ultravioleta-Visible
μL: microlitro
μg: microgramo
λ: Longitud de onda
α-T: Alfa-tocoferol

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Calea sessiliflora* Less.

Tabla 2. Reactivos y materiales de laboratorio utilizados.

Tabla 3. Equipos utilizados en la investigación.

Tabla 4. Pruebas realizadas para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios en *C. sessiliflora* Less.

Tabla 5. Porcentajes de humedad y rendimiento de la extracción etanólica de las partes de la planta de *Calea sessiliflora* Less.

Tabla 6. Resumen de los resultados en la determinación cualitativa de metabolitos secundarios.

Tabla 7. Resultados obtenidos para los extractos etanólicos totales de *C. sessiliflora* Less en el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y Actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS y Rancimat, como también la actividad citotóxica, fitotóxica y actividad anticoagulante.

Tabla 8. Análisis de varianza para fenoles totales.

Tabla 9. Prueba del rango estudentizado de Tukey para GAE en partes de la planta.

Tabla 10. Prueba del rango estudentizado de Tukey para GAE en concentraciones de extracto.

Tabla 11. Prueba del rango estudentizado de Tukey para GAE en los diferentes tratamientos.

Tabla 12. Análisis de varianza para medias de ECAT.

Tabla 13. Prueba del rango estudentizado de Tukey para las concentraciones de ECAT.

Tabla 14. Prueba del rango estudentizado de Tukey para las concentraciones de los tratamientos evaluados para inhibir el 50 % del radical DPPH.

Tabla 15. Análisis de varianza para el radical ABTS**.

Tabla 16. Prueba del rango estudentizado de Tukey para las concentraciones de los tratamientos evaluados para inhibir el 50 % del radical ABTS**.

Tabla 17. Coeficiente de correlación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Tabla 18. Resultados de la prueba T de student.

Tabla 19. Análisis de varianza para mortalidad de *Artemia franciscana*.

Tabla 20. Análisis de las comparaciones para la mortalidad de *Artemia franciscana*.

Tabla 21. Prueba del rango estudentizado de Tukey para la mortalidad de *Artemia franciscana*.

Tabla 22. Análisis de varianza para *Allium cepa* en la inhibición de crecimiento de raíz.

Tabla 23. Análisis de las comparaciones en el crecimiento de la raíz en *Allium cepa*.

Tabla 24. Prueba del rango estudentizado de Tukey para *Allium cepa* en la inhibición del crecimiento de raíz.

Tabla 25. Análisis de varianza para el % de crecimiento *S. capricornianum*.

Tabla 26. Prueba del rango estudentizado de Tukey para el porcentaje del crecimiento de la población en *S. capricornianum*.

Tabla 27. Análisis de varianza para actividad anticoagulante sobre veneno de *Bothrops asper*.

Tabla 28. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Inhibición de la actividad del veneno de *B. asper*.

Tabla 29. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para los tratamientos respecto a la Inhibición de la actividad del veneno de *B. asper*.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Nauplio del crustáceo de *A. franciscana* (Fernandez, M. 2017).

Figura 2. Microfotografía de *Selenastrum capricornutum*.

Figura 3. Fotografía de *B. asper*.

Figura 4. Material vegetal de *C. sessiliflora* Less. **A)** Hojas, **B)** Flores, **C)** Raíz.

Figura 5. Diagrama de extracción para las partes de la planta *C. sessiliflora* Less.

Figura 6. Curva de calibración con ácido gálico.

Figura 7. Curva de calibración con Catequina.

Figura 8. Distribución de la concentración ECAT en las muestras evaluadas.

Figura 9. Distribución de la concentración en las muestras evaluadas para inhibir el 50 % del radical DPPH.

Figura 10. Concentración letal (LC₅₀) para *Artemia francisaca* a las 24 h.

Figura 11. Distribución de mortalidad de *Artemia franciscana* frente a las muestras evaluadas.

Figura 12. Concentración inhibitoria del crecimiento (IC₅₀) de las raíces de *Allium cepa* a 72 h.

Figura 13. Distribución del crecimiento de la raíz en *Allium cepa* frente a las muestras evaluadas.

Figura 14. Distribución de la concentración en las muestras evaluadas para inhibir la actividad del veneno de serpiente de *B. asper*.

LISTADO DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción del radical DPPH^{*} con, **A)** Antioxidante; **B)** Estándar Trolox (Nur, A. Nusrat, J. Rafiquzzaman M. 2013).

Esquema 2. **A)** Formación del radical ABTS^{**} **B)** Reacción del estándar Trolox con del radical ABTS^{**} (Erel, O. 2004).

Esquema 3. Reacción patrón de ácido gálico con reactivo Folin-Ciocalteu (Vernon, S. *et al.* 1999).

Esquema 4. Reacción de AlCl₃ para la cuantificación espectrofotométrica de flavonoides. (Zhishen J, *et al.* 1999).

RESUMEN

Los compuestos presentes en una planta pueden ser muy variados debido a que producen metabolitos secundarios que le confieren propiedades biológicas únicas, las cuales en algunos casos son usadas para su defensa, estos metabolitos que se encuentran en especies vegetales son estudiados por la fitoquímica la cual los clasifica según sus grupos funcionales, algunos de estos metabolitos tienen una gran importancia comercial y son usados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y también son usadas como fuentes de interés agroquímico.

En el presente trabajo se realizó la identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos totales de *C. sessiliflora* Less (hojas y flores), utilizando el tamizaje fitoquímico, con lo que se determinó la presencia de grupos funcionales c aracterísticos de compuestos como fenoles, flavonoides, saponinas, alcaloides, lactonas, entre otros.

Se determinó el contenido de fenoles totales y flavonoides totales en los extractos etanólicos de *C. sessiliflora* Less, el extracto de hojas tiene la mayor cantidad de estos metabolitos con $1952,857 \pm 14,286$ mg de ácido gálico/ g de muestra seca y $1646,773 \pm 17,108$ mg de catequina/ g de muestra seca, el extracto de flores presentó un contenido de fenoles totales con media de $1429,048 \pm 26,513$ mg de ácido gálico/ g de muestra seca y flavonoides totales de $1404,107 \pm 17,108$. mg de catequina/ g de muestra seca. También se evaluó la actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS y Rancimat. El extracto de hojas fue el que presentó mayor respuesta frente al método DPPH encontrando un porcentaje de inhibición al 50 % a una concentración de $23,594 \pm 0,345$ mg/mL de extracto, mientras que en el ensayo de ABTS el extracto de flores fue el presente mayor actividad con una concentración de $1060,952 \pm 5,697$ mg/mL de extracto para alcanzar el porcentaje de inhibición al 50 %. Para el ensayo de Rancimat el extracto de flores fue el que presentó un factor de protección mayor para el aceite de coco, con media de $2,000 \pm 0,020$ y para los extractos etanólicos de hojas y romero alcanzaron factores de protección valores de $1,500 \pm 0,020$ y $1,000 \pm 0,020$ respectivamente.

Por otro lado, se determinó la actividad toxicológica de los extractos de hojas y flores de *C. sessiliflora* Less, mediante el ensayo de *Artemia franciscana*, encontrando que los extractos son catalogados según el CYTED como altamente tóxicos debido a que sus concentraciones letales a las 24 horas son de $15,760 \pm 0,949$ y $15,950 \pm 0,831$ mg/mL de extracto respectivamente, no se encontró diferencias significativas entre la variable de respuesta para estos extractos. Se realizó un estudio de fitotóxicidad de los extractos etanólicos totales frente al ensayo de *Allium cepa* y se logró observar que la adición de los extractos influye directamente en el crecimiento de las raíces de las cebollas encontrando un porcentaje de Inhibición de $22,740 \pm 3,110$ y $47,940 \pm 7,550$ en mg/mL de extracto a 72 h para hojas y flores respectivamente.

Como complemento de la investigación se realizó las pruebas anteriormente mencionadas para el extracto de raíz, con el ánimo de realizar una comparación de la actividad en cada una de las partes de la planta de *C. sessiliflora* Less.

También se evaluó la fitotóxicidad de los extractos etanólicos totales utilizando las microalgas *Selenastrum capricornutum*, encontrando que el extracto de raíz es el que tiene una mayor influencia sobre la población de la microalga con respecto a su propagación, debido a que se encontró una media de $27,534 \pm 1,594$ % y los extractos de hojas y flores no presentan ninguna alteración en la población significativa con respecto al control con medias $4,150 \pm 0,366$ Y $0,559 \pm 0,603$ % respectivamente.

Por último se evaluó el poder anti-coagulante de los extractos sobre el veneno de serpiente *Bothrops asper* observando que el extracto que presentó un mayor porcentaje de inhibición a una concentración de 500 mg/mL es el extracto de hojas seguido de los extractos de flores y raíz con medias de $22,872 \pm 0,286$; $22,015 \pm 0,274$ y $21,381 \pm 0,441$ respectivamente, pero estos porcentajes no son lo suficientemente eficaces para establecer que los extractos tengan actividad anti-coagulante, ya que según lo reportado en la literatura un antídoto de veneno debe establecer una dosis efectiva media a una concentración a la cual sea 3 veces el tiempo de coagulación del plasma más el veneno.

Los resultados obtenidos por los extractos de *C. sessiliflora* Less, para cada una de las actividades biológicas realizadas en la investigación, han despertado un gran interés para seguir estudiando esta planta y continuar con el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios que se encuentran presentes en la planta, para así poder darles un aprovechamiento en la industria farmacéutica, alimenticia y agronómica.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con una gran biodiversidad de especies vegetales, ya que en promedio una de cada diez especies existentes en el mundo se encuentra en el hábitat colombiano (Prada, J. 2015). La familia Asteraceae es una de las familias más numerosas en especies a nivel mundial y se encuentran en el territorio colombiano, incluye aproximadamente 1,600 géneros y 23,000 especies. Debido a esta variedad de plantas se ha tratado de buscar, conocer y experimentar distintas formas de utilizar los recursos naturales disponibles del entorno y es así como la medicina tradicional colombiana ha implementado estrategias para la búsqueda de plantas con valores medicinales, permitiendo así ampliar el conocimiento sobre la utilización de plantas para el tratamiento de enfermedades, llevando al reconocimiento de las propiedades terapéuticas de especies vegetales, lo cual se considera como un recurso primordial para la conservación de la salud.

Calea es uno de los géneros pertenecientes a esta familia (Asteraceae), existen aproximadamente 125 especies y están distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de América (Amaral. P, *et al.* 2017). Dentro de este grupo se encuentra *Calea sessiliflora* Less, es una planta herbácea, de flor amarilla. Es conocida comúnmente como Chicharrón o Carrasposa por comunidades campesinas e indígenas residentes de la región cercana al municipio de Almaguer (Departamento del Cauca), sus hojas son usadas tradicionalmente para la preparación de una infusión como tratamiento alternativo para el dolor de cabeza, de estómago, muscular, de articulaciones, entre otras enfermedades. Su lugar de origen es el sur de Colombia y su distribución altitudinal en Colombia se encuentra por debajo de los 2300 msnm (Ramírez, B. Macías, D. Varona, G. 2012).

Con el ánimo de validar científicamente el conocimiento ancestral de especies vegetales de este género, se han realizado estudios fitoquímicos y farmacológicos en aproximadamente 37 especies de *Calea*; muchos de estos trabajos han evaluado las partes aéreas de estas plantas enfocándolos en las actividades citotóxicas, vasodilatadoras y antimicrobianas (Amaral. P, *et al.* 2017). Debido a la poca información existente sobre *C. sessiliflora* Less y al interesante potencial que la planta ha adquirido tradicionalmente como tratamiento alternativo para dolores, surge este trabajo de investigación en el que se va a llevar a cabo la evaluación cualitativa de los grupos funcionales presentes en los extractos etanólicos totales de flores y hojas a través del tamizaje fitoquímico, la evaluación de la actividad antioxidante mediante los ensayos DPPH, ABTS⁺, Fenoles y Flavonoides totales, la actividad citotóxica (*Artemia franciscana*) y la actividad fitotóxica mediante el ensayo de *Allium cepa*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 FAMILIA *Asteraceae*

La familia *Asteraceae* o *Compositae* incluye aproximadamente 1,600 géneros y 23,000 especies, agrupadas en 43 tribus distribuidas alrededor del mundo, (Beretta *et al*, 2008), dentro de estas tribus, *Neurolaeneae* se caracteriza por presentar plantas con flores y cuenta con 154 especies, también agrupa a 6 géneros entre los que se encuentran (*Calea*, *Enydra*, *Greenmaniella*, *Heptanthus*, *Neurolaena* e *Staurochlamys*) (Lima, G. 2016). Es una familia distribuida en todas las latitudes y en altitudes que van desde el nivel del mar hasta zonas alpinas, por lo que es posible encontrar ejemplares en todos los tipos de vegetación, desde plantas herbáceas, arbustos, trepadoras, epífitas y hasta árboles, pero se hallan mejor representada en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales (Fernandes, A. Ritter, M. 2009).

La familia *Asteraceae* se caracteriza por su gran importancia económica, además de que algunas especies son utilizadas en la medicina tradicional (*Achyrocline satureioides*, *Pluchea sagittalis*, *Matricaria recutita* L), como plantas ornamentales, como plantas oleaginosas (*Helianthus annuus* L) y en la industria para perfumes, como insecticidas (*Tanacetum cinerariifolium*), y alimentos (*Lactuca sativa* L, *Taraxacum officinale* Weber). Por otro lado, algunos ejemplares son especies invasoras en la agricultura y tóxicos para los animales y el hombre (Beretta *et al*, 2008). Es la familia evolutivamente más exitosa dentro de las plantas con flores, debido a su continua adaptación a diferentes hábitats, esto ha venido acompañada por diversos cambios fitoquímicos que le han permitido a la familia desarrollar y explorar nuevos mecanismos defensivos contra la depredación por microorganismos, insectos, herbívoros y estrés físico causado por la radiación UV (Shilpa, K. *et al*, 2010).

2.2 GÉNERO *Calea*

Calea es uno de los géneros pertenecientes a la familia *Asteraceae*, existen aproximadamente 125 especies y están distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de América, (Amaral. P, *et al*. 2017). Se han realizado estudios fitoquímicos y farmacológicos en 37 especies del género *Calea* hasta la fecha, en donde las partes aéreas de estas plantas han sido probadas para varios estudios biológicos que incluyen actividades vasodilatadoras, citotóxicas y antimicrobianas (Amaral. P, *et al*. 2017).

2.2.1 *Calea sessiliflora* Less.

Calea glomerata Klatt y *Calea sessiliflora* Less sistemáticamente presentan sinonimia, la clasificación taxonómica se encuentra en la tabla 1. Esta planta pertenece a la familia *Asteraceae* del género *Calea*, es herbácea con aproximadamente 50 cm de altura, de flor amarilla, presenta filotaxia decusada y hojas enteras con ápice agudo (Herbario), es conocida comúnmente como Chicharrón o Carrasposa. Se puede encontrar en el sur de Colombia y su

distribución altitudinal se encuentra por debajo de los 2300 msnm (Ramírez, B. Macías, D. Varona, G. 2012).

2.2.2 Clasificación Taxonómica

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Calea sessiliflora* Less.

CLASE	Magnoliophyta
ORDEN	Aasterales
FAMILIA	Asteraceae
TRIBU	Neurolaeneae
GÉNERO	Calea
ESPECIE	sessiliflora

Importancia del uso de plantas en la búsqueda de metabolitos con actividad biológica.

Desde inicios de la civilización las plantas no solo se han empleado como fuente de alimentación, si no que tienen importantes propiedades beneficiosas para la salud. A esta práctica se le conoce como medicina tradicional, la cual ha tomado fuerza a través del tiempo y se ha posicionado como una alternativa para el tratamiento de enfermedades. Con el ánimo de comprender la relación planta-hombre, se han realizado varios estudios etnobotánicos, evidenciando de esta manera el aprovechamiento y reconocimiento que la población hace de los recursos naturales de su entorno con el uso de las plantas medicinales y aromáticas (Ramírez, B. Macías, D. Varona, G. 2012), debido a que estas tienen una compleja composición química y cuentan con una amplia variedad de metabolitos primarios y secundarios, los cuales son utilizados en la industria farmacéutica, cosmética, agraria, entre otras (Heinrich, *et al*, 2004), Es por eso que muchas investigaciones han llevado a la síntesis de metabolitos los cuales cuentan con una estructura compleja, una actividad evaluada y establecida, pero estos al no ser metabolizados totalmente podrían quedar acumulados en el organismo y por tanto tendrían efectos tóxicos, en algunas investigaciones se ha reportado que estas especies sintéticas tienen efectos secundarios sobre la salud, por tanto no es recomendable suministrarlos a través de la dieta (Castell, J. s.f.; Dorman, H, Hiltunen, R. 2004).

Algunas plantas son ricas en compuestos que poseen propiedades antioxidantes, capaces de inhibir procesos de oxidación en alimentos, de envejecimiento celular y algunos tipos de cáncer. La presencia de antioxidantes naturales en los alimentos es importante, porque estos compuestos contribuyen a definir las características organolépticas y a preservar la calidad nutricional de los productos que los contienen, además, porque al ser ingeridos, ayudan a preservar en forma considerable la salud de los individuos que los consumen. En la actualidad, es considerada una de las formas más efectivas de reducir el riesgo de desarrollo de aquellas enfermedades crónicas degenerativas (Losada, S. Bravo, C. 2017).

Debido a los anteriores argumentos existe la necesidad de conocer científicamente la composición, actividad y propiedades que puedan presentar los extractos etanólicos totales provenientes de fuentes naturales como las plantas, para establecer el efecto que podría tener sobre organismos vivos con el fin de encontrar alternativas innovadoras, saludables y amigables con el medio ambiente que puedan ser útiles para la industria farmacéutica, de cosméticos, alimenticia y agronómica, pues algunos compuestos naturales son más seguros que los sintéticos y tienen una mayor acogida comercialmente por la población (Dorman, H. Hiltunen, R. 2004).

2.3 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón desapareado en la última capa del orbital más externo. Este electrón le da una configuración electrónica energéticamente alta, que la hace una sustancia altamente reactiva e inestable. Estas especies radicalarias se producen dentro del organismo como resultado natural de los procesos metabólicos como la respiración, la cadena de transporte de electrones y procesos redox las cuales están propensas a reaccionar fácilmente debido a que tienen un periodo de vida media corto (una millonésima de segundo), por lo que pueden reaccionar fácilmente con moléculas orgánicas que se encuentren adyacentes a ellas como carbohidratos, aminoácidos, proteínas, lípidos presentes en alimentos o tejidos biológicos, haciendo que cambien su estructura, promoviendo reacciones en cadena para la producción de las especies radicalarias (Frankel, E. 2010), que en altas concentraciones generan daños irreversibles en tejidos y se consideran como tóxicos (Losada, S. Bravo, C. 2017).

Estas especies radicalarias pueden ser de carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno, etc. Las de mayor importancia son las especies reactivas de oxígeno (ERO), de las cuales se tiene el tipo ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), radical perhidroxilo (HOO^{\cdot}), el peroxilo (RO_2^{\cdot}), el alcoxilo (RO^{\cdot}), entre otros (Frankel, E. 2010; Coronado, M. Vega, S. Rey, L. 2015). Por tanto, estas tienen una función fisiológica en el organismo y participan en la síntesis de colágeno, prostaglandinas, disminuyen la síntesis de catecolaminas, participan en la fagocitosis y tienen la capacidad de activar enzimas para que puedan ejercer su papel enzimático.

2.4 ESTRÉS OXIDATIVO

En los seres vivos existe un equilibrio interno entre la producción de radicales libres y el gasto de estas especies por parte de los antioxidantes. El estrés oxidativo se define como el desequilibrio de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ERO/ERN) y la capacidad del organismo para contrarrestar la acción en los sistemas de defensa antioxidante. El estrés oxidativo surge de la generación desmesurada de ERO y ERN o de la baja capacidad de protección antioxidante por los sistemas endógenos para combatir el ataque oxidativo que va encaminado hacia

biomoléculas específicas, causando múltiples daños en el organismo como enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson), además de patologías cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y envejecimiento prematuro (Losada, S. Bravo, C. 2017; Coronado, M. Vega, S. Rey, L. 2015).

2.5 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias químicas que inhiben la reacción de oxidación de los radicales libres, actuando en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y teniendo más de un mecanismo de acción mediante el intercambio de un electrón o átomo de hidrógeno con las moléculas de radicales libres para estabilizarlos. Para que un antioxidante tenga actividad antiradicalaria debe cumplir con una característica básica, la cual es la generación de un radical más estable o menos reactivo que la especie radicalaria inicial (Frankel, E. 2010). La mayoría de los antioxidantes se clasifican de acuerdo con sus características estructurales, en el cuerpo humano pueden ser de naturaleza endógena o exógena (Ugartondo, V. 2009).

Los antioxidantes endógenos incluyen antioxidantes enzimáticos tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasas, etc, que previenen la formación de ERO, o que utilizan estas especies para poder ejercer su papel enzimático, también existen antioxidantes no enzimáticos muy eficientes como melatonina, coenzima Q. Los antioxidantes exógenos son aquellos que son suministrados a través de la dieta, la principal fuente de antioxidantes exógenos son los compuestos polifenólicos como los ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas y cumarinas estos también incluyen algunos eliminadores de radicales para suprimir o romper las reacciones en cadena, tales como el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), etc, los cuales pueden ceder un átomo de hidrógeno a la especie radicalaria para estabilizarla (Losada, S. Bravo, C. 2017).

