

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA EN
EXTRACTOS ETANÓLICOS TOTALES DE HOJAS DE *Zephyranthes carinata*
(Amaryllidaceae)**

HAMILTON ALEXANDER MARTINEZ NARANJO

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

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA EN
EXTRACTOS ETANÓLICOS TOTALES DE HOJAS DE *Zephyranthes carinata*
(Amaryllidaceae)**

HAMILTON ALEXANDER MARTINEZ NARANJO

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

Director

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

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

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

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

Nota de aceptación

Director

Juan Carlos Argoti Burbano Ph.D.

Jurado

Luis Alberto Lenis Velásquez Ph.D.

Jurado

Emerson Alonso Rengifo Carpintero Ph.D.

Dedicatoria

A Dios por estar siempre con mígo ayudándome y brindándome fortaleza y sabiduría en cada una de las etapas de mí carrera de pregrado.

A mí madre María Custodia Martínez por ser mí apoyo incondicional y fuente de inspiración para alcanzar mis metas.

A mis hermanos Johana, María y Juan David por sus todas sus bendiciones y oraciones para que yo saliera adelante.

A mí primo y hermano Jairo Daniel por su apoyo y por estar con mígo en los momentos de alegrías y tristezas.

A mí abuelita María Alodía que desde el cielo siempre va a estar guiándome he iluminado mí camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de trabajo de grado, Dr. Juan Carlos Argoti Burbano, por su tiempo y esfuerzo, en la orientación de este proyecto de investigación.

Al director del grupo QCB Dr. Fabio Antonio Fajardo, por la oportunidad brindada al permitirme hacer parte del grupo de investigación y por brindarme su confianza y apoyo incondicional durante todo este proceso.

Al M.Sc. Oscar Darío Bermúdez Zambrano, por su constante colaboración y buenos consejos. Al Dr. Fernando Hernández por su asesoría en el análisis estadístico. Al Dr. German Cuervo quien me facilitó la unidad de análisis industriales y a los monitores: Edwin Cifuentes, Katerin Macias, Yuri Barrios, Paola Barbosa y Maicol Pérez por su colaboración en el equipo UV-VIS. Al Dr. Bernardo Ramírez, por clasificar la especie estudiada. Al Dr. José Luis Hoyos Concha por permitirme trabajar en el laboratorio de Biotecnología y a la M.Sc. Rocio Bonilla por su colaboración en el equipo Rancimat.

A mi compañera Diana Isabel Correa por su colaboración en la realización de algunos ensayos.

A mis compañeros de grupo de investigación: Diana Isabel Correa, Vanesa Bastidas, Lina Trujillo, Anuar Caldón, Angie Rengifo, Mary López, Norma Galíndez y Alejandra Muñoz por tantos momentos compartidos.

A mis compañeros de carrera: Wilson viveros, Jean Pierre Calvache, Ximena Prieto, Alejandro Salamanca, Andrés Parra Reyes, Eymi Ramires y Leydi Conú por estar con migo en los momentos de alegrías, tristezas, y por compartir buenos momentos, que serán inolvidables.

A todos aquellos que han quedado en los recintos de mi memoria y que fueron partícipes en la obtención de mis sueños, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
2 MARCO TEORICO.....	4
2.1 FAMILIA AMARYLLIDACEAE	4
2.1.1 Alcaloides de la familia Amaryllidaceae	5
2.2 GÉNERO ZEPHYRANTHES.....	5
2.3 <i>Zephyranthes carinata</i>	6
2.3.1 Hábitat y distribución.....	6
2.3.2 Descripción taxonómica.....	7
2.3.3 Descripción exomorfológica.....	7
2.3.4 Propiedades biológicas del genero <i>Zephyranthes</i>	7
2.4 RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES.....	9
2.5 CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES.....	9
2.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	10
2.7 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	11
2.7.1 Método del DPPH•	11
2.7.2 Método del ABTS•+	12
2.7.3 Método RANCIMAT	13
2.8 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	13
2.8.1 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	13
2.8.2 Determinación de flavonoides totales por el método de tricloruro de Aluminio	14
2.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVAD CITOTÓXICA.....	14
2.9.1 Actividad citotóxica frente <i>Artemia franciscana</i>	14
3 PROBLEMA CIENTÍFICO	16
4. OBJETIVOS	17
4.1 OBJETIVO GENERAL	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5 METODOLOGIA.....	18

5.1 MATERIALES Y EQUIPOS.....	18
5.1.1 Reactivos.....	18
Tabla 3. Reactivos usados en la investigación.	18
5.1.3 Material vegetal.....	19
5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y ALCALOIDES	19
5.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	20
5.4 OBTENCIÓN DE SUBFRACCIONES A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS MEDIANTE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	21
5.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	22
5.5.1 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el de método DPPH.....	22
5.5.2 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el de método ABTS	22
5.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método Rancimat	23
5.6 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	24
5.6.1 Determinación fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	24
5.6.2 Determinación de flavonoides totales por el método tricloruro de aluminio	24
5.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA.....	25
5.7.1 Determinación de la actividad citotóxica mediante el bioensayo con <i>Artemia Franciscana</i>	25
6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
7.1 PORCENTAJES DE RENDIMIENTO.....	27
7.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	28
7.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	32
7.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	39
7.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA.....	42
7.7 CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA	45
8. CONCLUSIONES.....	47
9. RECOMENDACIONES	48

10 BIBLIOGRAFÍA	49
11 ANEXOS	54

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
AChE	Acetilcolinesterasa
ABTS	2,2' ácido azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico
AcOEt	Acetato de etilo
Ac	Acuosa
BHT	Butilhidroxitolueno
BuOH	Butanol
CL ₅₀	Concentración letal media
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CYTED	Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
EET	Extracto etanólico total
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de Nitrógeno
EAG	Equivalente a ácido gálico
EQ	Equivalente a quercetina
FP	Factor de protección
FA	Fracción de Alcaloides
Hex	Hexano
mL	mililitro
mg	miligramo
ms	Muestra seca
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
QCB	Química de Compuestos Bioactivos
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
W	Tungsteno
ups	Unidades prácticas de salinidad
µL	microlitro
µg	microgramo
%I	Porcentaje de inhibición
% AA	Porcentaje de actividad antioxidante
λ	Longitud de onda
α-T	Alfa-tocoferol

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN).....	9
Tabla 2. Clasificación de los modelos de ensayo según su modo de reacción SET o HAT	11
Tabla 3. Reactivos usados en la investigación.	18
Tabla 4. Equipos utilizados en la investigación.....	19
Tabla 5. Ensayos empleados para la identificación de metabolitos secundarios en <i>Z. carinata</i>	21
Tabla 6. Porcentajes de rendimiento de la extracción etanólica de hojas de <i>Z. carinata</i>	27
Tabla 7. Porcentajes de rendimiento de las subfracciones obtenidas mediante extracción líquido-líquido.....	27
Tabla 8. Porcentaje de rendimiento de la fracción de alcaloides obtenidos a partir de los extractos etanólicos de las hojas de <i>Z. carinata</i>	28
Tabla 9. Resultados del Tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de hojas de <i>Z. carinata</i>	29
Tabla 10. Resultados de la actividad antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides totales en extractos etanólicos y subfracciones de hojas de <i>Z. carinata</i>	32
Tabla 11. Resultados de la actividad citotóxica obtenidos mediante el bioensayo frente a <i>A. franciscana</i>	42

