

**EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y FARMACOLÓGICA EN EL  
EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Crinum x powellii* (Amaryllidaceae)**

**JULIETH VANESSA BASTIDAS RIVERA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA  
DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)  
POPAYÁN  
2016**

**EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y FARMACOLÓGICA EN EL  
EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Crinum x powellii* (Amaryllidaceae)**

**JULIETH VANESSA BASTIDAS RIVERA**

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

Director

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

Asesor

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

Asesor

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

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA  
DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)  
POPAYÁN  
2016**

## **Agradecimientos**

A la Universidad del Cauca por mi formación académica.

A mi director Fabio Antonio Cabezas Fajardo y mi asesor Oscar Darío Bermúdez por su confianza, consejos, enseñanzas y colaboración de manera incondicional durante la realización de este trabajo, además por permitirme ser parte de la familia QCB.

Al profesor Juan Carlos Argoti por su colaboración durante el desarrollo de este trabajo.

A la Unidad de Análisis Industriales por prestar el equipo UV-Vis con el cual fue posible realizar los ensayos de actividad antioxidante.

Al Grupo Biotecnología–Productos Naturales (GB-PN) de la Universidad Tecnológica de Pereira, en especial a los profesores Oscar Marino Mosquera Martínez, Jaime Niño Osorio y Lina Marcela Cadavid por ayudarme en todo lo que necesité para realizar los ensayos complementarios en el laboratorio.

A cada uno de los integrantes del Grupo Química de Compuestos Bioactivos: Dianita Correa, Hamilton Martínez, Alejandra Muñoz, Norma Galíndez, Anuar Caldon y Mary López por darme su apoyo, alegría y momentos especiales, en especial a Lina Marcela Trujillo Chacón quien estuvo en todo momento para ayudarme de manera incondicional en mi trabajo y por brindarme su amistad.

A mis amigos Manuel Mera, Cristian Gasca Silva, Marcela Revelo y Laura Durán, Katherine Alegría por su valiosa amistad y apoyo incondicional durante el transcurso de la carrera y de la vida.

A mi familia, por su apoyo para el transcurso y finalización de mi carrera, también por enseñarme a ser una persona correcta y por demostrar el verdadero significado de respeto y amor.

## Nota de aceptación

---

---

---

---

Director

---

Fabio Antonio Cabezas Fajardo Ph.D.

Jurado

---

Edier Humberto Pérez Ph.D.

Jurado

---

Danny Alejandro Arteaga Ph.D.

Popayán, 14 de diciembre de 2016

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 FAMILIA AMARYLLIDACEAE.....	3
2.1.1 Género <i>Crinum</i> .....	3
2.1.2 Especie <i>Crinum x powellii</i> .....	3
2.1.3 Taxonomía de <i>Crinum x powellii</i> .....	4
2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	4
2.2.1 Alcaloides.....	5
2.2.2 Flavonoides y Antocianinas.....	6
2.2.3 Taninos.....	7
2.2.4 Esteroides y triterpenoides.....	8
2.2.5 Cumarinas.....	8
2.2.6 Cardenólidos.....	8
2.2.7 Saponinas.....	9
2.2.8 Antraquinonas.....	10
2.3 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	11
2.4 ESTRÉS OXIDATIVO.....	11
2.5 ANTIOXIDANTES.....	12
2.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU.....	13
2.7 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	13
2.7.1 Método del DPPH.....	14
2.7.2 Método del ABTS <sup>+</sup> .....	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	18
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
5. MATERIALES Y METODOS.....	19
5.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	19
5.2 REACTIVOS.....	19
5.3 PROCESO DE SECADO Y EXTRACCIÓN.....	20
5.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	20
5.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	21
5.5.1 Fraccionamiento.....	21
5.5.2 Determinación del contenido total de fenoles.....	22
5.5.3 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo	

DPPH.....	22
5.5.4 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS <sup>+</sup> .....	23
5.6 Análisis estadístico.....	24
5.7 Determinación de la actividad citotóxica mediante el bioensayo de la <i>Artemia salina</i> .....	24
5.8 Determinación del contenido total de flavonoides a través del método de tricloruro de aluminio.....	24
5.9 Determinación de la actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa.....	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
6.1. Tamizaje fitoquímico y extracción.....	26
6.2. Actividad antioxidante.....	27
6.2.1. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.....	27
6.2.2. Actividad antioxidante determinada por el método del 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH·).....	29
6.2.3 Actividad antioxidante determinada por el método del 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato (ABTS <sup>+</sup> ).....	32
6.2.4. Correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales.....	34
6.3. Actividad citotóxica en el EET de hojas de <i>C. x powellii</i> determinada mediante bioensayo con <i>A. salina</i> .....	35
6.4 Contenido total de flavonoides a través del método de tricloruro de aluminio.....	36
6.5 Actividad de inhibición enzimática.....	37
6.5.1 Actividad de inhibición sobre la acetilcolinesterasa (AChE).....	37
7. CONCLUSIONES.....	39
8. RECOMENDACIONES.....	40
9. BIBLIOGRAFÍA.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>A</b>	Absorbancia
<b>ÁA</b>	Ácido ascórbico
<b>ABTS</b>	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina) 6-sulfonato
<b>Ac</b>	Acuosa
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>CARO</b>	Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno
<b>CAET</b>	Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentración letal
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EAG</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>EET</b>	Extracto etanólico total
<b>ELL</b>	Extracción Líquido-Líquido
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>eq</b>	Equivalente
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ES</b>	Extracto seco
<b>FC</b>	Folin-Ciocalteu
<b>FRAP</b>	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante
<b>g</b>	Gramos
<b>Hex</b>	Hexano
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración capaz de inhibir 50 % de la actividad máxima
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mo</b>	Molibdeno
<b>m.s.n.m.</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>NI</b>	No presentó inhibición

<b>NR</b>	No realizado
<b>•OH</b>	Radical hidroxilo
<b>P</b>	Significancia
<b>PBS</b>	Solución de buffer fosfatos
<b>PI</b>	Porcentaje de inhibición
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlación
<b>RL</b>	Radical libre
<b>TPC</b>	Contenido de fenoles totales
<b>Trolox</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible
<b>W</b>	Tungsteno
<b>%AA</b>	Porcentaje de actividad antioxidante
<b>λ</b>	Longitud de onda
<b>α-T</b>	Tocoferol
<b>μg</b>	Microgramo



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies reactivas de oxígeno.....	11
<b>Tabla 2.</b> Pruebas realizadas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico total de hojas de <i>Crinum x powellii</i> .....	20
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de humedad y de extracción de las fracciones y el EET de hojas de <i>C. x powellii</i> .....	26
<b>Tabla 4.</b> Compuestos presentes en el extracto etanólico proveniente de hojas de <i>C. x powellii</i> determinados por tamizaje fitoquímico.....	26
<b>Tabla 5.</b> Curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones, utilizada para la determinación de compuestos fenólicos de las fracciones y el EET de hojas de <i>C. x powellii</i> , por el método Folin-Ciocalteu.....	27
<b>Tabla 6.</b> Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante del EET y fracciones provenientes de hojas de <i>C. x powellii</i> , acompañados de la desviación estándar ( $\pm$ DS).....	29
<b>Tabla 7.</b> Curva de calibración Trolox a diferentes concentraciones, utilizada para la determinación de la actividad antioxidante de las fracciones y el EET de hojas de <i>C. x powellii</i> por el método DPPH.....	30
<b>Tabla 8.</b> Curva de calibración Trolox a diferentes concentraciones, utilizada para la determinación de la actividad antioxidante de las fracciones de hojas y el EET de <i>C. x powellii</i> por el método ABTS <sup>+</sup> .....	32
<b>Tabla 9.</b> Clasificación toxicidad según CYTED.....	35
<b>Tabla 10.</b> Actividad citotóxica del (EET) de hojas de <i>C. x powellii</i> obtenida por el método de <i>A. salina</i> .....	36
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de inhibición y concentración en el cual el porcentaje de inhibición es del 50% (CL <sub>50</sub> ) del EET de hojas de <i>C. x powellii</i> sobre AChE.....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Flores de diferentes especies de la familia Amaryllidaceae.....	3
<b>Figura 2.</b> Planta de <i>Crinum x powellii</i> en la que se aprecia la morfología de sus hojas y flores.....	4
<b>Figura 3.</b> Estructuras químicas de ácido shikímico y ácido mevalónico.....	5
<b>Figura 4.</b> Principales núcleos químicos de los cuales derivan los alcaloides...	
<b>Figura 5.</b> Estructura química de algunos flavonoides.....	6
<b>Figura 6.</b> Clasificación de los taninos.....	7
<b>Figura 7.</b> Esqueleto esteroídico.....	8
<b>Figura 8.</b> Estructura química de la cumarina.....	8
<b>Figura 9.</b> Estructura química de un cardenólido.....	9
<b>Figura 10.</b> Estructura química de la saponina triterpenoide y esteroide.....	9
<b>Figura 11.</b> Estructura química de la 1,8-dihidroxiantraquinona.....	11
<b>Figura 12.</b> Estructura química de la Coenzima Q10 y Melatonina.....	12
<b>Figura 13.</b> Estructura química de la vitamina C y E.....	13
<b>Figura 14.</b> Estructura química de la N-acetil-cisteína y L-Carnitina.....	13
<b>Figura 15.</b> Esquema que ilustra el procedimiento seguido para el fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de <i>C. x powellii</i> .....	21
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración de ácido gálico por el método Folin-Ciocalteu.....	28
<b>Figura 17.</b> Contenido total de fenoles determinado por el método Folin-Ciocalteu a una concentración de 1000 ppm para las fracciones y el EET de hojas de <i>C. x powellii</i> .....	28
<b>Figura 18.</b> Curva de calibración Trolox para el método DPPH.....	30
<b>Figura 19.</b> Capacidad antioxidante de las fracciones y el EET de hojas de <i>C. x powellii</i> determinada por el método DPPH.....	30
<b>Figura 19.</b> Contenido total de fenoles determinado por el método Folin-Ciocalteu a una concentración de 1000 ppm para las fracciones y el EET de hojas de <i>C. x powellii</i> .....	31
<b>Figura 20.</b> Curva de calibración Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS <sup>+</sup> .....	32
<b>Figura 21.</b> Capacidad antioxidante de las fracciones y el EET de hojas de <i>C. x powellii</i> determinada por el método ABTS <sup>+</sup> .....	33
<b>Figura 22.</b> Correlación entre el contenido de fenoles totales, obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante encontrada por el método DPPH-, de las fracciones y el extracto etanólico total de hojas de <i>C. x powellii</i> .....	34
<b>Figura 23.</b> Correlación entre el contenido de fenoles totales, obtenidos	

mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante encontrada por el método ABTS <sup>+</sup> de las fracciones y el extracto etanólico total de hojas de <i>C. x powellii</i> .....	34
<b>Figura 24.</b> Toxicidad aguda y crónica del extracto etanólico total de hojas de <i>C. x powellii</i> , obtenida mediante el bioensayo de <i>A. salina</i> .....	36
<b>Figura 25.</b> Curva de calibración del kaempferol para la determinación de CTF.....	37
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de inhibición enzimática del EET de hojas <i>C. x powellii</i> sobre la enzima acetilcolinesterasa asociada a la enfermedad de Alzheimer...	38

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Biogénesis de compuestos antracénicos vía MalonilCoA....	10
<b>Esquema 2. a)</b> Reacción química entre el antioxidante y el DPPH·	
<b>b)</b> Reacción entre DPPH· y Trolox.....	14
<b>Esquema 3. a)</b> Formación del radical ABTS <sup>+</sup> <b>b)</b> Reacción química entre Trolox y ABTS <sup>+</sup> .....	15

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó el tamizaje fitoquímico, la actividad antioxidante, determinación de fenoles totales, actividad citotóxica, a partir del extracto etanólico total de hojas de *Crinum x powellii* "álbum".

Mediante extracción por método Soxhlet se obtuvo el extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii* y posteriormente se realizó la actividad citotóxica por el bioensayo de *Artemia salina*. Se evaluó la actividad antioxidante por los métodos DPPH· y ABTS<sup>+</sup>, donde se utilizaron ácido ascórbico, BHT y tocoferol como patrones de referencia. Se determinaron fenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteau.

El tamizaje fitoquímico realizado mostró la presencia de algunos alcaloides, saponinas, flavonoides y cumarinas volátiles. En la evaluación de actividad antioxidante por el método DPPH· se encontró que la fracción butanólica presentó una actividad antioxidante de 78,961%, indicando que es mayor tanto para el extracto etanólico total como para la fracción de hexano, acetato de etilo y agua. Este resultado muestra una relación con el contenido de fenoles totales, dado que la fracción butanólica fue 120,684 mg ácido gálico/g extracto seco, presentando una mejor actividad antioxidante, que es atribuible a la presencia de compuestos fenólicos. Por el contrario en el método ABTS<sup>+</sup>, la fracción de acetato de etilo fue la que presentó mayor actividad antioxidante (63,454%), frente al EET y a las demás fracciones. Con respecto a la actividad citotóxica del EET de hojas de *C. x powellii* presentó una CL<sub>50</sub> de 308,800 µg/mL, indicando toxicidad moderada.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante, Actividad citotóxica, *Crinum x powellii*, *Artemia salina*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, los productos naturales son de suma importancia en todo el mundo porque ofrecen diversas ventajas en la salud humana y animal (1), sobretodo en la prevención de enfermedades como el cáncer.

El riesgo de padecer algún tipo de cáncer en cualquier persona antes de los 75 años es del 18.7%. En Colombia, el cáncer de próstata, estómago, pulmón y colorrectal, afecta al género masculino, por el contrario el cáncer de mama, cuello uterino y estómago es frecuente en el género femenino (2), por lo que surgió la necesidad de investigar sobre compuestos de origen vegetal, debido a que ejercen un efecto protector en la evolución de enfermedades.

Por otro lado, muchas plantas poseen marcada actividad biológica debido a la presencia de diversos metabolitos secundarios. Las plantas de la familia Amaryllidaceae son algunas de ellas, conocidas por su riqueza en compuestos bioactivos particularmente por la presencia de algunos alcaloides, dada su marcada actividad biológica: antiviral, antibacterial, insecticida, entre otras (3).