Los metabolitos secundarios que tienen una actividad biológica tienen un valor agregado, debido a que juegan un papel muy importante en la industria, ya sea como fuente de transformación o como agentes estabilizantes de productos, tal es caso de los compuestos con actividad antioxidante, los cuales se encuentran en fuentes naturales como las plantas, frutas y vegetales, estos son ricos en flavonoides, carotenoides, vitaminas y compuestos fenólicos, estos últimos son los que se caracterizan por tener un alto valor en la industria alimentaria, de cosméticos, farmacéutica, entre otras, debido a que tienen estructuras con la capacidad de evitar reacciones vía radicalaria, generando una estabilidad en un producto, brindando así un periodo de vida útil mayor. Por otro lado, se utilizan los antioxidantes sintéticos, pero estos se encuentran regulados y deben estar en bajas cantidades por seguridad del consumidor, por consiguiente, es otra de las razones por la que existe la necesidad de buscar día a día nuevos compuestos que tengan un potencial

antioxidante, provenientes de fuentes vegetales, y que sean de fácil obtención, que disminuyan los costos de producción y así evitar el uso de especies sintéticas en productos terminados.

2.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la actividad antioxidante no se puede realizar in vivo o directamente, debido a que las especies radicalarias tienen periodos de vida muy cortos en los cuales no se podría establecer una medida directa o se necesitaría de un sistema de medida rápida, una característica que debe tener un radical para poder ser estudiado es que sea de color para que este sea perceptible. Para la determinación de la actividad antioxidante se necesita de un agente oxidante que promueva un daño oxidativo sobre una especie, este daño es reducido o inhibido por la especie antioxidante, esta inhibición es proporcional al poder antioxidante de una especie, con un cambio en la tonalidad de la solución en el tiempo se puede evidenciar el efecto que tiene el antioxidante sobre la especie oxidante.

Para evaluar la actividad antioxidante se pueden emplear varios métodos in vitro (Pourmorad, F. *et al*, 2006) los cuales pueden medir la capacidad antioxidante de una sustancia, estas mediciones se basan en reacciones de transferencia de electrones (ET), los cuales involucran una reacción redox utilizando al agente oxidante como un indicador final de la reacción por el cambio de color de la solución, entre los ensayos se encuentran FRAP (parámetro antioxidante reductor de iones férricos) y CUPRAC (Potencia reductora de cobre (II)). Reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), estos monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente se componen de una especie radicalaria sintética y un agente antioxidante, entre los ensayos pertenecientes a este grupo son ORAC (capacidad de absorbencia de radicales de oxígeno) y TRAP (parámetro antioxidante de captura radical total). En algunos casos se presentan reacciones mixtas, en las cuales hay una combinación de las dos primeras reacciones (HAT y ET), estas fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libre, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra, entre los ensayos se tienen DPPH y ABTS (Huang, D. *et al*. 2005).

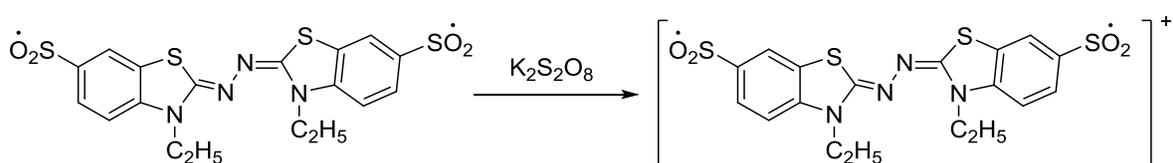
No existe un método único y universal el cual se pueda utilizar para medir la actividad antioxidante de una sustancia, es por eso que los métodos más usados comúnmente a nivel mundial para medir la actividad antioxidante en plantas y alimentos son aquellos que involucran compuestos cromógenos de naturaleza radical tales como: ABTS^{*+} (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), (Tovar, 2013).

2.6.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

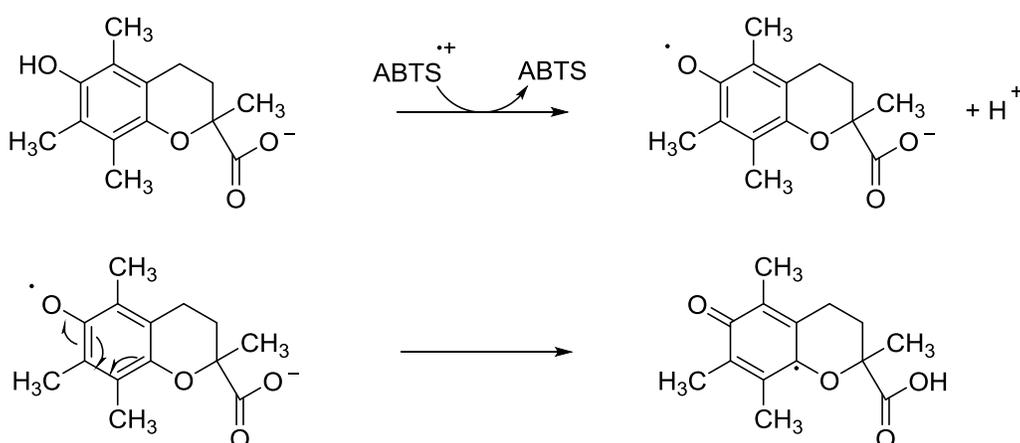
Este método fue propuesto originalmente por Brand-Williams en 1995, y se fundamenta en la desaparición del radical cromógeno púrpura (DPPH) por acción de la muestra antioxidante, que produce una disminución en la intensidad del color

muy intenso y pasa a una solución incolora. El radical catión $ABTS^{+\cdot}$, se genera por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio, esto se lleva a cabo a temperatura ambiente, en ausencia de luz, en un tiempo de 16 h. Una vez generado el radical se prosigue a realizar el ensayo. La influencia de la concentración de antioxidante y la duración de la reacción de inhibición del radical se tienen en cuenta al determinar la actividad antioxidante, éste método colorimétrico, es aplicable para determinar el parámetro EC_{50} . La capacidad relativa de los antioxidantes donantes de hidrógeno para eliminar $ABTS^{+\cdot}$, se puede medir espectrofotométricamente a 734 nm. El esquema 2 muestra la reacción de un compuesto antioxidante con el radical $ABTS^{+\cdot}$ (Re, R. *et al.* 1999).

A



B



Esquema 2. A) Formación del radical $ABTS^{+\cdot}$ **B)** Reacción del estándar Trolox con del radical $ABTS^{+\cdot}$ (Erel, O. 2004).

2.6.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método RANCIMAT

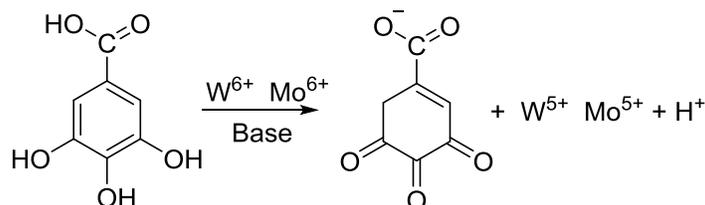
La evaluación de la capacidad para proteger el aceite de Coco de la oxidación se llevó a cabo mediante el método de Rancimat, este fue propuesto por primera vez por Hadorn y Zurcher. La prueba consiste en la oxidación acelerada de un aceite que se lleva a cabo calentando la muestra a 110 °C, mientras pasa un flujo de aire a través de ella. La generación de productos de oxidación volátiles, como ácido fórmico y ácido acético (Upadhyay, R. Niwas, H. 2015), son arrastrados por el flujo de aire a un recipiente que contiene agua desionizada, esto genera un cambio significativo en la conductividad eléctrica de la fase acuosa permitiendo así que se

pueda detectar y evidenciar el inicio del proceso de envejecimiento del aceite. La estabilidad de oxidación se puede relacionar con el llamado “tiempo de inducción, el cual es el tiempo que transcurrió desde el inicio de la prueba hasta que los productos de oxidación aumentan la conductividad del agua en la celda” (Ghosh, M. 2018).

Muchos estudios destacan la influencia que tienen los compuestos fenólicos sobre la actividad antioxidante y la actividad biológica que puedan presentar los extractos de plantas, es por eso que existen métodos complementarios (fenoles y flavonoides totales) los cuales ayudan a tener una estimación del poder biológico de una especie vegetal que pueda ser una fuente de metabolitos activos y que sean utilizados en el beneficio de la salud humana, ya que estos métodos miden la cantidad de estos metabolitos presentes en la muestra.

2.6.4 Determinación del contenido total de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu.

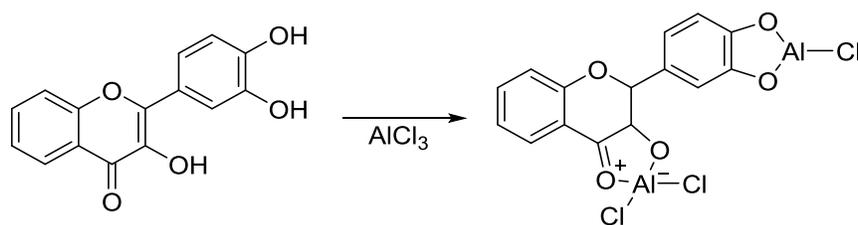
El ensayo fue propuesto por Folin y Ciocalteu en 1927, se utiliza como medida para la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales y alimentos. Este método espectrofotométrico está basado en la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos de la muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico. El reactivo de Folin-Ciocalteu (solución de color amarillo) está compuesto por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), los cuales reaccionan con todo tipo de fenoles, provocando su oxidación y la reducción de dichos ácidos en óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) de color azul (esquema 3), siendo proporcional este color a la cantidad de grupos hidroxilo presentes en la muestra. La oxidación de los fenoles presentes presenta un máximo de absorción a 760 nm, y se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico (Vernon, S. *et al.* 1999). El mecanismo de reacción es llevado a través del sistema oxido-reducción, por lo que además se podría considerar como un método de medida de la actividad antioxidante total (Pourmorad, F. *et al.*, 2006).



Esquema 3. Reacción ácido gálico con reactivo Folin-Ciocalteu (Vernon, S. *et al.* 1999).

2.6.5 Determinación del contenido total de flavonoides por el método de tricloruro de aluminio.

Para la determinación de flavonoides totales se llevará a cabo el método de tricloruro de aluminio, el cual fue propuesto originalmente por Zhishen J, *et al.* 1999, es un método colorimétrico que se fundamenta en la capacidad que tiene el catión aluminio para formar un complejo en medio básico generando una coloración rosa de la solución. En el esquema 4, se muestran la reacción que ocurren en esta determinación. Este método se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 500 nm con base a una curva de calibración de un patrón de catequina o quercetina (Zhishen J, *et al.* 1999).



Esquema 4. Reacción de AlCl₃ para la cuantificación espectrofotométrica de flavonoides. (Zhishen J, *et al.* 1999).

2.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

2.7.1 Actividad citotóxica frente *Artemia franciscana*

El ensayo de *Artemia franciscana* fue desarrollado en 1982 por Meyer y Col, desde entonces se ha utilizado en varios sistemas de ensayos biológicos ya que responde a un amplio rango de compuestos químicos, entre estas aplicaciones, se han utilizado en el análisis de residuos de plaguicidas, micotóxicas, contaminantes corrientes, anestésicos, dinoflagelados y plantas, para así determinar la concentración letal al 50 % (CL₅₀) (Jaramillo, A. 2014; Sanabria A, López S. 1997) de una especie de interés, el ensayo consiste en exponer nauplios del crustáceo (figura 1) a unas concentraciones de la sustancia estudiada bajo condiciones que más se asemejen a su hábitat natural. Debido a esto resulta importante su aplicación en programas de descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas y medicamentos de origen natural (Correa, F. Ramírez, L. 1993). El bioensayo con *A. franciscana* tiene las ventajas de ser rápido, barato y sencillo (Fernandez, M. 2017). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, sin necesitar equipamiento especial empleando además pequeñas cantidades de muestra. Los resultados de toxicidad son clasificados por la Fundación Internacional para la Ciencia, el Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).



Figura 1. Nauplio del crustáceo de *A. franciscana* (Fernandez, M. 2017).

2.7.2 Actividad Fitotóxica en *Allium cepa*

Allium test es un bioensayo para detectar contaminantes y sustancias potencialmente tóxicas para la salud (Causil, L. *et al.* 2017), además es una de las especies vegetales más usadas para la detección de diferentes tipos de cambios genéticos causados por sustancias químicas, como es la inhibición del crecimiento en las raíces de *A. cepa* y las alteraciones en el ciclo mitótico (Nefic, H, *et al.* 2013). La implementación de *A. cepa* como sistema de prueba para detectar sustancias tóxicas se remonta a los años 40, pero fue en el trabajo de Fiskesjö G. 1985, que se implementó y se ha utilizado hasta la fecha para evaluar una gran cantidad de agentes químicos como: pesticidas, residuos industriales, disolventes orgánicos, fármacos, extractos de plantas entre otros, como un modelo simple y eficaz para monitorear daño a nivel celular en organismos vegetales superiores (Nefic, H, *et al.* 2013) caracterizándose por ser una prueba de bajo costo, se maneja fácilmente y tiene ventajas sobre otras pruebas a corto plazo que requieren preparaciones previas de muestras analizadas, así como la adición de un sistema metabólico exógeno (Morais, D. Marin, M. 2009), (Khanna, N. Sharma, S. 2013).

2.7.3 Actividad Fitotóxica en microalgas *Selenastrum capricornutum*

El ensayo con el alga *S. capricornutum* fue presentado por primera vez por la Agencia de Protección Ambiental de Canadá (Environment Canada, 1992), *S. capricornutum* es un alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna (figura 2), puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos (Granados, Y. Ronco, A. Díaz, M. (s.f)).



Figura 2. Microfotografía de *Selenastrum capricornutum*

Este ensayo puede ser utilizado para estimar el potencial de fitotoxicidad debido a que cuando las algas son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos su reproducción se afecta, alterando la tasa de crecimiento de la población, teniendo así una habilidad para detectar efectos adversos a mezclas complejas de sustancias químicas en aguas dulces superficiales o subterráneas. De acuerdo a la resolución N° 0062 de 2007 del IDEAM, si el resultado es $\geq 50\%$, la muestra analizada se deberá clasificar como ecotóxica; en el trabajo de Blaise *et al.*, 2000, se realizaron modificaciones de esta metodología utilizando viales de vidrio más pequeños reduciendo así los volúmenes utilizados.

2.7.4. Actividad anticoagulante

También se quiso evidenciar si los extractos etanólicos totales de *C. sessiliflora* Less presentaban algún tipo de efecto como antídoto de veneno de serpiente y se realizó la evaluación de la actividad anticoagulante.

2.7.4.1 Determinación de la actividad anticoagulante de los extractos de *C. sessiliflora* Less sobre el veneno de serpiente de *Bothrops asper*.

La actividad coagulante de los venenos se puede determinar sobre plasma o sobre una solución de fibrinógeno (Gené, J. Roy, A. Rojas, G. Gutiérrez, J. Cerdas, L. (1989); Pereáñez, J. Vargas, L. (2009)). La neutralización de la actividad de venenos por antídotos se determina mediante experimentos en los que se incubaba una cantidad constante de veneno y se varía la cantidad del antídoto, posteriormente se determinan los tiempos de coagulación al agregar alícuotas de estas mezclas a plasma citratado o a una solución de fibrinógeno (Gené, J. Roy, A. Rojas, G. Gutiérrez, J. Cerdas, L. (1989)).



Figura 3. Fotografía de *B. asper*.

Muchos venenos de serpientes contienen enzimas que actúan directamente sobre el fibrinógeno (serina proteínas tipo trombina), o sobre el factor X (metaloproteinas) o sobre la protrombina (serina proteinasas o metaloproteinasas) (Sánchez, E. *et al.*, 2015). El resultado de la acción de estas enzimas es la coagulación del plasma o, en el caso de las enzimas tipo trombina, la coagulación tanto del plasma como de

las soluciones de fibrinógeno (Vivas, D. Sandoval, G. *et al.* (2015)). *Bothrops asper* (figura 3) es una especie de serpiente perteneciente a la familia *Viperidae*. Se trata de una de las más grandes y venenosas especies que habitan la selva neotropical, esta víbora puede llegar a medir aproximadamente 2 m y su distribución por el territorio del país está dada desde los valles interandinos hasta el Chocó, contando con toda la costa pacífica y atlántica.

2.8 ESTADO DEL ARTE

Estudios biológicos del género *Calea*.

Investigaciones fitoquímicas se han realizado en los últimos años para especies pertenecientes al género *Calea*, se ha encontrado que contienen metabolitos secundarios los cuales tienen un valor biológico interesante debido a que en su mayoría contienen compuestos como oxido de cariofileno, α -cadinol y (-)- α -Gurjuneno, estos le proporcionan a las plantas actividades biológicas como antimicrobianas, antifúngicas e insecticidas (Mora, L. Pérez, A. 2016), claro ejemplo de lo anterior es los extractos de éter de petróleo y acetato de etilo de las partes aéreas de esta planta *C. zacatechichi* y el aceite esencial de *C. jamaicensis* los cuales revelaron la presencia de ésteres grasos, ácidos fenólicos, esteroides, monoterpenos y una sesquiterpé lactona (Souza, R. *et al.* 2015)

En el trabajo de Anaya, C. 2009. Reporta que las hojas y el tallo de *C. urticifolia* contienen: alcaloides, taninos, lactonas, sesquiterpénicas y flavonoides. Se han reportado derivados sesquiterpénicos de atripliciólido, 6-metoxiisoeugenol, timol, compuestos alquénicos, 4-6-dimetoxi-2-isobutiroxifenol.

Ortiz, M. 2011, reporta para *C. urticifolia* que presenta componentes terpénicos. En las partes aéreas se han identificado sesquiterpenos, cuatro derivados de atripliciólido, calin A, cinco derivados de caleuriticoide y germacreno C y D, monoterpenos (2-isopropil-4-metil-fenol y timol), los cuales se identificaron de igual manera en la raíz, además, de tres derivados bencénicos.

Por otro lado, para *C. pinnatifida* Less. Se reporta Investigaciones fitoquímicas de los extractos de éter de petróleo y acetato de etilo de las partes aéreas de esta planta y su aceite esencial, en donde se revelaron la presencia de ésteres grasos, ácidos fenólicos, esteroides, monoterpenos, un poliacetileno y una sesquiterpén lactona (Lima, T. Santos, A. Costa, D. Souza, R. *et al.* 2015).

A pesar de que existen pocos trabajos específicos sobre *C. sessiliflora* Less, se presenta a continuación el resumen de las investigaciones encontradas en la literatura que se han realizado sobre *C. sessiliflora* Less, y que tienen algún tipo de relación con el enfoque de la investigación, dentro de los trabajos adelantados para

la especie, se encuentran los efectos citotóxicos, antihipertensivos y vasodilatadores del extracto etanólico preparado a partir de *C. sessiliflora* Less.

En el trabajo de Guerrero *et al.* 2002, se encuentran los efectos antihipertensivos y vasodilatadores del extracto etanólico de *C. sessiliflora* Less, analizado en ratas SHR y Wistar a una dosis de 20 mg/kg. Encontrando que *C. sessiliflora* Less relajaron las contracciones inducidas por KCl (80 mM) y fenilefrina (10^{-6} M) de una manera dependiente de la concentración. El mismo autor reporta que *C. sessiliflora* Less es una planta usada como infusión en la medicina popular colombiana para el tratamiento de la hipertensión.

Según lo reportado por Mora, L. Pérez, A. 2016, se determinó la actividad larvica de veintiséis aceites esenciales provenientes de plantas de las familias *Verbenaceae*, *Labiatae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Poaceae*, *Piperaceae*, *Turneraceae* y *Myrtaceae* frente al mosquito *Aedes aegypti*, para lo cual se obtuvieron las curvas de letalidad de dichos aceites. Los aceites que mostraron una mejor actividad fueron: *Piper medium* con una CL₅₀ de 24,9 ppm, *Piper holtonii* con una CL₅₀ de 25,7 ppm, *C. sessiliflora* Less con una CL₅₀ de 28,3 ppm *Piper cf. Subflavum* con una CL₅₀ de 29,9 ppm y por último *Turnera diffusa* con una CL₅₀ de 30,4 ppm. En este mismo estudio fue evaluada *C. glomerata* la cual presentó una CL₅₀ de 59,9 ppm. Por otro lado, el autor reporta que “dentro de las plantas estudiadas en este trabajo se encuentra la *Baccharis trinervis* de la familia *Asteraceae*, en su aceite esencial se ha reportado la presencia de β-felandreno, α-tujeno, sabineno, α-pineno, los cuales se encuentran reportados con propiedades farmacológicas, antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobiana y antifúngicas.”

En el trabajo de Gómez. A. 2016, se determinó las propiedades insecticidas y/o repelentes de los aceites esenciales de *C. sessiliflora* Less y *Tagetes verticillata*, sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Dryophthoridae) validando el uso tradicional de especies vegetales por comunidades campesinas e indígenas para el control de plagas en maíz almacenado.

En el trabajo de Mantilla, J. Sanabria, A. 1985, fue evaluada la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de 56 plantas superiores por el método de dilución en agar frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium fortuitum*. Quince plantas mostraron actividad antibacteriana significativa, entre ellas *C. sessiliflora* Less de la cual se evaluó la parte aérea y las raíces; se presentó mayor impacto de respuesta para la parte aérea representado en la ausencia del crecimiento de las especies evaluadas, para las raíces se reporta que hubo una reducción significativa de la población.

Dado que existe cierta actividad biológica en especies vegetales pertenecientes al género *Calea*, se podría esperar una actividad prometedora para *C. sessiliflora*

Less, es por ello que se ve en la necesidad de realizar este trabajo de investigación el cual va enfocado hacia la determinación de la actividad antioxidante, debido a que no se encontró reportes literarios que abarquen esta actividad, como también se pretende indagar sobre la evaluación de la actividad citotóxica, fitotóxica y anticoagulante, ya que esto daría idea del efecto que podría tener el uso de extractos etanólicos de *C. sessiliflora* Less sobre organismos vivos para la búsqueda de nuevos metabolitos que contengan actividad biológica los cuales puedan ser utilizados en futuras investigaciones, en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética, agraria, entre otras, además de que estos metabolitos sean obtenidos de una fuente natural como una alternativa innovadora, saludable y amigable con el medio ambiente.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De la amplia variedad de especies endémicas de la región cercana al municipio de Almaguer (Departamento del Cauca) se destaca la planta conocida como chicharrón (*Calea sessiliflora* Less) la cual, tradicionalmente es usada por las comunidades campesinas e indígenas para la preparación de una infusión como un tratamiento alternativo para dolores de cabeza, de estómago, musculares, de articulaciones, entre otras enfermedades.