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de familia Amaryllidacea en las diferentes regiones tropicales y subtropicales del mundo.....	4
Figura 2. Ejemplos de alcaloides de la familia Amaryllidaceae A. Norbelladina, B. Galantamina, C. Licorina, D. Hemantamina, E. Montanina, F. Crinina.....	5
Figura 3. Especies del genero <i>Zephyranthes</i> reportados en Colombia A: <i>Z. carinata</i> , B: <i>Z. susatana</i> , C: <i>Z. rosea</i>	6
Figura 4. Fotos de la especie <i>Zephyranthes carinata</i>	7
Figura 5. Algunos flavonoides reportados en el género <i>Zephyranthes</i> A. (2S)-7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavan-3'-O-β-D-glucopiranosido. B (2S)-7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavan. C (2S)-7,4'-dihidroxi-3'- metoxiflavan. D (2R,3R)-7-metoxi-flavan-3-ol	8
Figura 6. Estructura del DPPH• antes y después de la reacción con el antioxidante	12
Figura 7. Estructura del catión radical ABTS•+ antes y después de la reacción con el antioxidante.	12
Figura 8. Esquema del funcionamiento del equipo Rancimat.....	13
Figura 9. Reacción de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	14
Figura 10. Formación del complejo flavonoide-Al.....	14
Figura 11. Nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	15
Figura 12. Hojas de <i>Z. carinata</i> (material vegetal).....	19
Figura 13. Cinética de la reacción del DPPH y las subfracciones de BuOH y Hex obtenidas por Soxhlet.....	34
Figura 14. Comparación de la Cl ₅₀ en extractos y subfracciones de hojas de <i>Z. carinata</i> obtenidos por el método DPPH.....	35
Figura 15. Comparación de la Cl ₅₀ en extractos y subfracciones de hojas de <i>Z. carinata</i> obtenidos por el método ABTS•+.....	37
Figura 16. Comparación de los factores de protección en extractos y subfracciones de hojas de <i>Z. carinata</i> obtenidos por el método Rancimat.	38
Figura 17. Comparación del contenido de fenoles en extractos y subfracciones de hojas de <i>Z. carinata</i>	40
Figura 18. Comparación del contenido de flavonoides totales en extractos y subfracciones de hojas de <i>Z. carinata</i>	41
Figura 19. Comparación de la CL ₅₀ de los extractos y subfracciones a las 6 horas de exposición.	44
Figura 20. Comparación de la CL ₅₀ de los extractos etanólicos y subfracciones a las 24 horas de exposición.	46

RESUMEN

Se determinó actividad antioxidante y citotóxica en extractos etanólicos totales de hojas de *Zephyranthes carinata* (Amaryllidaceae) obtenidos por los métodos de extracción: Soxhlet y Percolación, así mismo se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos presentes en esta especie.

Se encontró que de la actividad antioxidante evaluada con los métodos DPPH[•] y ABTS^{•+} fueron mayores en los extractos etanólicos y subfracciones obtenidos por el método de soxhlet que con el método de percolación. Con el método DPPH[•] la subfracción de Hex y la subfracción de BuOH fueron los que presentaron la mayor actividad antioxidante ($CI_{50}=448,71 \pm 3,42 \mu\text{g/mL}$ y $CI_{50} = 482,37 \pm 4,09 \mu\text{g/mL}$ respectivamente). La subfracción de Hex mostró una mayor velocidad de captación de radicales DPPH[•] a los 15 min de reacción, en comparación con la subfracción de BuOH. Con la subfracción de BuOH de encontró que la captación de radicales DPPH[•] a los 15 min no fue completa, debido a que a mayores tiempos de reacción continuaba captando radicales libres, presentando por lo tanto una mayor actividad antioxidante en comparación con con la subfracción de Hex. Con el método ABTS^{•+} se encontró que la subfracción de BuOH presentó la mayor actividad antioxidante ($CI_{50} = 578,95 \pm 3,03 \mu\text{g/mL}$), y la misma presentó el mayor contenido de fenoles totales ($67,49 \pm 0,14 \text{ mg EAG / g ms}$) y flavonoides totales ($56,94 \pm 0,96 \text{ mg EAQ / g ms}$). La actividad antioxidante por el método Rancimat demostró que el EET obtenido por soxhlet fue el que presentó una mayor actividad protectora frente al aceite de ajonjolí ($FP=1,11 \pm 0,00$). Respecto a la actividad citotóxica utilizando el bioensayo de *Artemia franciscana* se encontró que el EET obtenido por soxhlet a las 6 y 24 horas de exposición fue más letal en comparación con EET obtenido por percolación ($CL_{50}= 328,61 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$ y $CL_{50}=188,80 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$ respectivamente), clasificándose ambas concentraciones según el CYTED como moderadamente tóxico.

Palabras clave: *Amaryllidaceae*; *Zephyranthes carinata*; Actividad antioxidante; Estabilidad oxidativa; Contenido fenólico total; Actividad citotóxica.

ABSTRAC

Antioxidant and cytotoxic activity was determined in total ethanol extracts of leaves of *Zephyranthes carinata* (Amaryllidaceae) obtained by the extraction methods: Soxhlet and Percolation, as well as the content of phenolic compounds present in this species.

It was found that of the antioxidant activity evaluated with the DPPH[•] and ABTS^{•+} methods were higher in the ethanolic extracts and subfractions obtained by the soxhlet method than with the percolation method. With the DPPH method, the Hex subfraction and the BuOH subfraction were the ones with the highest antioxidant activity ($IC_{50} = 448.71 \pm 3.42 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $IC_{50} = 482.37 \pm 4.09 \mu\text{g} / \text{mL}$ respectively). The Hex subfraction showed a higher DPPH[•] radical uptake rate at 15 min reaction, compared to the BuOH subfraction. With the BuOH subfraction, it was found that DPPH[•] uptake at 15 min was not complete, because at higher reaction times it continued to capture free radicals, thus presenting a higher antioxidant activity as compared to the subfraction of Hex. With the ABTS^{•+} method, it was found that the BuOH subfraction presented the highest antioxidant activity ($IC_{50} = 578.95 \pm 3.03 \mu\text{g} / \text{mL}$), and it had the highest total phenol content ($67.49 \pm 0.14 \text{ mg EAG} / \text{g ms}$) and total flavonoids ($56.94 \pm 0.96 \text{ mg EQ} / \text{g ms}$). The antioxidant activity by the Rancimat method showed that EET obtained by soxhlet was the one that presented a greater protective activity against sesame oil ($PF = 1.11 \pm 0.00$). With regard to cytotoxic activity using *Artemia franciscana* bioassay, it was found that EET obtained by soxhlet at 6 and 24 hours of exposure was more lethal compared to EET obtained by percolation ($CL_{50} = 328.61 \pm 1.04 \mu\text{g} / \text{mL}$ And $CL_{50} = 188.80 \pm 1.25 \mu\text{g} / \text{mL}$ respectively), both concentrations being classified according to CYTED as moderately toxic.

Keywords: Amaryllidaceae; *Zephyranthes carinata*; Antioxidant activity; Oxidative stability; Total phenolic content; Cytotoxicity activity.

1 INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) se producen continuamente en los sistemas biológicos como productos o subproductos de reacciones enzimáticas y también producidas por las fuentes exógenas incluyendo el tabaco, el humo, las radiaciones y los pesticidas. Estas ERO son capaces de oxidar las estructuras celulares como los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono, produciendo enfermedades degenerativas como: cataratas, aterosclerosis, muerte celular y cáncer. Las ERO pueden detener su acción oxidativa por medio de los antioxidantes, los cuales donan electrones o átomos de hidrógeno logrando estabilizar los radicales libres.

El género *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) comprende aproximadamente 60 especies de plantas originarias de América. Son plantas perennes, herbáceas y bulbosas que han sido empleadas principalmente como plantas ornamentales y utilizadas como medicina alternativa por muchos países debido a sus actividades farmacológicas.

Zephyranthes carinata es una especie de planta bulbosa originaria de México y Guatemala, ha sido utilizada en la medicina tradicional en China para calmar la fiebre y para tratar los abscesos. Tiene actividades biológicas como antiinflamatorio, anticolinesterásico, antitumoral, debido principalmente a su contenido de alcaloides. En Colombia el género *Zephyranthes* es muy abundante sin embargo se ha encontrado pocos estudios a nivel fitoquímico en la especie *Z. carinata*. Los estudios realizados se han enfocado en bulbos cuyos alcaloides han presentado alta actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa asociada al mal de Alzheimer. Debido a la gran diversidad de metabolitos que presenta el género *Zephyranthes* en este trabajo de investigación se pretende determinar la actividad antioxidante y citotóxica en extractos etanólicos totales de las hojas de *Zephyranthes carinata*, obtenidos por dos métodos de extracción: Soxhlet y percolación, así mismo cuantificar el contenido de compuestos fenólicos presentes en esta especie.