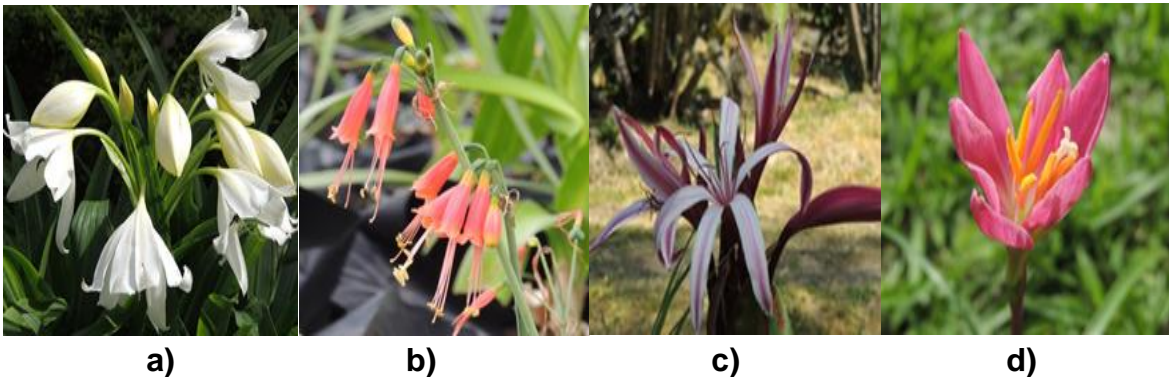
En plantas del género *Crinum* pertenecientes a dicha familia botánica son abundantes los alcaloides de tipo licorina, los cuales presentan actividades biológicas tales como: antimálarica, anticancerígena y citotóxica (4-7).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 FAMILIA AMARYLLIDACEAE

Las plantas de la familia Amaryllidaceae, son monocotiledóneas, bulbosas con flores llamativas (Figura 1). Alrededor del mundo se encuentran 1310 especies y 90 géneros. Se distribuyen en tres zonas geográficas distintas, en el sur de América, el sur de África y el Mediterráneo (8, 9).

Son utilizadas como plantas ornamentales y son de gran importancia en la industria de la floricultura y en medicina tradicional debido a su alto contenido de metabolitos secundarios como alcaloides a los cuales se le atribuyen diferentes tipos de actividad antifúngica, antiparasitaria, antiinflamatoria, entre otras (3, 10-12) .



**Figura 1.** Flores de diferentes especies de la familia **Amaryllidaceae**: **a)** *Crinum jagus*, **b)** *Phaedranassa lehmannii*, **c)** *Crinum amabile*, **d)** *Zephyrantes s.p*

Fuente: Fotos tomadas por Oscar Darío Bermúdez Zambrano, Depto de Biología, Unicauca, Popayán, Cauca.

#### 2.1.1 Género *Crinum*

Existen 160 especies de *Crinum*, de las cuales sólo 30 de ellas han sido objeto de estudio, encontrándose distribuidas alrededor del mundo cerca de lagos y fuentes de agua en trópicos, subtrópicos y regiones templadas de Asia, Australia, África y América (9).

#### 2.1.2 Especie *Crinum x powellii*

La especie *Crinum x powellii* hort. ex Baker es producto del cruce entre *C. bulbispermum* y *C. moorei*; proveniente de jardines botánicos en Europa, florece en verano con flores blancas vistosas similares a las de los lirios, están dispuestas en umbelas de 6 a 9 flores en la extremidad de un largo escapo macizo, las hojas

son planas, largas (9 a 12 dm), arrosetadas. Sus bulbos son de 0,7 dm de diámetro aproximadamente, provistos de cuellos cortos (13). En la Figura 2 se muestra la *Crinum x powellii*.



**Figura 2.** Planta de *Crinum x powellii* en la que se aprecia la morfología de sus hojas y flores

Fuente: Fotos tomadas por Oscar Darío Bermúdez Zambrano, Depto de Biología, Unicauca Popayán, Cauca.

### 2.1.3 Taxonomía de *Crinum x powellii*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Amaryllidaceae

Género: *Crinum*

Especie: *Crinum x powellii*

## 2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS

Son definidos como compuestos que proceden de metabolitos primarios (azúcares, proteínas, grasas, nucleótidos, etc), que no poseen una función relacionada con los procesos fisiológicos primordiales producidos por las plantas, microorganismos y animales.

Los metabolitos secundarios ejercen funciones importantes en la supervivencia de los organismos, generando cierto tipo de sustancias que promuevan atracción o defensa hacia otras especies, además que se les atribuyen diversas actividades biológicas. La producción, biosíntesis o acumulación de dichas sustancias es regulada por factores ambientales, además de la genética y ontogénica inmersa en el ser viviente. La luz, la temperatura, el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el ozono

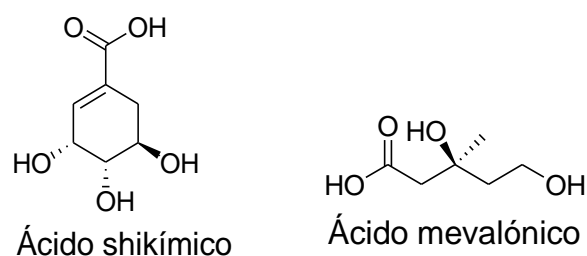


(O<sub>3</sub>) y el tipo de suelo, se consideran factores que varían la concentración de los metabolitos secundarios (14, 15).

Las plantas pueden biosintetizar un gran número de metabolitos secundarios. Los grupos más comunes se nombran a continuación.

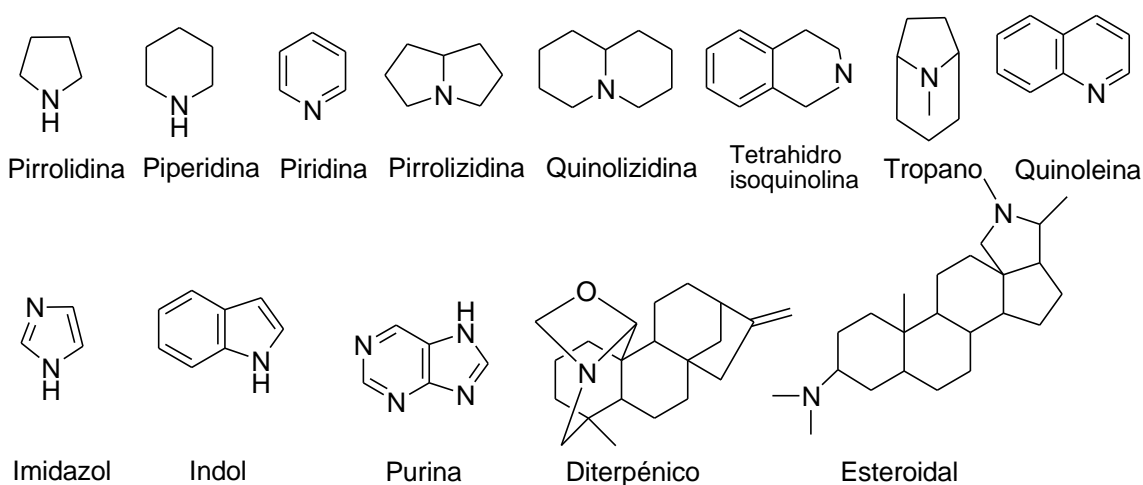
### 2.2.1 Alcaloides

De acuerdo a su origen biosintético, los alcaloides se derivan de: aminoácidos formados a partir del ácido shikímico, terpenos como producto de ácido mevalónico (Figura 3), y acetogeninas originados de malonato y acetato (16). Estructuralmente se pueden distinguir varios tipos de alcaloides como: alifáticos, aromáticos y origen diverso (purinas, macrociclos, etc) (Figura 4).



**Figura 3.** Estructuras químicas del ácido shikímico y ácido mevalónico (17, 18)

Recientemente, se han identificado más de 27.000 alcaloides de origen natural encontrados en flores, animales y microorganismos. Los extractos vegetales con alto contenido de alcaloides se utilizan frecuentemente por su propiedad analgésica, antipirética, antiasmática, anticancerígena, antiarrítmica, antihipertensiva y antibacteriana (19, 20).



**Figura 4.** Principales núcleos químicos de los cuales derivan los alcaloides (21)

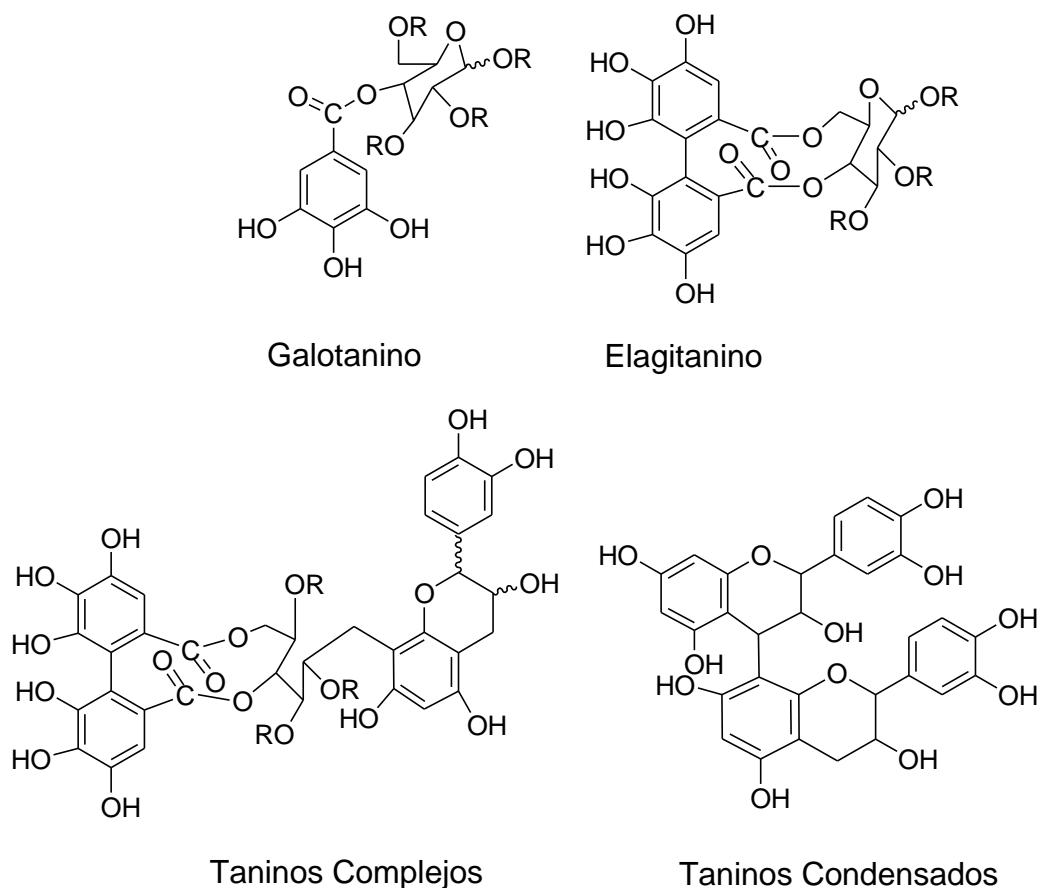


presión arterial e inflamación y estrés oxidativo con lo que frenan los procesos neurodegenerativos de enfermedades como Parkinson y Alzheimer (24, 25).

### 2.2.3 Taninos

Los taninos son biosintetizados vía acetogeninas (16). Son compuestos fenólicos con peso molecular elevado. Se clasifican en dos clases: taninos hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables son estructuras de D-glucosa esterificada con ácidos hidroxifenólicos, como ácido elágico o ácido gálico, donde se produce elagitaninos o galotaninos. Los taninos condensados (Figura 6) se encuentran en semillas y en grandes cantidades en la corteza y en la madera de algunos árboles, son llamados proantocianidinas, compuestos por cadenas oligoméricas y poliméricas de unidades de polihidroxi flavonas.

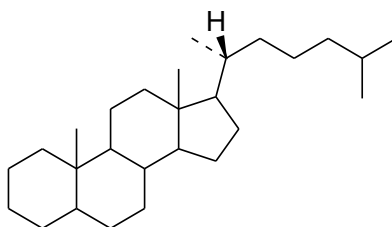
En medicina, los taninos son utilizados como antidiarreicos y antiinflamatorios, e industrialmente los taninos condensados son utilizados para el curtido de pieles (26, 27).



**Figura 6.** Clasificación de los taninos

### 2.2.4 Esteroides y triterpenoides

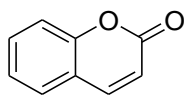
Son compuestos producidos por plantas y animales. Los terpenoides se biosintetizan a partir de la vía del ácido mevalónico, donde tres moléculas de acetil-CoA se condensan y forman dicho ácido (16). Los triterpenoides son compuestos orgánicos con un esqueleto carbonado de seis unidades de isopreno (hidrocarburo de 5 átomos de carbono alifáticos o cíclicos). Los esteroides (Figura 7) son triterpenoides, son compuestos producidos por plantas y animales. Los esteroides constan de una estructura con cuatro ciclos, en los que 3 de ellos son de seis miembros y un ciclo es de 5 miembros. Se han realizado ensayos *in vivo* e *in vitro* de triterpenoides de origen natural y se ha demostrado actividad antiinflamatoria, antitumoral, antiinfecciosa y antimálarica (28-30).



**Figura 7.** Esqueleto esteroídico

### 2.2.5 Cumarinas

Son compuestos de origen natural, se derivan biogenéticamente del ácido shikímico (22). En su estructura contienen un anillo bencénico ligado a una pirona (anillo heterocíclico de seis miembros con un átomo de oxígeno y cinco carbonos  $sp^2$ ) (Figura 8). Poseen actividad biológica diversa como: antitrombótica, antibacteriana, anti-mutagénica, antiinflamatoria, anticoagulante y anticancerígena. Algunas cumarinas son utilizadas como medicamentos anticancerígenos, otras se agregan a protectores solares o en cremas para absorber los rayos UV, todas dependerán del tipo de núcleo de cumarina (31, 32).

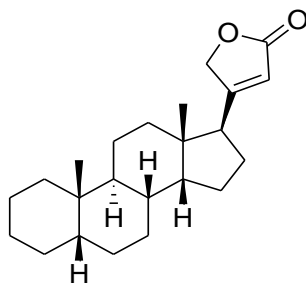


**Figura 8.** Estructura química de la cumarina (33)

### 2.2.6 Cardenólidos

Su biosíntesis se produce a partir de la vía del ácido mevalónico. Son esteroides cardiotónicos en los que un anillo pentagonal de lactona  $\alpha$ - $\beta$ -insaturada está ligado al C-17. Tienen 23 átomos de carbono en su estructura (Figura 9).

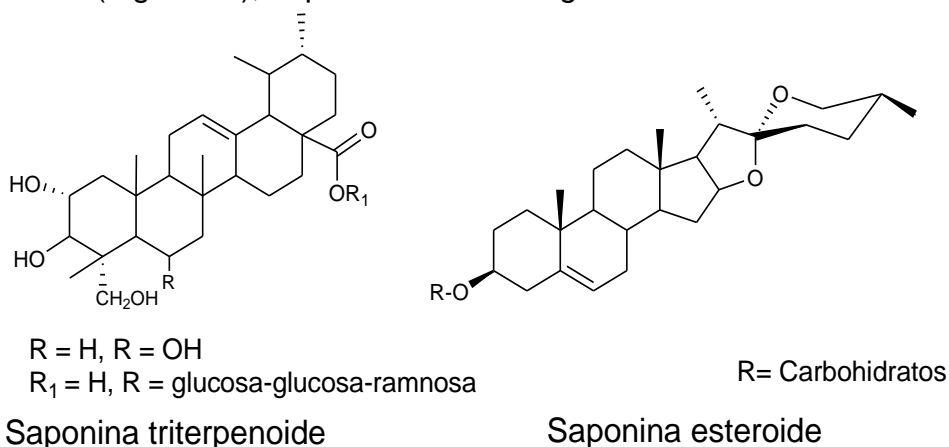
A concentraciones bajas se usan como medicamentos, que actúan selectivamente sobre el corazón incrementando la fuerza de contracción del miocardio, aumentando el rendimiento cardiaco y disminuyendo su frecuencia, además mejoran la circulación sistémica o general del cuerpo humano. También ejercen su función como diuréticos, aumentando la filtración glomerular. Una desventaja de los cardenólidos es que a concentraciones altas presentan alta toxicidad (34, 35).