Se han realizado estudios fitoquímicos y farmacológicos en especies pertenecientes al género *Calea*, los cuales han llevado a comprender la relación planta-hombre y de esta manera observar como el ser humano hace un aprovechamiento de su entorno con el uso de especies vegetales para su beneficio. Estos estudios están basados en la utilización de extractos de las partes aéreas de las plantas para la evaluación de las actividades vasodilatadoras, citotóxicas y antimicrobianas (Amaral. P, *et al.* 2017). Para la especie *C. sessiliflora* Less, existe una información limitada. Debido a esto, se ve la necesidad de generar un trabajo de investigación que abarque estudios relacionados con la composición química y actividad biológica que puedan presentar los extractos de plantas para evidenciar el efecto que podrían tener sobre organismos vivos, buscando así la validación del conocimiento ancestral. Es por ello que surge este trabajo de investigación en el que se llevó a cabo la determinación cualitativa del extracto etanólico total de las flores y hojas a través del tamizaje fitoquímico, la evaluación de la actividad antioxidante mediante los ensayos de DPPH, ABTS⁺ y se realizaron los ensayos complementarios que ayudaron a la determinación de la actividad antioxidante (Fenoles y Flavonoides totales), como también se realizó la evaluación de la actividad citotóxica y fitotóxica frente a los bioensayos de *Artemia franciscana* y *Allium cepa* respectivamente.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antioxidante, citotóxica y fitotóxica del extracto etanólico total de flores y hojas de *Calea sessiliflora* Less.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Realizar el tamizaje fitoquímico del EET de flores y hojas de *C. sessiliflora* Less.

4.2.2 Determinación cualitativa y cuantificación de fenoles y flavonoides totales de flores y hojas de *C. sessiliflora* Less.

4.2.3 Evaluar la actividad antioxidante del EET de flores y hojas de *C. sessiliflora* Less, por medio de los métodos de DPPH, ABTS⁺.

4.2.4. Determinar la actividad citotóxica y fitotóxica preliminar del EET de flores y hojas de *C. sessiliflora* Less, mediante los ensayos de *Artemia franciscana* y *Allium cepa* respectivamente.

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

4.2.5 Realizar el tamizaje fitoquímico, evaluar la actividad antioxidante por medio de los métodos de DPPH, ABTS⁺, la determinación cualitativa y cuantificación de Fenoles y Flavonoides totales en el extracto etanólico total (EET) de raíz de *C. sessiliflora* Less., como también la evaluación de la actividad citotóxica y fitotóxica, mediante los ensayos de *Artemia franciscana* y *Allium cepa* respectivamente.

4.2.6 Evaluar la actividad antioxidante de los EET de flores, hojas y raíz de *C. sessiliflora* Less, por medio del método Rancimat, la determinación de la actividad fitotóxica en microalgas *S. capricornutum* y la evaluación la actividad anticoagulante sobre el veneno de serpiente de *B. asper*.

5. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo con éxito este trabajo de investigación se utilizaron una serie de reactivos y materiales adquiridos de diferentes casas comerciales los cuales se encuentran en la Tabla 2 (anexo 1), como también los equipos de laboratorio utilizados los cuales se reportan en la Tabla 3 (anexo 2).

5.1 Recolección del material vegetal de *Calea sessiliflora* Less

La recolección de las hojas, flores y raíz de *C. sessiliflora* Less se realizó en la vereda Gonzalo Achiral (Municipio de Almaguer-Cauca) ubicado a una altura de 1964 m.s.n.m y según la georreferenciación Latitud 1°56'22,92"N; Longitud 76°51'45,12" O. La especie fue clasificada y depositada en el herbario de la Universidad del Cauca, (número de registro de especie 01 CAUP). El material vegetal fue llevado al laboratorio del grupo de Investigación Química de Compuestos Bioactivos (QCB) donde se lavó, se secó en estufa a 40 °C hasta peso constante. Se cortó en trozos pequeños para posteriormente realizar la extracción.

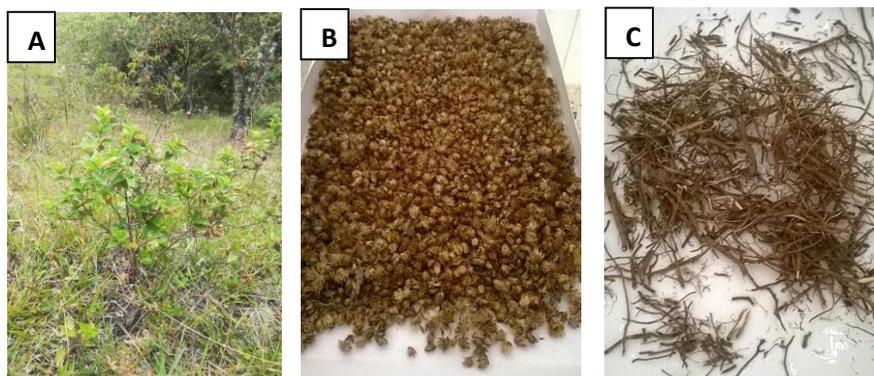


Figura 4. Material vegetal de *C. sessiliflora* Less. **A)** Hojas, **B)** Flores, **C)** Raíz

5.2 Obtención de los extractos etanólicos totales de hojas, flores y raíz de *C. sessiliflora* Less

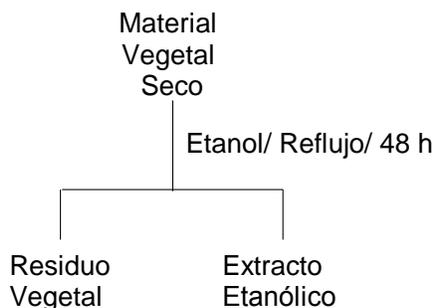


Figura 5. Diagrama de extracción para las partes de la planta *C. sessiliflora* Less.

En la figura 5 se observa el diagrama que se utilizó para la obtención de los extractos etanólicos totales, se pesaron aproximadamente 20 g de material vegetal seco y luego se sometió a extracción soxhlet durante un tiempo de 48 horas, usando como solvente etanol rectificado (aproximadamente 98 %). Luego de obtener el extracto etanólico, se llevó a sequedad mediante el uso de un equipo de concentración a presión reducida, hasta obtener un peso constante de EET. Las muestras se guardaron en recipientes de vidrio ámbar y en el desecador o dado el caso en refrigeración.

5.3 Tamizaje Fitoquímico

Se realizaron una serie de pruebas cualitativas para determinar la presencia de algunos metabolitos secundarios, las pruebas que se le realizaron a los extractos etanólicos totales fueron establecidas siguiendo las metodologías planteadas por Sanabria A, López S. 1997; Bilbao M. 1997 y Sanabria, A. 1983. Las pruebas realizadas se muestran en la Tabla 4 y la descripción de la metodología se puede encontrar en la sección de anexos (anexo 3).

Tabla 4. Pruebas realizadas para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios en *C. sessiliflora* Less.

METABOLITO	PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS
Alcaloides	Reacción con reactivo de Dragendorff Reacción con reactivo de Mayer Reacción con reactivo de Wagner
Cardiotónicos	Reacción con reactivo de Baljet Reacción con reactivo de Kedde Reacción de Raymond-Marthoud Reacción de Keller-Killian
Cumarinas Volátiles	Papel impregnado con NaOH (Observación UV)
Taninos	Reacción de Cloruro férrico
Saponinas	Formación de espuma estable por 15 min
Triterpenos y/o Esteroides	Reacción de Liebermann-Burchard Reacción de Salkowski
Flavonoides	Reacción de Shinoda Reacción con NaOH
Derivados antracénicos libres	Reacción de Borntrager Reacción con Acetato de Magnesio Test Hidróxido de Amonio.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

5.4.1 Determinación de la actividad antioxidante del EET *Calea sessiliflora* Less por el método DPPH

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Brand, W. *et al* (1995), con algunas modificaciones: Se pesaron 3 mg del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) y se disolvieron en 100 mL de metanol. Posteriormente se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis, GENESIS 6 a una longitud de onda de 515 nm, ajustando la solución a 0.800 ± 0.03 de absorbancia. Anteriormente se realizó una curva del radical DPPH para establecer la concentración de trabajo del radical (35.132 mg/mL). Se realizaron curvas para los antioxidantes de referencia (ácido ascórbico, trolox, α -tocoferol) y para las muestras (EET de hojas, flores y raíz), las curvas se realizaron en rangos específicos de concentración tal que se obtuviera una inhibición de 0,500 dentro de la curva. Para el análisis de las muestras y los estándares de referencia, se mezclaron 1200 μ L del radical DPPH• con 600 μ L de cada solución preparada para cada curva, se agitaron y se mantuvieron en la oscuridad durante 15 minutos, transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia espectrofotométricamente a 515 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, se utilizó un control el cual consistía en reemplazar el volumen de la muestra (600 μ L) por metanol. La inhibición del radical libre DPPH se calculó mediante la ecuación 1.

$$\text{Inhibición } 50 \% = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Ecuación 1. Inhibición del radical DPPH al 50 % (EC₅₀).

Mediante una gráfica de concentración vs inhibición y el análisis de regresión lineal obtenido a partir de la ecuación de la recta, se encontró la concentración necesaria para obtener una inhibición de 0.500, la cual se expresa como (EC₅₀).

5.4.2 Determinación de la actividad antioxidante del EET de *Calea sessiliflora* Less por el método ABTS**

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita Re, R. *et al*, con algunas modificaciones: Para la preparación del radical ABTS** se pesaron 18 mg de ABTS y se disolvieron en 54 mL de solución buffer fosfato pH 7,45. Después, se añadieron 6 mL de persulfato de potasio 2,45 mM, se dejó en la oscuridad y temperatura ambiente por 16 h para la formación del radical. Transcurrido el tiempo, 30 mL de la solución de ABTS** se diluyó con solución buffer y metanol hasta obtener una absorbancia de 0.800 ± 0.030 a 734 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

Se realizaron curvas de antioxidantes de referencia como ácido ascórbico, trolox, α -tocoferol, para las muestras (EET de hojas, flores y raíz) se realizaron curvas en rangos específicos de concentración tal que se obtuviera una inhibición del 0,500

dentro de la curva. Para el análisis de las muestras y los estándares de referencia, se mezclaron 1485 µL del radical ABTS** con 15 µL de cada solución preparada para cada curva, se agitaron y se mantuvieron en la oscuridad durante 7 minutos, transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia espectrofotométricamente a 734 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, se utilizó un control el cual consistía en reemplazar el volumen de la muestra (15 µL) por metanol. La inhibición del radical libre ABTS** se calculó mediante la ecuación 2.

$$\text{Inhibición } 50 \% = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Ecuación 2. Inhibición del radical ABTS** al 50 % (EC₅₀).

Mediante una gráfica de concentración vs inhibición y el análisis de regresión lineal obtenido a partir de la ecuación de la recta, se encontró la concentración necesaria para obtener una inhibición de 0.500, la cual se expresa como (EC₅₀).

5.4.3 Determinación de la actividad antioxidante del EET de *Calea sessiliflora* Less por el método de Rancimat.

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita Läubli *et al*, 1986 con algunas modificaciones. Se usó el instrumento Rancimat automatizado (Modelo 892, Metrohm). Se preparó una concentración de 1000 mg/mL extracto/aceite. Para probar la estabilidad oxidativa del aceite de coco, se siguieron las siguientes condiciones, se pesó (3 g) de cada muestra extracto/aceite y se transfirió a un tubo de reacción, se estableció un flujo de aire de 20 L/h y una temperatura de 110 °C (Upadhyay, R. Niwas, H. 2015). Los productos oxidantes volátiles se recogieron en una celda de medición con 60 ml de agua desionizada, se midió continuamente la conductividad del agua para determinar el aumento de la conductividad durante el análisis. Como control se utilizó el aceite de coco sin extracto, y como control positivo se utilizó un estándar comercial (BHT) a una concentración de 200 mg/mL BHT/aceite. Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como factor de protección (FP) y se calcularon empleando la ecuación 3.

$$\text{Factor Protección} = \frac{\text{Tiempo Inducción Aceite con Antioxidante}}{\text{Tiempo Inducción Aceite sin Antioxidante}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Ecuación 3. Calculo del factor de protección del aceite.

5.4.4 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología descrita por (Singleton *et al*). Se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico en metanol como estándar a diferentes concentraciones (10, 15, 25, 35, 45 y 55) mg/mL. En una cubeta plástica se agregó 1 mL de solución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu y 200 μ L de solución metanólica antes preparada. Se homogenizaron por medio de agitación mecánica y se almacenó en ausencia de luz por 5 minutos, para garantizar completa oscuridad el recipiente se envuelve con papel aluminio, pasado este tiempo se agregó 800 μ L de solución de carbonato de sodio y nuevamente se homogenizó, se incubó en ausencia de luz por 60 minutos. Pasado este tiempo se realizó la medición espectrofotométrica a una absorbancia de $\lambda=760$ nm.

Para la determinación del contenido de fenoles totales en los extractos de *C. sessiliflora* Less, se prepararon soluciones madres de 1000 mg/L de extracto en metanol, de esta solución se prepararon concentraciones de 500, 250 y 100 mg/L de extracto. Siguiendo con las condiciones descritas para la curva de calibración se prosigue para la determinación de fenoles totales en cada una de las muestras. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg GAE/ g muestra) utilizando siguiente ecuación 4:

$$C = \frac{cV}{m} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde: c (mg/mL) concentración de Ácido Gálico establecida de la curva de regresión lineal.

V:(mL) volumen de extracto utilizado para el ensayo

m:(g) peso de muestra seca utilizada

Ecuación 4: Cálculo para hallar la concentración de fenoles presentes en la muestra.

5.4.5 Determinación del contenido de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio.

Los flavonoides totales se determinaron mediante el ensayo colorimétrico del tricloruro de aluminio de acuerdo con lo desarrollado por (Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999), con algunas modificaciones realizadas en el grupo de Química de Compuestos Bioactivos (QCB). Se realizó una curva de calibración utilizando catequina en metanol como estándar a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 μ g/mL. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente forma, en una celda se agregaron 140 μ L de la muestra metanólica, y se añadieron 52,5 μ L de NaNO₂ (5%) y 805 μ L de agua desionizada, se homogenizó y dejó reaccionar por 5 minutos en

oscuridad, una vez transcurrido el tiempo se agregaron 210 μL de AlCl_3 (2,5%). Se agitó la mezcla dejando reaccionar por 6 minutos. Posterior a esto se agregaron 350 μL de NaOH (1 M) y 350 μL de agua desionizada, se homogenizó y se mantuvo en ausencia de luz por 5 minutos, finalmente se midió espectrofotométricamente la absorbancia a $\lambda=500$ nm.

Para la cuantificación de flavonoides totales en los extractos se prepararon soluciones madre de 1000 mg/L de extracto, pesando 5 mg de cada muestra y se disolvieron en 5 mL de metanol, de esta solución se prepararon concentraciones de 250 mg/L de extracto. Se realizó el procedimiento descrito anteriormente para la curva de calibración. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra seca (mg ECAT/ g muestra) utilizando la ecuación 5:

$$C = \frac{cV}{m} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde: c (mg/mL) concentración de Catequina establecida de la curva de regresión lineal.

V:(mL) volumen de extracto utilizado para el ensayo

m:(g) peso de muestra seca utilizada

Ecuación 5: Cálculo para hallar la concentración de flavonoides presentes en la muestra.

5.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

5.5.1 Determinación de la actividad citotóxica frente *Artemia franciscana*

La determinación de la actividad citotóxica de *A. franciscana* se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Sanabria, A. López, S. 1997, con algunas modificaciones, la metodología desarrollada fue de la siguiente forma, para la preparación del agua de mar, eclosión de los crustáceos y preparación de la muestra se encuentra en el anexo 4.

Ensayo de letalidad: 10 nauplios de *A. franciscana* fueron transferidos a viales con capacidad para 5 mL, se procedió a agregar los volúmenes respectivos para obtener las concentraciones de trabajo y se aforó a un volumen final de 5 mL, se incubaron en una cámara ambiental con las mismas condiciones en las que fueron eclosionados, finalmente se realizaron conteos de nauplios muertos a las 24 horas (dosis crónica).

Control positivo: se realizó el ensayo de letalidad en las condiciones anteriormente mencionadas, a diferentes concentraciones de dicromato de potasio, 10, 20, 30 y 40 mg/mL

Control negativo: se realizó el ensayo con el máximo volumen de DMSO agregado en el ensayo de letalidad (150 µL en 5 mL de agua de mar) y un segundo control solo con agua de mar.

5.5.2 Determinación de la fitotoxicidad mediante el Ensayo en *Allium cepa*

La determinación de la actividad fitotóxica de *A. cepa* se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita Fiskesjö G. 1985, con algunas modificaciones, la metodología desarrollada para el ensayo fue de la siguiente forma:

Se seleccionaron 30 bulbos de *A. cepa* con diámetros entre $4,25 \pm 0,25$ cm a las cuales se les retiró el catáfilo externo, posterior a esto se cortaron los restos del área radicular sin dañar las raíces primordiales. Se colocaron en agua destilada por 48 h para promover el crecimiento de nuevas raíces y poder observar el grado de respuesta de las cebollas. Se prepararon soluciones acuosas de extracto etanólico de 1000 mg/mL y según el rango de respuesta de concentración, se realizó una curva de trabajo. Del grupo de 30 cebollas se seleccionaron los individuos con mayor número de raíces nuevas y que hayan tenido un crecimiento homogéneo, las cuales fueron cortadas nuevamente y sometidas a los diferentes tratamientos de extracto. El montaje se realizó en tubos de centrifuga sellados con papel aluminio para garantizar completa oscuridad, con capacidad de 18 mL y de 19 cm de altura, utilizando 3 réplicas para cada tratamiento y control. El periodo de exposición fue de 72 horas en oscuridad, a temperatura ambiente y en una cámara ambiental. Para determinar la fitotoxicidad que puedan presentar los extractos de *C. sessiliflora* sobre raíces de cebollas, se determinará con la inhibición del crecimiento de la raíz en cebollas y se expresará como LC₅₀.

5.5.3 Determinación de la fitotoxicidad en microalgas *Selenastrum capricornutum*

La determinación de la actividad fitotóxica de *S. capricornutum* se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Granados, Y. Ronco, A. Díaz, M. (s.f), con algunas modificaciones, la metodología desarrollada para el ensayo fue la siguiente:

Se preparó 5 soluciones las cuales se rotularon como solución 1, 2, 3, 4 y 5.

Solución 1: se prepararon soluciones independientes pesando 9.7 mg de sulfato de zinc, 4 mg de cloruro de cobalto, 18 mg de molibdato de sodio, 0.6 mg de cloruro de cobre, estos se disolvieron y se aforaron a 5 mL con agua destilada, posteriormente estas soluciones se usaron para preparar la solución 1, como se describe a continuación; se pesó 3,04 g de cloruro de magnesio, 1,1 g de cloruro de calcio, 0,0464 g de ácido bórico, 0,116 g de sulfato de magnesio tetrahidratado, 200 µL de solución de sulfato de zinc, 0,024 g de cloruro férrico, 200 µL de solución de cloruro de cobalto, 200 µL de solución de molibdato de sodio, 200 µL de solución de cloruro

de cobre y 0,075 g de etilendiaminotetraacético sal disódica y se adicionaron en el mismo orden a un balón de 100 mL el cual se aforó con agua destilada.

Solución 2: se pesó 6,125 g de nitrato de sodio y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Solución 3: se pesó 3,67 g de sulfato de magnesio y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Solución 4: se pesó 0,261 g de fosfato de potasio y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Solución 5: se pesó 3,75 g de bicarbonato de sodio y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Una vez preparadas las 5 soluciones se tomó 100 μ L de cada una de ellas y de manera ordenada fueron adicionadas a un balón de 100 mL que finalmente se aforó con agua destilada, el pH de la solución debe ser de 7.5 ± 0.1 para lo cual se utilizó HCl y NaOH al 0.1N para ajustar el pH. La solución preparada se filtró con filtro de 0.22 μ m y se transfirió a un Erlenmeyer de 250 mL el cual se tapó con un copo de gasa y algodón que tenía incrustada una pipeta Pasteur la cual servirá para la conexión del flujo de aire, posteriormente este Erlenmeyer se lleva a la autoclave a una temperatura entre 121-127°F y 15-20 psi de presión por 15 minutos.

En la solución preparada anteriormente se inoculó un cultivo de microalga *S. capricornutum* partiendo desde un cultivo en medio sólido, este cultivo se dejó por un periodo de 13 días, una vez pasado este tiempo se realizó el conteo en cámara de Neubauer para establecer el número de células por mililitro (debido a que anteriormente se había realizado el seguimiento de la absorbancia y la densidad celular por mL de cada cultivo con el fin de establecer la una curva que relacione la absorbancia con el número de células por mL). Una vez establecido el número de células por mililitro se realizó el cálculo del volumen necesario para tomar 1×10^7 células las cuales van a ser el número de partida para el ensayo.

Para determinar la fitotoxicidad que puedan presentar los extractos de *C. sessiliflora* sobre *S. capricornutum*, se realizó un montaje en tubos de ensayo con capacidad de 10 mL y de 11 cm de altura, se prepararon soluciones acuosas de extracto etanólico de 1000 mg/mL de las cuales fueron utilizadas para realizar la curva de trabajo, el periodo de exposición fue de 72 horas, temperatura ambiente, agitación cada 3 h durante el día, se utilizaron 3 réplicas para cada tratamiento y control, la fitotoxicidad se expresará con respecto al % de crecimiento de la población.

5.5.4 Determinación de la actividad anticoagulante de los extractos de *C. sessiliflora* Less sobre el veneno de serpiente de *Bothrops asper*.