2 MARCO TEORICO

2.1 FAMILIA AMARYLLIDACEAE

Amaryllidaceae es una familia de plantas herbáceas, perennes, bulbosas o rizomatosas, pertenecientes al orden Asparagales de las monocotiledóneas¹. Comprenden alrededor de 59 géneros y 800 especies². Tienen una amplia distribución (figura1) y se encuentra bien representada en los trópicos siendo los principales centros de distribución América del sur, sur de África, especialmente en la región andina, en Europa principalmente en el Mediterráneo y en algunas regiones templadas de Asia³. En Colombia esta familia botánica se encuentra ampliamente distribuida, encontrándose los géneros *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes*, *Hippeastrum* y *Crinum* entre otras⁴.



Figura 1. Distribución de familia Amaryllidaceae en las diferentes regiones tropicales y subtropicales del mundo. Imagen tomada de www.thecompositaehut.com

Esta familia de plantas además de ser utilizadas ornamentalmente se han empleado como hierbas medicinales durante miles de años por pueblos indígenas de todo el mundo³, por ejemplo la especie *Narcissus tazetta* ha sido utilizado en la medicina tradicional en la China e India como analgésico y por comunidades del norte de África los cuales le han atribuido propiedades anticancerígenas⁵. La especie *Hippeastrum vittatum* se emplea en Haití y República Dominicana para casos de inflamación aguda, y para el tratamiento de traumatismos⁶, *Narcissus pseudonarcissus* se utiliza en España como calmante para la tos⁷, *Hippeastrum reginae* se utiliza en México como expectorante⁸. En la actualidad estas plantas han sido consideradas de gran interés debido a su contenido de alcaloides con actividades farmacológicas importantes.

2.1.1 Alcaloides de la familia Amaryllidaceae

Los alcaloides de la familia Amaryllidaceae (figura 2) son un tipo específico de alcaloides derivados de la isoquinolina característicos y prácticamente exclusivos para esta familia de plantas. El amplio número de estos compuestos y las múltiples variaciones a nivel estructural que presentan los alcaloides de esta familia se deben a las rutas biosintéticas que los producen, por lo que se encuentran clasificados en nueve esqueletos del tipo: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y galantamina, alcaloides procedentes del precursor O-metilnorbelladina. Sus particularidades químicas más notables se resumen a continuación³:

1. Una estructura base C₆-C₁-N-C₂-C₆, en la que la porción C₆-C₁ deriva del aminoácido L-fenilalanina y el fragmento N-C₂-C₆ proviene de L-tirosina.
2. Son bases moderadamente débiles con pK_a entre 6 y 9.
3. La mayoría contiene un solo átomo de nitrógeno, el cual puede ser secundario, terciario o incluso cuaternario. Típicamente, el número de carbonos varía entre 16 y 20, según los sustituyentes del sistema policíclico.

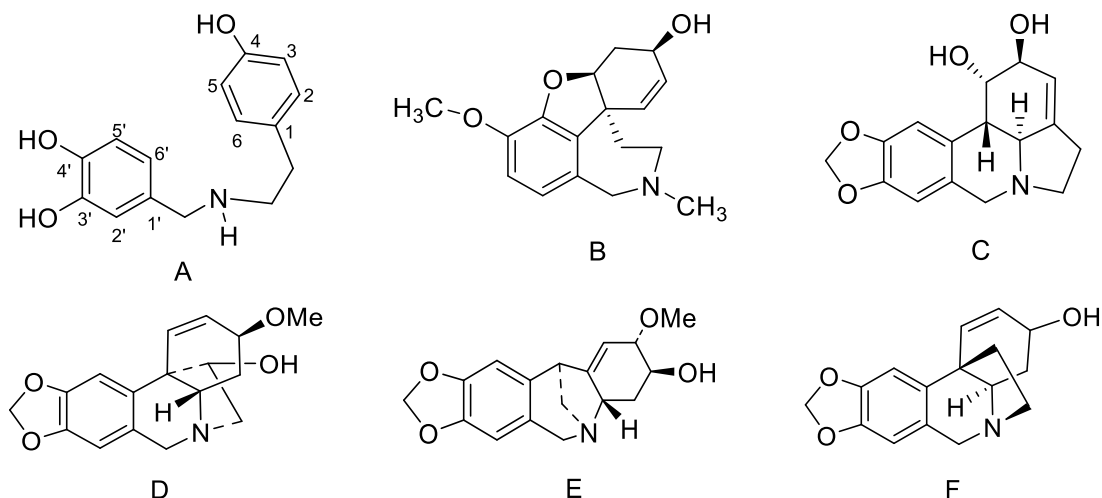


Figura 2. Ejemplos de alcaloides de la familia Amaryllidaceae A. Norbelladina, B. Galantamina, C. Licorina, D. Hemantamina, E. Montanina, F. Crinina³.

2.2 GÉNERO ZEPHYRANTHES

El género *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) comprende aproximadamente 60 especies de plantas perennes, herbáceas y bulbosas originarias de América.^{9 10} produce flores de color rosa, blanco o amarillo por tallo (figura 3)¹¹. Han sido ampliamente

utilizados ornamentalmente y tradicionalmente se conocen como “lirios de lluvia” debido a su tendencia a florecer poco después de periodos lluviosos. El género *Zephyranthes* es muy abundante en Colombia, según lo reportado en la literatura. Se conocen 6 especies; *Z. susatana*, *Z. albiella*, *Z. carinata*, *Z. puertoricensis*, *Z. robusta*, y *Z. rosea*.⁹ Las investigaciones que se conocen sobre este género de plantas en Colombia, está relacionado con las caracterizaciones morfológicas, que también enriquecen el conocimiento de la diversidad botánica y con el cual se han podido establecer diferencias entre otras especies de *Zephyranthes*. Sin embargo, existe la necesidad de realizar un análisis químico, caracterizaciones biológicas, e identificación de principios activos en estas plantas dado su potencial terapéutico.



Figura 3. Especies del genero *Zephyranthes* reportados en Colombia A: *Z. carinata*, B: *Z. susatana*, C: *Z. rosea*.⁹

2.3 *Zephyranthes carinata*

2.3.1 Hábitat y distribución

Zephyranthes carinata, es una especie de planta bulbosa perteneciente a la familia de las Amaryllidaceae, originaria de México y Guatemala. Esta especie se expandió ampliamente desde el sur de EE.UU. hasta Costa Rica, las Antillas, y algunos lugares aislados en América del Sur¹². En Sudamérica, aparentemente sólo se produce cultivado y naturalizado, generalmente florece después de los periodos lluviosos, pero en pastos húmedos y bajo condiciones de cultivación⁹. Se ha observado como una maleza en las plantaciones de caña de azúcar en el cinturón subandino y como colonizador en pastos y laderas. En Colombia esta especie se encuentra distribuida en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Santander y Cauca. También se cultiva con frecuencia en jardines, sobre todo en regiones frías por encima de 2200 m.s.n.m¹³.

2.3.2 Descripción taxonómica

La especie *Z. carinata* presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden:	Lilianaes Takht
Orden:	Asparagales Link
Familia:	Amaryllidaceae J. St.-Hil
Género:	<i>Zephyranthes</i>
Especie:	<i>Zephyranthes carinata</i>

2.3.3 Descripción exomorfológica

Presenta bulbos ovoides de 3,5 cm de diámetro, túnicas de color rojo vino, escapo de 10-15 cm de largo, espata lila oscuro grande (35-50 mm), pedúnculo de 10-30 mm de largo, perigone grande, de color rosa, con un tubo de hasta 20 mm de largo, tépalos de 60 mm de largo y 15-20 mm de ancho, anteras erguidas, amarillo grande (15-20 mm de largo), estilo de 50-60 mm de largo, con tres lóbulos cortos de 1,5-2 mm⁹.