**Figura 9.** Estructura química de un cardenólido (36)

### 2.2.7 Saponinas

Se sintetizan a partir de la vía del ácido mevalónico (16). Las saponinas son llamadas glucósidos, son compuestos orgánicos que tienen en su estructura una aglicona no azucarada con diversos sustituyentes que pueden ser metilo, hidroxilo o carboxilo, que a su vez se une a uno o más azúcares como glucosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa, ramnosa o metilpentosa. Se clasifican como triterpénicas o esteroidales (Figura 10), dependiendo de la aglicona.

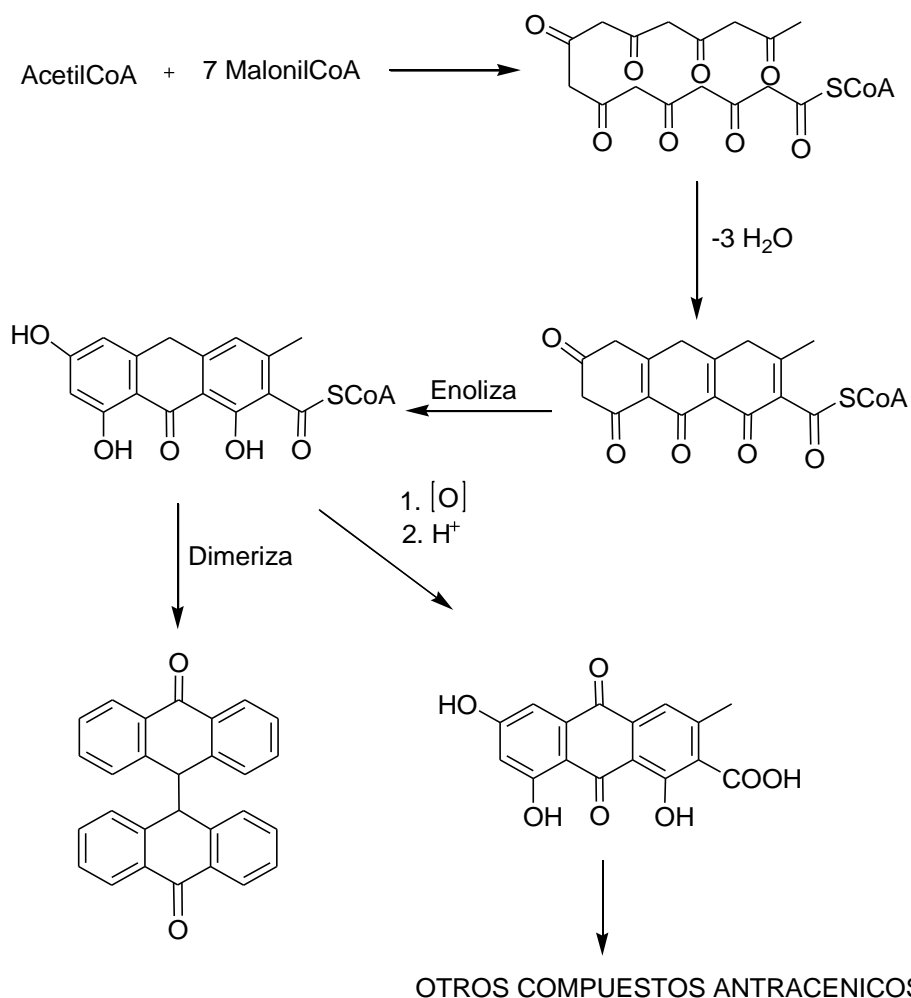


**Figura 10.** Estructura química general de saponinas triterpenoides y esteroidales (38)

Se encuentran distribuidas en plantas y en organismos marinos. Presentan actividad antiinflamatoria, reducen los niveles de colesterol y de glucosa en la sangre (37).

## 2.2.8 Antraquinonas

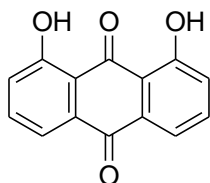
En la biogénesis de compuestos antracénicos vía MalonilCoA, una molécula de AcetilCoA se condensa sucesivamente con 7 moléculas de MalonilCoA para producir una cadena policetídica de 16 carbonos u octacétido. Después, el octacétido se pliega de la manera como se presenta en el Esquema 1, y se cicliza por condensaciones entre los grupos metilenos y sus vecinos carbonilos para dar el triciclo cetónico. Este intermedio enoliza para generar el núcleo de las antronas. El núcleo de las antronas puede dimerizarse enzimáticamente para producir diantronas, o puede oxidarse para dar antranoles y/o antraquinonas (16, 39).



**Esquema 1.** Biogénesis de compuestos antracénicos vía MalonilCoA

Las antraquinonas se clasifican en simples y complejas: las simples tienen un esqueleto carbonado 1,8-dihidroxi-antraquinónico (Figura 11), en el que el C-3 se sustituye por grupos metilo, metoxilo, carboxilo e hidroxetilen, y las complejas tienen componentes estructurales donde hay una dimerización.

Se distribuyen en la naturaleza en algunos microorganismos e insectos y en mayor parte en plantas. Actualmente, se obtienen fármacos naturales con efectos laxantes a base de plantas que contengan cierto tipo de antraquinonas, que son utilizados por personas quienes sufren de estreñimiento crónico.



**Figura 11.** Estructura química de la 1,8-dihidroxi-antraquinona (40)

### 2.3 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El oxígeno es uno de los elementos más importantes y esenciales en organismos aeróbicos pero puede causar daño celular debido a reacciones de oxidación.

Los radicales libres se definen como especies químicas reactivas que contienen un electrón desapareado en el orbital externo, lo que genera alta reactividad oxidante debido a su inestabilidad. Se estabilizan por medio de reacciones de oxidación-reducción con moléculas biológicas como: ARN, ADN, lípidos, enzimas, entre otros, reaccionando de manera muy rápida con el radical, por ello se conocen como especies reactivas. Como ejemplo de las especies reactivas se encuentran las ERO, ellas son representadas por ambas moléculas oxigenadas, radicales y no radicales (tabla 1) (41, 42). Además, se pueden encontrar especies reactivas de nitrógeno, hierro, cobre y azufre.

**Tabla 1.** Especies reactivas de oxígeno.

Radicales	No radicales
Superóxido ( $O_2^-$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
Hidroxilo ( $OH^\cdot$ )	Singlete de oxígeno ( $1/2 O_2$ )
Peroxilo ( $RO_2^\cdot$ )	Ozono ( $O_3$ )

### 2.4 ESTRÉS OXIDATIVO

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 de 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, caracterizada por el descenso de actividad de los sistemas endógenos para combatir el ataque oxidativo encaminado hacia biomoléculas

específicas, causando múltiples daños en el organismo como enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson), además de patologías cardiovasculares y algunos tipos de cáncer, envejecimiento prematuro (disminución del tiempo de vida) (41, 43).

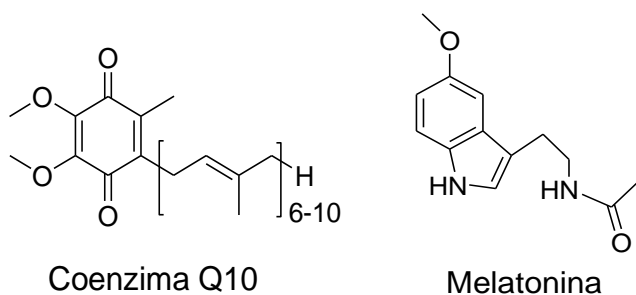
## 2.5 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias generalmente orgánicas que impiden o retardan la autooxidación, inhibiendo su mecanismo o la reacción en cadena. Estos compuestos evitan la acumulación de ERO mediante el aumento de captación intracelular, previniendo el daño celular (41).

Los antioxidantes pueden ser de origen endógeno o exógeno.

- **Antioxidantes endógenos**

Los antioxidantes se encuentran en el cuerpo humano siendo participes como mecanismos de defensa, algunos de ellos son enzimáticos como glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, catalasa y superóxido dismutasa protegiendo a las células de las consecuencias tóxicas del metabolismo del oxígeno. También existen antioxidantes no enzimáticos muy eficientes como melatonina, coenzima Q 10 (Ubiquinona) (Figura 12) y proteínas quelantes de metales (43, 44).

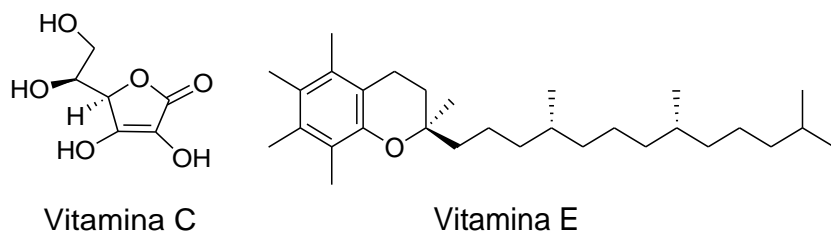


**Figura 12.** Estructura química de la Coenzima Q10 y melatonina (45, 46)

- **Antioxidantes exógenos**

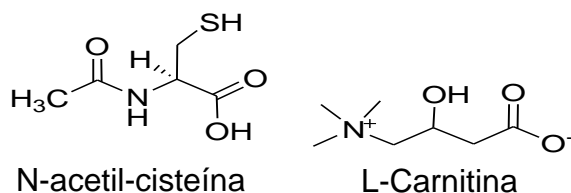
Los carotenoides, oligoelementos, polifenoles, vitamina C y E (Figura 13), son antioxidantes naturales, que contrarrestan la peroxidación lipídica eliminando los radicales libres derivados del oxígeno, ayudando a minimizar los efectos perjudiciales causados en el organismo. Se ha reportado que la vitamina C y vitamina E puede restaurar la salud vascular o prevenir el daño vascular y en estudios epidemiológicos se dice que el consumo de alimentos ricos en polifenoles puede llegar a disminuir los factores de riesgo de diabetes tipo 2 (47-49).





**Figura 13.** Estructura química de la vitamina C y E (50, 51)

Existen algunos antioxidantes sintéticos como N-acetil-cisteína y L-carnitina (Figura 14) los cuales son compuestos que normalizan la producción de ERO sustituyendo los antioxidantes endógenos en las células endoteliales y de músculo liso (47).



**Figura 14.** Estructura química de la N-acetil-cisteína y L-Carnitina (52, 53)

## 2.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Este método espectrofotométrico está basado en la reacción de los fenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu en presencia de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . El reactivo de Folin-Ciocalteu está compuesto por una mezcla de ácido fosfotúngstico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) y ácido fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), los cuales reaccionan con todo tipo de fenoles, provocando su oxidación y la reducción de dichos ácidos en óxidos de tungsteno ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) y molibdeno ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ) de color azul. Los compuestos de color azul poseen una absorción máxima a una longitud de onda de 765 nm, la intensidad de absorción de luz es proporcional a la concentración de fenoles (54, 55).

## 2.7 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

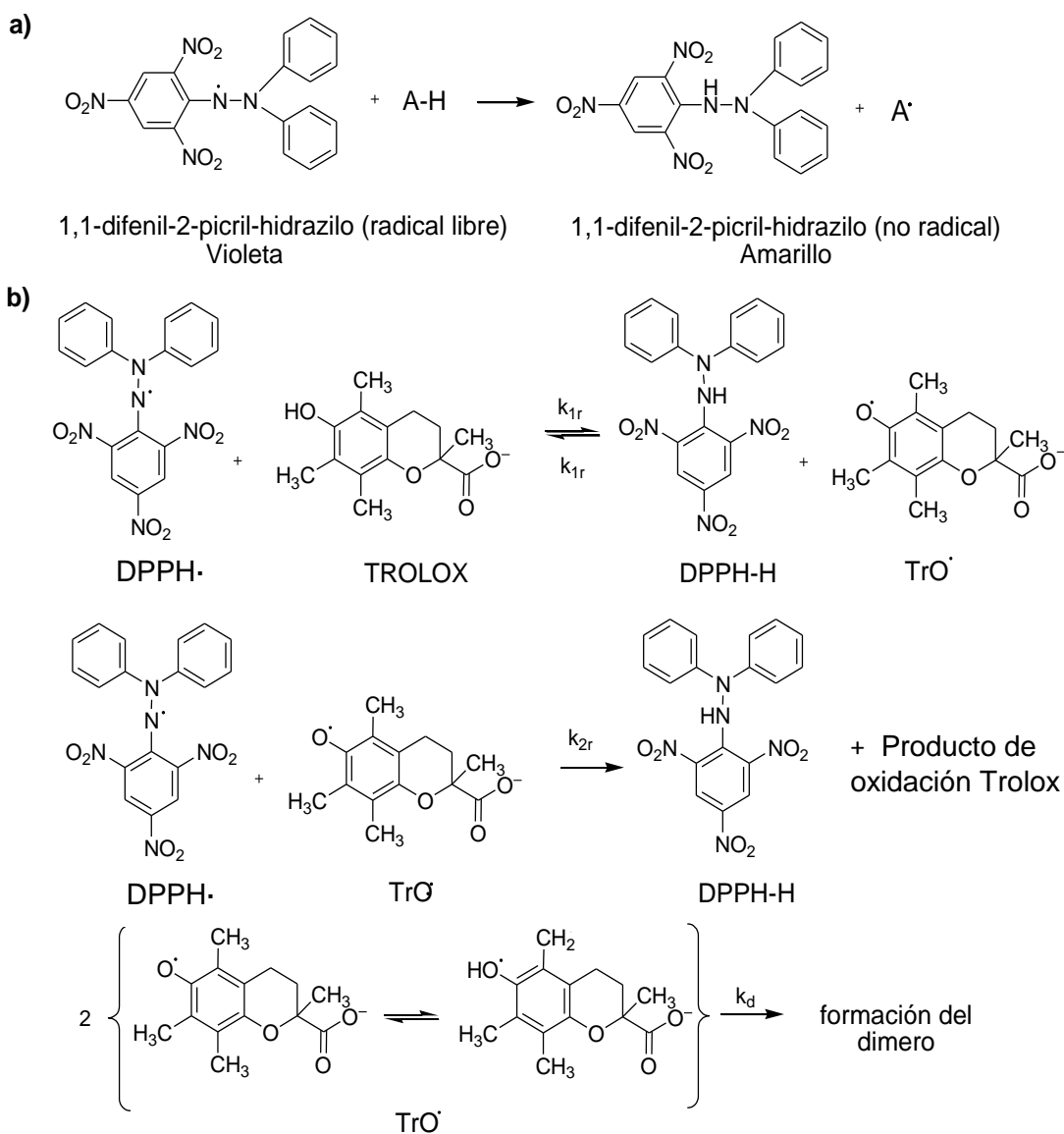
Actualmente, existen varios métodos para evaluar la actividad antioxidante en sistemas *in vitro* o *in vivo*. Uno de los ensayos *in vitro* más utilizados es la medida de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla, alimento, muestra biológica o extracto vegetal, la cual consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical.