Para esta actividad, se trabajó con el veneno liofilizado de *Bothrops asper* colectado en la Localidad de Juan de Acosta (Atlántico), almacenado a -21 °C, y el cual fue suministrado por el grupo de investigación de farmacología de la Universidad del

Valle, este ensayo de actividad anticoagulante fue implementado en dichas instalaciones.

Obtención del plasma sanguíneo

La muestra de sangre se colectó en tubos al vacío con citrato de sodio, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos y se separó el plasma del resto de componentes de la sangre.

Preparación de las muestras de EET y veneno

Se preparó una solución madre de 1000 mg/mL de cada uno de los extractos etanólicos totales, se disolvieron en solución salina (NaCl 0,9 %, pH 7,0), de la cual se prepararon las soluciones de trabajo. La muestra de veneno liofilizado se pesó, se diluyó en solución salina y se preparó una solución madre de 1000 mg/mL de la cual se tomó el volumen necesario para el ensayo.

Ensayo de la actividad anticoagulante

El ensayo de la actividad anticoagulante se realizó adicionando 50 μ L (25 μ L veneno y 25 μ L EET) de mezclas de veneno/extracto (incubadas previamente a 37 °C por 15 minutos) sobre 200 μ L de plasma sanguíneo citratado (incubado a 37 °C por cinco minutos en un bloque térmico). Se mantuvo la concentración de veneno constante (0.5 g *B. asper*) y se varió la concentración del extracto. Se registró el tiempo de coagulación del plasma después de adicionar las mezclas veneno/extracto, lo cual se realizó en un bloque térmico para mantener la temperatura a 37°C.

Se realizó un control positivo con 50 μ L de la mezcla veneno (0.5 g/solución salina) previamente incubada a las mismas condiciones de las mezclas veneno/extracto para determinar el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo. El control negativo se realizó adicionando 50 μ L de solución salina (previamente incubada) al plasma sanguíneo, además de otro control negativo con el extracto y solución salina. Los resultados se expresan como la dosis efectiva media (DE_{50}) la cual consiste en la concentración que triplice el tiempo de coagulación del plasma. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados se expresaron como el promedio de tres valores \pm la desviación estándar. Se realizaron las siguientes pruebas: Varianza (ANOVA), comparaciones de medias (prueba de Tukey), todas las pruebas con un valor de confianza del 95%. El análisis se realizó en el software Statistical Analysis System (SAS) 9.4 y los elementos gráficos se realizaron en GraphPad Prism 6.0.

6.1 Porcentajes de rendimiento

En la tabla 5 se muestran los porcentajes de humedad de cada una de las partes de la planta evaluada y el rendimiento de extracción de los extractos etanólicos totales obtenidos por el método de extracción soxhlet, se puede apreciar que la parte de la planta que tiene la mayor capacidad de almacenamiento de agua son las flores, seguido de hojas y raíz. Por otro lado, las hojas fueron las que obtuvieron mayor porcentaje de extracción seguido del extracto de flores y raíz. En ambos casos la raíz es la que tiene menor porcentaje de humedad como de extracción, algo similar ocurre en el trabajo de Carrión, A. García, C. 2010, donde obtuvieron mayor porcentaje de extracción etanólica en hojas, que en el extracto de raíz de 24 plantas vegetales con usos medicinales.

Tabla 5. Porcentajes de humedad y rendimiento de la extracción etanólica de las partes de la planta de *Calea sessiliflora* Less.

MUESTRA	% HUMEDAD (p/p)	% EXTRACCIÓN (p/p)
HOJAS	43,5509 \pm 0,018	24,7428 \pm 0,002
FLORES	44,8368 \pm 0,018	10,9157 \pm 0,002
RAÍZ	25,7118 \pm 0,018	8,2079 \pm 0,002

6.2 Tamizaje Fitoquímico.

El tamizaje fitoquímico fue realizado empleando métodos colorimétricos los cuales se fundamentan en la posibilidad de que algunas moléculas presentes en los extractos puedan reaccionar según un grupo funcional específico y se evidencian cambios en la coloración de la solución o en algunos casos la presencia de precipitado. En la Tabla 6 se encuentran los resultados obtenidos para el tamizaje fitoquímico, se puede observar que al menos uno de estos metabolitos secundarios está presente en los extractos etanólicos de *C. sessiliflora* Less, los cuales se identificaron de forma cualitativa, los metabolitos encontrados fueron: alcaloides, cardiotónicos, cumarinas, saponinas, triterpenos y/o esteroides, taninos, flavonoides y derivados antracénicos libres.

Tabla 6. Resumen de los resultados en la determinación cualitativa de metabolitos secundarios.

METABOLITO	PRUEBA PARA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS	PRUEBA PARA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS		
		Hojas	Flores	Raíz
Alcaloides	Dragendorff.	-	-	-
	Mayer.	+	-	+
	Wagner.	+	+	+
Cardiotónicos	Reactivo de Baljet.	-	+	-
	Kedde.	-	+	-
	Raymond-Marthoud.	-	-	-
	KellerKillian.	-	-	-
Cumarinas Volátiles	Papel impregnado con NaOH (Observación UV).	+	-	-
Taninos	Reacción de Cloruro férrico.	+	+	+
Saponinas	Formación de espuma estable por 15 min.	+	-	-
Triterpenos y/o Esteroides	Liebermann-Burchard.	+	-	-
	Salkowski.	+	+	+
Flavonoides	Reacción de Shinoda.	+	+	+
	Reacción con NaOH.	+	+	+
Derivados antracénicos libres	Reacción de Borntrager.	-	+	-
	Reacción con Acetato de Mg.	-	-	-
	Test Hidróxido de Amonio.	-	+	-

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

6.2.1 Alcaloides.

1. Reacción con el reactivo de Dragendorff.

Una vez agregado el reactivo de Dragendorff se presentó una coloración rojiza-naranja acompañada de una turbidez en los extractos etanólicos totales de hojas, flores y raíz, es diferente al blanco, pero con tonalidad parecida al reactivo (naranja), no se tiene certeza de la respuesta de la prueba por tanto se considera la prueba negativa para alcaloides en estos extractos, ya que en el control positivo a parte de la coloración se obtuvo un precipitado de color marrón.

2. Reacción con el reactivo de Mayer.

Al adicionar el reactivo de Mayer en los extractos etanólicos totales de hojas y raíz, se presentó una coloración blanco crema acompañada de una turbidez, indicando la presencia de estos metabolitos, por tanto, se considera la prueba como positiva para alcaloides en estos extractos.

3. Reacción con el reactivo de Wagner.

Una vez agregado el reactivo de Wagner se presentó una coloración rojiza-naranja acompañada de una turbidez en todos los extractos, indicando que la prueba es positiva para alcaloides en estos extractos. Al transcurrir el tiempo en el extracto etanólico de hojas se generó un precipitado de color marrón parecido al del control positivo, en los otros extractos no se observó el precipitado.

Estas pruebas cualitativas ayudan a identificar la existencia de este metabolito secundario (alcaloides), pero no permiten determinar la naturaleza del alcaloide, pero en la reacción con el reactivo de Wagner se presentó un precipitado para el extracto de hojas, esto indica que la prueba es más sensible y por tanto más confiable para el tipo de alcaloides que están presentes en la muestra.

6.2.2 Cardiotonicos.

1. Reacción con el reactivo de Baljet:

Una vez adicionado el reactivo de Baljet se presentó una coloración rojiza-naranja en el extracto etanólico total de flores, indicando que la prueba es positiva para cardiotonicos en este extracto, para los extractos de hojas y raíz se considera la prueba negativa.

2. Reacción con reactivo de Kedde:

Para los extractos de hojas y raíz la coloración final es similar al control, indicando que la prueba es negativa, pero en el caso del extracto de flores al adicionar el reactivo de Kedde lentamente se nota presencia de coloración rojiza, una vez terminado de adicionar el reactivo y transcurrido un tiempo la solución se torna de color naranja, confirmando la presencia de cardiotónicos en este extracto, por la coloración sería positivo para cardenolidos en el extracto de flores.

3. Reacción con reactivo de Keller-Kiliani:

Los extractos presentaron una coloración amarilla-verdosa, no se notaron cambios significativos con respecto al antes y después de agregar los reactivos por tanto se considera como negativa la prueba.

4. Reacción con reactivo de Raymond- Marthoud.

La prueba se considera negativa, ya que se no hubo diferencias en color con respecto al control.

La reacción con el reactivo de Kedde ayuda a la identificación del anillo de lactona, núcleo esteroidal y los desoxiazúcares, los cuales son característicos de los glicósidos cardiotónicos, haciendo más sensible la identificación de este metabolito en especies vegetales.

6.2.3 Cumarinas Volátiles.

Para el control y los extractos de flores y raíz no aparecieron manchas fluorescentes en el papel filtro, en el extracto de hojas se alcanza a distinguir una mancha fluorescente de color amarillo-verdoso, es diferente a la del control, por tanto se considera como positiva esta prueba.

6.2.4 Taninos.

Para el control negativo la solución se torna de una coloración amarilla muy translúcida casi incolora, para el control positivo la solución se torna de color azul oscuro, para el extracto de hojas la coloración es azul oscura-negro indicando la presencia de taninos hidrolizables, en el extracto de flores se observa una coloración verdosa, color característico de la presencia de taninos condensados, de igual forma ocurre en el extracto de raíz ya que la coloración de la solución fue pardo-verdoso.

6.2.5 Saponinas.

Se observó en el extracto de hojas una cantidad de burbujas y su tamaño es mediano, en los extractos de flores y raíz se presentan burbujas, pero con un menor tamaño. Una vez transcurridos los 15 min se observa que hay burbujas en el extracto de hojas, en los extractos de flores y raíz han desaparecido las burbujas por tanto se considera la prueba negativa para flores y raíz y positiva para el extracto etanólico total de hojas.

6.2.6 Triterpenos y/o Esteroides.

1. Reacción Liebermann-Burchard

Para los extractos de flores y raíz no se presentaron cambios significativos entre el antes y después de la prueba, por tanto, se considera negativa, para el extracto de hojas entre los 13 - 15 min de reacción la solución se tornó verde-azulosa dando como positiva para esteroides.

2. Reacción Salkowski

Al transcurrir aproximadamente 1 h de reacción todos los extractos se tornaron de color rojo intenso, dando como positiva esta prueba en los extractos, siendo esta prueba la más efectiva para la identificación de este metabolito.

6.2.7 Flavonoides.

1. Reacción de Shinoda

Después de un tiempo aproximado de 3 h de reacción, todas las soluciones se tornan de una coloración roja, indicando la presencia de este metabolito secundario en los diferentes extractos de la planta de *C. sessiliflora* Less.

2. Reacción con NaOH

La coloración presentada en el control positivo es amarilla intensa, en el extracto de hojas la coloración de la solución es amarilla, para el extracto de flores se presenta una coloración naranja y para el extracto de raíz una coloración amarilla pálida, pero se parte de una solución incolora. Por tanto, se considera positiva la presencia de flavonoides en cada uno de los extractos etanólicos.

6.2.8 Derivados antracénicos libres.

1. Reacción de Borntrager.

En el control y los extractos de hojas y raíz la solución no tiene cambio de color significativo entre el antes y después por tanto se considera la prueba negativa, en el extracto de flores se presenta una coloración naranja intensa muy diferente al color inicial y al control, por eso que se considera positiva esta prueba para el extracto de flores.

2. Reacción con Mg (OAc)₂.

No se observa cambios significativos antes y después de la adición del acetato de magnesio por tanto se considera negativa la prueba en los extractos de hojas, flores y raíz.

3. Test Hidróxido de Amonio

Para el control, extractos de hojas y raíz, no se observó cambios significativos en la coloración de la solución, en el extracto de flores se tornó de una coloración naranja intenso, dando como positiva esta prueba, por tanto, se confirma la presencia de antraquinona en el extracto etanólico total de flores.

Tanto la Reacción de Borntrager como el test con NH_4^+OH son utilizadas para la determinación de quinonas libres, para el caso del extracto de flores se trata de antraquinonas libres.

6.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES, FLAVONOIDES TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos para la determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales, la actividad antioxidante mediante por los métodos DPPH, ABTS y RANCIMAT, resultados de citotoxicidad (*Artemia salina*), fitotoxicidad (*Allium cepa*), inhibición en el crecimiento de microalgas y la actividad anticoagulante de los extractos de cada una de las partes de la planta de *C. sessiliflora* Less.

Tabla 7. Resultados obtenidos para los extractos etanólicos totales de *C. sessiliflora* Less en el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y Actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS y Rancimat, como también la actividad citotóxica, fitotóxica y actividad anticoagulante.

MUESTRA	Fenoles totales ^a	Flavonoides totales ^b	DPPH ^c	ABTS ^d	Rancimat ^e	<i>Artemia franciscana</i> ^f	<i>Allium cepa</i> ^g	<i>Micro-algas</i> ^h	Actividad anticoagulante ⁱ
HOJAS	1952,857 ± 14,286	1646,773 ± 17,108	23,594 ± 0,345	1212,466 ± 28,703	1,500 ± 0,020	15,760 ± 0,949	22,740 ± 3,11	4,150 ± 0,366	22,872 ± 0,286
FLORES	1429,048 ± 26,513	1404,107 ± 17,108	56,439 ± 0,664	1060,952 ± 5,697	2,000 ± 0,020	15,950 ± 0,831	47,940 ± 7,55	0,559 ± 0,603	22,825 ± 0,274
RAÍZ	1127,460 ± 19,245	948,640 ± 19,399	107,482 ± 1,970	1827,500 ± 26,518	1,500 ± 0,020	149,030 ± 0,058	103,500 ± 12,31	27,534 ± 1,594	21,381 ± 0,441
ROMERO	----	----	32,743 ± 0,357	1713,999 ± 63,396	1,000 ± 0,020	----	----	----	----
A.A	----	----	8,205 ± 0,285	240,350 ± 0,304	----	----	----	----	----
α-Tocoferol	----	----	14,481 ± 0,133	622,905 ± 14,358	----	----	----	----	----
Trolox	----	----	7,533 ± 0,020	357,032 ± 4,853	----	----	----	----	----
BHT	----	----	----	----	1,000 ± 0,020	----	----	----	----
Control positivo	----	----	----	----	----	19,440 ± 0,577	----	----	----

Los resultados presentados se expresan como la media de tres determinaciones ± SD.

^a Contenido de fenoles totales expresado como mg de ácido gálico/ g de muestra seca (GAE/ g muestra)

^b Contenido de flavonoides totales expresado como mg de catequina/ g de muestra seca (ECAT/ g muestra)

^c Concentración efectiva media para inhibir el 50 % del radical DPPH EC₅₀ en mg/mL

^d Concentración efectiva media para inhibir el 50 % del radical ABTS EC₅₀ en mg/mL

^e Valor expresado en actividad protectora para el aceite de coco por el ensayo de Rancimat (no tiene unidades)

^f Concentración letal CL₅₀ en mg/mL de extracto a 24 h

^g Concentración Inhibitoria del crecimiento de las raíces de *Allium cepa* CI₅₀ en mg/mL de extracto a 72 h

^h Inhibición del crecimiento de las micro-algas *S. capricornutum* en 125 mg/mL de extracto a 72 h;

ⁱ Inhibición del veneno de *Bothrops asper* a 500 mg/mL de extracto.

6.3.1 Determinación del contenido de Fenoles Totales por el ensayo Folin-Ciocalteu.

En la Tabla 7 se encuentran los resultados obtenidos para el contenido de fenoles totales en los extractos de hojas, flores y raíz de *C. sessiliflora* Less, a una concentración de 250 mg/mL de extracto. El rango de valores obtenidos esta entre $1127,460 \pm 19,245$ y $1952,857 \pm 14,286$ mg Ac Gálico/ g muestra (GAE). De estas muestras, la que presentó mayor contenido de compuestos fenólicos fue el extracto de hojas, con una media de $1952,857 \pm 14,286$, seguido de los extractos de flores y raíz con medias de ($1429,048 \pm 26,513$ y $1127,460 \pm 19,245$) respectivamente. En la Figura 6 se presenta una curva de calibración utilizando ácido gálico en metanol como estándar.

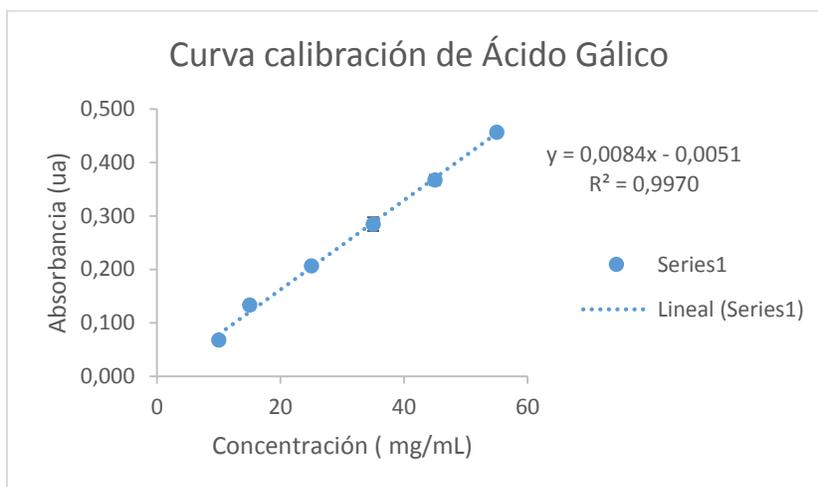


Figura 6. Curva de calibración con ácido gálico

Se realizó un análisis de varianza ANOVA de los resultados para comparar las partes de la planta de *C. sessiliflora* Less, (Hojas, Flores y Raíz), y las diferentes concentraciones utilizadas (100, 250 y 500 mg/mL de extracto). En la tabla 8 se muestra los resultados de ANOVA los cuales indican que existe diferencia significativa entre las partes de la planta y las concentraciones con respecto a la variable de respuesta GAE (mg Ac Gálico/ g muestra).

Tabla 8. Análisis de varianza para fenoles totales

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Concetr	2	11430686.53	5715343.27	382.66	<.0001
PPlanta	2	2147241.84	1073620.92	71.88	<.0001

Según la prueba de Tukey (Tabla 9) la cual agrupa todas las concentraciones evaluadas de cada parte de la planta y genera una media para realizar una comparación entre ellas. Se presenta diferencia significativa entre los extractos de las diferentes partes de la planta. El mayor contenido de GAE se encontró en el extracto de hojas, con una media de $1943.862 \pm 10,328$ mg Ac Gálico/ g muestra, seguido del extracto de flores ($1507.884 \pm 15,003$ mg Ac Gálico/ g muestra) y por último el extracto de raíz con media de $1261.852 \pm 6,608$ mg Ac Gálico/ g muestra.

Tabla 9. Prueba del rango estudentizado de Tukey para GAE en partes de la planta.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	PPlant
A	1943.86	9	Hojas
B	1507.88	9	Flores
C	1261.85	9	Raiz

En cuanto a las concentraciones, se puede observar en la Tabla 10 que hay diferencia significativa. La concentración de extracto que mayor contenido de GAE presentó fue la de 500 mg/mL con una media de 2399.95 mg Ac Gálico/ g muestra, seguidas de las concentraciones de 250 mg/L y 100 mg/L con medias de 1503.12 y 810.53 mg Ac Gálico/ g muestra respectivamente. Evidenciando de esta manera que existe una relación directamente proporcional entre el GAE presente en la muestra con el aumento de la concentración de extracto.

Tabla 10. Prueba del rango estudentizado de Tukey para GAE en concentraciones de extracto.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Concetr
A	2399.95	9	500
B	1503.12	9	250
C	810.53	9	100

En la Tabla 11, se presentan los tratamientos que se evaluaron para la determinación de GAE en los extractos. Según la prueba de Tukey el tratamiento con mayor contenido de GAE se obtuvo por el tratamiento 1, el cual consiste en el extracto etanólico total de hojas a una concentración de 500 mg/L, con una media de $2898.889 \pm 7,274$ mg Ac Gálico/ g muestra, seguido del tratamiento 2 que corresponde al extracto etanólico total de flores a una concentración de 500 mg/L

con una media de $2311.59 \pm 21,472$ mg Ac Gálico/ g muestra. Se encontró que el tratamiento 3 (Extracto etanólico total de raíz a 500 mg/L, con media de $1989.37 \pm 15,307$ mg Ac Gálico/ g muestra) y tratamiento 4 (EET de hojas a una Concentración de 250 mg/L con media de $1952.86 \pm 14,286$ mg Ac Gálico/ g muestra) no presentan diferencia significativa entre ellos, pero entre los demás tratamientos si existe diferencia significativa, esto quiere decir que, si se necesita una cantidad equivalente de fenoles expresados como GAE se puede utilizar uno de estos dos extractos a esas concentraciones, dicho en otras palabras para encontrar en el extracto de raíz una cantidad de fenoles igual a la presente en el extracto de hojas a una concentración de 250 mg/L se debe utilizar el doble de concentración del extracto de raíz. El tratamiento con menor contenido de GAE por el ensayo de Folin-Ciocalteu fue el tratamiento 9 que corresponde al extracto etanólico total de raíz con concentración de 100 mg/L con una media de $681.43 \pm 11,984$ mg Ac Gálico/ g muestra. De las partes de la planta evaluadas las hojas son las que presentan mayor contenido de fenoles y la raíz es la que cuenta con menor contenido de este metabolito secundario, en el trabajo de Gutierrez, Y. *et al.* 2018, reportan que el contenido de compuestos fenólicos para *Tagetes lucida cavanilles* una planta perteneciente a la familia Asteraceae es de $2,83 \pm 0,05$ mg/mL de extracto, lo que indica que el extracto de hojas de *C. sessiliflora* cuenta con aproximadamente 7 veces más el contenido de compuestos fenólicos, los cuales son expresados como mg Ac Gálico/ g muestra.