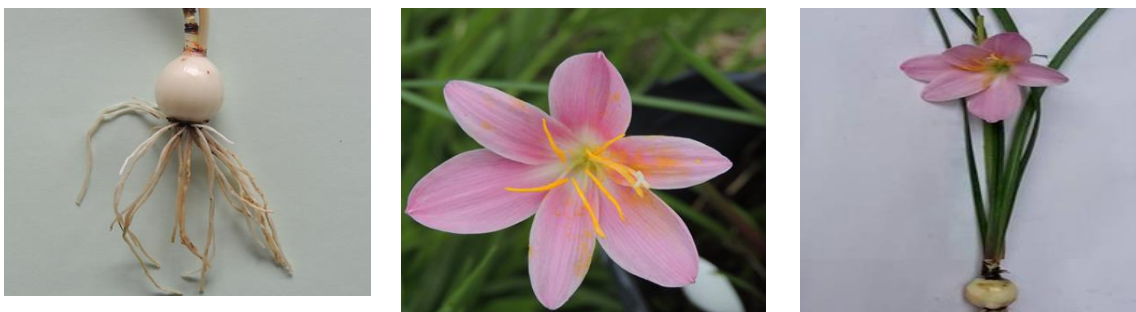


Figura 4. Fotos de la especie *Zephyranthes carinata* Fuente: Fotos tomadas por Oscar Darío Bermúdez Zambrano, Depto de Biología, Popayán, Cauca.

2.3.4 Propiedades biológicas del genero *Zephyranthes*

Las plantas del genero *Zephyranthes* son conocidas por su valor ornamental y propiedades medicinales debido a su contenido de metabolitos los cuales presentan diferentes actividades farmacológicas. Por ejemplo, en el estudio de Zhan et al¹⁴ y Chilpa et al¹⁵ se aislaron 17 y 6 alcaloides de *Zephyranthes candida* y *Zephyranthes concolor* respectivamente. Los alcaloides tipo galantamina en ambos estudios exhibieron actividades inhibitoras de AChE. Aslam et al¹⁶ evaluó la actividad de captación de radicales DPPH, actividad antiinflamatoria, actividad analgésica y

actividad toxicológica en ratas albinas wistar, utilizando extractos metanolicos de *Zephyranthes citrina* encontrando que estos poseen potencial para ser utilizados en el campo farmacológico. Kojima et al¹³ y Luo et al¹⁷ aislaron 2 y 7 alcaloides de *Zephyranthes carinata* y *Zephyranthes candida* respectivamente, los cuales presentaron una potente actividad citotóxica en diversas líneas celulares tumorales humanas. Zhan et al¹⁸ aislaron cuatro flavonoides de *Zephyranthes candida* (figura 5) estos mostraron efectos inhibidores significativos en la producción de monóxido de nitrógeno inducida por lipopolisacáridos en macrófagos de ratón lo que sugiere su potencial como agentes antiinflamatorios.

En Colombia existen pocos estudios a nivel fitoquímico de la especie *Z. carinata*, los análisis realizados se han enfocado en los bulbos como en el trabajo de Cortés et al¹⁹ quien reportó la presencia de 22 alcaloides en esta especie identificados mediante GC/MS, los extractos de alcaloides exhibieron una alta actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa ($CI_{50} = 5,97 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$) lo cual sugiere que pueden ser utilizados para el tratamiento del Alzheimer. Debido a las diferentes actividades biológicas que puede presentar esta especie, en el presente trabajo de investigación se determinó la actividad antioxidante y citotóxica en extractos etanólicos de hojas de *Z. carinata* con el fin de encontrar nuevos productos naturales que puedan aplicarse en el futuro a nivel humano o industrial.

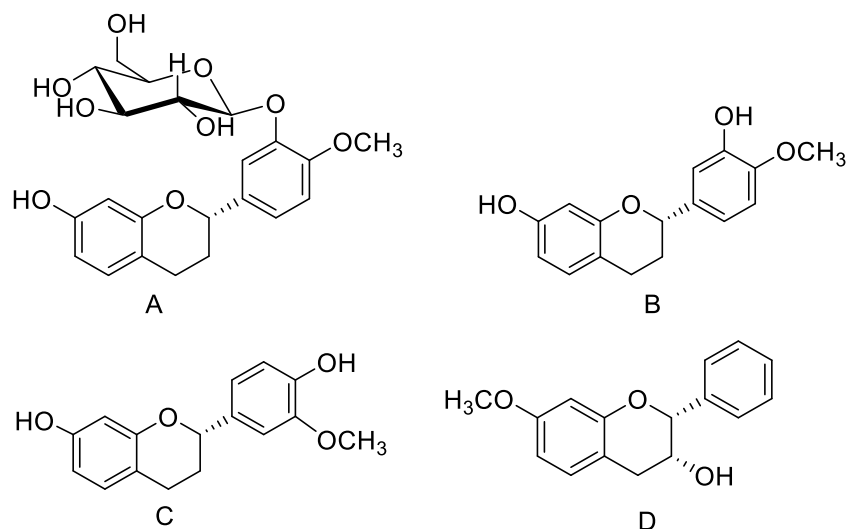


Figura 5. Algunos flavonoides reportados en el género *Zephyranthes* A. (2S)-7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavan-3'-O-β-D-glucopiranósido. B (2S)-7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavan. C (2S)-7,4'-dihidroxi-3'- metoxiflavan. D (2R,3R)-7-metoxi-flavan-3-ol^{20 18}

2.4 RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

Un radical libre es una especie química que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable y reactivo con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena²¹. Dentro de este concepto general, las formas reducidas del oxígeno se denominan especies reactivas del oxígeno (ERO) (Tabla 1), en las que se incluyen radicales libres y peróxido de hidrógeno. Las ERO son producto del metabolismo celular y fuentes exógenas (rayos X, humo de tabaco, contaminación ambiental); tienen una participación dual en la célula, ya que pueden adoptar un papel benéfico o perjudicial en los sistemas vivos.

Tabla 1 Principales especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)²².

Radicales libres	Especies reactivas no radicales
Superóxido $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno H_2O_2
Hidroxilo $HO\cdot$	Hidroperóxidos $ROOH$
Alcoxi $RO\cdot$	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Peroxi $ROO\cdot$	Oxígeno singlete 1O_2
Óxido nítrico $NO\cdot$	Ozono O_3
Dióxido de nitrógeno $\cdot NO_2$	Peroxinitrito $ONOO^-$
Radical nitrato $\cdot NO_3$	Peroxinitrato O_2NOO
	Ácido nitroso, HNO_2

Dado que las ERO y otras formas de radicales libres se producen constantemente en forma inevitable durante los procesos metabólicos, las células han desarrollado un poderoso y complejo sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes que reciben el nombre genérico de antioxidantes, los cuales pueden definirse como compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. También se pueden definir como: cualquier sustancia que es capaz de retrasar o prevenir o eliminar el daño oxidativo de una molécula diana²³.

2.5 CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES

No existe un criterio único para la clasificación de los antioxidantes, por que varios de ellos actúan por diversos mecanismos. La literatura reporta varias formas de clasificación a saber:

2.5.1 Clasificación según fuente de origen

En ésta clasificación encontramos los antioxidantes naturales y los antioxidantes sintéticos. Los antioxidantes naturales se extraen de plantas y animales. Entre los antioxidantes de origen natural se destacan los carotenoides y los polifenoles como los ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos²⁴. Los antioxidantes sintéticos que en su mayoría son compuestos fenólicos con varios grupos alquilo, como el butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), *ter*-butil-hidroquinona (TBHQ) y propilgalato (PG); donde la estructura de éste tipo de compuestos permite donar un protón a un radical libre²⁵.