Algunos compuestos cromógenos utilizados para medir la actividad antioxidante de una muestra son: ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), DMPD (diclorhidrato de N,N-Dimetilpferilendiamina) y FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica). Los

métodos más empleados son  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  y  $\text{DPPH}^{\cdot-}$ , debido a que presentan buena estabilidad bajo ciertas condiciones (56).

### 2.7.1 Método del DPPH·

El  $\text{DPPH}^{\cdot-}$  es conocido como un radical libre estable, que tiene deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula, lo que hace que no se formen dímeros, a diferencia de otros radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta típico del radical, el cual puede absorber en metanol en una longitud de onda entre 515 y 517 nm.

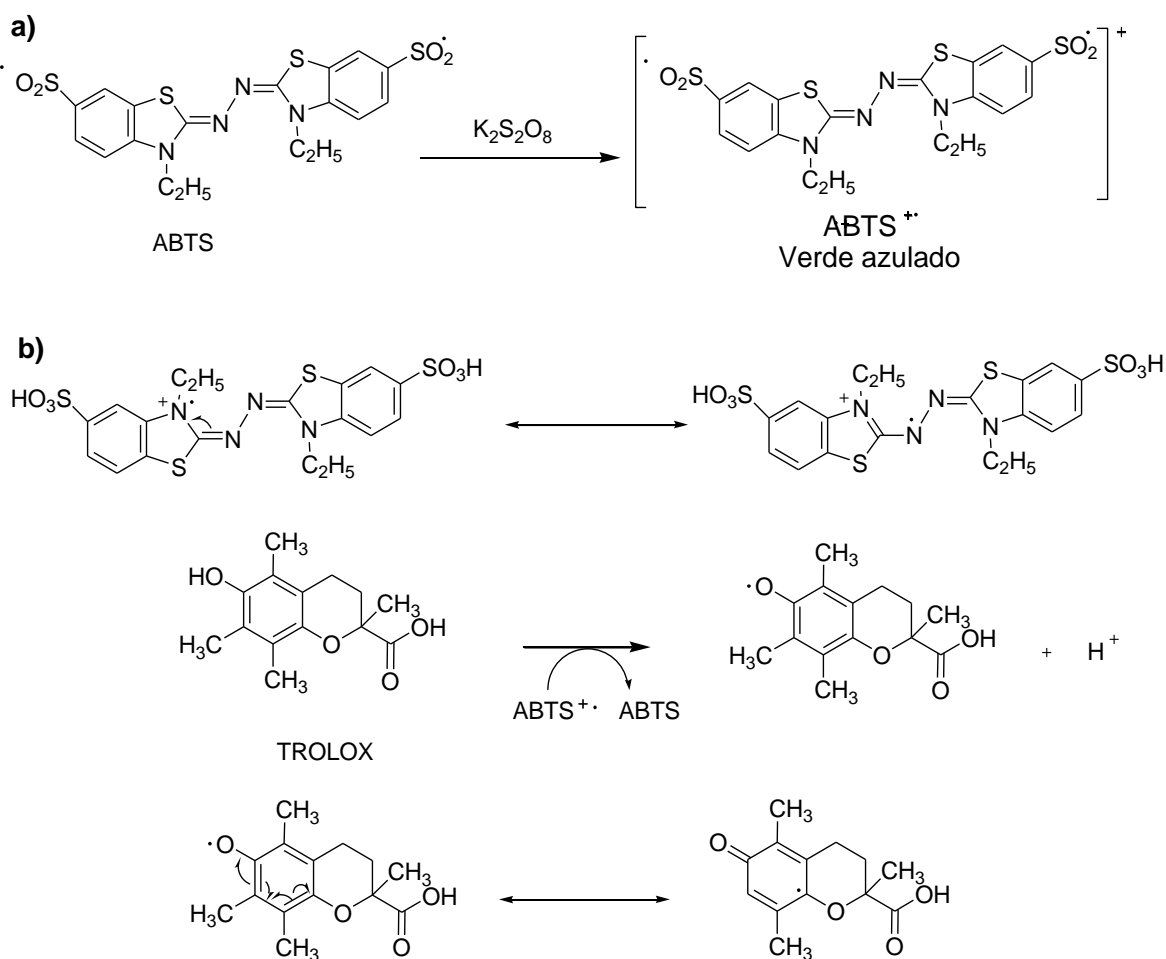


**Esquema 2. a)** Reacción química entre el antioxidante y el  $\text{DPPH}^{\cdot-}$  **b)** Reacción entre  $\text{DPPH}^{\cdot-}$  y Trolox

Cuando el electrón desapareado del DPPH· se aparea con un electrón o llega a sustraer un átomo de hidrógeno del compuesto antioxidante la solución pasa a color amarillo claro que corresponde a la forma reducida DPPH-H. El DPPH· comienza como un radical libre (Esquema 2), el paso inicial de la reacción con Trolox permite la formación de una forma oxidada de Trolox (TroO·). El radical TroO· reacciona con otra molécula de DPPH· estabilizando a este radical y formándose un producto de oxidación Trolox. Estudios recientes han revelado que el tiempo de reacción requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox es entre 15-30 min (57).

### 2.7.2 Método del ABTS<sup>•+</sup>

El ABTS<sup>•+</sup> tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica.



**Esquema 3. a) Formación del radical ABTS<sup>•+</sup> b) Reacción química entre Trolox y ABTS<sup>•+</sup>**

El radical  $ABTS^{\cdot+}$  tiene la ventaja que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico. El ensayo consiste en la técnica de decoloración, donde el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes.

Otra explicación del método es la generación del radical catión  $ABTS^{\cdot+}$ , donde se implica la producción del cromóforo  $ABTS^{\cdot+}$  (verde azulado) a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ). La adición de los antioxidantes al radical previamente formado lo reduce a ABTS (Esquema 3). La decoloración está relacionada con el porcentaje de inhibición del radical catión  $ABTS^{\cdot+}$ , determinado en función entre concentración y tiempo. (58, 59).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los radicales libres juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cancerígenas y tumorales, actualmente, se han reportado a nivel mundial cifras alarmantes de personas con cáncer, siendo causante de la muerte de miles de ellas. El uso de compuestos sintéticos antioxidantes que ayudan a reducir los efectos dañinos de los radicales libres ha sido cuestionado por sus efectos adversos sobre la salud, es por esto que se ha generado interés en la búsqueda de antioxidantes naturales. Actualmente, no se ha reportado actividad antioxidante, ni citotóxica en el extracto etanólico total de hojas de *Crinum x powellii*, sin embargo, la presencia de alcaloides como undulatina y licorina (metabolitos con actividad antineoplásica y anticancerígena), justifica el estudio biológico de esta planta que se propone en este trabajo de investigación. En Popayán, es frecuente el cultivo de esta especie.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antioxidante y citotóxica del extracto etanólico obtenido de hojas de *Crinum x powellii*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii* mediante técnicas de análisis cualitativo para determinar la presencia de metabolitos secundarios.
- Determinar los fenoles totales contenidos en el extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii* empleando el método de Folin-Ciocalteu.
- Evaluar la actividad antioxidante de la fracción acuosa, butanol, acetato de etilo, hexano y del extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii* a través de los métodos colorimétricos DPPH· y ABTS<sup>+</sup>.
- Evaluar la actividad citotóxica en el extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii* a través del bioensayo de letalidad en *Artemia salina*.
- Determinar el contenido total de flavonoides en el extracto etanólico total de hojas de *C.x powellii* a través del método de tricloruro de aluminio.
- Evaluar la actividad de inhibición enzimática en el extracto etanólico total de hojas *C. x powellii* sobre la enzima acetilcolinesterasa.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El material vegetal, correspondiente a hojas de *C. x powellii*, proviene de la colección de plantas de la familia Amaryllidaceae, a cargo del Grupo de Investigación Química de Compuestos Bioactivos (QCB), establecida en la vereda la Rejoja, propiedad de la Universidad del Cauca.

### 5.2 REACTIVOS

Etanol al 96%, hexano, acetato de etilo, butanol, adquiridos de J.T. Baker (Xalostoc, México). Ácido (+)-tartárico, ácido clorhídrico (37%), ácido acético glacial, ácido pícrico, tricloruro de antimonio, adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Nitrato de bismuto III pentahidratado, persulfato de potasio, hidróxido de sodio, ácido cítrico, hidróxido de potasio, yoduro de potasio, ácido bórico, adquiridos de Carlo Erba (Val de Reuil, Francia). Ácido sulfúrico concentrado, cloruro férrico anhidro, sulfato ferroso heptahidratado, adquirido de Fisher Scientific (Nueva York, USA). Cloroformo, adquirido de Mallinckrodt (Xalostoc, México). Gelatina, adquirida de Difco (Le Point de Claix, Francia). Ácido 3,5-dinitrobenzoico, adquirido de Alfa Aesar (Nueva York, USA). Acetato de plomo (II) fue adquirido de Laboratorios Biocroma (Cali, Colombia). Todos los reactivos de grado analítico: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, ácido acético, metanol, ácido sulfúrico, adquiridos de Vetec. Sílicagel 60F254, adquirida de Merck (Darmstadt, Alemania). DPPH· (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), ABTS (sal diamónica del ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzo tiazolin-6-sulfónico), BHT (Butilhidroxitolueno), DL- $\alpha$ -Tocoferol, Trolox (ácido-6- hidroxil- 2, 5, 7, 8 tetrametilcromano- 2-carboxílico), adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ácido ascórbico, carbonato de sodio, adquiridos de Mol Labs (Bogotá, Colombia). Metanol, adquirido de JT. Baker (Xalostoc, México). Cloruro de sodio, fosfato dihidrógeno de potasio, fosfato de sodio dibásico, cloruro de potasio, persulfato potásico, adquiridos de CarloErba (Val de Reuil, Francia). Folin-Ciocalteau, ácido gálico adquiridos por Panreac (Barcelona, España). Dimetilsulfóxido, dicromato de potasio, adquiridos de JT Baker (Xalostoc, México). Huevos de *Artemia salina*, sal marina sintética, adquirida de Quimpo (Popayán, Colombia). Hidróxido de sodio, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, dimetilsulfóxido, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, bicarbonato de sodio, tartrato de sodio y potasio, bisulfito de sodio, adquiridos de Vetec. Acetato de Etilo (Synth, Sao Paulo, Brasil) acetato de etilo, cloroformo, metanol y *n*-hexano de las marcas Mallinckrodt, J.T Baker (Phillipsburg, Estados Unidos) y Carlo Erba (Arese Milano, Italia). Acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* tipo VI-S, Ácido-5,5'- Ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) (Reactivo de Ellman), ioduro de acetilticolina (IATC) y la

eserina, adquiridos de Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos). Galantamina (Reminyl), adquirida de Janssen-Cilag (Zug, Suiza). Buffer Base-Tris, adquirido de Promega (Fitchburg, Estados Unidos).

### 5.3 PROCESO DE SECADO Y EXTRACCIÓN

Se utilizaron 140 g de material vegetal fresco. Se cortaron las hojas en trozos pequeños y secaron a 25 °C durante un mes. Las hojas secas se colocaron en bolsas herméticas para evitar deterioro biológico, físico y químico. Se pesaron 30 g de material vegetal seco y luego se sometió a extracción soxhlet durante un tiempo de 48 horas, usando como solvente etanol al 96 %. Luego de obtener el extracto etanólico, se llevó a sequedad mediante concentración a presión reducida. Las muestras se guardaron en refrigerador a una temperatura de 4°C.

### 5.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

**Tabla 2.** Pruebas realizadas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico total de hojas de *Crinum x powellii*.

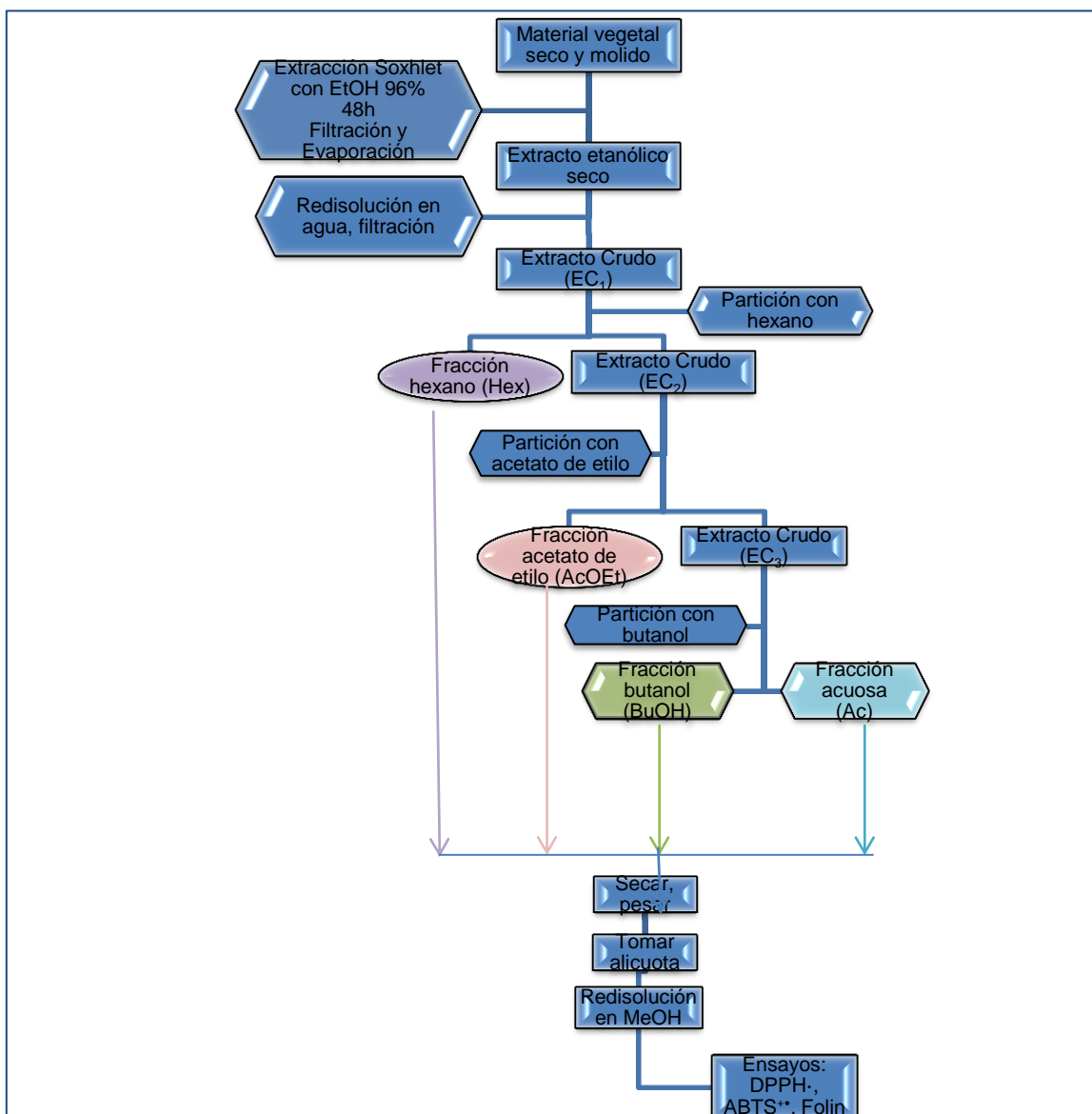
Metabolito	Prueba en tubo de ensayo	Descripción
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff Mayer	Precipitado color anaranjado-rojizo Precipitado de color blanco a crema
	Wagner	Precipitado color marrón
<b>Cardiotónicos</b>	Reactivo de Baljet Kedde	Coloración naranja-rojiza Coloración rosa o azul-violeta
	Raymond-Marthoud Keller-Killiani	Coloración naranja-rojiza En la superficie aparece un anillo pardo y una capa acética azul verdosa
	Volátiles en papel impregnado con NaOH	Puntos fluorescentes amarillos-verdosos en el papel con Luz UV (365 nm)
<b>Cumarinas</b>		
<b>Taninos</b>	Cloruro férrico	Coloración azul o verde
	Solución salina	No hay coloración y precipitación
	Solución gelatina	Precipitado blanco
	Solución gelatina y sal	Precipitado blanco
<b>Saponinas</b>	Agua caliente	Formación de espuma
<b>Triterpenos y esteroides</b>	Liebermann-Burchard	Coloración verde, azul-verdosa
	Salkowski	Coloración amarilla-rojiza
<b>Derivados antracénicos libres</b>	Reacción de Borntrager	Coloración rojiza



Se efectuó al extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii*, el tamizaje fitoquímico con el propósito de identificar cualitativamente metabolitos secundarios como: alcaloides, cardiotónicos, cumarinas volátiles, taninos, saponinas, triterpenos y esteroides (16, 60). En la tabla 2 se presentan las pruebas cualitativas realizadas al extracto etanólico total de hojas de *Crinum x powellii* para el tamizaje fitoquímico.