Tabla 11. Prueba del rango estudentizado de Tukey para GAE en los diferentes tratamientos

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Trat
A	2898.89	3	1
B	2311.59	3	2
C	1989.37	3	3
C			
C	1952.86	3	4
D	1429.05	3	5
E	1127.46	3	6
F	979.84	3	7
G	783.02	3	8
H	668.73	3	9

Nieto, M. *et al.* 2018, reporta que el contenido de fenoles en árnica (*Heterotheca inuloides*), es de 23 mg Ac Gálico/g muestra, en condiciones de riego con una solución nutritiva de 0.5 M, pero con respecto a su control el cual se encuentra a condiciones de campo, este contenido es aproximadamente 20 mg Ac Gálico/g muestra, lo cual concuerda con el resultado reportado para esta investigación con lo obtenido para el extracto de hojas de *C. sessiliflora* Less. ($1952,857 \pm 14,286$, Tabla 7) ya que tendría una diferencia mínima con lo encontrado el extracto de árnica por Nieto, estableciendo por lo anterior que estas especies son productoras de estos metabolitos secundarios y posiblemente serian una fuente de suministro de estos compuestos con actividad biológica.

6.3.2 Determinación de flavonoides totales por el método de tricloruro de Aluminio

En la Tabla 7 se encuentran los resultados para el contenido de flavonoides totales de los extractos de hojas, flores y raíz de *C. sessiliflora* Less, a una concentración de 250 mg/mL de extracto, obtenidos a partir de una curva de calibración utilizando catequina en metanol como estándar (Figura 7). Se encontró que el contenido de flavonoides totales en las partes de la planta varía entre $948,640 \pm 19,399$ y $1646,773 \pm 17,108$ mg Catequina/ g muestra. De estas muestras, la que presentó un mayor contenido de flavonoides fue el extracto de hojas, con una media de $1646,773 \pm 17,108$, seguido de los extractos de flores y raíz con medias de $1404,110 \pm 17,108$ y $948,640 \pm 19,399$ respectivamente.

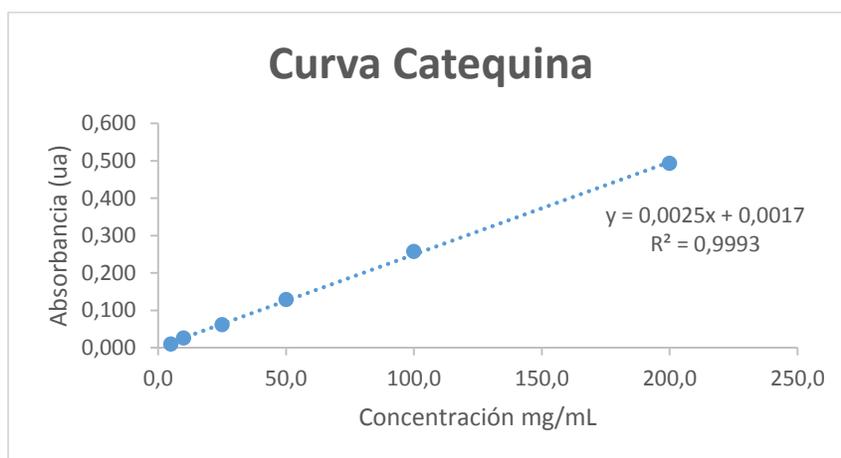


Figura 7. Curva de calibración con Catequina

En el análisis ANOVA mostrado en la Tabla 12 se observa que no existe diferencia significativa entre las repeticiones del triplicado a una concentración de 250 mg/mL de extracto, se encuentra que existe diferencia significativa entre las partes de la planta en su contenido flavonoides expresados como mg Catequina/ g muestra

(ECAT) con una probabilidad < 0.0001 %. En la Figura 8 (anexo 5) se muestra como se encuentra la distribución de ECAT en las partes de la planta de *C. sessiliflora* Less por el ensayo de tricloruro de aluminio, a una concentración de 250 mg/L de extracto. El extracto etanólico total de las hojas fue el que presentó mayor contenido de ECAT, seguido del extracto de flores y raíz. En la Tabla 13 se muestran los resultados de la prueba de Tukey para ECAT donde se observa que existe diferencia significativa entre las medias del contenido de ECAT presente en las partes de la planta. Según esta prueba estadística el contenido de ECAT más elevado se encuentra en el extracto de las hojas con una media de $1646.773 \pm 17,108$ mg Catequina/ g muestra, seguido del extracto de flores con media de $1404.110 \pm 17,108$ mg Catequina/ g muestra y por último el extracto de raíz con media de $948,640 \pm 19,399$ mg Catequina/ g muestra.

En la determinación de los metabolitos secundarios como fenoles y flavonoides totales a una concentración de 250 mg/mL se puede observar que en cada uno de los ensayos, la muestra que mayor contenido de estos metabolitos presentó fue el extracto de hojas, y en menor cantidad estos metabolitos se presentaron en el extracto de raíz, pero para el caso del extracto de flores se encuentra que a esta concentración estos metabolitos se encuentran en la misma cantidad, ya que al hacer una comparación de medias con una prueba T, entre el contenido de fenoles ($1429,048 \pm 26,513$) y flavonoides ($1404,110 \pm 17,108$) se encuentra que no existe diferencia significativa entre ellas, por tanto se asume que el contenido de estos metabolitos están en la misma proporción en el extracto de flores. Por otro lado, en el trabajo de Gutierrez, Y. *et al.* 2018, reportan que el contenido de flavonoides para *Tagetes lucida* Cavanilles es de $0,74 \pm 0,02$ mg/mL de extracto, planta perteneciente a la familia *Asteraceae*, al hacer una comparación entre este contenido y el presente en el extracto de hojas de *C. sessiliflora* se puede decir que este último cuenta con aproximadamente 22 veces mayor contenido de flavonoides.

En el estudio realizado por Nieto, M. *et al.* 2018, para árnica (*Heterotheca inuloides*), reportan que el contenido de flavonoides en es de 2100 mg Catequina/g muestra, en condiciones de riego con una solución nutritiva de 0.5 M, pero en condiciones de campo, este contenido es aproximadamente 1600 mg Catequina/g muestra, indicando que la producción de este metabolito secundario se ve favorecido por unas condiciones de riego, al hacer la comparación con el contenido de este metabolito en el extracto de hojas ($1646,773 \pm 17,108$ mg Catequina/g muestra) que fue la muestra que presentó mayor contenido de flavonoides, se podría establecer que en las condiciones de campo estas plantas tendrían la misma capacidad de producir este metabolito. Para el estudio de Nieto los contenidos de fenoles y flavonoides en árnica son muy parecidos, situación similar que ocurre con el resultado reportado para esta investigación con respecto al contenido de fenoles y flavonoides presentes en el extracto de flores de *C. sessiliflora* Less (Tabla 7).

Tabla 12. Análisis de varianza para medias de ECAT

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
rept	2	4125.5822	2062.7911	1.84	0.2715
PPlanta	2	704164.4089	352082.2044	313.80	<.0001

Tabla 13. Prueba del rango estudentizado de Tukey para las concentraciones de ECAT

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	PPlanta
A	1646.77	3	Hojas
B	1404.11	3	Flores
C	948.64	3	Raiz

6.3.3 Determinación de la actividad antioxidante de *Calea sessiliflora* Less por el método DPPH

En la Tabla 7 se encuentran los resultados obtenidos para la inhibición del radical DPPH a una concentración efectiva media (EC_{50}) de los extractos de romero, hojas, flores y raíz, como también para los estándares comerciales utilizados en el ensayo (ácido ascórbico, α -tocoferol y trolox). Se encontró que EC_{50} para el ensayo varía entre $7,533 \pm 0,020$ y $107,482 \pm 1,970$ mg/L de extracto. De las muestras evaluadas el extracto de hojas de *C. sessiliflora* Less ($23,594 \pm 0,345$ mg/L) fue la que necesitó la menor concentración para estabilizar el radical DPPH.

En la figura 9 se puede apreciar la distribución de las concentraciones de las muestras evaluadas para inhibir el 50 % del radical DPPH (EC_{50}), se observa que hay diferencia significativa con una probabilidad < 0.0001 % entre las muestras evaluadas. Para este ensayo, una mayor concentración de extracto requerida para inhibir el radical DPPH significa una menor actividad antioxidante. La muestra que necesita mayor concentración para inhibir el 50% (EC_{50}) del radical es el extracto de raíz con una media de $107.482 \pm 1,970$ mg/mL de extracto (Tabla 7). De las muestras evaluadas (estándares y extractos) la que necesita menor concentración para estabilizar el 50 % de los radicales DPPH presentes en el medio de reacción es el trolox (EC_{50}) con una media de $7.533 \pm 0,020$ mg/mL, siendo esta la muestra con mayor capacidad antioxidativa entre los estándares y extractos. En la prueba de Tukey (tabla 14), se puede observar que no existe diferencia significativa entre los estándares Trolox y Ácido Ascórbico con medias de $7.533 \pm 0,020$ y $8.204 \pm 0,285$ mg/mL respectivamente, pero si existe diferencia significativa con la muestra de Tocoferol con media de 14.481 mg/mL que también es un estándar comercial y

se caracterizan por su alta actividad antioxidante (Mezadri, T. 2005), por tanto utilizar los estándares Trolox y Ácido Ascórbico estadísticamente sería igual, obteniendo similares comportamientos respecto a la inhibición del radical DPPH. En la Tabla 14 se establece que existe diferencia significativa entre los extractos evaluados, encontrando que el extracto de hojas es el que tiene una mayor acción para inhibir el 50 % del radical DPPH (EC_{50}) debido a que es el extracto que necesita una menor concentración para inhibir el radical con una media de $23.593 \pm 0,345$ mg/mL, seguido de los extractos de romero ($32.743 \pm 0,357$ mg/mL), de flores ($56.439 \pm 0,664$ mg/mL) y por último el extracto de raíz $107.482 \pm 1,970$ mg/mL. Al hacer una comparación de la actividad anti oxidativa del radical DPPH entre las EC_{50} del estándar Trolox y el extracto de hojas se encuentra que el Trolox tiene aproximadamente 3 veces mayor actividad antioxidante que el extracto de hojas, algo de resaltar de esta comparación es que el estándar se considera una sustancia pura y tiene una actividad definida, en el extracto hay una mezcla de metabolitos que pueden o no tener actividad, presentando efectos de sinergia o antagonismo para la actividad, por tanto se puede asumir que el extracto de hojas tiene una buena actividad antioxidante y se podría seguir haciendo estudios con el aislamiento de metabolitos presentes en el extracto, para así poder potencializar el efecto anti oxidativo. Por otro lado el extracto de raíz EC_{50} con media de $107.482 \pm 1,970$ mg/mL fue el que tuvo una menor actividad antioxidante por este ensayo. Para lograr que el extracto de raíz tenga una actividad similar al del extracto etanólico de hojas frente al radical DPPH se debe utilizar aproximadamente 5 veces más esta concentración (EC_{50}) y lo que se esperaría teóricamente es que estos resultados sean muy similares bajo las mismas condiciones de trabajo.

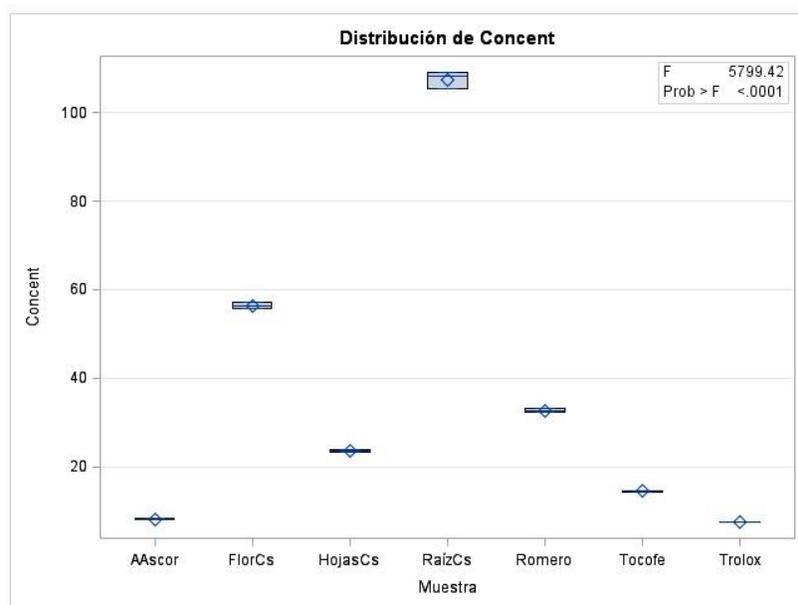


Figura 9. Distribución de la concentración en las muestras evaluadas para inhibir el 50 % del radical DPPH

Por otro lado en el trabajo reportado por Bendif, H. Boudjeniba, M. Djamel, M. *et al.* 2017, establecen que el EC₅₀ para el extracto de romero es de 26.5 ± 0.4, que al compararlo con el obtenido en este trabajo (32,743 ± 0,357) es muy similar demostrando que este extracto mantiene una robustez para este método de la medición de la actividad antioxidante, pero al realizar la comparación de este valor con el valor obtenido del extracto de hojas de *C.sessiliflora* Less (23,594 ± 0,345 mg/mL), se podría asumir que el extracto de hojas tiene aproximadamente 1,4 veces mayor efectividad para la inhibición del radical DPPH que el extracto de romero el cual se le conoce y atribuye que tiene una actividad antioxidante conocida (Baj, T. Baryluk, A. Sieniawska, E. 2018). De igual forma otros autores reportan en sus trabajos que el EC₅₀ para el extracto de romero evaluado por el ensayo DPPH es de 28.5 ± 1.5 (Zaouali, Y. Bouzaine, T. Boussaid, M. 2010), para el mismo trabajo también reportan que el extracto de flores de romero tiene una EC₅₀ de 55.000 ± 0.900 y para este estudio se encontró una EC₅₀ de 56.439 ± 0,664 mg/mL de extracto de flores, lo que daría un indicio de que los principios activos de las dos plantas se encuentran en las hojas. En el trabajo de Bouyanya, A. *et al.* 2017, establecen que a una concentración de 30 µg/mL de extracto de romero tiene un porcentaje de inhibición del 25 % del radical, pero a una concentración de 60 µg/mL, este porcentaje no sufre cambios bruscos, pero al duplicar esta concentración su porcentaje de inhibición supera el 65 %, por lo anterior se demuestra que el extracto etanólico total de hojas de *C. sessiliflora* Less tiene un potencial antioxidante que supera al del extracto de romero, por tanto se podría pensar en el uso del extracto de hojas de *C. sessiliflora* Less como una fuente de metabolitos para la industria.

Tabla 14. Prueba del rango estudentizado de Tukey para las concentraciones de los tratamientos evaluados para inhibir el 50 % del radical DPPH

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Muestra
A	107.4820	3	RaízCs
B	56.4397	3	FlorCs
C	32.7433	3	Romero
D	23.5937	3	HojasCs
E	14.4813	3	Tocofe
F	8.2047	3	AAscor
F			
F	7.5333	3	Trolox

6.3.4 Determinación de la actividad antioxidante de *Calea sessiliflora* Less por el método ABTS^{•+}

En la Tabla 7 se encuentran los resultados obtenidos para la concentración efectiva media de inhibición del radical ABTS por parte de los extractos de romero, hojas, flores y raíz, como también de los estándares comerciales utilizados en el ensayo (ácido ascórbico, α -tocoferol y trolox). Se encontró que EC₅₀ para el ensayo varía entre 240,350 \pm 0,304 y 1827,500 \pm 26,518 mg/mL. De los estándares el que tuvo mayor actividad fue el ácido ascórbico y para las muestras evaluadas el extracto de flores de *C. sessiliflora* Less fue la que tuvo mayor acción sobre el radical ABTS.

En el análisis ANOVA mostrado en la Tabla 15 se observa que no existe diferencia significativa entre las repeticiones del tratamiento, pero sí existe diferencia significativa entre los tratamientos con una probabilidad < 0.0001 %. En la Tabla 16 se muestran los resultados de la prueba de Tukey donde se hace una comparación de medias para inhibir el 50 % del radical ABTS^{•+} (EC₅₀), se muestra que existen diferencias significativas para los extractos de hojas, flores, raíz y romero, como también entre los estándares comerciales Tocoferol, Trolox y Ácido Ascórbico.

Para esta investigación los extractos tienen mayor afinidad para reaccionar con el radical DPPH que con el radical ABTS^{•+} debido a que se necesita de una menor concentración para estabilizar el 50 % de los radicales presentes en el medio de reacción y así contrarrestar su modo de acción, ya que al hacer la comparación de los valores de EC₅₀ en los ensayos evaluados, se tiene que son mayores en el ensayo ABTS^{•+} que en el DPPH, tal como lo ha expresado en su trabajo Fernandez, M. 2005. Además se observa en el ensayo DPPH que los estándares tienen un comportamiento similar con el ensayo ABTS^{•+}, pero en el DPPH al hacer una comparación de medias con la prueba de Tukey (Tabla 14) se encuentra que entre los estándares A. ascórbico y Trolox no tienen diferencia significativa, por tanto se podría asumir que el Ácido Ascórbico es el estándar que tiene una mayor actividad antioxidante para los dos métodos (DPPH y ABTS^{•+})

En los resultados de la prueba de Tukey (Tabla 16) se puede apreciar que existe diferencia significativa entre los extractos evaluados, se encuentra que el extracto de flores de *C. sessiliflora* Less es el que tiene mayor poder para estabilizar el radical ABTS^{•+} con una media de 1060,95 \pm 5,697 mg/mL, indicando que la muestra necesita una menor concentración para inhibir el 50 % del radical (EC₅₀) en comparación a las demás, ya que para este tipo de ensayos, entre menor concentración utilizada, mayor será la actividad que presente la muestra.

Al hacer una comparación de la actividad antioxidante por el ensayo del radical ABTS^{•+} entre las EC₅₀ del estándar Ácido Ascórbico y el extracto de flores, se encuentra que el Ácido Ascórbico tiene aproximadamente 4.4 veces mayor actividad antioxidante que el extracto de flores, algo de resaltar de esta comparación es que en el extracto hay una mezcla de metabolitos, por tanto se puede asumir que el

extracto de flores tiene una buena actividad antioxidante y que se podría seguir realizando estudios que conlleven al aislamiento y evaluación de metabolitos presentes en el extracto, proporcionando nuevos conocimientos y contribuyendo así con la búsqueda de nuevos metabolitos que pudieran ser utilizados en futuras investigaciones logrando potencializar el efecto antioxidante que se encuentre en la muestra.

Siguiendo con el orden descendiente en actividad antioxidante de los extractos por el ensayo de ABTS^{•+} seguiría el extracto de hojas, romero y raíz con medias de $1212,470 \pm 28,703$; $1714,00 \pm 63,396$ y $1827,500 \pm 26,518$ mg/mL respectivamente. En la prueba de Tukey se considera al extracto etanólico total de flores como el que contiene su mayor actividad para inhibir el radical ABTS^{•+}, y el que tiene la menor eficiencia para inhibir al radical ABTS^{•+} es el extracto etanólico total de raíz. Se ha podido observar hasta el momento que el extracto de raíz ha sido el que ha tenido menor acción antioxidante por los ensayos DPPH y ABTS^{•+}, lo que quiere decir esto es que los principios activos con actividad antioxidante de la planta de *C. sessiliflora* Less, se encuentran en las partes aéreas (hojas y flores) debido a que en estos extractos fue en donde se encontró la mayor actividad frente a los métodos evaluados, también en estas muestras fue donde se halló la mayor cantidad de metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides) los cuales tienen un gran interés biológico, estos metabolitos se encontraban en mayor proporción en hojas, seguido de flores y por último raíz. En el trabajo Neira, A. 2009 expresa que los fenoles y flavonoides se encuentran más en las partes aéreas de las plantas. Algunos de los fenoles y flavonoides se les atribuye un papel importante como antioxidantes, estos tienen un mecanismo de defensa esencial contra patógenos, para la reparación de tejidos dañados y están siendo utilizados en productos naturales para proporcionar tratamientos seguros que sean efectivos para pacientes con trastornos inflamatorios tal como lo reporta Salvan, J. Gagliotti, S. Jim, Y. et al. 2017.

En el trabajo de Nieto, M. et al. 2018, establece que la concentración de los metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos se ve modificada por estrés biótico y abiótico al que se somete la planta. Factores como la temperatura, radiación, nutrición y el riego, son factores de estrés abiótico que afectan la concentración de compuestos fenólicos presentes en una planta y a su vez esto generaría la acumulación de estas especies en las partes aéreas de la planta.

Tabla 15. Análisis de varianza para el radical ABTS^{•+}

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Repet	2	1495.915	747.957	0.89	0.4373
Tratto	6	7127727.076	1187954.513	1408.52	<.0001

Tabla 16. Prueba del rango estudentizado de Tukey para las concentraciones de los tratamientos evaluados para inhibir el 50 % del radical ABTS**

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Tratto
A	1827.50	3	RaízCs
B	1714.00	3	Romero
C	1212.47	3	HojasCs
D	1060.95	3	FlorCs
E	622.91	3	Tocofe
F	357.03	3	Trolox
G	240.35	3	AAscor

Correlación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante

En la Tabla 17 se presenta el coeficiente de correlación lineal entre el contenido de fenoles, flavonoides totales y actividad antioxidante, esta relación se encuentra en un rango de (-0,883; -0,998). El análisis de la relación entre la actividad captadora de radicales DPPH y ABTS y el contenido de fenoles y flavonoides totales muestra una correlación inversa alta (Tabla 17).

Las correlaciones son completamente lineales cuando se relaciona la actividad antioxidante con la concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos. Se establece un comportamiento directamente proporcional entre estas variables, a mayor contenido de compuestos fenólicos se presenta una mayor actividad antioxidante, el método de Folin-Ciocalteu es específico para compuestos fenólicos, y la buena actividad antioxidante está asociada a este tipo de compuestos por tanto se establece que la actividad presentada por los extractos se debe a los metabolitos fenólicos presentes en la muestra. Algo importante de resaltar en este análisis es que los extractos no son sustancias puras, se encuentran otros metabolitos secundarios y es posible que se presenten comportamientos sinérgicos o antagonistas entre los compuestos fenólicos y los otros metabolitos presentes en el extracto, favoreciendo o afectando la actividad. En el trabajo que realizó Odabasoglu, F. Aslan, A, *et al.* 2005, sobre el análisis de actividad antioxidante y compuestos fenólicos establece una relación directa, además establece que este comportamiento lineal es mayor en las partes aéreas de las plantas debido a que es aquí donde se concentran más estos metabolitos secundarios.