2.5.2 Clasificación según acción en organismos vivos

En ésta categoría los antioxidantes se agrupan en primarios, secundarios y terciarios. Los primarios previenen la formación de nuevas especies reactivas de oxígeno. Esto se consigue convirtiendo las especies reactivas de oxígeno en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas. En este grupo se destacan las siguientes enzimas glucosa oxidasa, el peróxido dismutasa, la catalasa, y la glutatión peroxidasa²⁶. Los antioxidantes secundarios capturan los radicales y evitan las reacciones en cadena. Ejemplos de ellos son la vitamina E y C, β -caroteno y sustancias endógenas con capacidad antioxidante, entre las cuales se encuentran glutatión urato, bilirrubina y ubiquinona²⁷. Finalmente los antioxidantes terciarios que son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas endonucleasa apurinica/apirimidínica y polimerasa β , reparadoras del ADN, y la metionina sulfóxido reductasa²⁸.

2.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. La medición de una muestra oxidante, puede usar intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante²⁹.

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test invitro (ver tabla 2) para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presenten diferentes variaciones loc cual puede dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método

y otro. Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías:

Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (SET)³⁰. Sin embargo, el mecanismo que domina un sistema será determinado por la estructura química del antioxidante, su solubilidad, coeficiente de partición, energía de disociación de enlace, potencial de ionización y condiciones del medio de reacción, como el pH.

Tabla 2. Clasificación de los modelos de ensayo según su modo de reacción SET o HAT³⁰

Ensayo	Categoría
ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	Basados en la transferencia de electrones
FRAP (Poder de reducción antioxidante del hierro)	
DMPD (N,N- dimetil-p-fenilendiamina)	
CUPRAC (Capacidad de reducción antioxidante del cobre)	
ORAC (Capacidad de absorción del radical oxígeno)	Basados en la transferencia de átomos de hidrógeno
TRAP (Parámetro antioxidante de captura de radicales)	
DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)	

2.6.1 Métodos que combinan mecanismos HAT y SET

Algunos métodos ampliamente usados como el ABTS y el DPPH se fundamentan en la estabilización de radicales libres sintéticos cuya reacción con un antioxidante genera un cambio que puede ser detectado instrumentalmente. Sin embargo, se ha mostrado que estos radicales pueden ser estabilizados tanto por mecanismos HAT como SET y, por lo tanto, los patrones de reactividad y el mecanismo son difíciles de interpretar cuando no se conoce la estructura química del antioxidante evaluado³¹.

2.7 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.7.1 Método del DPPH•

Este método fue propuesto originalmente por Brand-Williams en 1995, y se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH• (figura 6), esta medición puede hacerse espectrofotométricamente

siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 515 nm³². La reacción de estabilización se considera que transcurre principalmente mediante un mecanismo SET, con un aporte marginal de HAT.

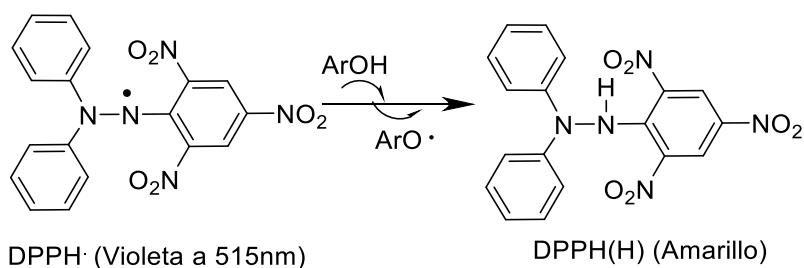


Figura 6. Estructura del DPPH• antes y después de la reacción con el antioxidante³¹.

2.7.2 Método del ABTS^{•+}

Este método fue propuesto originalmente por Miller y Rice-Evans en 1993, y se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS^{•+} (figura 7), el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) por acción de la metamioglobina y peróxido de hidrógeno³³. Este método fue criticado debido a que los antioxidantes reaccionan con los agentes oxidantes mismos, lo que podría conducir a una sobreestimación de la capacidad antioxidante. Re y Rice- Evans en 1999 desarrollaron un ensayo mejorado de decoloración del catión radical ABTS^{•+} empleando persulfato como oxidante, compensando con ello las debilidades del ensayo original³⁴. El radical catión preformado de 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS^{•+}) se genera por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. La influencia de la concentración de antioxidante y la duración de la reacción de inhibición del radical se tienen en cuenta al determinar la actividad antioxidante³⁴.

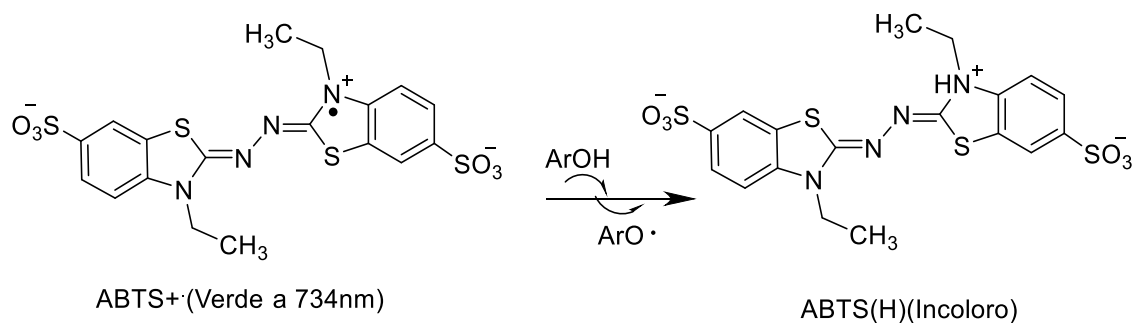


Figura 7. Estructura del catión radical ABTS^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante³¹.

2.7.3 Método RANCIMAT

La determinación del índice de estabilidad oxidativa por Rancimat es el método estándar más utilizado para determinar la susceptibilidad a la oxidación de grasas y aceites comestibles por exposición a elevadas temperaturas y flujo de aire³⁵. Fue desarrollado por Hadorn y Zurcher en el año 1974, y se fundamenta en el hecho de que la mayoría de los productos volátiles de bajo peso molecular formados en la descomposición de los hidroperóxidos corresponden a ácidos orgánicos volátiles como: ácido acético y ácido fórmico^{36 37}. A las altas temperaturas, estos ácidos son transportados por una corriente de aire a un segundo recipiente con agua destilada provocando un aumento de la conductividad de la misma (figura 8). El tiempo transcurrido hasta la formación de estos productos de reacción secundarios es lo que se denomina tiempo de inducción o índice de estabilidad oxidativa³⁷.

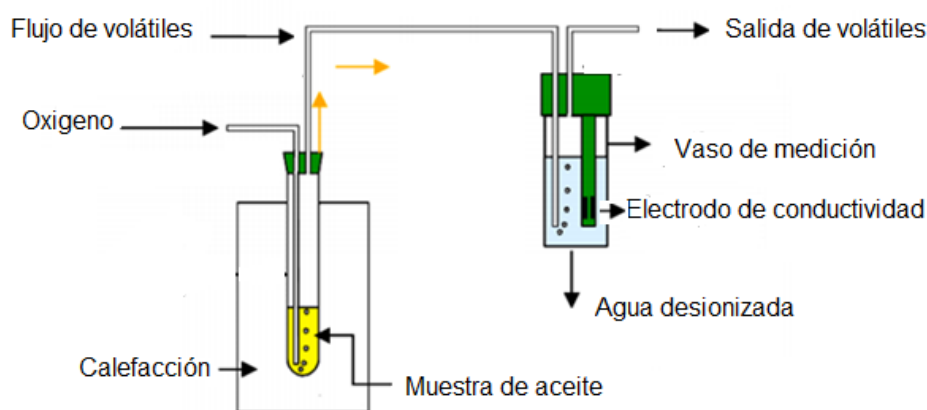


Figura 8. Esquema del funcionamiento del equipo Rancimat³⁸

2.8 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

2.8.1 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Este método fue propuesto por Folin y Ciocalteu en 1927, se fundamenta en la reducción, en medio básico, de una mezcla de ácidos fosfowolfrámicos y fosfomolibdicos ($H_3Mo_{12}O_{40}P$ y $H_3[P(W_3O_{10})_4]$) con compuestos polifenólicos hasta óxidos de color azul (W_8O_{13} y Mo_8O_{23}), los cuales presentan absorbancia a una longitud de onda de 760 nm. El reactivo de Folin-Ciocalteu, a pesar de ser el más comúnmente empleado para la determinación del contenido de polifenoles, puede

reaccionar con compuestos no fenólicos, como son el ácido ascórbico, los azúcares y los aminoácidos, produciéndose así una sobrevaloración del contenido fenólico³⁹.