## 5.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

### 5.5.1 Fraccionamiento



**Figura 15.** Esquema que ilustra el procedimiento seguido para el fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de *C. x powellii*

Este proceso se realizó mediante extracción líquido-líquido (ELL), utilizando disolventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo, 1-butanol). La metodología se efectuó de la siguiente manera: Se adicionó 1 g de extracto etanólico seco en 30 mL de agua y se disolvió con ayuda de un equipo de ultrasonido. Este fue designado como extracto crudo (EC<sub>1</sub>). En un embudo de separación se depositó el EC<sub>1</sub> y se adicionaron 10 mL de hexano, se agitó, se dejó reposar por 10 minutos, dónde se observó la separación de la fase orgánica y de la fase acuosa, se repitió dos veces el proceso mediante extracción sucesiva, obteniéndose la fracción hexano (Hex) y del extracto acuoso crudo (EC<sub>2</sub>). Al EC<sub>2</sub> se le adicionó acetato de etilo (de igual manera que el fraccionamiento con hexano) donde se generó, la fracción de acetato de etilo (AcOEt) proporcionada y el EC<sub>3</sub>. Al EC<sub>3</sub>, se le realizó el fraccionamiento con 1-butanol, donde se obtuvo, la fracción butanólica (BuOH) correspondiente y la fracción acuosa (Ac). Finalmente cada fracción obtenida (Hex, AcOEt, BuOH, Ac) se llevó a sequedad y se almacenó a una temperatura de 4°C. Con dichas fracciones y el EET, se prepararon soluciones madre de 1000 µg/mL para realizar la evaluación de actividad antioxidante y determinación cuantitativa de fenoles totales.

En la Figura 15 se presenta el esquema que muestra el procedimiento realizado para el fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de *C. x powellii*.

### **5.5.2 Determinación del contenido total de fenoles**

La determinación se llevó a cabo mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (61) con algunas modificaciones (62). La curva de calibración se preparó a partir de disoluciones metanólicas del patrón ácido gálico variando la concentración en un rango de valores desde 15 a 75 µg/mL, y el valor de absorbancia se determinó en el espectrofotómetro a una  $\lambda=760$  nm.

Los análisis de las muestras se realizaron de la siguiente forma: se mezclaron 1 mL de solución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu (0,2 equivalentes/L) y 0,2 mL de solución metanólica del extracto, a diferentes concentraciones (500 a 2000 µg/mL), luego se incubaron por 5 minutos. Consecutivamente se adicionaron 0,8 mL de solución acuosa de carbonato de sodio (7,5 g/100 mL), se agitaron y se incubaron en la oscuridad por una hora y se registró el valor de absorbancia a una  $\lambda=760$  nm. El contenido de componentes fenólicos presentes se expresó como miligramos de ácido gálico por gramos en peso seco de la planta.

### **5.5.3 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH-**

Este ensayo se llevó a cabo por colorimetría (63) con ciertas modificaciones (62). Se disolvió 3,0 mg de DPPH<sup>•</sup> en 100 mL de metanol y a partir de esta disolución,

se preparó por dilución una nueva solución cuya absorbancia fue  $0,800 \pm 0,03$  ( $\lambda=515$  nm) en un espectrofotómetro UV-Vis GENESIS 6.

Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente y en la oscuridad, la medida de la absorbancia se efectuó así: se mezclaron 2 mL de solución de DPPH<sup>\*</sup> en una celda con 1 mL de disolución metanólica de la muestra, en un rango de concentraciones de muestra de 20 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , y posteriormente se agitó. Cada 15 minutos se tomaron medidas. En este ensayo se emplearon los patrones estándar de ácido ascórbico (ÁA),  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -T) y Butilhidroxitolueno (BHT).

La curva de calibración se realizó con una solución estándar de Trolox, en la que se utilizaron concentraciones desde 5 a 20  $\mu\text{g/mL}$ .

Los resultados fueron convertidos a porcentaje de actividad antioxidante (%AA) y expresados como capacidad antioxidante en  $\mu\text{mol}$  de equivalentes Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico)/g de extracto seco (CAET). Los valores se expresaron como la media de tres réplicas.

#### **5.5.4 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS<sup>+</sup>**

Este ensayo se llevó a cabo por colorimetría (59) con ciertas modificaciones (62). Este procedimiento se efectuó en la oscuridad y a temperatura ambiente. El catión radical ABTS<sup>+</sup> se disolvió en buffer fosfato (pH 7,4) por reacción de 50 mL de una disolución de ABTS en persulfato potásico (2 mM) más 200  $\mu\text{L}$  de solución de persulfato de potasio en agua desionizada (70 mM), la mezcla se dejó en reposo durante 17 horas. La disolución de ABTS<sup>+</sup> preparada se diluyó con buffer hasta que la medida de la absorbancia fue  $0,800 \pm 0,03$  ( $\lambda=734$  nm). La determinación de absorbancia en las muestras se hizo de la siguiente forma: 1900  $\mu\text{L}$  de una solución buffer de fosfatos (PBS) (pH=7,4) del catión radical ABTS<sup>+</sup> se mezclaron en una celda de plástico con 100  $\mu\text{L}$  de una solución metanólica de la muestra, variando las concentraciones desde 20 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  de cada fracción, se agitaron y se colocaron a temperatura ambiente y en la oscuridad por un tiempo de 5 minutos y se registró el valor de la absorbancia en el espectrofotómetro a 734 nm.

La curva de calibración se realizó con una solución estándar de Trolox que fue construida variando concentraciones entre 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Los resultados fueron convertidos a porcentaje de actividad antioxidante (%AA) y expresados como capacidad antioxidante en  $\mu\text{mol}$  de equivalentes Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico)/g de extracto seco. Los valores se expresaron como la media de tres réplicas.

## 5.6 Análisis estadístico

Los resultados de la actividad antioxidante fueron expresados como el promedio de 3 determinaciones. A los resultados obtenidos en los métodos DPPH· y ABTS<sup>+</sup> se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey con un nivel de significancia  $p < 0,05$ . Además, se realizó un análisis de correlación de Pearson ( $R^2$ ) entre el TPC y la capacidad antioxidante total determinada mediante los métodos DPPH· y ABTS<sup>+</sup>. El análisis estadístico se desarrolló empleando el software SPSS 11.5.

## 5.7 Determinación de la actividad citotóxica mediante el bioensayo de la *Artemia salina*

Se determinó la citotoxicidad preliminar del EET de hojas de *C. x powellii* mediante el bioensayo con camarones de mar (60). Se agregaron 50 mg de huevos de *Artemia salina* en 300 mL de solución de sal marina, preparada a partir de 30 g de sal marina disuelta en 1 litro de agua destilada. De esta forma se colocaron a eclosionar los huevos durante 48 horas en una cámara ambiental (Biotronette Mark III, Environmental Chamber). En tubos de ensayos se adicionaron 10 nauplios y se completó con 5 mL de solución salina al 3,7% y a cada uno se agregaron diferentes concentraciones del extracto disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), de tal manera que al final se obtuvieron concentraciones de 10, 50, 100, 200 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Se realizaron 4 controles, 2 positivos y 2 negativos, en uno de los controles negativos se utilizó DMSO y en el otro los nauplios en agua de mar. Para los controles positivos se hizo la preparación con concentraciones de 400 y 800 ppm de una solución de dicromato de potasio. Se realizó el conteo de larvas muertas transcurridas 6 y 24 horas.

Los cálculos de Concentración Letal 50 ( $CL_{50}$ ) se realizaron empleando el software GraphPad Prism 5.0.

## 5.8 Determinación del contenido total de flavonoides a través del método de tricloruro de aluminio

La determinación se llevó a cabo por el método del tricloruro de aluminio (64). La curva de calibración se preparó a partir de disoluciones metanólicas del patrón kaempferol variando la concentración en un rango de valores desde 0 a 0,8  $\mu\text{g/mL}$ , y el valor de absorbancia se determinó en el espectrofotómetro a una  $\lambda = 500 \text{ nm}$ . Previo al ensayo se preparó una solución metanólica del extracto (100  $\mu\text{g/mL}$ ). El análisis de la muestra fue realizado de la siguiente manera: en los pozos, se

agregaron 115  $\mu\text{L}$  de agua, 20  $\mu\text{L}$  de solución metanólica del extracto y 7,5  $\mu\text{L}$  de nitrito de sodio (5%), posteriormente se incubaron por 5 minutos. Luego se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de solución etanólica de tricloruro de aluminio (2,5%). Después se dejó reaccionar por 6 minutos. Por último, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de solución acuosa de hidróxido de sodio (1M) y 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada, se homogenizó y 5 minutos después se midió el valor de absorbancia en el lector de microplacas, Thermo Scientific Multiskan GO a una  $\lambda=500\text{ nm}$ .

Para dicho ensayo, el blanco fotométrico estaba compuesto por 272,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . De forma análoga el blanco del extracto vegetal consistió en 20  $\mu\text{L}$  del extracto vegetal y 252,5  $\mu\text{L}$  de metanol.

### **5.9 Determinación de la actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa**

La determinación se llevó a cabo por colorimetría (65, 66). Previo al ensayo, se preparó una solución de 1000  $\mu\text{g/mL}$  del extracto vegetal disuelto en solución buffer tris (50 mM, pH 8) y en metanol al 10 %.

El análisis de la muestra fue realizado de la siguiente manera: en una microplaca de 96 pozos, se agregaron 25  $\mu\text{L}$  extracto disuelto (15,625 $\mu\text{g/mL}$ , 31,25  $\mu\text{g/mL}$ , 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , 125  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$  y 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), 50  $\mu\text{L}$  de tampón B (50 mmol/L, pH 8, conteniendo 0.1 % albumina de suero bovino), 125  $\mu\text{L}$  ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) disuelto en tampón A, 3 mmol/L (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, conteniendo 0.1 mol/L NaCl y 0.02 mol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 25  $\mu\text{L}$  de yoduro de acetiltiocolina (15 mmol/L), posteriormente se agitó, se determinó el valor de absorbancia en el lector de microplacas a una  $\lambda=405\text{ nm}$ . Finalmente, se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de solución de acetilcolinesterasa, se incubó por 15 minutos a 30°C, y nuevamente se registró el valor de absorbancia a una  $\lambda=405\text{ nm}$ .

En la preparación del control negativo, a excepción de agregar extracto vegetal se utilizó 25  $\mu\text{L}$  de buffer tris, más todos los reactivos y cantidades anteriormente mencionadas en este ensayo. El blanco fotométrico estaba compuesto por 250  $\mu\text{L}$  buffer tris (50 mM, pH 8). Paralelamente, se realizó un blanco a partir del extracto vegetal que contenía 25  $\mu\text{L}$  de extracto vegetal y 225  $\mu\text{L}$  de buffer tris.

La curva de respuesta para los patrones, eserina y galantamina, fue construida variando concentraciones entre 7,81 y 500  $\mu\text{g/mL}$ . Los parámetros de regresión no lineal fueron trazados para cada curva y los valores de concentración inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ ) se determinaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Tamizaje fitoquímico y extracción

El resultado obtenido para el rendimiento de la extracción procedente de hojas de *C. x powellii* se presentan en tabla 3. Respecto a las fracciones evaluadas, se encontró que la fracción Ac presentó un mayor porcentaje de extracción, comparada con las fracciones BuOH, AcOEt y Hex.

**Tabla 3.** Porcentaje de humedad y de extracción de las fracciones y el EET de hojas de *C. x powellii*.

%Humedad	
	84,138 ± 1,004
%Extracción	
EET	9,844 ± 0,103
Ac	54,929 ± 1,507
BuOH	7,758 ± 0,463
AcOEt	3,796 ± 0,173
Hex	2,706 ± 0,114

**Tabla 4.** Compuestos presentes en el extracto etanólico proveniente de hojas de *C. x powellii* determinados por tamizaje fitoquímico.

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

Interpretación de resultados:

(-) Metabolito ausente

(+) Metabolito presente

El tamizaje fitoquímico fue realizado empleando métodos colorimétricos (tabla 2), mediante los que se determinó cualitativamente metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii*.

Como resultado del ensayo fitoquímico se encontró la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, los cuales comúnmente se encuentran en plantas de la familia Amaryllidaceae (12). Así mismo, se determinó la presencia de saponinas, triterpenos y cumarinas (tabla 4).

La presencia de diferentes metabolitos secundarios en el EET indica que a dicho extracto, se le puede atribuir diferentes procesos biosintéticos en la célula vegetal.

## 6.2. Actividad antioxidante

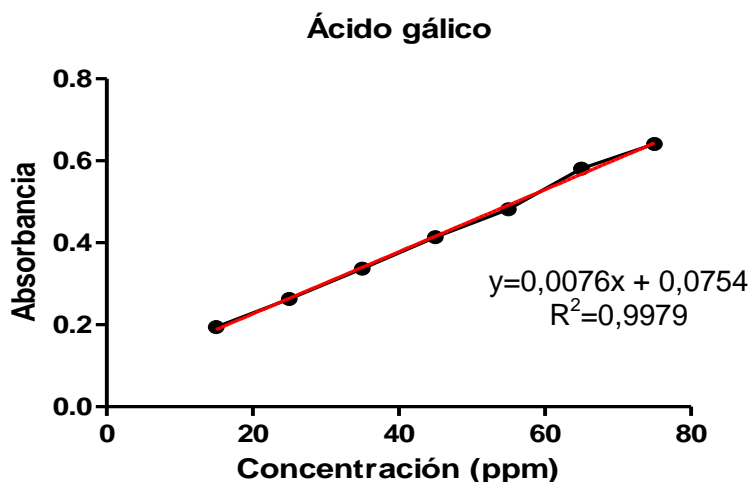
### 6.2.1. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

La actividad antioxidante se relaciona con el contenido de compuestos fenólicos en materiales vegetales, por ello se determinó el contenido de fenoles totales (TPC) en el EET y en las diferentes fracciones, utilizando el ensayo Folin-Ciocalteu.