La relación entre el contenido de fenoles y la capacidad captadora de radicales (DPPH y ABTS), sugiere que aproximadamente el 90 % de la actividad evaluada para los extractos etanólicos totales de las partes de la planta de *C. sessiliflora* Less,

resulta de la contribución de los compuestos fenólicos, por tanto, es posible asumir que la actividad antioxidante que presentan estos extractos se debe a este tipo de metabolitos secundarios.

Tabla 17. Coeficiente de correlación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Muestra	Fenoles Totales		Flavonoides Totales	
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
Hojas	-0,998	-0,996	-0,959	-0.957
Flores	-0,996	-0,989	-0,949	-0,975
Raíz	-0,970	-0,995	-0,883	-0,967

6.3.5 Determinación de la actividad antioxidante de por el ensayo de RANCIMAT de *Calea sessiliflora* Less.

En la Tabla 7 se encuentran los resultados obtenidos para la determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de Rancimat, Los valores obtenidos para el factor de protección para el aceite de coco por los extractos de romero, hojas, flores y raíz a una concentración de 1000 mg/mL de extracto fueron 1.0, 1.5, 2.0, 1.5 respectivamente y 1.0 para el estándar BHT a una concentración de 200 mg/mL.

Tabla 18. Resultados de la prueba T de student.

DF	Valor t	Pr > t
4	7.48	0.0017
2	10.00	0.0099
3a	8.66	0.0032
3b	5.74	0.0105

En la Tabla 18 se muestran los resultados de la prueba T de student para los diferentes tratamientos evaluados en el ensayo de Rancimat, donde se puede observar que hay diferencia significativa $Pr = 0.0017$ en los diferentes tratamientos evaluados, es decir, al menos la media de un tratamiento es estadísticamente diferente a los demás tratamientos. Para verificar cuales tratamientos eran estadísticamente diferentes se realizó otra prueba de T donde se compara los tratamientos de las partes de la planta de *C. sessiliflora* Less (hojas, raíz y flores), como resultado se obtuvo una $Pr = 0.0099$ (Tabla 18), esto indica que los tratamientos hojas y raíz son diferentes al tratamiento de flores, es de esperarse debido a que el valor de medias en el factor de protección para los tratamientos hojas y raíz es de 1.5 y para el tratamiento de flores es de 2.0, por esta razón, el extracto etanólico total de flores es el que tiene la mayor acción protectora para el aceite de coco y por tanto mayor acción anti-oxidante por el ensayo de Rancimat. Para conocer las diferencias entre los demás tratamientos se realizó una prueba T para los tratamientos romero, BHT, hojas y raíz mostrando diferencia significativa

Pr = 0.0032 (Tabla 18), entre los tratamientos romero, BHT su factor de protección es de 1.0, por tanto sus medias no tendrían diferencia significativa, en los tratamientos hojas y raíz su valor de medias en su factor de protección es de 1.5 generando que no haya diferencia significativa entre ellos, en cambio, los tratamientos de romero, BHT vs hojas, raíz si presentan diferencia significativa, estos resultados indican que los extractos de hojas y raíz tienen mayor capacidad anti oxidativa que el extracto de romero y el estándar comercial BHT (200 mg/mL). Por otro lado se realizó una prueba T entre los tratamientos romero, BHT, hojas y flores para los cuales se tiene un factor de protección de 1.0, 1.0, 1.5 y 2.0 respectivamente, generando diferencia significativa entre ellos debido a una Pr = 0.0105 (Tabla 18), teniendo en cuenta las pruebas anteriores y sabiendo que existe diferencia significativa entre romero, BHT vs hojas (Tabla 18, DF 3a) y hojas, raíz y flores (Tabla 18, DF 2), se realiza esta prueba para corroborar que el tratamiento de flores es estadísticamente significativo a los demás tratamientos y por tanto tiene la mayor capacidad protectora para el aceite de coco en el ensayo de Rancimat, se puede asumir que el extracto de flores es el que tiene la capacidad anti oxidativa más alta, seguido del extracto hojas, raíz, romero y por último el estándar comercial BHT.

En estudios previos establecen al extracto de romero como uno de los aditivos muy utilizados para la estabilización de aceites, debido a esto los extractos de romero han sido empleados en la estabilización de diversas matrices alimenticias, en donde ha demostrado tener un marcado efecto protector contra fenómenos de peroxidación lipídica (Peiretti, P. *et al.* 2012), por lo que en la actualidad se ha venido empleando en la estabilización de aceites y grasas (Doolaege, E. Vossen, E. Raes, K. *et al.* 2012). Como es el caso de la utilización del extracto de romero para retardar la oxidación en el aceite de almendra de Choibá (Piedrahita, C. 2015) a una concentración de 1000 mg/L de extracto reportando un factor de protección mayor que el del estándar utilizado BHT 200 mg/L. para esta investigación se obtuvieron factores de protección iguales para el extracto de romero y el estándar BHT a las mismas condiciones, pero al hacer una comparación del extracto de romero con los extractos etanólicos de *C. sessiliflora* Less se puede apreciar que el extracto de flores tiene un factor de protección mayor, los resultados anteriores demostraron que el extracto de flores aumentó el tiempo de estabilidad oxidativa del aceite de Coco, lo que posiblemente lo postularía como un extracto para ser utilizado en la estabilización de matrices lipídicas siempre y cuando cumpla con los parámetros de la normativa los cuales indican que debe ser inocuo, activo a bajas concentraciones, liposolubles y estables procesos ordinarios de la tecnología alimentaria.

6.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVAD CITOTÓXICA

6.4.1 Ensayo de toxicidad sobre *Artemia franciscana*

En la Tabla 7 se encuentran los resultados obtenidos para la concentración letal CL_{50} en *Artemia franciscana* a las 24 h de exposición con los extractos de hojas, flores y raíz, como también el control positivo (Dicromato de potasio) utilizado para el ensayo. Se encontró que CL_{50} para el ensayo varía entre $15,760 \pm 0,949$ y $149,030 \pm 0,058$ mg/mL. De las muestras evaluadas el que tuvo mayor actividad fue el extracto de hojas de *C. sessiliflora* Less y el extracto de raíz fue el que tuvo menor acción sobre la mortalidad en *A. franciscana*, en la Figura 10 se presenta el gráfico de la concentración letal (LC_{50}) para *Artemia franciscana* a las 24 h.

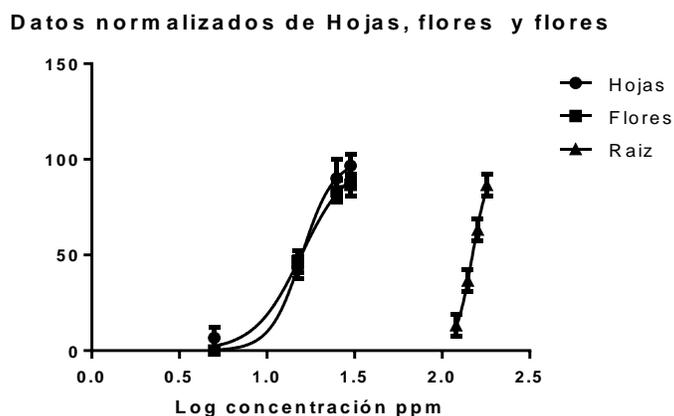


Figura 10. Concentración letal (LC_{50}) para *Artemia franciscana* a las 24 h.

En el análisis ANOVA mostrado en la Tabla 19 se observa que existe diferencia significativa entre los extractos y concentraciones evaluadas frente a la mortalidad con una probabilidad < 0.0001 %. En la Figura 11 (anexo 6) se puede observar la distribución de la mortalidad frente a los extractos evaluados encontrando que en todos los casos hubo respuesta de mortalidad de *Artemia franciscana* con respecto al testigo que no hubo mortalidad, el extracto de hojas presentó mayor mortalidad, seguido del extracto de flores y raíz. En la Tabla 20 se puede apreciar las comparaciones importantes del ensayo entre la mortalidad y los respectivos extractos. El testigo no presenta mortalidad, por tanto, los extractos de hojas, flores, raíz y control positivo frente al testigo presentan diferencia significativa, es decir la aplicación del extracto influye en la mortalidad de la *Artemia franciscana*, entre los extractos de hojas vs raíz y hojas vs control positivo existe diferencia significativa, algo que no ocurre entre hojas vs flores, flores vs raíz, flores vs control positivo y raíz vs control positivo que no se presenta diferencia significativa. En la Tabla 21 se presenta los resultados de la prueba de Tukey donde se agrupan los tratamientos con la misma letra para indicar que no hay diferencia significativa entre ellos, los tratamientos 9 (Hojas a una concentración 30 mg/mL), 5 (Control positivo a una concentración 40 mg/mL), 8 (Hojas a una concentración 25 mg/mL), 17 (Raíz a una concentración 180 mg/mL), 13 (Flores a una concentración 30 mg/mL) y 12 (Flores a una concentración 25 mg/mL) no presentan diferencia significativa, por tanto estos

tratamientos tienen un comportamiento similar con respecto a la mortalidad, en este grupo los tratamientos 9 y 8 pertenecen al extracto de hojas en diferente concentración, estos presentan una tasa de mortalidad que no es significativamente diferente, es decir que al utilizar una concentración de 30 mg/mL se esperaría igual comportamiento al utilizar la concentración de 25 mg/mL frente a la mortalidad de *Artemia franciscana*, análogamente ocurre para los tratamientos 13 y 12 pertenecientes al extracto de flores, con respecto a los tratamientos 9, 13 y 17 no existe diferencia significativa, pero los tratamientos 9 y 13 son 6 veces más letales que el tratamiento 17. Los tratamientos 16 (Raíz a una concentración 160 mg/mL) y 4 (Control positivo a una concentración 30 mg/mL) pertenecen al grupo B, estos no presentan diferencia significativa, pero el tratamiento 4 (Control positivo a una concentración 30 mg/mL) y 11 (Flores a una concentración 15 mg/mL) pertenecientes al grupo C no tienen diferencia significativa entre ellos, pero si existe diferencia significativa entre los tratamientos 11 y 16. Los tratamientos 11, 7 y 15 no difieren significativamente entre ellos, los tratamientos 15 y 3 no presentan diferencias significativas, sin embargo los tratamientos 11 y 7 no son parecidos al tratamiento 3. Los tratamientos 3 y 14 no presentan diferencias significativas al igual que los tratamientos 14, 2, 6, 10 y 1 los cuales fueron los que presentaron menor mortalidad.

Al no encontrar diferencias significativa entre el extracto de hojas y flores con respecto a la variable de respuesta (mortalidad de *Artemia franciscana* a las 24 h), hay que tener en cuenta la producción del extracto, ya que es más factible la obtención del extracto etanólico de hojas debido a que la planta cuenta con la capacidad de producción de hojas durante todas las épocas del año, mientras que las flores solo se encuentran en etapas de floración (2-3 veces al año), además que el porcentaje de extracción para las hojas es mayor que el presentado por las flores (Tabla 4).

En el estudio de Jaramillo, A. 2014, determina la concentración de letalidad de los extractos de Diente de león (*Taraxacum officinale*), Escoba Amarga (*Parthenium hysterophorus*), las cuales son especies de la familia *Asteraceae* a la cual pertenece la planta de esta investigación, Jaramillo establece que la concentración letal a las 24 h de exposición del extracto de *Taraxacum officinale* es de 274.34 mg/mL y para *P. hysterophorus* de 95.88 mg/mL, La categoría de toxicidad fue designada de acuerdo a la clasificación de citotoxicidad del CYTED como moderadamente tóxico y altamente tóxico, respectivamente. Para los extractos de la planta de estudio según el CYTED se les ha clasificado dentro del rango de altamente tóxico para extracto de hojas y flores, para el extracto de Raíz como moderadamente tóxico, lo cual concuerda con lo encontrado por Jaramillo, C. *et al.* 2016.

En otro estudio se comprobó la actividad de los extractos etanólicos de hojas y flores de *Achyrocline bogotensis* especie perteneciente a la familia *Asteraceae* la cual es una especie de referencia para la determinación de la toxicidad. El extracto etanólico total de hojas mostraron actividad bacteriostática y fungistática, así como

poder bactericida contra el *S. aureus* y *S. epidermis*, el extracto etanólico de flores presentó actividad contra *S. aureus* y *S. epidermis* (Cárdenas, M. Sanchez, E. Torrenegra, R. 1990), mostrando así la actividad biológica por parte de especies pertenecientes a esta familia.

Tabla 19. Análisis de varianza para mortalidad de *Artemia franciscana*

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EXTRACT	2	21.5555556	10.7777778	34.68	<.0001
CONCEN	9	530.0000000	58.8888889	189.47	<.0001

Tabla 20. Análisis de las comparaciones para la mortalidad de *Artemia franciscana*

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***.				
EXTRACT Comparación	Diferencia entre medias	Límite de confianza al 95% Simultáneo		
HOJAS - FLORES	0.5000	-0.1525	1.1525	
HOJAS - RAIZ	0.9167	0.2642	1.5691	***
HOJAS - CONTROL+	1.0833	0.4309	1.7358	***
HOJAS - TEST1	5.9167	4.8850	6.9483	***
FLORES - HOJAS	-0.5000	-1.1525	0.1525	
FLORES - RAIZ	0.4167	-0.2358	1.0691	
FLORES - CONTROL+	0.5833	-0.0691	1.2358	
FLORES - TEST1	5.4167	4.3850	6.4483	***
RAIZ - HOJAS	-0.9167	-1.5691	-0.2642	***
RAIZ - FLORES	-0.4167	-1.0691	0.2358	
RAIZ - CONTROL+	0.1667	-0.4858	0.8191	
RAIZ - TEST1	5.0000	3.9683	6.0317	***
CONTROL+ - HOJAS	-1.0833	-1.7358	-0.4309	***
CONTROL+ - FLORES	-0.5833	-1.2358	0.0691	
CONTROL+ - RAIZ	-0.1667	-0.8191	0.4858	
CONTROL+ - TEST1	4.8333	3.8017	5.8650	***
TEST1 - HOJAS	-5.9167	-6.9483	-4.8850	***
TEST1 - FLORES	-5.4167	-6.4483	-4.3850	***
TEST1 - RAIZ	-5.0000	-6.0317	-3.9683	***
TEST1 - CONTROL+	-4.8333	-5.8650	-3.8017	***

Tabla 21. Prueba del rango estudentizado de Tukey para la mortalidad de *Artemia franciscana*.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.					
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT	[mg/mL]	
	A	9.6667	3 9	Hojas, 30	
	A	9.6667	3 5	Cont+, 40	
	A	9.0000	3 8	Hojas, 25	
	A	8.6667	3 17	Raíz, 180	
	A	8.6667	3 13	Flores, 30	
	A	8.3333	3 12	Flores, 25	
	B	6.3333	3 16	Raíz, 160	
C	B	6.0000	3 4	Cont+, 30	
C	D	4.6667	3 11	Flores, 15	
	D	4.3333	3 7	Hojas, 15	
E	D	3.6667	3 15	Raíz, 140	
E	F	2.6667	3 3	Cont+, 20	
G	F	1.3333	3 14	Raíz, 120	
G		1.0000	3 2	Cont+, 10	
G		0.6667	3 6	Hojas, 5	
G		0.0000	3 10	Flores, 5	
G		0.0000	3 1	Testigo	

6.4.2 Ensayo de Fitotoxicidad sobre *Allium cepa*

En la Tabla 7 se encuentran los resultados obtenidos para los extractos de hojas, flores y raíz en el ensayo de fitotoxicidad en *Allium cepa*, la concentración Inhibitoria CI_{50} a 72 h tiene un rango entre $22,743 \pm 3,112$ y $103,500 \pm 12,312$ mg/mL. De las muestras evaluadas la que tuvo mayor actividad fue el extracto de hojas, seguido del extracto de flores y por último el extracto de raíz de *C. sessiliflora* Less con medias de $22,743 \pm 3,112$; $47,937 \pm 7,545$ Y $103,500 \pm 12,312$ mg/mL respectivamente, Figura 12 se presenta la gráfica de concentración inhibitoria (IC_{50}) del crecimiento de las raíces de *Allium cepa* a 72 h por los extractos.

En el análisis ANOVA mostrado en la Tabla 22 se observa que existe diferencia significativa entre los extractos y concentraciones evaluadas frente a la inhibición del crecimiento de las raíces de las cebollas con una probabilidad < 0.0001 %. En la Figura 13 (anexo 7) se puede observar la distribución del crecimiento de la raíz de las cebollas frente a los extractos evaluados encontrando que en todos los casos

hubo respuesta de crecimiento respecto al testigo que fue en que tuvo mayor crecimiento, el extracto que presentó mayor inhibición en el crecimiento de la raíz de las cebollas es el extracto de hojas, seguido del extracto de flores y por último el extracto de raíz. En la Tabla 23 (anexo 8) se puede apreciar las comparaciones importantes del ensayo entre el crecimiento de la raíz en las cebollas y los respectivos extractos. El testigo frente a los extractos de hojas, flores, raíz presentan diferencia significativa, es decir la aplicación del extracto influye en el crecimiento de las raíces de las cebollas, entre los extractos de raíz vs hojas y raíz vs flores existe diferencia significativa, algo que no ocurre entre los extractos de hojas vs flores en algunas concentraciones, que no se presenta diferencia significativa y por tanto se vería igual respuesta al aplicar cualquiera de estos extractos.

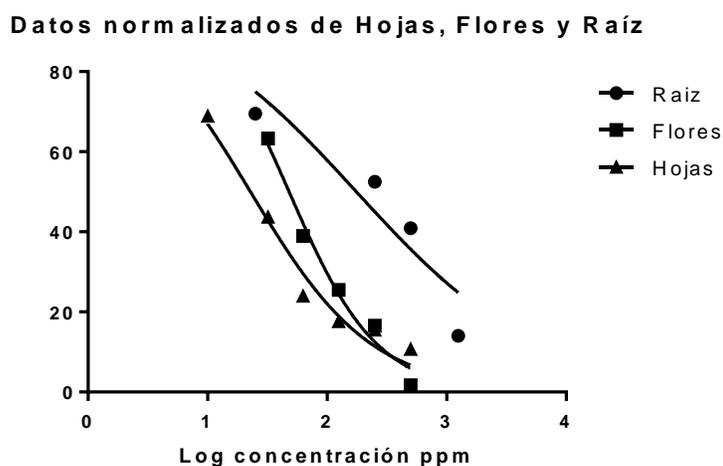


Figura 12. Concentración inhibitoria del crecimiento (IC₅₀) de las raíces de *Allium cepa* a 72 h.

En la Tabla 24 se presenta los resultados de la prueba de Tukey en orden descendente con respecto a la inhibición del crecimiento de las raíces de las cebollas, donde se agrupan los tratamientos con la misma letra para indicar que no hay diferencia significativa entre ellos, el tratamiento 1 fue el que obtuvo mayor crecimiento de las raíces de las cebollas con una media de 2,7157 cm de longitud corresponde al testigo, los tratamientos 2 (Raíz a una concentración 25 mg/mL) y 11 (Hojas a una concentración 10 mg/mL) son aquellos que presentan una menor concentración de extractos pero aun así se observa que hay influencia en el crecimiento de la raíz con respecto al testigo, siendo este grupo el que presento mayor respuesta de crecimiento, los tratamientos 6 (Flores a una concentración 32 mg/mL), 3 (Raíz a una concentración 250 mg/mL), 12 (Hojas a una concentración 32 mg/mL) no presentan diferencia significativa entre ellos, es decir que se podría utilizar una de estas concentraciones de los respectivos extractos para poder obtener el mismo resultado en la inhibición del crecimiento de las raíces, los tratamientos 3, 12 y 4 (Raíz a una concentración 500 mg/mL) según la prueba de Tukey hay valores cercanos entre sus medias por eso los toma que no tuvieran

diferencia significativa pero genera otro grupo (D), por lo que se considera que el tratamiento 4 es una transición hacia el siguiente grupo (E) para no tener valores tan dispersos, de igual manera los tratamientos 12, 4 y 7 (Flores a una concentración 63 mg/mL) no presentan diferencia significativa, los tratamientos 8 (Flores a una concentración 125 mg/mL), 13 (Hojas a una concentración 63 mg/mL), 14 (Hojas a una concentración 125 mg/mL), 9 (Flores a una concentración 250 mg/mL), 15 (Hojas a una concentración 250 mg/mL), y 5 (Raíz a una concentración 1250 mg/mL) conforman el grupo F en la tabla de Tukey por tanto no presentan diferencias significativas entre ellos, pero a su vez se genera otro grupo de transición tal como ocurrió anteriormente entre los tratamientos 14, 9, 15, 5 y 16 (Hojas a una concentración 500 mg/mL) los cuales no tienen diferencias significativas entre sus medias pero sirven para no generar cambios bruscos entre medidas, el grupo H conformado por los tratamientos 5, 16 y 10 (Flores a una concentración 500 mg/mL) no hay diferencia significativa entre el valor de sus medias, siendo este último grupo el que obtiene una menor respuesta en el crecimiento de las raíces de las cebollas, evidenciando de esta manera que al aumentar la concentración de extracto se afecta el crecimiento de las raíces de las cebollas, entendiendo que es inversamente proporcional, a medida que aumentó la concentración de extracto el crecimiento de las raíces disminuye.

Tabla 22. Análisis de varianza para *Allium cepa* en la inhibición de crecimiento de raíz.