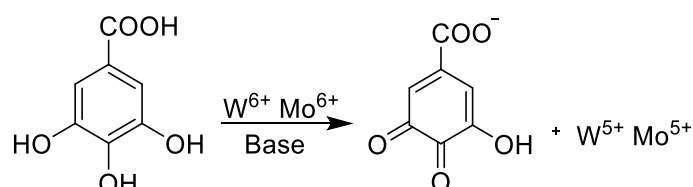


Figura 9. Reacción de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

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

Este método fue propuesto por Zhishen en 1999, se fundamenta en la reacción de los iones de aluminio con los grupos OH de los flavonoides en medio alcalino para formar un complejo de color rosa que se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm⁴⁰.

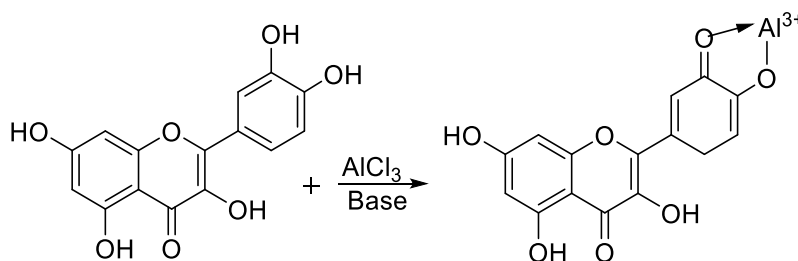


Figura 10. Formación del complejo flavonoide-Al

2.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

2.9.1 Actividad citotóxica frente *Artemia franciscana*

Uno de los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a *Artemia franciscana*. (Figura 9). Fue desarrollada en 1982 por Meyer y Col, y consiste en exponer compuestos activos o extractos de plantas a nauplios de *Artemia franciscana*, para determinar la concentración letal 50⁴¹.

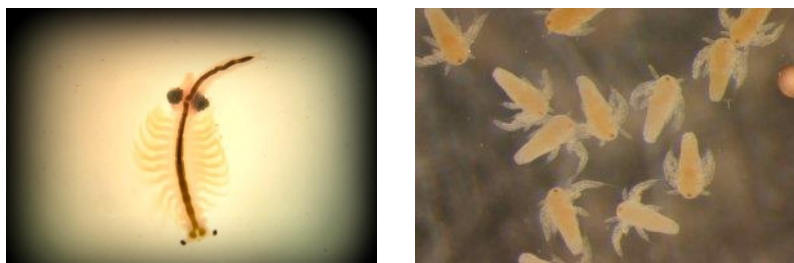


Figura 11. Nauplios de *Artemia franciscana*⁴²

La *Artemisa franciscana* se ha utilizado en varios sistemas de ensayos biológicos; entre estas aplicaciones, se han utilizado en el análisis de residuos de plaguicidas, micotóxicas, contaminantes corrientes, anestésicos, dinoflagelados y plantas. Dentro de los usos de mayor actividad, la *Artemia* es útil para predecir actividades plaguicidas y farmacológicas en la evaluación biológica de productos naturales mediante extractos crudos, fracciones o compuestos puros, ya que responde a un amplio rango de compuestos químicos y farmacológicamente diversos; es por ello que resulta importante su aplicación en programas de descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas y medicamentos de origen natural⁴³. El bioensayo con *A. Franciscana* tiene las ventajas de ser rápido, barato y sencillo. Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, sin necesitar equipamiento especial empleando además pequeñas cantidades de muestra.

3 PROBLEMA CIENTÍFICO

Las especies del genero *Zephyranthes* han sido ampliamente utilizadas como medicina alternativa en muchos países del mundo. Por ejemplo, las hojas de *Z. candida* se usan en Sudáfrica, para el tratamiento de la diabetes mellitus. En Perú se ha utilizado la *Z. parulla* para el tratamiento de tumores. En la India se utilizan las especies *Z. rosea* y *Z. flava* para una variedad de propósitos terapéuticos como: dolencias en el oído y el pecho, infecciones virales, tumores, cáncer de mama. Sin embargo, a pesar de sus usos terapéuticos en las culturas ancestrales, hay pocos estudios a nivel fitoquímico y de actividad biológica del género *Zephyranthes*, el cual es muy abundante en Colombia; por lo tanto con el presente trabajo de investigación se pretende evaluar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios presentes en las hojas de la especie *Z. carinata*, y evaluar su actividad antioxidante y citotóxica por dos métodos de extracción: Soxhlet y percolación.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la actividad antioxidante y citotóxica en los extractos etanólicos de las hojas de *Z. carinata* (Amaryllidaceae) obtenidos por los métodos de extracción Soxhlet y Percolación.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Obtener extractos etanólicos de hojas de *Z. carinata* mediante los métodos de extracción Soxhlet y percolación.

4.2.2 Identificar cualitativamente metabolitos secundarios en los extractos etanólicos de las hojas de *Z. carinata* mediante tamizaje fitoquímico.

4.2.3 Comparar la actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y actividad citotóxica en extractos etanólicos de hojas de *Z. carinata*.

4.2.4 Cuantificar el contenido de flavonoides totales en los extractos etanólicos y en las subfracciones obtenidas por soxhlet y percolación.

4.2.5 Obtener la fracción de alcaloides a partir de los extractos etanolicos totales y su evaluación citotóxica frente a *Artemia franciscana*.

5 METODOLOGIA

5.1 MATERIALES Y EQUIPOS

5.1.1 Reactivos

Tabla 3. Reactivos usados en la investigación.

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

5.1.2 Equipos

Tabla 4. Equipos utilizados en la investigación

Equipo	Modelo	Marca
Espectrofotómetro de Uv-vis	GENESIS 6	Thermo Scientific (Texas, USA)
Rotavaporador	Laborota 4003	Heidolph Instruments Gmbh Co (Schwabach, Alemania)
Balanza analítica	Ohaus	Adventure (EE.UU)
Cámara ambiental	Biotronette lab line 846	(Virginia USA)
Rancimat	892	METROHM

5.1.3 Material vegetal

Las hojas frescas de *Z. carinata* (figura 12) se obtuvieron de la colección de plantas de la familia Amaryllidaceae, a cargo del Grupo de Investigación QCB, localizada en el Jardín Botánico Álvaro José Negret de la Universidad del Cauca ubicada en la vereda la Rejoya, al noroccidente del municipio de Popayán (Cauca), entre los 2° 31' 23" Norte y 76° 35' 73" Oeste, a una altitud de 1800 m. La planta fue identificada por el taxónomo Bernardo Ramírez del Departamento de Biología de la Universidad del Cauca cuyo espécimen fue depositado en el herbario de la Universidad del Cauca.



Figura 12. Hojas de *Z. carinata* (material vegetal)

5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y ALCALOIDES

Las hojas de *Z. carinata* se cortaron en pequeños trozos y se depositaron en papel periódico y se sometieron a secado a temperatura ambiente durante 15 días, hasta peso constante, con los pesos inicial y final se determinó el porcentaje de humedad.

A continuación las hojas se trituraron y se pasaron por un tamiz N 22 con el objetivo de obtener un tamaño de partícula homogéneo. Finalmente se realizó el proceso de extracción con los métodos Soxhlet y percolación.

5.2.1 Obtención del extracto etanólico por el método Soxhlet

Se pesaron 10 g secos del material vegetal triturado en un cartucho de celulosa, y se colocaron en equipo soxhlet donde se realizó la extracción sólido-líquido durante 48 horas utilizando 500 mL etanol al 98%. Al completar el tiempo de extracción se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador a (40 mbar, 40 °C) se se obtuvo el extracto etanólico total (EET).