El contenido de compuestos fenólicos presentes en hojas de *C. x powellii* se expresó en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/ g ES), usando la curva de calibración del patrón de ácido gálico. En la Figura 16 se muestra la curva de calibración de Trolox obtenida, con un coeficiente de correlación de 0,9979 entre concentración de Trolox y su respectiva absorbancia (tabla 5).

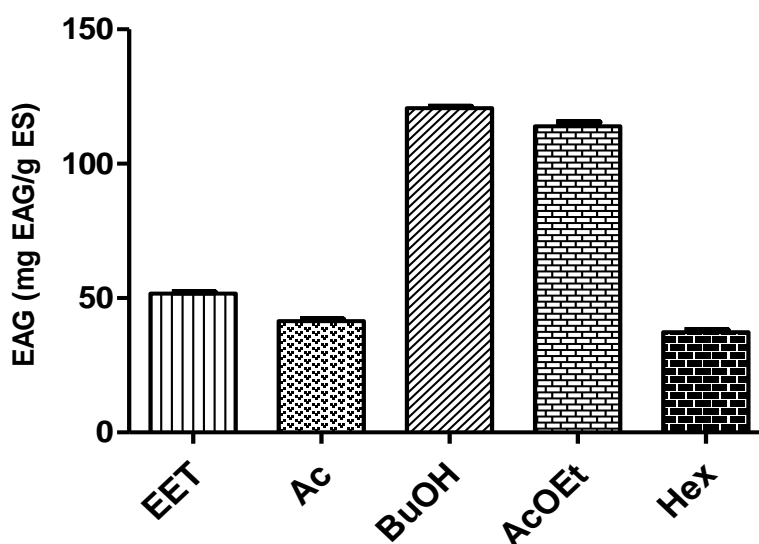
**Tabla 5.** Curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones, utilizada para la determinación de compuestos fenólicos de las fracciones y el EET de hojas de *C. x powellii*, por el método Folin-Ciocalteu.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	A prom.	DS	CV
15	0,198	0,195	0,190	0,194	0,004	2,080
25	0,260	0,266	0,263	0,263	0,003	1,141
35	0,340	0,334	0,388	0,337	0,003	0,906
45	0,415	0,416	0,412	0,414	0,002	0,502
55	0,485	0,479	0,482	0,482	0,003	0,622
65	0,584	0,581	0,579	0,581	0,003	0,433
75	0,640	0,643	0,639	0,641	0,002	0,325



**Figura 16.** Curva de calibración de ácido gálico por el método Folin-Ciocalteu

Considerando todas las fracciones, el TPC en orden descendente tiene el siguiente comportamiento: BuOH > AcOEt > EET > Ac > Hex (Figura 17).



**Figura 17.** Contenido total de fenoles determinado por el método Folin-Ciocalteu a una concentración de 1000 ppm para las fracciones y el EET de hojas de *C. x powellii*

En la tabla 6, se puede observar que el TPC para el EET de hojas de *C. x powellii* es  $51,737 \pm 0,789$  mg EAG/g ES. En cuanto a las fracciones, el TPC de la fracción de Hex ( $37,351 \pm 1,325$  mg EAG/g ES) es aproximadamente cuatro veces menor si se compara con el TPC de la fracción de BuOH ( $120,684 \pm 0,949$  mg EAG/g ES), por lo tanto, se considera que los compuestos fenólicos presentes en el EET de las hojas de *Crinum x powellii* son de origen medianamente polar.



**Tabla 6.** Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante del EET y fracciones provenientes de hojas de *C. x powellii*, acompañados de la desviación estándar ( $\pm$ DS).

Fracción	Folin- Ciocalteu		DPPH-		ABTS <sup>+</sup>	
	EAG*	CAET**	%AA	CAET**	%AA	
EET	51,737 $\pm$ 0,789	39,771 $\pm$ 0,740	32,506 $\pm$ 0,932	317,307 $\pm$ 3,477	30,694 $\pm$ 0,359	
Ac	41,474 $\pm$ 0,949	35,353 $\pm$ 0,336	29,910 $\pm$ 0,416	237,661 $\pm$ 4,619	20,240 $\pm$ 0,434	
BuOH	120,684 $\pm$ 0,949	82,120 $\pm$ 0,301	78,961 $\pm$ 0,354	553,313 $\pm$ 0,981	55,061 $\pm$ 0,101	
AcOEt	113,930 $\pm$ 2,688	58,348 $\pm$ 0,200	53,460 $\pm$ 0,244	634,596 $\pm$ 2,604	63,454 $\pm$ 0,269	
Hex	37,351 $\pm$ 1,325	49,889 $\pm$ 0,354	41,063 $\pm$ 0,416	112,199 $\pm$ 3,452	10,570 $\pm$ 0,389	
ÁA	NR	85,769 $\pm$ 0,097	85,208 $\pm$ 0,116	449,152 $\pm$ 1,288	47,423 $\pm$ 0,142	
$\alpha$ -T	NR	82,628 $\pm$ 0,314	83,404 $\pm$ 0,384	600,789 $\pm$ 5,816	56,776 $\pm$ 0,570	
BHT	NR	52,916 $\pm$ 0,271	45,830 $\pm$ 0,325	710,407 $\pm$ 3,115	70,122 $\pm$ 0,317	

\*= mg EAG/g ES, \*\*=  $\mu$ mol Trolox/g ES

El TPC en el EET de hojas de *C. x powellii*, se comparó con el TPC en el EET de hojas de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) (62), en el que se utilizó el mismo método empleado en este trabajo para la determinación del contenido fenoles totales, se encontró que el TPC en el EET de hojas de *P. dubia* (104,670  $\pm$  0,541 mg EAG/g ES) es aproximadamente 2 veces mayor que el TPC en el EET de hojas de *C. x powellii* (51,737  $\pm$  0,789 mg EAG/g ES), lo que indica que el TPC en el EET de hojas de *C. x powellii* es relativamente bajo. La extracción de compuestos fenólicos depende del tipo de compuesto fenólico y del disolvente (67).

En el estudio realizado sobre el TPC en el EET de hojas de *Caliphruria subedentata* (Amaryllidaceae) (68), se encontró que está directamente relacionado con los resultados obtenidos en las fracciones del EET de hojas de *Crinum x powellii*, encontrándose que las fracciones medianamente polares de BuOH y AcOEt, muestran comportamientos semejantes para ambas especies.

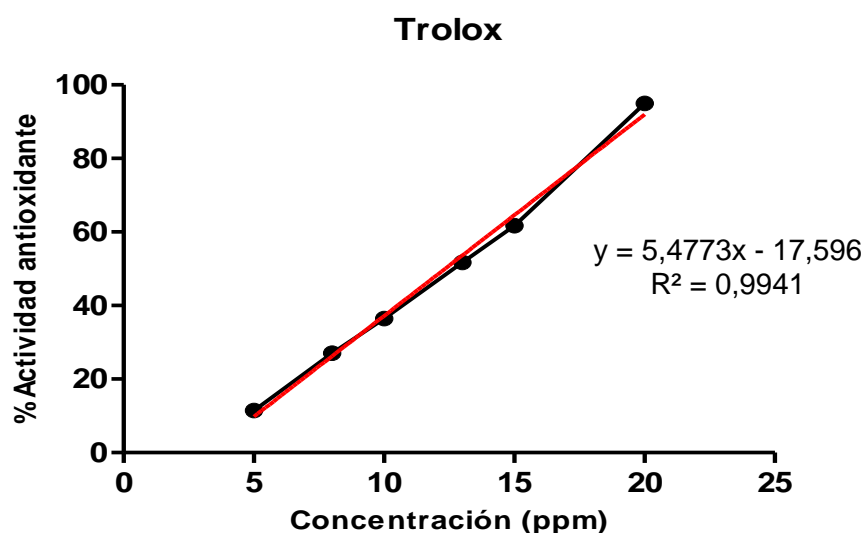
### 6.2.2. Actividad antioxidante determinada por el método del 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH·)

La capacidad atrapadora de radicales libres del EET de hojas y fracciones de *C. x powellii* fue determinada por un método colorimétrico usando como radical DPPH·. Los resultados obtenidos en los ensayos realizados se expresan como CAET ( $\mu$ mol Trolox/g ES) (tabla 6), utilizando una curva de calibración Trolox. En la

Figura 18 se muestra la curva de calibración de Trolox obtenida, con un coeficiente de correlación de 0,9941 entre concentración de Trolox y su respectiva absorbancia (tabla 7).

**Tabla 7.** Curva de calibración Trolox a diferentes concentraciones, utilizada para la determinación de la actividad antioxidante de las fracciones y el EET de hojas de *C. x powellii* por el método DPPH.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	A prom.	DS	CV
0	0,550	0,553	0,551	0,551	0,002	0,277
5	0,490	0,486	0,488	0,488	0,002	0,410
8	0,400	0,405	0,402	0,402	0,003	0,626
10	0,350	0,353	0,348	0,350	0,003	0,718
13	0,265	0,268	0,266	0,266	0,002	0,574
15	0,210	0,213	0,211	0,211	0,002	0,723
20	0,028	0,028	0,027	0,028	0,001	2,087

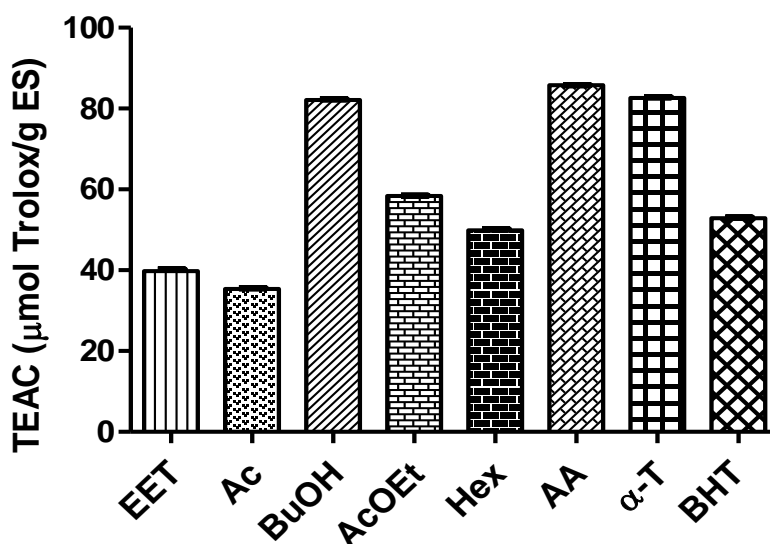


**Figura 18.** Curva de calibración Trolox para el método DPPH.

Para este ensayo, los antioxidantes sintéticos ÁA y  $\alpha$ -T presentaron mayor capacidad antirradicalaria ( $85,769 \pm 0,097$ ) y ( $82,628 \pm 0,314$ )  $\mu\text{mol Trolox/g ES}$ , respectivamente, si se compara con las fracciones y el EET, esto se debe a que son compuestos puros con elevada actividad antioxidante. Al comparar estos resultados con los obtenidos en el EET y en las fracciones estudiadas, se encontró que la fracción butanólica presenta una actividad antioxidante cercana al patrón de

ÁA (Figura 19), lo que indica que dicha fracción contiene compuestos polares de origen fenólico responsables de la actividad inhibidora del radical DPPH·.

En las fracciones AcOEt, Hex y Ac, la actividad antioxidante fue menor que la obtenida en la fracción BuOH, indicando que estas fracciones tienen un bajo contenido de compuestos con actividad antirradicalaria, sin embargo el valor de CAET de la fracción Hex es cercano al patrón BHT, esto se debe a que el radical DPPH· reacciona principalmente con compuestos apolares, además es más selectivo en la reacción con donadores de cationes hidrógeno (69).



**Figura 19.** Capacidad antioxidante de las fracciones y el EET de hojas de *C. x powellii* determinada por el método DPPH·.

Al comparar los resultados obtenidos de actividad antioxidante para el EET de hojas de *C. x powellii*, con el EET de hojas de *P. dubia* (62), se encontró que en las dos especies, las fracciones BuOH y AcOEt presentaron el mayor contenido de fenoles totales y la mayor actividad captadora de radicales, debido a que estas fracciones contienen metabolitos con alta actividad antioxidante.

La fracción BuOH ( $101,65 \pm 1,30 \mu\text{mol Trolox/g}$ ) y la fracción Ac ( $83,64 \pm 1,48 \mu\text{mol Trolox/g}$ ), del EET de hojas de *C. subedentata* (68) presentaron el mayor valor de CAET lo que indica que los metabolitos con mayor actividad antioxidante se encuentran en las fracciones mediana y altamente polares, al igual que la fracción butanólica ( $82,120 \pm 0,301$ ) en hojas de *C. x powellii*.

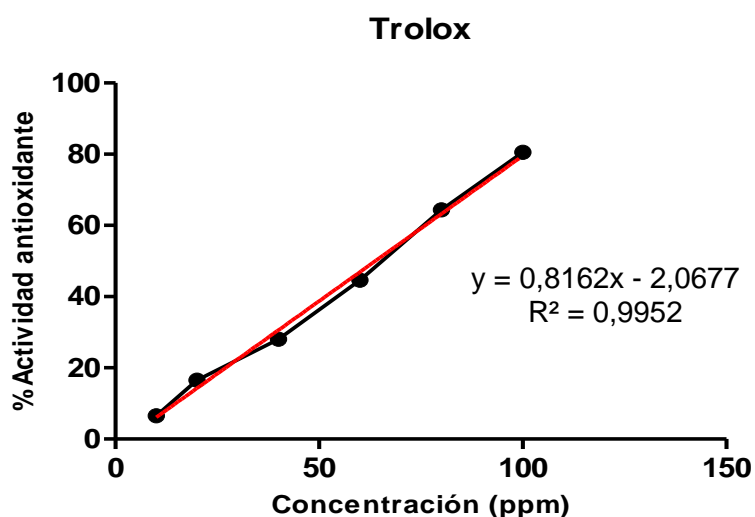
La presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas y terpenos influyen en la actividad antioxidante de las fracciones y del EET de hojas de *C. x powellii* (70).

### 6.2.3 Actividad antioxidante determinada por el método del 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina) 6-sulfonato (ABTS<sup>+</sup>)

La capacidad atrapadora de radicales libres fue determinada por el método colorimétrico ABTS<sup>+</sup>, en el EET de hojas de *C. x powellii* y en cada una de las fracciones Hex, AcOET, But y Ac, los resultados se expresaron en CAET (μmol Trolox /g ES) (tabla 6), utilizando una curva de calibración Trolox. En la Figura 20 se muestra la curva de calibración de Trolox determinada, con un coeficiente de correlación de 0,9952 entre concentración de Trolox y su respectiva absorbancia (tabla 8).