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EXTRACT	2	3.90951730	1.95475865	93.55	<.0001
CONCEN	7	12.33748907	1.76249844	84.35	<.0001

Tabla 24. Prueba del rango estudentizado de Tukey para *Allium cepa* en la inhibición del crecimiento de raíz.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.					Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.						
Tukey Agrupamiento		Media	N	TRAT	Tukey Agrupamiento		Media	N	TRAT		
	A	2.71567	3	1		F	0.69200	3	8		
	B	1.88667	3	2		F	0.65200	3	13		
	B	1.87367	3	11	G	F	0.48300	3	14		
	C	1.44667	3	6	G	F	0.44333	3	9		
D	C	1.42567	3	3	G	F	0.40133	3	15		
D	C	E	1.18933	3	12	G	F	H	0.36667	3	5
D		E	1.10967	3	4	G		H	0.29333	3	16
		E	1.05933	3	7			H	0.04667	3	10

6.4.3 Determinación de la fitotoxicidad en microalgas *Selenastrum capricornutum*

En la Tabla 7 se encuentran los resultados obtenidos para los extractos de *C. sessiliflora* Less, con respecto al ensayo de fitotoxicidad en *S. capricornutum*, el porcentaje de inhibición encontrado para la concentración de 125 mg/mL de extracto a las 72 h está en un rango de $0,559 \pm 0,603$ a $27,534 \pm 1,594$ %. De las muestras evaluadas, en la que se presentó mayor crecimiento de la población de *S. capricornutum* fue en el extracto de flores, seguido del extracto de hojas y por último el extracto raíz de *C. sessiliflora* Less con medias de; $99,441 \pm 0,603$; $95,850 \pm 0,366$ y $72,466 \pm 1,594$ mg/mL respectivamente. En la Tabla 25 se observa los resultados del análisis de varianza ANOVA, mostrando que existe diferencia significativa entre los extractos y concentraciones evaluadas frente al porcentaje de crecimiento de la población de *S. capricornutum* con una probabilidad < 0.0001 %.

Tabla 25. Análisis de varianza para el porcentaje de crecimiento *S. capricornianum*

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EXTRACT	2	1639.60106	819.80053	46.19	<.0001
CONCEN	2	16175.87331	8087.93666	455.67	<.0001

En la Tabla 26 se presenta los resultados de la prueba de Tukey donde se agrupan los tratamientos 4 (Flores a una concentración de 125 mg/mL) y 8 (Hojas a una concentración 250 mg/mL) con la misma letra (E) y los tratamientos 8 y 7 (Hojas a una concentración 125 mg/mL) (F) para indicar que no hay diferencia significativa entre ellos, para el extracto de hojas a estas dos concentraciones se aprecia que se obtiene un mismo comportamiento frente al crecimiento de la población de *S. capricornutum* sin tener en cuenta la concentración, indicando que se esperaría el mismo resultado utilizando uno o el otro tratamiento, pero entre los tratamientos 4 y 7 si existe diferencia significativa, de igual forma ocurre con los demás tratamientos a los cuales se les asigna diferentes letras encontrando diferencia estadística entre ellos.

Como el porcentaje de Inhibición es la diferencia entre 100 y el porcentaje de crecimiento, por tanto se puede asumir que el extracto de raíz presentó la mayor inhibición en el crecimiento de la población de la micro alga seguido del extracto de hojas y flores con medias de $27,534 \pm 1,594$; $4,150 \pm 0,366$ Y $0,559 \pm 0,603$ mg/mL respectivamente, también se encontró que en cada uno de los tratamientos utilizados hubo respuestas de inhibición en el crecimiento de la población de *S. capricornutum* con respecto al testigo, debido a que no se presentó un crecimiento normal, esto quiere decir que la aplicación del extracto afecta el crecimiento poblacional de la micro alga indicando que hay una fitotoxicidad leve por parte de los extractos etanolicos de *C. sessiliflora* Less, ya que según lo especifica la resolución N° 0062 de 2007 del IDEAM al ser un resultado menor al 50 % estos extractos no se pueden catalogar como ecotóxicos.

Tabla 26. Prueba del rango estudentizado de Tukey para el porcentaje del crecimiento de la población en *S. capricornianum*.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento		Media	N	TRAT
	A	151.077	3	6
	B	146.528	3	9
	C	138.866	3	3
	D	108.539	3	5
	E	100.079	3	4
F	E	96.648	3	8
F		95.850	3	7
	G	91.779	3	2
	H	72.466	3	1

6.4.4 Determinación de la actividad anticoagulante de los extractos de *C. sessiliflora* Less sobre el veneno de serpiente de *Bothrops asper*.

En la Tabla 7 se encuentran los resultados obtenidos para los extractos de hojas, flores y raíz de *C. sessiliflora* Less, con respecto al ensayo de actividad anticoagulante sobre el veneno de *B. asper*, el porcentaje de inhibición de la actividad del veneno se encuentra en un rango de $21,381 \pm 0,441$ a $22,872 \pm 0,286$ %, evaluado a una concentración de 500 mg/mL de extracto. De las muestras evaluadas la que tuvo un mayor porcentaje de inhibición fue el extracto de hojas, seguido del extracto de flores y por último el extracto raíz con medias de $22,872 \pm 0,286$; $22,825 \pm 0,274$ y $21,381 \pm 0,441$ respectivamente.

En el análisis de varianza ANOVA mostrado en la Tabla 27 se puede observar que no existe diferencia significativa entre los extractos, pero si existe diferencia significativa entre las concentraciones utilizadas para el ensayo con una probabilidad < 0.0001 %, tal como se aprecia en la Figura 14 (anexo 9) donde se muestra la distribución de la inhibición de la coagulación del extracto con respecto a la concentración, observándose una relación lineal debido a que a mayor concentración de extracto mayor inhibición en la actividad del veneno de *B. asper*, por otro lado al hacer una prueba Tukey (Tabla 28, anexo 10) para la comparación entre los extractos evaluados de *C. sessiliflora* Less se puede ratificar lo anteriormente mencionado, debido a que no existe diferencia estadística entre extractos y solo se podría hacer comparaciones significativas entre los extractos (hojas, flores y raíz) con el testigo.

Tabla 27. Análisis de varianza para actividad anticoagulante sobre veneno de *Bothrops asper*

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EXTRACT	2	0.11161667	0.05580833	0.91	0.4114
CONCEN	3	10.15049722	3.38349907	55.36	<.0001

En la Tabla 29 se presenta los resultados de la prueba de Tukey para los tratamientos utilizados en el ensayo con respecto a la Inhibición de la actividad coagulante del veneno de serpiente *B. asper*, se encontró que hay 4 grupos (A, B, C y D) entre los cuales se distribuye la actividad anticoagulante de los extractos de *C. sessiliflora* Less, habiendo diferencia significativa entre ellos. El extracto que presento un mayor porcentaje de inhibición es el extracto de hojas seguido de los extractos de flores y raíz con medias de $22,872 \pm 0,286$; $22,825 \pm 0,274$ y $21,381 \pm 0,441$ % respectivamente pero estos porcentajes no son lo suficientemente eficaces para establecer que los extractos tengan actividad anti-coagulante, ya que según lo reportado en la literatura para que un antídoto de veneno tenga una buena actividad se debe establecer una dosis efectiva media a una concentración a la cual el tiempo de coagulación sea tres veces mayor al tiempo de coagulación del plasma más el veneno (control), es decir, para que haya una inhibición del 100 % de la actividad del veneno por parte de los extractos de *C. sessiliflora* Less se debe trabajar con concentraciones que superan los 500 mg/mL algo que ya sale de lo reportado, ya que a mayores concentraciones no se tiene en cuenta para la aplicación de dicha actividad, por tanto se obtiene que los extractos provenientes de *C. sessiliflora* Less no tiene efecto sobre la inhibición de la actividad del veneno de serpiente de *B. asper*.

Tabla 29. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para los tratamientos respecto a la Inhibición de la actividad del veneno de *B. asper*

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	11.5500	3	13
A	11.5467	3	9
A	11.4867	3	5
B	11.0033	3	12
B	10.9167	3	8
B	10.8000	3	4

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
B	C	3	11
B	C	3	3
B	C	3	7
B	C	D	10.2333 3 6
	C	D	10.0100 3 10
	C	D	9.9833 3 2
		D	9.4633 3 1

En el trabajo de Yarlequé, M. 2016, establece que para que un extracto de plantas tenga una actividad anticoagulante, éste debe de tener en su composición una cantidad de flavonoides glicosilados que inhiben la coagulación, como es el caso de la 3',4'-dihidroxi-7-O-gli-5 metóxido flavona la cual se le conoce su poder anticoagulante, Yarlequé estableció que los porcentajes de inhibición de la fase acuosa estuvieron entre 63,58 y 92,65 % para extracto de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton “chupasangre”; esto nos indica que para los extractos de *C. sessiliflora* Less no hay presencia de este tipo de compuestos, a pesar de que se encontró que tienen una buena cantidad de estos metabolitos secundarios.

Posibles aplicaciones potenciales de *C. sessiliflora* Less según lo encontrado y relacionado por la investigación

Los resultados que se han obtenido para *C. sessiliflora* Less en este trabajo de investigación, indican que es una especie muy promisoría a nivel farmacológico debido a que se encontró cualitativamente con el estudio fitoquímico la presencia de grupos funcionales que tienen una importancia biológica, también se determinó que los extractos cuentan con cantidades de compuestos fenólicos apreciables y una actividad antioxidante buena al compararla con los estándares utilizados, despertando gran interés por los antioxidantes naturales que contiene la planta, ya que ayudarían o podrían inhibir el daño oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno tal como se encuentra reportado en la literatura, además de que jugarían un papel muy importante en la prevención o reducción de enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis y algunos tipos de cáncer, por otro lado los extractos de la planta presentaron una actividad toxicológica la cual se considera de gran importancia en el campo de estudio a nivel medicinal, ya que con el aislamiento y caracterización de estos metabolitos presentes en los extractos se podría llevar a cabo estudios enfocados a líneas celulares de algún tipo cáncer.

7. CONCLUSIONES

A partir del tamizaje fitoquímico se pudo identificar cualitativamente una gran variedad de metabolitos secundarios con grupos funcionales como flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, triterpenos y/o esteroides los cuales tienen un valor biológico alto por la actividad que presentan, los cuales posiblemente se les atribuye los efectos de actividad biológica o farmacológicos que podrían presentar los extractos etanólicos de *C. sessiliflora* Less.

El contenido de fenoles y flavonoides de los extractos etanólicos es considerado como alto, lo cual infiere que los extractos de *C. sessiliflora* Less tengan un potencial activo como agentes antioxidantes, lo que explica su gran actividad biológica ya que los compuestos fenólicos están relacionados con la actividad antioxidante, además se encontró una relación lineal directa entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos de actividad antioxidante in vitro muestran que los extractos etanólicos de cada una de las partes de la planta de *C. sessiliflora* Less, pueden ser fuentes naturales de compuestos antioxidantes, por tanto, podrían tener una posible aplicación en el desarrollo de productos en la industria cosmética, farmacéutica y agroquímicos.

El extracto de hojas de la *C. sessiliflora* Less, presentó la mejor actividad antioxidante por el método de captación de radicales DPPH y cuenta con el mayor contenido de fenoles y flavonoides, esto muestra que el extracto es idóneo para el aislamiento de metabolitos secundarios con esta actividad.

La aplicación de los extractos etanólicos de *C. sessiliflora* Less afecta significativamente el crecimiento de las raíces en las cebollas de *A. cepa*, como también en la población de microalgas evidenciando de esta manera el efecto fitotóxico que tienen los extractos etanólicos de *C. sessiliflora* Less sobre estas especies. Por otro lado, se pudo evidenciar el efecto citotóxico por parte de los extractos frente al crustáceo de *A. franciscana* siendo considerado como altamente tóxico. De esta manera se observa que los extractos tienen un poder toxicológico el cual se podría seguir estudiando en líneas celulares de algún tipo de cáncer, esto posiblemente se deba a la presencia de alcaloides, saponinas y lactonas los cuales son algunos de los metabolitos secundarios que se encuentran reportados y son considerados como tóxicos.

Los extractos de hojas, flores y raíz de *C. sessiliflora* Less presentaron una gran cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides los cuales son reconocidos por tener una actividad anticoagulante y astringente, pero al evaluar su actividad anticoagulante frente al veneno de *B. asper*, no se presentaron resultados contundentes, por tanto se asume que los compuestos que presentan dicho efecto

biológico como flavonoides glicosilados no se encuentran presentes en los extractos etanólicos totales de la planta.

A pesar de que se tienen las mismas condiciones de muestreo, tratamiento de la muestra y tiempo de extracción, se hace evidente que los compuestos que tienen algún tipo de actividad biológica se encuentran en las partes aéreas de la planta.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Amaral, P, *et al.* 2017. "The Genus *Calea* L. A Review of Isolated compounds and biological activities." *Journal of Medicinal Plants Research* 11(33): 518–37.
- Anaya, C. 2009. Investigación de adulteraciones y/o falsificaciones mediante la técnica de cromatografía en capa fina en las especies vegetales *petiveria alliacea* (epacina), *calea urticifolia* (juanislama) y el cartilago de *sphyma zygaena* (tiburón); comercializados en el mercado municipal de zacamil. Universidad de el salvador. Centro América.
- Baj, T. Baryluk, A. Sieniawska, E. 2018. Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L. and *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*. (115), pp 52-61.
- Bendif, H. Boudjeniba, M. Djamel, M. *et al.* 2017. *Rosmarinus eriocalyx*: An alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*. (218), pp 78-88.
- Beretta, M. Fernandes, A. Schneider, A. Ritter, M. 2008. A familia Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, pp 189-216.
- Bilbao M. 1997. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío. Editorial Norma, Armenia.
- Blaise C, Forget G, Trottier, S. 2000. Toxicity Screening of Aqueous Samples Using a Cost-Effective 72-hour Exposure *Selenastrum capricornutum* Assay. *Environmental Toxicology* (15), pp 352-359.
- Bouyanya, A. Et-Touys, A. Bakri, Y. *et al.* 2017. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial Pathogenesis*. (111), pp 41-49.
- Brand, W. Cuvelier C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci Technol*. 28(1):25-30.
- Carmona, M. Gassen, D. Scandiani, M. 2009. Síntomas de fitotoxicidad en soja conocerlos para evitar confusiones. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Cárdenas, M. Sanchez, E. Torrenegra, R. 1990. Sustancias Responsables de la actividad Microbiana presentes en *Achyrocline bogotensis* H.B.K. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Carrión, A. García, C. 2010. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. Universidad de Cuenca. Ecuador.

- Castell, J. s.f. El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos, pp 95-121
- Causil, L. Coronado, J. Verbel, L. et al. 2017. Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). Revista colombiana de ciencias hortícolas. (11), pp 97-104.
- Coronado, M. Vega, S. Rey, L. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Revista chilena de nutrición. (42), pp 1-7.
- Correa, F. Ramírez, L. 1993. Morfología y biometría de cinco poblaciones de *Artemia franciscana* (*Anostraca: Artemiidae*). Revista de Biología Tropical, 41:103-110.
- Doolaeege, E. Vossen, E. Raes, K. et al. 2012. Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidant concentrations, in reduced nitrite liver pâtés. Meat Sci. (90), pp 925–931.
- Dorman, H. Hiltunen, R. 2004. Fe (III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. Food Chemistry. (88), pp 193-199.
- Environment Canada. 1992. Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. Environmental Protection. Series EPS1/RM/24.
- Erel, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical Biochemistry. (37), pp 277-285.
- Fernandes, A. Ritter, M. 2009. A família *Asteraceae* no Morro Santana, Porto Alegre. Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Biociências. (4), pp 395-439.
- Fernandez, M. 2005. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno de los compuestos antioxidantes del vino: ensayos in vitro e in vivo. Área de nutrición y bromatología. Universidad de Sevilla.
- Fernandez, M. 2017. Artemia, información del género y la especie *Artemia franciscana*. Paradais-sphynx. Disponible en: <https://invertebrados.paradais-sphynx.com/artropodos/artemia-género-franciscana.htm>.
- Fiskesjö G. 1985. The Allium-test as a standard in environmental monitoring, Hereditas. (102), pp 99-112.

- Frankel, E. 2010. Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos de aplicación industrial. Antioxidantes Naturales. Aspectos Saludables, Toxicológicos Y Aplicaciones Industriales.
- García, A. Pérez, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3), pp 119-145.
- Gené, J. Roy, A. Rojas, G. Gutiérrez, J. Cerdas, L. (1989) Comparative study on the coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. Toxicon. (27), pp 841-848.
- Ghosh, M. Upadhyay, R. Kumar, D. Niwas, H. 2018. Kinetics of lipid oxidation in omega fatty acids rich blends of sunflower and sesame oils using Rancimat. Food Chemistry. (272), pp 471-477.
- Gómez, A. 2016. "Evaluación de las Propiedades Insecticidas Y/o Repelentes de" *Calea glomerata* Klatt. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Colombia.
- Granados, Y. Ronco, A. Díaz, M. (s.f). Ensayo de toxicidad crónica con el alga *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) por el método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. (1), pp 69-87.
- Guerrero, M. et al. 2002. "Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian Medicinal Plants." Journal of Ethnopharmacology 80(1), pp 37-42.
- Gutiérrez, Y. Scull, R. García, G. Montes, A. 2018. Pharmacognostic, phytochemical and biological evaluation of a hydroalcoholic extract of *Tagetes lucida* Cavanilles. Revista cubana de plantas medicinales. (23), pp 1-7.
- Heinrich, M. Bames, J. Gibbons, S. y Williamson, E. 2004. Phytotherapy and pharmacognosy. In Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. (2), pp 4-21.
- Huang, D. et al. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (53), pp 1841-1856.
- Jaramillo, C. et al. 2016. Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. Revista de Biología Tropical. (64), pp 1171-1184.

- Khanna, N. Sharma, S. 2013. *Allium Cepa* Ensayo de aberración cromosómica de la raíz: una revisión. Indian J. Pharm. Biol. Res. (1), pp 105-119.
- Läubli M, Bruttel P. 1986. Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the rancimat method. J Am Oil Chem Soc. 63(6), pp 792-795.
- Lima, G. 2016. Estudos taxonômicos do gênero *Calea* L. (Asteraceae: *Neurolaeneae*) na região Centro-Oeste do Brasil. Universidade Federal de Goiás. Brasil.
- Lima, T. Santos, A. Costa, D. Souza, R. et al. 2015. Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* and evaluation of their leishmanicidal activity. Revista Brasileira de Farmacognosia. (25), pp 7-10.
- Lock, O. 1988. Investigación Fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. PUCP. Fondo Editorial: Lima, Perú.
- Losada, S. Bravo, C. 2017. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. J. Med. Chem. (133), pp 379–402.
- Mantilla, J. Sanabria, A. 1985. Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. (4), pp 25-33.
- Marcano, D. Hasegawa M. 2002. Fitoquímica Orgánica. Editorial Torino. Venezuela.
- Martínez, A. 2012. Quinonas y compuestos relacionados. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín.
- Martinez, M. Valencia, P. Jimenez, U. 2008. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín.
- Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, McLaughlin J. Brine Shrimp. 1982. A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Plant Med. 45(5), pp 31-34.
- Mezadri, T. 2005. Evaluación de la actividad antioxidante de frutos de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) y sus derivados. Área de nutrición y bromatología. Universidad de Sevilla.
- Mora, L. Pérez, A. 2016. Determinación de la actividad larvicida de aceites esenciales, pertenecientes a ocho familias de especies botánicas, frente al *Aedes aegypti*. Universidad Santo Tomas, Bucaramanga, Colombia.

- Miller N, Rice C, Davies M, Gopinathan V, Milner A. 1993. A Novel Method for Measuring antioxidant Capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 84(4), pp 407-412.
- Morais, D. Marin, M. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* (682), pp 71-81.
- Nefic, H. Musanovic, J. Metovic, A. Kurteshi, K. 2013. Alteraciones cromosómicas y nucleares en las células de la punta de la raíz de *Allium Cepa* L. inducidas por Alprazolam. *Medical archives, journal of the academy of medicinal sciences of bosnia and Herzegovina.* (67), pp 388-392.
- Neira, A. 2009. Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana*. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Nieto, M. García, J. Caltzontzin, V. Chavez, R. Estrada, M. 2018. Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de fenoles, flavonoides totales y su capacidad antioxidante en el árnica (*Heterotheca inuloides*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* (21), pp 1-10.
- Nur, A. Nusrat, J. Rafiquzzaman M. 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal.* (21), pp 143-152.
- Odabasoglu, F. Aslan, A, *et al.* 2005. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia.* 76 (2), pp 216-219.
- Ortiz, M. 2011. Evaluación del extracto etanólico de *Calea urticifolia* (Mill.). Sobre la regulación de la secreción de adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Pereáñez, J. Vargas, L. (2009). Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina. *Latreia* (22), pp 382-391.
- Peiretti, P. Gai, F. Ortoffi, M. Aigotti, R. Medana, C. 2012. Effects of Rosemary Oil (*Rosmarinus officinalis*) On The Shelf-Life of Minced Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) during Refrigerated Storage. *Foods.* (1), pp 28–39.
- Piedrahita, C. 2015. “Estabilidad oxidativa y vida útil del aceite de choibá (*Dipteryx oleifera Benth.*), suplementado con extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)”. Universidad Nacional de Colombia. Medellin, Colombia.
- Pourmorad, F. Hosseinimerhr, S. Shahabimajd. N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology.* 5 (11), pp. 1140-1147.