5.2.2 Obtención del extracto etanólico por el método percolación

Se pesaron 10 g secos del material vegetal triturado y se adicionaron en un Erlenmeyer que contenía 500 mL etanol al 98%, se tapó y se dejó durante 48 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz solar. Transcurrido dicho tiempo la muestra se filtró a través de papel filtro Whatman, con el propósito de eliminar restos de sólidos procedentes del material vegetal y luego se pasaron a concentrar los extractos a presión reducida (40 mbar, 40 °C) recuperando el solvente y obteniendo el EET.

5.2.3 Obtención de alcaloides totales mediante el método ácido base

Para la obtención de alcaloides se siguió la metodología propuesta por Kassem et al⁴⁴ con algunas modificaciones. Para ello se pesaron 120,0 g de hojas secas de *Z. carinata* y se extrajeron mediante los métodos: Soxhlet y Percolación durante 48 horas utilizando etanol al 98%, a continuación se concentró el extracto a presión reducida (EET), el cual se disolvió en 50 mL HCl al 2.5% (pH 2). Se transfirió a un embudo de separación donde se desengrasó con hexano (2x25 mL) y se despigmentó con éter etílico (2x25 mL), la fase acuosa ácida se alcalinizó con NH₄OH (pH 8), y los alcaloides libres se extrajeron en cloroformo y se secaron a presión reducida en un rotaevaporador (40 mbar, 40 °C).

5.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

La identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de hojas de *Z. carinata* se llevó a cabo según el método descrito por Sanabria Al et al⁴⁵, haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación. En la tabla 4 se detallan cada uno de los ensayos realizados.

5.4 OBTENCIÓN DE SUBFRACCIONES A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS MEDIANTE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

El fraccionamiento de los extractos etanólicos totales se realizó mediante extracción líquido-líquido, para ello se pesó 1,00 g de cada uno de los extractos y se disolvieron en 30 mL de agua destilada. A continuación la disolución se transfirió a un embudo de separación donde se fraccionó sucesivamente utilizando disolventes en orden ascendente de polaridad, *n*-hexano (3x10 mL), acetato de etilo (3x10 mL) y *n*-butanol (3x 10 mL) obteniendo así tres subfracciones orgánicas, y la subfracción acuosa restante, cada una de las subfracciones obtenidas se llevó a sequedad mediante calentamiento a presión reducida (40 mbar, 40 °C). Finalmente los residuos secos de cada subfracción se utilizaron para los análisis de actividad antioxidante, actividad citotóxica y determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales.

Tabla 5. Ensayos empleados para la identificación de metabolitos secundarios en *Z. carinata*

Ensayo	Reactivo	Resultado esperado
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado naranja
	Mayer	Precipitado crema
	Wagner	Precipitado café
Cardiotónicos	Baljet	Rojo, naranja, violeta
	Kedde	Rojo-azul, violeta
	Keller-Kiliani	Colores intensos
	Salkowski	Rojo sangre, amarillo
	Liebermann-Bourchard	Verde, azul-verdoso, rojo
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	Rojo carmesí, Naranja
Taninos	Cloruro férrico	Café, rojizos
	Solución de gelatina	Precipitado blanco o turbidez
	Solución de gelatina sal	Precipitado blanco o turbidez
Triterpenos y Esteroides	Liebermann- Burchard	Verde intenso
	Salkowski	Rojo
Cumarinas volátiles	Papel impregnado con NaOH	Verde revelado en uv
Saponinas	Formación de espuma	Formación de espuma
Carotenos	Reactivo de Carr-Price	Azul-verde
Quinonas	Test Bornträger	Rojo o rosado

5.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.5.1 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH

Este ensayo se llevó a cabo mediante el protocolo colorimétrico descrito Brand-Williams et al³², con algunas modificaciones. Se pesaron 2,9 mg del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo DPPH• y se disolvieron en 100 mL de metanol, se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-vis y se ajustó a un valor de 0.800 ± 0.03 ($\lambda = 515$ nm). Para el análisis de los extractos y subfracciones de *Z. carinata* se mezcló en una celda 1200 μ L de la solución de DPPH• con 600 μ L de los extractos y fracciones previamente disueltos en metanol a diferentes concentraciones 1000, 800, 500, 400, 300, 200 y 100 μ g/mL con el fin de determinar un rango de linealidad de la reacción del DPPH•, se agitaron y se mantuvieron en oscuridad por 15 minutos. Finalizado ese tiempo de reacción se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-vis a 515 nm. Como controles de referencia se utilizaron butilhidroxitolueno (BHT), ácido ascórbico (AA) y tocoferol (α -T) a concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 90 y 100 μ g/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados de la actividad antioxidante fueron expresados en CI_{50} que es la concentración de antioxidante requerido para una inhibición del 50% de los radicales libres³², la cual se determinó por análisis de regresión lineal de la curva entre la concentración de la muestra y el porcentaje de inhibición⁴⁶. El porcentaje de inhibición del radical libre DPPH• se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% I = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100$$

Dónde: A_B = absorbancia del blanco a ($t = 0$ min) y A_A = absorbancia de la muestra a ($t = 15$ minutos)⁴⁶.

5.5.2 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método ABTS

Este ensayo se llevó a cabo mediante la metodología desarrollada por Re et al³⁴, con algunas modificaciones. Para la preparación del radical ABTS^{•+} se pesaron 18 mg del ABTS (2,2' ácido azinobis-3-etil- benzotiazolin-6- sulfónico) y se disolvieron en 54 mL de solución buffer fosfato pH 7,4. Posteriormente esta solución se mezcló con 6 mL de disolución de persulfato potásico 2,45 mM y se dejó reposar a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical

ABTS^{•+} se diluyó con solución buffer y metanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.700 ± 0.03 a 734 nm.

Para el análisis de los extractos y subfracciones de *Z. carinata* se mezcló en una celda 1520 μL de solución del catión radical ABTS^{•+} con 80 μL de los extractos y subfracciones previamente disueltos en metanol a diferentes concentraciones 1000, 800, 500, 400, 300, 200 y 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con el fin de determinar un rango de linealidad de la reacción del radical ABTS^{•+}. Se agitaron y se mantuvieron en oscuridad por 5 minutos. Finalizado este tiempo de reacción se determinó la absorbancia a 734 nm empleado el espectrofotómetro UV-vis, como controles de referencia se utilizaron (BHT), (AA) y (α -T) a concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 90 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados de la actividad antioxidante fueron expresados en CI_{50} la cual se determinó por análisis de regresión lineal de la curva entre la concentración de la muestra y el porcentaje de inhibición⁴⁶. El porcentaje de inhibición del radical libre ABTS^{•+} se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% I = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100$$

Dónde: A_B = absorbancia del blanco a ($t = 0$ min) y A_A = absorbancia de la muestra a ($t = 5$ minutos).

5.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método Rancimat

La evaluación de la capacidad para proteger un aceite de la oxidación, se llevó a cabo mediante el método Rancimat, siguiendo la metodología descrita por Läubli et al⁴⁷. Para ello se pesó 3,00 g aceite de ajonjolí libre de antioxidantes y se adicionó el extracto o subfracción de *Z. carinata* hasta una concentración de 200 ppm. A continuación la muestra se adicionó en un tubo de ensayo y se introdujo en el equipo Rancimat, a una temperatura de 130 °C, y flujo de aire 20 L/h con el fin de determinar el tiempo de inducción de la muestra. Como blanco de control se utilizó el aceite de ajonjolí sin extracto, y como control positivo se utilizó BHT a una concentración de 200 ppm. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como factor de protección (FP) empleando la siguiente fórmula:

$$\text{FP} = [T_{Ic}/T_{Is}]$$

Dónde: T_{Ic} = tiempo de inducción en horas del aceite de Ajonjolí con antioxidante y T_{Is} = tiempo de inducción en horas del aceite de Ajonjolí sin antioxidante.