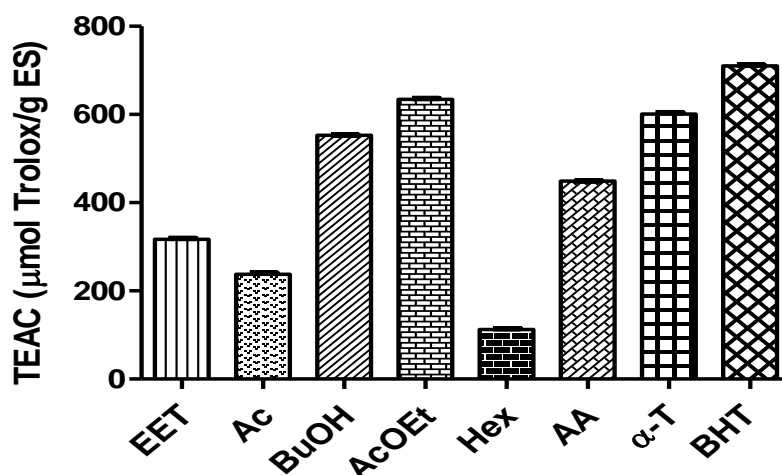
**Tabla 8.** Curva de calibración Trolox a diferentes concentraciones, utilizada para la determinación de la actividad antioxidante de las fracciones de hojas y el EET de *C. x powellii* por el método ABTS<sup>+</sup>.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	A prom.	DS	CV
0	0,776	0,778	0,782	0,779	0,003	0,392
10	0,727	0,727	0,729	0,728	0,001	0,159
20	0,650	0,651	0,649	0,650	0,001	0,154
40	0,560	0,562	0,559	0,560	0,002	0,273
60	0,433	0,430	0,431	0,431	0,002	0,354
80	0,280	0,278	0,275	0,278	0,003	0,906
100	0,152	0,152	0,150	0,151	0,001	0,763



**Figura 20.** Curva de calibración Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS<sup>+</sup>

Realizando una comparación con los resultados obtenidos en el EET y en las fracciones estudiadas, se encontró que las fracciones AcOEt y BuOH, presentan una actividad antioxidante cercana al patrón de BHT (Figura 21), indicando que dichas fracciones contienen compuestos medianamente polares, los cuales son los responsables de la actividad inhibidora del radical  $ABTS^+$ . En las fracciones Ac y Hex la actividad antioxidante fue menor que la obtenida en BuOH y AcOEt, por lo que se deduce que estas fracciones presentan un bajo contenido de compuestos con actividad antirradicalaria. La fracción AcOEt presenta compuestos de mediana polaridad como cumarinas y fenoles, los que tienen alta actividad antioxidante. También el catión radical  $ABTS^+$  es afín a compuestos polares por lo que reacciona fundamentalmente con compuestos aromáticos hidroxilados (69).



**Figura 21.** Capacidad antioxidante de las fracciones y el EET de hojas de *C. x powellii* determinada por el método  $ABTS^+$

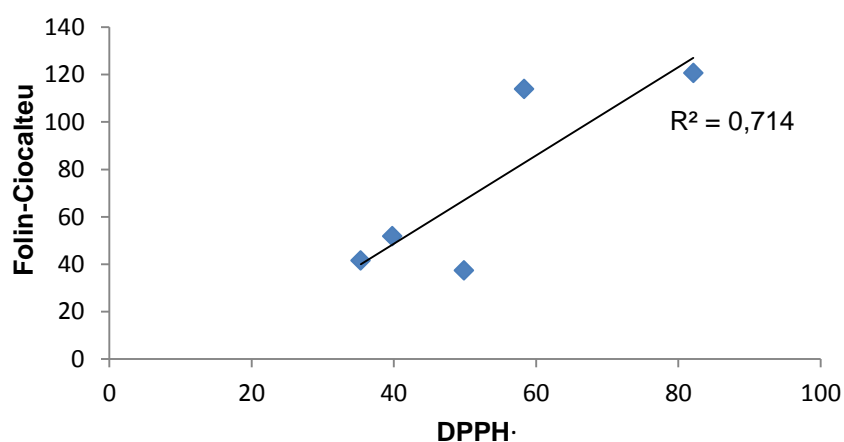
El patrón BHT fue el estándar que presentó mayor capacidad antirradicalaria si se compara con los patrones ÁA y  $\alpha$ -T. En el método DPPH $\cdot$ , el impedimento estérico puede determinar la reacción de ciertos antioxidantes ante este radical. Esto explicaría el hecho que el BHT, con un grupo hidroxilo impedido estéricamente, presenta una mayor capacidad antioxidante en el método  $ABTS^+$  que en el DPPH $\cdot$ , mientras que el ácido ascórbico, que posee varios grupos hidroxilos poco impedidos, actúa como un antioxidante más eficiente con DPPH $\cdot$ .

Comparando los resultados del análisis de las fracciones estudiadas, con lo reportado en fracciones de hojas de *P. dubia* (62), se encuentra que las fracciones BuOH y AcOEt presentan la mejor actividad antioxidante tanto en el estudio de *P. dubia* como en el de *C. x powellii*, indicando que estas especies contienen compuestos medianamente polares y polares responsables de la buena capacidad captadora de radicales libres.

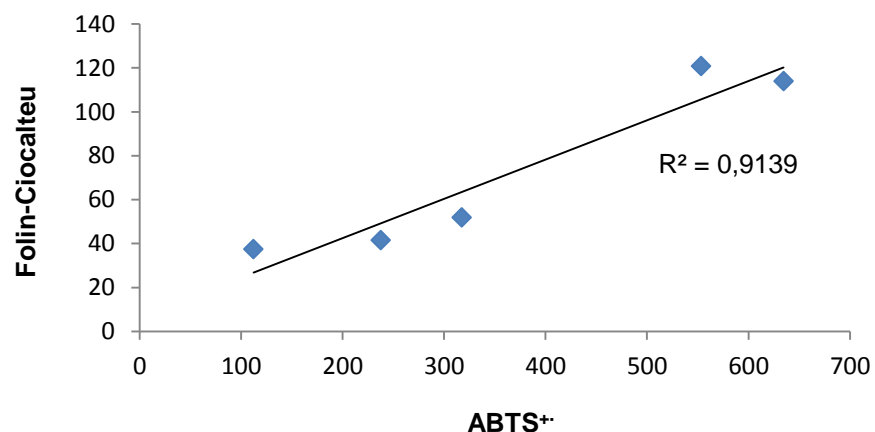
La fracción AcOEt ( $470,01 \pm 2,38 \mu\text{mol Trolox/g ES}$ ) y BuOH ( $213,28 \pm 3,89 \mu\text{mol Trolox/g ES}$ ) del EET de hojas de *C. subedentata* (68) presentaron la mayor capacidad radicales libres indicando que los compuestos responsables de la actividad antioxidante en las hojas son de carácter medianamente polar, al igual que en las fracciones AcOEt ( $634,596 \pm 2,604$ ) y BuOH ( $553,313 \pm 0,981$ ) en hojas de *C. x powellii*, donde se obtuvieron los valores más altos.

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

La prueba de Tukey muestra que todas las fracciones difieren significativamente, siendo la fracción correspondiente a BuOH y AcOEt las que tienen actividad antioxidante significativamente superior a las demás fracciones.



**Figura 22.** Correlación entre el contenido de fenoles totales, obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante encontrada por el método DPPH·, de las fracciones y el extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii*



**Figura 23.** Correlación entre el contenido de fenoles totales, obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante encontrada por el método ABTS⁺, de las fracciones y el extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii*

La prueba de correlación de Pearson (Figura 22 y 23) muestra que existe una correlación positiva y altamente significativa ( $R^2=0,7140$  y  $R^2=0,9139$ ), entre el porcentaje de actividad antioxidante obtenido por los métodos DPPH· y ABTS<sup>+</sup> y el contenido de fenoles totales, indicando que el 71,40 y el 91,39% de la actividad captadora de radicales evaluada en fracciones de hojas de *C. x powellii* es debida a la presencia de compuestos fenólicos, la mayor parte de estos compuestos contribuyen a la actividad antioxidante por la capacidad de donación de un electrón a partir de los grupos hidroxilo y de los anillos fenólicos, debido a que estabilizan la carga del oxígeno cuando esta se deslocaliza (71). Sin embargo las correlaciones no son completamente lineales porque la actividad antioxidante también está influenciada por otros metabolitos secundarios y no solamente por fenoles.

### 6.3. Actividad citotóxica en el EET de hojas de *C. x powellii* determinada mediante bioensayo con *A. salina*

Los estudios de evaluación citotóxica en extractos de plantas, representan evidencias experimentales adicionales, importantes en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral. Dichos ensayos han sido empleados de forma rutinaria como métodos de tamizaje de extractos naturales con potencialidad en la terapia contra el cáncer (72, 73).

Los resultados obtenidos en este ensayo, se clasificaron según su toxicidad (tabla 9), de acuerdo al programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (74).

**Tabla 9.** Clasificación toxicidad según CYTED.

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

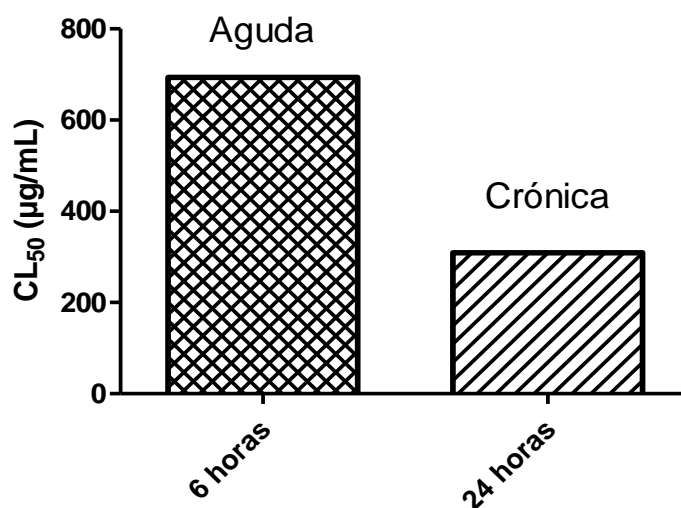
Los valores obtenidos a partir del EET de hojas de *C. x powellii* presentados en la

tabla 10, son expresados en  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), definida como la concentración letal media con la que un agente causa la mortalidad en el 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas. Se obtuvieron valores de  $CL_{50}$  de  $693,933 \pm 3,522$  y  $308,80 \pm 6,062$   $\mu\text{g/mL}$ , para la toxicidad aguda (ligeramente tóxico) y crónica (moderadamente tóxico) respectivamente (tabla 9). La toxicidad se debe principalmente a metabolitos secundarios como alcaloides, triterpenos y esteroides (75, 76) todos estos encontrados en el tamizaje fitoquímico.

**Tabla 10.** Actividad citotóxica del EET de hojas de *C. x powellii* determinada mediante el bioensayo con *Artemia salina*.

	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	6 horas* (Aguda)	24 horas* (Crónica)
<b>Hojas</b>	$693,933 \pm 3,522$	$308,800 \pm 6,062$
<b>Dicromato de potasio</b>	$8,124 \pm 0,132$	$8,124 \pm 0,132$

\*= resultados expresados  $CL_{50} \pm DS$



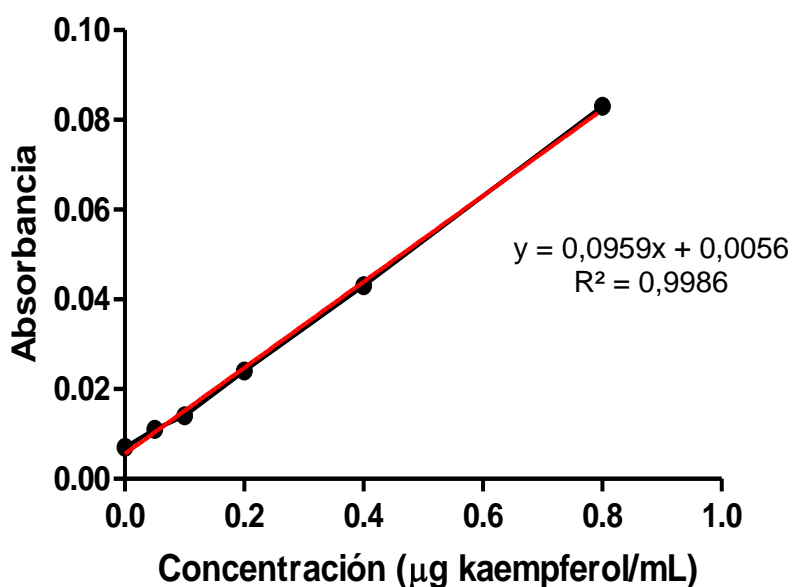
**Figura 24.** Toxicidad aguda y crónica del extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii*, obtenida mediante el bioensayo de *A. salina*

#### 6.4 Contenido total de flavonoides a través del método de tricloruro de aluminio

Se determinó el contenido totales de flavonoides (CTF) en el EET por reacción directa con tricloruro de aluminio (64). El contenido de flavonoides presentes en el EET hojas de *C. x powellii* se expresó en microgramos equivalentes de kaempferol



por miligramo de extracto (mg kaempferol/g extracto), empleando la curva de calibración del patrón de kaempferol (Figura 25).



**Figura 25.** Curva de calibración del kaempferol para la determinación de CTF

El CTF en el EET de hojas de *C. x powellii*, se comparó con el CTF en el extracto metanólico total de *Passiflora apoda* (77), en el que se utilizó el mismo método planteado en este trabajo para la determinación del CTF.

Se encontró que el CTF en el extracto metanólico total de *Passiflora apoda* (0,370 mg kaempferol/g extracto) es aproximadamente la mitad del CTF reportado para el EET de hojas de *C. x powellii* (0,772 mg kaempferol/g extracto), indicando que el CTF en el EET de hojas de *C. x powellii* es relativamente alto.

Existe la posibilidad de una relación alta entre la actividad antioxidante con el TPC y el CTF, debido a su gran aporte como antioxidantes, sin embargo, no debe dejarse de lado el hecho de que la actividad antioxidante también está influenciada por otros metabolitos secundarios (78).