- Prada, J. 2015. Análisis metabolómico de la especie *baccharis latifolia* (Asteraceae) en la sabana de bogotá. Universidad militar nueva granada. Bogotá, Colombia.
- Prashant, T. Bimlesh, K. Mandeep, K. Gurpreet, K. and Harleen, K. 2011. Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. (1), pp 98-106
- Ramírez, B. Macías, D. Varona, G. 2012. “Potencialidades de la flora andina. 100 plantas útiles del macizo colombino.” Universidad del Cauca, pp 61–62.
- Re, R. et al. 1999. Antioxidant activity applying an improved abts radicalcation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26. 9/10: 1231-1237.
- Salvan, J. Gagliotti, S. Jim, Y. et al. 2017. *Calea uniflora* Less. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. *International Immunopharmacology*. (42), pp 139-149.
- Sanabria, A. 1983. Análisis fitoquímico preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia compositae. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Sanabria A, López S. 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 26:15-19.
- Sánchez, E. et al, 2015. Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente Neotropical Macagua (*Bothrops colombiensis*) de la región de Barlovento, estado Miranda, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. (67), pp
- Sanches, S. 2014. Investigación de la adulteración y falsificación en capsulas de *calea urticifolia* (juanislama), comercializadas en 7 mercados del área metropolitana de san salvador. Universidad de El Salvador. Centro América.
- Shilpa, K. Varun K. Lakshmi B. 2010. An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J Plant Sci*. (5), pp 222-247.
- Tovar, J. 2013. “Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la eco región cafetera.” *Journal of Chemical Information and Modeling* 53(9), pp 1689–99.
- Ugartondo, V. 2009. Carecterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

- Upadhyay, R. Niwas, H. 2015. Predictive modeling for shelf life estimation of sunflower oil blended with oleoresin rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and ascorbyl palmitate at low and high temperatures. *Food Science and Technology*. (60), pp 42-49.
- Vernon, S. Rudolf, O. Lamuela, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- Vivas, D. Sandoval, G. *et al.* (2015). Caracterización de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops pictus* "jergón de costa. *Revista peruana de Medicina Experimental y Salud*.(32), 652-658.
- Yarlequé, M. 2016. Aislamiento y caracterización bioquímica de compuestos fenólicos con actividad anticoagulante del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton "chupasangre". Universidad Nacional mayor de San Marcos. Lima –Perú.
- Zaouali, Y. Bouzaine, T. Boussaid, M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*. (48), pp 3144-3152.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chem*. (64), pp 555-559.

9. ANEXOS

Anexo 1. Tabla 2. Reactivos y materiales de laboratorio utilizados

REACTIVOS	ESPECIFICACIONES
Etanol, éter etílico, hexano, acetato de etilo, cloroformo, butanol, metanol, ácido fosfórico, acetonitrilo, dimetilsulfóxido y dicromato de potasio	J.T. Baker (Xalostoc, México)
Ácido (+)-tartárico, ácido clorhídrico, ácido acético glacial, ácido pícrico, tricloruro de antimonio, vainillina, tricloruro de aluminio, nitrito de sodio	Merck (Darmstadt, Alemania)
Nitrato de bismuto III pentahidratado, persulfato de potasio, hidróxido de sodio, ácido cítrico, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, yoduro de potasio, ácido bórico, Cloruro de sodio, fosfato dihidrógeno de potasio, fosfato de sodio dibásico, cloruro de potasio, persulfato potásico	Carlo Erba (Val de Reuil, Francia)
Ácido sulfúrico concentrado, cloruro férrico anhidro, sulfato ferroso heptahidratado	Fisher Scientific (Nueva York, USA)
Ácido 3,5-dinitrobenzoico Alfa Aesar Acetato de plomo (II)	Difco (Le Point de Claix, Francia) Alfa Aesar (Nueva York, USA), Laboratorios Biocroma (Cali, Colombia)
DPPH. (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), ABTS (sal diamónica del ácido 2,2-azino-bis (3etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DL- α -tocoferol, Trolox, polietilenglicol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ácido ascórbico, carbonato de sodio Folin-Ciocalteu, ácido gálico	Mol Labs (Bogotá, Colombia) Panreac (Barcelona, España)
Huevos de Artemia salina	
Aceite de coco	

Anexo 2. Tabla 3. Equipos utilizados en la investigación

EQUIPO	MODELO	MARCA
Espectrofotómetro de Uv-vis	GENESIS 6	Thermo Scientific (Texas, USA)
Rotavaporador	Laborota 4003	Heidolph Instruments GmbH Co (Schwabach, Alemania)
Ultrasonido		Fisher Scientific (Hampton, USA)
Balanza analítica	Ohaus	Adventure (EE.UU)
Cámara ambiente	Biotronette lab line 846	Virginia (USA)
Rancimat	892	METROHM

Anexo 3. Metodología descrita para el tamizaje fitoquímico sobre la especie *C. sessiliflora* Less.

Alcaloides.

De una solución madre de 2000 mg/L de extracto, se tomó 2.5 mL de los diferentes extractos en viales y a cada uno se le agregó 500 µL de HCl al 10 %, se calentó en baño maría por 10 minutos, después se filtró y se transfirió a viales para realizar las siguientes reacciones.

1. Reacción con el reactivo de Dragendorff.

Se adicionan 2 gotas del reactivo de Dragendorff, una coloración rojiza acompañada de un precipitado de color rojo ladrillo se considera la prueba como positiva, se utilizó el alcaloide Brucina como control positivo y se utilizó agua como blanco.

2. Reacción con el reactivo de Mayer.

Se adicionan 3 gotas del reactivo de Mayer a cada uno de los extractos, una coloración blancuzca acompañada de un precipitado lechoso se considera la prueba como positiva, se utilizó el alcaloide Brucina como control positivo y se utilizó agua como blanco.

3. Reacción con el reactivo de Wagner.

Se adicionan 2 gotas del reactivo de Wagner, una coloración rojiza acompañada de un precipitado de color marrón se considera la prueba como positiva, se utilizó el alcaloide Brucina como control positivo y se utilizó agua como blanco.

Cardiotonicos.

Se preparó una solución madre de 2000 mg/L de extractos, de los cuales se tomó 2.5 mL de los diferentes extractos en viales y a cada uno se le agregó 1.25 mL de Ac. Pb al 10% + 1 mL de agua desionizada, se llevó a baño maría por 10 min, se enfrió y luego se filtró, al filtrado se le agregó 5 mL de cloroformo, la fase clorofórmica se separa en viales para realizar las siguientes pruebas.

1. Reacción con el reactivo de Baljet:

Se utilizó 800 µL de la solución clorofórmica de cada uno de los extractos, se llevó a sequedad y se adicionó 3 gotas del reactivo de Baljet, se utilizó 800 µL de cloroformo como control negativo, una coloración rojo ladrillo se considera como positivo para la prueba.

2. Reacción con reactivo de Keede:

Se utilizó 800 µL de la solución clorofórmica de cada uno de los extractos de hojas, flores y raíz, se llevaron a sequedad y se adicionó 800 µL del reactivo de Keede, se utilizó 800 µL de cloroformo como control negativo, una coloración rojo o azul indica la presencia de cardenolidos y por tanto se considera como positivo para la prueba.

3. Reacción con reactivo de Keller-Kiliani:

Se tomó 800 µL de las soluciones madre, se llevaron a sequedad, se le adicionaron 800 µL de ácido acético glacial + 1 gotas de cloruro de hierro al 5 % en metanol + 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Como control negativo se utilizó etanol rectificado al 98%. Para considerar la prueba como positiva se esperan observar coloraciones intensas.

4. Reacción con reactivo de Raymond- Marthoud.

A 800 µL de las soluciones madre de los extractos etanolicos totales, se llevaron a sequedad, posteriormente se adiciono 500 µL del reactivo de Raymond-Marthoud (m-dinitrobenceno en etanol 50 mg/ 5 mL). Como control negativo se toma 800 µL de etanol. Para que la prueba se considere positiva la solución se debe de tornar de color rojizo.

Cumarinas Volátiles.

Se tomó un papel filtro impregnado con NaOH diluido y se colocó en un tubo de ensayo el cual contenía 2 mL de extracto etanólico total de hojas, flores y raíz a una concentración de 2000 mg/L, posteriormente se coloca en baño maría por 3 min y se revela con luz UV. Se utiliza etanol como control. La aparición de manchas fluorescentes es un indicativo de que la prueba es positiva.

Taninos.

Se pesó 10 mg de cada uno de los extractos (hojas, flores y raíz), se disolvieron en 3 mL de agua desionizada, se utilizó Ácido Gálico como estándar positivo (se pesó 5 mg y se disolvió en el mismo volumen) y H₂O como control, una coloración azul es indicio de taninos hidrolizables, verde taninos condensados.

En un tubo de ensayo se tomó 1 mL de cada solución y se le agregó 2 gotas de FeCl₃ al 10 %.

Saponinas.

Se pesó 10 mg de cada uno de los extractos (hojas, flores y raíz), se disolvieron en 2 mL de agua desionizada hirviendo, una vez frio, se prosiguió hacer una agitación manual por 40 segundos, la presencia de burbujas estables por más de 15 minutos hace que se considere como positiva la prueba.

Triterpenos y/o Esteroides.

Se pesó 10 mg de EET de hojas, flores y raíz, se adicionó cloroformo y se filtró, en la fase clorofórmica se separa en dos tubos para realizar las pruebas de Liebermann-Burchard y Salkowski, para las dos reacciones se utiliza cloroformo como control.

1. Reacción de Liebermann-Burchard

En el primer tubo se agregó 1 mL anhídrido acético + 3 gotas de H₂SO₄ concentrado. Coloración azul- verdosa indicio de esteroides. Rosa, rojo o violeta terpenoides.

2. Reacción de Salkowski

En el segundo tubo se agregó 1 mL de H₂SO₄ concentrado, una coloración rojiza indicativo positivo para esta prueba.

Flavonoides.

1. Reacción de Shinoda.

Se tomó 1 mL de la solución madre de 2000 mg/L, se agregó Mg + 3 gotas de HCl concentrado, para el control positivo se utilizó quercetina y se preparó una madre de 1000 mg/mL de la cual se tomó 1 mL, siguiendo el mismo procedimiento, para el control se utilizó etanol. La aparición de un color rojo-violeta indicativo de la presencia de este metabolito en el extracto.

2. Reacción con NaOH

Se tomó 200 µL de la solución madre de 2000 mg/L + 800 µL de etanol + 3 mL de agua desionizada + 5 gotas de NaOH diluido. Como estándar positivo se utiliza quercetina y como control se utiliza etanol. Una coloración amarilla o naranja indicativo de la presencia del metabolito.

Derivados antracénicos libres.

Para determinar la presencia de estos metabolitos en los extractos etanólicos de hojas, flores y raíz se pesó 200 mg del extracto y se adicionó 5 mL de cloroformo se agito y se dejó reposar por 15 min, posteriormente se separa la fase clorofórmica para realizar las reacciones de Borntrager, con Acetato de Mg, Test Hidróxido de Amonio.

1. Reacción de Borntrager.

Se toma 1 mL de la solución clorofórmica y se adiciona NaOH al 5 %, una coloración rojiza en fase acuosa es indicio de antraquinonas. Se utilizó control cloroformo 1 mL.

2. Reacción con Mg (OAc)₂.

Se toma 1 mL de la solución clorofórmica y se adiciona 1mL acetato de magnesio al 5 % en metanol, una coloración roja indica la presencia de antraquinonas libres. Se utilizó 1mL cloroformo como control.

3. Test Hidróxido de Amonio.

Se tomó 1 mL de la solución etanólica madre de 2000 mg/ mL de los extractos de hojas, flores y raíz, se adiciono 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado, se deja

reaccionar por 2 min, la aparición de una coloración roja es indicativo de antraquinona.

Anexo 4. Metodología para ensayo de *A. Franciscana*.

Preparación agua de mar:

Para la preparación del agua de mar sintética, se pesó 5 g de NaCl, 1.3 g de MgSO₄, 1 g de MgCl₂, 0,3 g de CaCl₂, 0,2 g de KCl y 2 g de NaHCO₃, se disolvió en agua destilada y se adicionó en un balón aforado de 1 L completando el aforo.

Eclosión del crustáceo: se pesaron 50 mg de huevos de *A. salina*, se les realizó un proceso de desinfección con hipoclorito al 5 %, durante 2 h. Una vez transcurrido este tiempo se filtraron por decantación y se les hizo un lavado con agua destilada, se repite este último proceso 5 veces, después se agregaron a un beaker el cual contenía 300 mL de agua de mar previamente preparada, se dejaron por 48 horas en una cámara ambiental con luz blanca constante a 25 °C.

Preparación muestras: se prepararon concentraciones de extracto según el rango de respuesta para cada extracto, se trabajó con concentraciones de 5, 15, 25 y 30 mg/mL de EET de hojas y flores, mientras que para el EET de raíz el rango de trabajo fue de 120, 140, 160 y 180 mg/mL de extracto. Para garantizar una total solubilidad del extracto se adicionó una cantidad de DMSO menor al 5 %. El ensayo se realizó por triplicado.

Anexo 5. Distribución de la concentración de flavonoides totales en las muestras evaluadas.

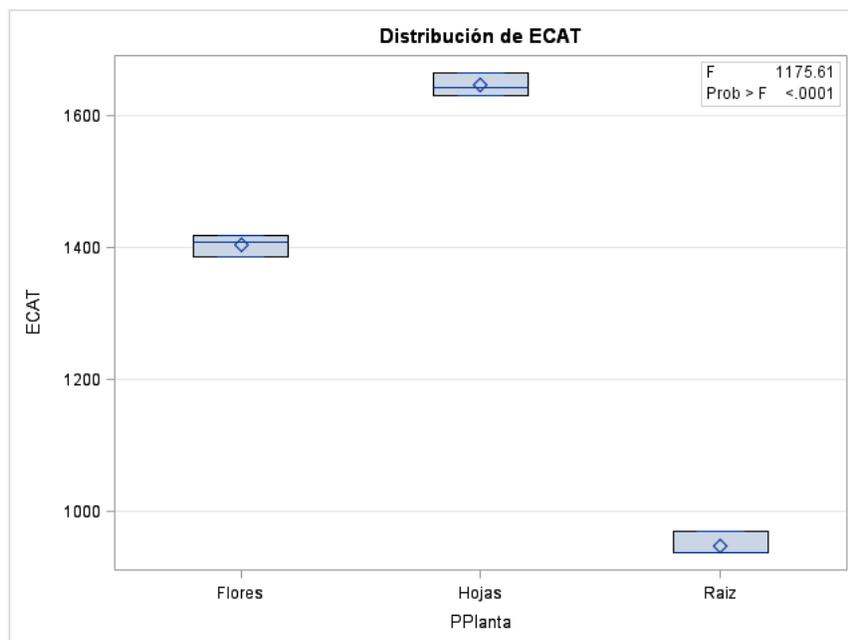


Figura 8. Distribución de la concentración ECAT en las muestras evaluadas

Anexo 6. Distribución de la mortalidad en *A. franciscana* de las muestras evaluadas

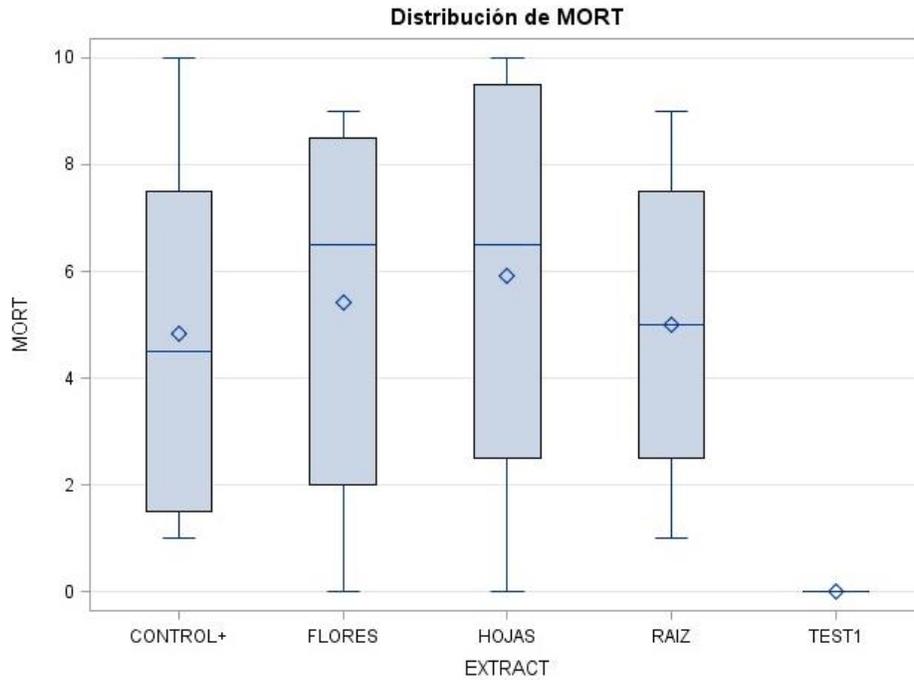


Figura 11: Distribución de mortalidad de *Artemia franciscana* frente a las muestras evaluadas.

Anexo 7. Crecimiento de raíces de *A. cepa* en las muestras evaluadas.

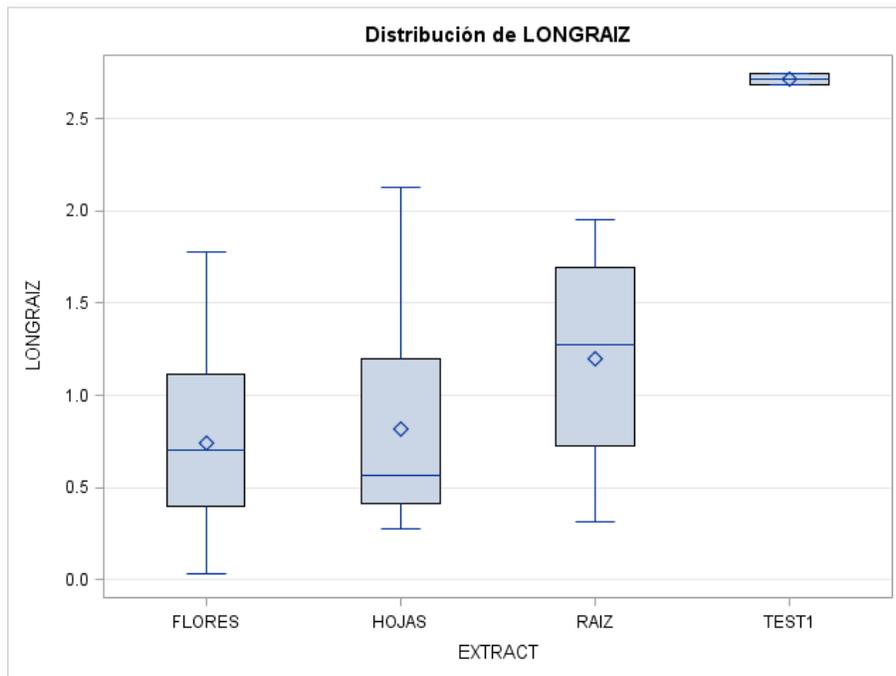


Figura 13: Distribución del crecimiento de la raíz en *Allium cepa* frente a las muestras evaluadas.

Anexo 8. Tabla 23. Análisis de las comparaciones en el crecimiento de la raíz en *Allium cepa*.

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***.

EXTRACT Comparación	Diferencia entre medias	Límite de confianza al 95% Simultáneo		
TEST1 - RAIZ	1.51850	1.26752	1.76948	***
TEST1 - HOJAS	1.90022	1.65775	2.14269	***
TEST1 - FLORES	1.97807	1.73216	2.22398	***
RAIZ - TEST1	-1.51850	-1.76948	-1.26752	***
RAIZ - HOJAS	0.38172	0.23682	0.52663	***
RAIZ - FLORES	0.45957	0.30898	0.61015	***
HOJAS - TEST1	-1.90022	-2.14269	-1.65775	***
HOJAS - RAIZ	-0.38172	-0.52663	-0.23682	***
HOJAS - FLORES	0.07784	-0.05809	0.21378	
FLORES - TEST1	-1.97807	-2.22398	-1.73216	***
FLORES - RAIZ	-0.45957	-0.61015	-0.30898	***
FLORES - HOJAS	-0.07784	-0.21378	0.05809	

Anexo 9. Inhibición del veneno de *B. asper* en las muestras evaluadas.

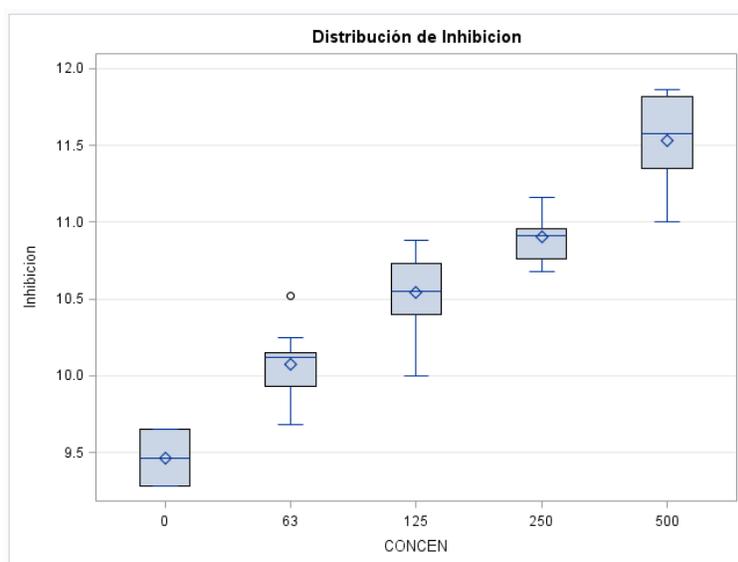


Figura 14: Distribución de la concentración en las muestras evaluadas para inhibir la actividad del veneno de serpiente de *B. asper*

Anexo 10. Tabla 28. Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Inhibición de la actividad del veneno de *B. asper*

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***.				
EXTRACT Comparación	Diferencia entre medias	Límite de confianza al 95% Simultáneo		
HOJAS - FLORES	0.0242	-0.2493	0.2976	
HOJAS - RAIZ	0.1283	-0.1451	0.4018	
HOJAS - TEST1	1.3500	0.9177	1.7823	***
FLORES - HOJAS	-0.0242	-0.2976	0.2493	
FLORES - RAIZ	0.1042	-0.1693	0.3776	
FLORES - TEST1	1.3258	0.8935	1.7582	***
RAIZ - HOJAS	-0.1283	-0.4018	0.1451	
RAIZ - FLORES	-0.1042	-0.3776	0.1693	
RAIZ - TEST1	1.2217	0.7893	1.6540	***
TEST1 - HOJAS	-1.3500	-1.7823	-0.9177	***
TEST1 - FLORES	-1.3258	-1.7582	-0.8935	***
TEST1 - RAIZ	-1.2217	-1.6540	-0.7893	***