## 6.5 Actividad de inhibición enzimática

### 6.5.1 Actividad de inhibición sobre la acetilcolinesterasa (AChE)

El EET de hojas de *C. x powellii* presentón inhibición baja a moderada sobre AChE a las concentraciones estandarizadas de 7,812-1000 µg/mL (Figura 26), los cuales fueron menos efectivos comparados con el patrón de galantamina (90,833%,  $IC_{50}$  4,818 µg/mL) y eserina (94,891%,  $IC_{50}$  2,603 µg/mL) (tabla 11). Indicando que

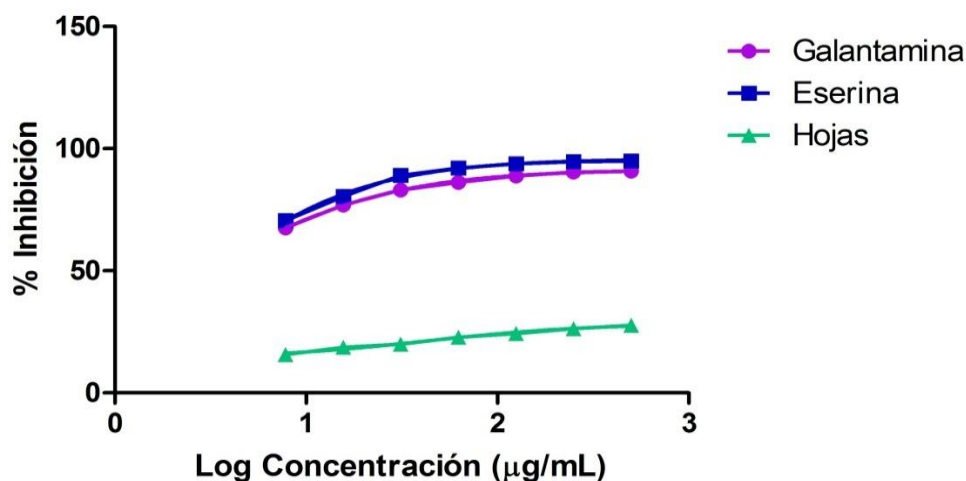
existe la probabilidad que los compuestos responsables de la actividad inhibidora como alcaloides y terpenos (79) se encuentran en baja cantidad.

**Tabla 11.** Porcentaje de inhibición y concentración en el cual el porcentaje de inhibición es del 50% (CL<sub>50</sub>) del EET de hojas de *C. x powellii* sobre AChE.

	%Inhibición	IC <sub>50</sub> *
<b>Hojas</b>	27,677	41,880
<b>Galantamina</b>	90,833	4,818
<b>Eserina</b>	94,891	2,603

\*= µg/mL

Los extractos vegetales que presentan actividad inhibidora sobre AChE, con porcentaje mayor a 50% son considerados potentes inhibidores de dicha enzima, mientras que porcentajes de inhibición desde 15 a 50 % son catalogados con actividad baja a moderada. Los inhibidores de colinesterasa son los únicos medicamentos para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer leve a moderada, un desorden asociado con degeneración progresiva de la memoria y función cognitiva (80).



**Figura 26.** Porcentaje de inhibición enzimática del EET de hojas *C. x powellii* sobre la enzima acetilcolinesterasa asociada a la enfermedad de Alzheimer

## 7. CONCLUSIONES

El tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *C. x powellii* permitió evidenciar la presencia de algunos alcaloides, saponinas, cumarinas, triterpenos y esteroides, a estos compuestos se les podría atribuir la actividad antioxidante del extracto.

La alta actividad captadora de radicales encontrada en la fracción de butanol y acetato de etilo por el método DPPH· y ABTS<sup>+</sup>, se relacionó con el contenido de fenoles lo que indica que estas fracciones constituyen una fuente promisoría de metabolitos secundarios, tales como flavonoides, saponinas, cumarinas, entre otros.

El extracto etanólico total de hojas de *C. x powellii* presentó toxicidad moderada frente a *Artemia salina*, por lo que se puede establecer su seguridad para proponer su uso en un futuro como posible producto farmacológico.

El extracto etanólico de hojas de *C. x powellii* tiene alto contenido de flavonoides si se compara con el contenido total de flavonoides de la especie *Passiflora apoda*.

El extracto etanólico de hojas de *C. x powellii* presentó inhibición enzimática baja a moderada sobre la enzima acetilcolinesterasa, indicando baja concentración de los metabolitos responsables de dicha inhibición.

## 8. RECOMENDACIONES

Los radicales utilizados en los ensayos son compuestos sintéticos que no se encuentran presentes de modo natural en sistemas biológicos, por consiguiente la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* se debe complementar con otros ensayos que se aproximen más a modelos biológicos.

Realizar estudios complementarios para identificar y determinar los compuestos responsables de la actividad antioxidante en extractos vegetales, mediante las técnicas analíticas como HPLC.

Efectuar la determinación de la actividad citotóxica en fracciones con el fin de observar la influencia sobre dicha actividad.

Es importante realizar ensayos en un rango amplio de líneas celulares tumorales con el objetivo de establecer una relación de la actividad citotóxica mediante el bioensayo con *Artemia salina*.

Evaluar la actividad antioxidante y citotóxica en diferentes órganos de la planta como raíces, bulbos y flores, con el fin de observar la relación de la actividad y los metabolitos secundarios presentes.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Qiu S, Sun H, Zhang A-H, Xu H-Y, Yang G-L, Hang Y, et al. Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2014;12(6):401-6.
2. Correa J, Ortiz D, Larrahondo J, Sánchez M, Pachón H. Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): una revisión bibliográfica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2012;11(2):111-26.
3. Nair J, Staden J. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;62:262-75.
4. Fennell C, Staden J. *Crinum* species in traditional and modern medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;78:15-26.
5. Niño J, Hincapie G, Correa Y, Mosquera O. Alkaloids of *Crinum x powellii* "album" (**Amaryllidaceae**) and their Topoisomerase Inhibitory Activity. *Zeitschrift für Naturforschung*. 2007;62c:223-6.
6. Niño J, Correa Y, Mosquera O, Ramirez L. Cuantificación de licorina en callos y raíces cultivados *in-vitro* de *Crinum x powellii* "album" (Amaryllidaceae) por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). *Scientia et Technica*. 2005;29:83-8.
7. Cabezas F, Argoti J, Martinez S, Codina C, Bastida J, Viladomat F. Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*. *Scientia et Technica* Año XIII. 2007;33:237-41.
8. Refaat J, Kamel M, Ramadan M, Ali A. *Crinum*; an endless source of bioactive principles: A review: A part 1- *Crinum* alkaloids: Lycorine - type alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2012;3:1883-90.
9. Tram N, Titorenkova T, Bankova V, Handjieva N, Popov S. *Crinum* L. (**Amaryllidaceae**). *Fitoterapia* 2002;73:183-208.
10. Cabezas F. Estudio químico de alcaloides en *Crinum kunthianum* ROEM y *Eucharis amazonica* PLANCHON & LINDEN, familia Amaryllidaceae Cali-Colombia: Universidad del Valle; 2002.
11. Cabezas F. Biogénesis, obtención y caracterización de alcaloides de Amaryllidaceae. Popayán: Universidad del Cauca 2016. 365 p.
12. Bastida J. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Transworld Research Network*. 2011:1-3.
13. Perdomo C, Ríos A. Inducción de la embriogénesis somática en *Crinum x powellii* "album" (**Amaryllidaceae**) [Tesis de pregrado]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2010.
14. Verma N, Shukla S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2015;105:105-13.

15. McKiernana A, Hovendena M, Brodribba T, Potts B, Davies N. Effect of limited water availability on foliar plant secondary metabolites of two *Eucalyptus* species. *Environmental and Experimental Botany*. 2014;2:55-64.
16. Dominguez A. *Metodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa México. 1985.
17. Lock O. *Colorantes Naturales*. Perú: Fondo editorial de la Universidad Católica del Perú; 1997. 72-4,143 p.
18. Bruni A. *Farmacognosia generale e applicata*. Italia: Piccin Nuova Libreria 1999. 109 p.
19. Cushnie T, Cushnie B, Lamb A. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2014;44:377-86.
20. Garzón G. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biológica Colombiana*. 2008;13:27-36.
21. Arango G. *Alcaloides y Compuestos Nitrogenados*. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica; 2008. p. 14.
22. Arango Acosta GJ. *Introducción al metabolismo secundario: Compuestos derivados del ácido shikímico*. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia; 2010.
23. Alinian S, Razmjoo J, Zeinali H. Flavonoids, anthocyanins, phenolics and essential oil produced in cumin (*Cuminum cyminum L.*) accessions under different irrigation regimes. *Industrial Crops and Products*. 2016;81:49-55.
24. Jain G, Gould K. Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants?. *Environmental and Experimental Botany*. 2015;119:48-53.
25. Dixon R, Liu C, Hyung J. Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013;24:329-35.
26. Lastra Fernandez JJ. *Bosques naturales de Asturias*. España: Universidad de Oviedo; 2001.
27. S G. *Pigmentos naturales Quinonicos*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima. Peru. 1998.
28. Watson RR. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. 2012.
29. Hui D, Jie W, Hui L, Pei-Xing Z, Yan-Jun X, Chong-Hui L, et al. Polyphenols and triterpenes from *Chaenomeles* fruits: Chemical analysis and antioxidant activities assessment. *Food Chemistry*. 2013;141:4260-8.
30. Ríos L. Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;128:1-14.
31. Thakur A, Singla R, Jaitak V. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;101:476-95.

32. Yousof A, Susoma J, Hyun Ah J, Ran JC, Anupom R, Jae Sue C. Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016;1-9.
33. Reija B. Estudio Estructural y Dinámico de Sistemas Organizados mediante Sondas fluorescentes [Tesis Doctoral]. Galicia: Universidad de Santiago de Compostella; 2007.
34. Tang W, Huang Y. Cardiotoxic Modulation in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(12):1073-4.
35. Mijatovic T, Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. Cardiotoxic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;32-57.
36. Vanaclocha B. Fitoterapia: Vademécum de prescripción. 4 ed: El Sevier; 2003.
37. Olalekan O. Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants - A review. *Pathophysiology*. 2015;22:95–103.
38. Ege S. Química Orgánica: Estructura y Reactividad. Barcelona: Editorial Reverté; 2000.
39. Martínez Martínez A. Quinonas y compuestos relacionados. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia; 2012.
40. Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. Venezuela: Editorial Torino; 2002.
41. Pisoschi A, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;97:55-74.
42. Wojtunik-Kulesza K, Oniszczyk A, Oniszczyk T, Waksmundzka-Hajnos M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;78:39-49.
43. Niño J, Correa Y, Cardona G, Mosquera O. Antioxidant and antitopoisomerase activities in plant extracts of some Colombian flora from La Marcada Natural Regional Park. *Revista de Biología Tropical*. 2011;59(3):1089-97.
44. Aslania B, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sciences*. 2016:1-40.
45. Alcázar-Fabra M, Navas P, Brea-Calvo G. Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2016;1857(8):1073-8.
46. Wang J, Wang Z-M, Li X-M, Li F, Wu J-J, Kong L-Y, et al. Synthesis and evaluation of multi-target-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease based on the fusion of donepezil and melatonin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2016;24(18):4324-38.
47. Bielli A, Scioli MG, Mazzaglia D, Doldo E, Orlandi A. Antioxidants and vascular health. *Life Sciences*. 2015;143:209-16.

48. Embuscado M. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants-a mini review. *Journal of Functional Foods*. 2015;18:811-9.
49. Gao M, Zhao Z, Lv P, Li Y, Gao J, Zhang M, et al. Quantitative combination of natural anti-oxidants prevents metabolic syndrome by reducing oxidative stress. *Redox Biology*. 2015;6:206-17.
50. Ahmad I, Qadeer K, Hafeez A, Zahid S, Sheraz MA, ur Rehman Khattak S. Effect of ascorbic acid on the photolysis of cyanocobalamin and aquocobalamin/hydroxocobalamin in aqueous solution: A kinetic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2017;332:92-100.
51. Gagic Z, Ivkovic B, Srdic-Rajic T, Vucicevic J, Nikolic K, Agbaba D. Synthesis of the vitamin E amino acid esters with an enhanced anticancer activity and in silico screening for new antineoplastic drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;88:59-69.
52. Montiel V, Sáez A, Expósito E, García-García V, Aldaz A. Use of MEA technology in the synthesis of pharmaceutical compounds: The electrosynthesis of N-acetyl-L-cysteine. *Electrochemistry Communications*. 2010;12(1):118-21.
53. Sinatra S. *The Sinatra solution: Metabolic cardiology*. Estados Unidos: Basic Health Publications, Inc 2005. 104 p.
54. Rebolo S. Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O: Ribeiro Valdeorras y Ribeira Sacra [Tesis de Doctorado]. Galicia: Universidad Santiago de Compostela 2007.
55. Fernández J. Barrido sistemático de la actividad antioxidante total y el contenido de compuestos fenólicos (flavonoides y fenoles totales) de alimentos vegetales del Departamento de la Paz, Bolivia. 2011:52-4,6.
56. Ibarra P. Determinación del contenido fenólico en extractos naturales mediante sensores enzimáticos. México D.F: Universidad Metropolitana 2010.
57. Alam N, Bristi N, Rafiquzzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012;21:143-52.
58. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004;37:277-85.
59. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, C R-E. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26:1231-7.
60. Sanabria A, López S, Gualdrón R. Estudio Fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colciencias*. 1997;26:15-9.
61. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965;16:144-58.
62. Trujillo Chacón L. Evaluación de la actividad antioxidante y citotóxica del extracto etanólico, de las hojas y bulbos de *Phaedranassa dubia*, (Amaryllidaceae)



colectada en el Departamento del Cauca [Tesis de Pregrado]. Popayán: Universidad del Cauca; 2015.

63. Brand-Williams W, Cuvelier M. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1995;28.

64. Kim D, Jeong S, Lee C. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 2003;81:321-6.

65. Nair J, Aremu A, van Staden J. Isolation of narciprimine from *Cyrtanthus contractus* (Amaryllidaceae) and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;137:1102-6.

66. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 1961;7:88-95.

67. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. 2006;99:838-41.

68. López M, Galindez N. Cuantificación de galantamina en hojas y bulbos de *Caliphruria subedentata* (Amaryllidaceae) fertilizada con macro y micronutrientes mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y evaluación de la actividad antioxidante, citotóxica y antifúngica [Tesis de pregrado]. Popayán, Cauca: Universidad del Cauca; 2016.

69. González Beltrán M, Sequeda Castañeda L. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de Agraz y su posible efecto Citotóxico *in vitro* en células leucémicas OCI AML3 y MOLT4. [Tesis de grado ]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2012.

70. Mahajan M, Kumar S. Effect of Quercetin and Epicatechin on the transcript expression and Activity of Antioxidant Enzymes in Tobacco Seedlings. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2013;3(1):81-90.

71. Ramirez C, Andersen M, Gardner P, Morrice P, Wood S, Duthie S. Anthocyanin rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(9):1033-7.

72. Newman D, Cragg G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. 2007;70(3):461-77.

73. Cordell GA, Kinghorn AD, JM. P. Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. Boca Ratón: CRC Press; 1993. 99-200 p.

74. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. 1995:214-25.

75. Wink M. Chemical Ecology of Alkaloids - Alkaloids Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications. New York: Plenum Press; 1998. 265-96 p.

76. Taiz L, Zeiger E. Fisiología vegetal Los Angeles Universidad Jaume; 2002. 542 p.

77. Tovar del Rio J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera [Tesis de Pregrado]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.
78. Surveswaran S, Y-Z C, Corke H, Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry. 2007;102:938-53.
79. Castellanos Castillo FA. Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano [Tesis de Maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia 2014.
80. Valencia Preciado D. Detección *in vitro* de inhibidores de la acetilcolinesterasa en plantas de la flora colombiana por el Método de Ellman [Tesis de Pregrado]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2015.