5.6 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

5.6.1 Determinación fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología descrita por Singleton et al.⁴⁸, se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico como patrón de cuantificación disuelto en metanol, a concentraciones de 15, 25, 35, 45, 55, 65 y 75 µg/mL. Se tomaron 200 µL de estas soluciones y posteriormente se adicionaron 1000 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos. Luego se adicionaron 800 µL de carbonato de sodio al 7,5 %, se agitó y se dejó durante 1 hora en la oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro UV-vis.

Para la determinación del contenido de fenoles totales en los extractos y subfracciones de *Z. carinata* se pesaron 3 mg de cada muestra y se disolvieron en 3 mL de metanol, se tomaron los mismos volúmenes y condiciones descritas para tratamiento de la curva de calibración. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/ g m) utilizando la siguiente fórmula:

$$C = cV / m$$

Dónde: c (mg/mL) es la concentración de ácido gálico establecida a partir de la curva de regresión lineal, V (mL) es el volumen de extracto de solución ensayada y m (g) es el peso de muestra seca.

5.6.2 Determinación de flavonoides totales por el método tricloruro de aluminio

La cuantificación de flavonoides totales se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Zhishen et al.⁴⁰ con algunas modificaciones. Se realizó una curva de calibración utilizando quercetina como estándar disuelto en metanol a concentraciones de 8, 30, 60, 120, 180, 240 y 300 µg/mL. A continuación se tomaron 140 µL de cada concentración y se le adicionaron 52,5 µL de nitrito de sodio al 5% y 805 µL de agua desionizada, se mezcló y se dejó reposar durante 5 minutos, luego se añadieron 210 µL de cloruro de aluminio al 2,5 %, se agitó y se dejó durante 6 minutos,

finalmente se añadieron 350 μ L de solución NaOH 1M y 350 μ L de agua desionizada, se mezcló y se dejó reposar durante 5 minutos, finalizado ese tiempo de reacción se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-vis a 500 nm.

Para la determinación del contenido de flavonoides totales en los extractos y subfracciones, de *Z. carinata* fue necesario despigmentar debido a que las clorofilas presentes en las muestras interfirieron en el análisis. Para ello se tomó 5 mg de cada muestra y se disolvieron en 5 mL de agua desionizada caliente. A continuación se transfirió a un embudo de separación donde se procedió a despigmentar con éter etílico (2x5 mL), se recogió la fase acuosa y se secó en una plancha de calentamiento con el fin de eliminar residuos de éter y se llevó hasta 5 mL con agua desionizada. A partir de esta solución se tomaron los mismos volúmenes y se llevaron a las mismas condiciones que el estándar de quercetina. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados en mg equivalentes de quercetina por gramo de muestra seca (mg EQ / g m) utilizando la siguiente fórmula:

$$C = cV / m$$

Dónde: c (mg/mL) es la concentración de quercetina establecida a partir de la curva de regresión lineal, V (mL) es el volumen de extracto de solución ensayada y m.(g) es el peso de muestra seca.

5.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

5.7.1 Determinación de la actividad citotóxica mediante el bioensayo con *Artemia Franciscana*

El ensayo preliminar de la actividad biológica con *A. franciscana*, se realizó siguiendo la metodología descrita por Sanabria y López ⁴⁵. Para obtener las larvas de *A. franciscana* se agregaron 50 mg de huevecillos en 300 mL de agua de mar artificial al 3%, y se incubaron en la cámara ambiental a 25 °C y luz blanca durante 48 horas. Una vez eclosionados los huevecillos se tomaron 10 larvas y se depositaron en viales de vidrio de 5 mL junto con 2 mL de solución salina. A continuación se pesaron 80 mg de los extractos etanólicos y las fracciones de alcaloides de *Z. carinata* y se disolvieron en 2 mL de DMSO, de estas soluciones se tomaron diferentes volúmenes y se adicionaron a los viales que contenían las larvas de *A. francisca* y se completó hasta un volumen de 5 mL con solución salina, de tal manera que al final se obtuvieron concentraciones de 20, 50, 100, 300, 600, 800 y

1000 µg/mL. Se realizó un control negativo que contenía 10 larvas de *A. franciscana* y 125 µL de DMSO y como control positivo se utilizó una solución de dicromato de potasio con la cual se realizó una curva de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 90 y 100 µg/mL. Finalizado este proceso se introdujeron en la cámara ambiental, y se realizaron los conteos de las larvas muertas a las 6 y 24 horas de exposición, todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se procesaron empleando el software Graph PadPrism 5.0 (California USA) donde se determinó el valor de la CL₅₀.

6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si hay diferencias significativas entre la actividad antioxidante y actividad citotóxica con los métodos de extracción: soxhlet y percolación se realizó un análisis de varianza ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia $p < 0,05$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se presentan como valores medios \pm SD.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 PORCENTAJES DE RENDIMIENTO

7.1.1 Rendimiento de los extractos etanólicos totales

En la tabla 5 se muestran los porcentajes de rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos por los métodos soxhlet y percolación.

Tabla 6. Porcentajes de rendimiento de la extracción etanólica de hojas de *Z. carinata*

Método	Volumen etanol (mL)	Tiempo (h)	Rendimiento (% p/p)
Soxhlet	500	48	15,61
Percolación	500	48	7,87

Se obtuvo un mayor porcentaje rendimiento de EET con el método soxhlet (15,61%) que con el método de percolación (7,87%), esto posiblemente se deba a la temperatura utilizada en el método soxhlet, donde el etanol es calentado de tal manera que alcanza su punto de ebullición (78 °C) lo que contribuye a aumentar la eficiencia del proceso ya que la constante de equilibrio de saturación se desplaza favoreciendo la extracción debido a que la temperatura favorece la solubilidad⁴⁹.

7.1.2 Rendimientos de subfracciones

A partir de los extractos etanólicos totales obtenidos por los métodos soxhlet y percolación se realizó el fraccionamiento mediante extracción Líquido-Líquido para obtener tres subfracciones orgánicas Hex, AcOEt, y BuOH y la subfracción Ac restante. Los rendimientos de cada subfracción se muestran en la tabla 6.

Tabla 7. Porcentajes de rendimiento de las subfracciones obtenidas mediante extracción líquido-líquido

Muestras	Soxhlet		Percolación	
	peso fracción (g)	Rendimiento (% p/p)	peso fracción (g)	Rendimiento (% p/p)
Hex	0,267	26,70	0,417	41,70
AcOEt	0,065	6,50	0,057	5,70
BuOH	0,178	17,80	0,105	10,50
Ac	0,435	43,50	0,356	35,60

Se encontró que los porcentajes de rendimiento más altos se obtuvieron con el método soxhlet a excepción de la subfracción de Hex. La subfracción de AcOEt por ambos métodos fue la que obtuvo el menor porcentaje de rendimiento.

7.1.3 Rendimiento de alcaloides

En la tabla 8 se muestran los porcentajes de rendimiento de la fracción de alcaloides obtenida mediante el procedimiento ácido base.

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento de la fracción de alcaloides obtenidos a partir de los extractos etanólicos de las hojas de *Z. carinata*

Método	Peso hojas secas (g)	Peso alcaloides (g)	Rendimiento (% p/p)
Soxhlet	120,02	0,098	0,082
Percolación	120,05	0,055	0,046

El EET obtenido por el método soxhlet fue el que presentó el mayor porcentaje de rendimiento de alcaloides (0,082%) en comparación con el método de percolación (0,046%), esto posiblemente podría ser debido a la temperatura utilizada en la obtención de los extractos etanólicos totales lo que ayudaría a una mayor extracción de alcaloides a partir del material vegetal. Cortes et al⁵⁰ obtuvo fracciones de alcaloides en bulbos de diferentes especies de Amaryllidaceae encontrando un porcentaje de rendimiento en bulbos de *Z. carinata* de (0,009%) un porcentaje muy bajo en comparación con el porcentaje obtenido en hojas de *Z. carinata*. Por lo anterior se podría decir que en esta especie presenta un mayor contenido de alcaloides en las hojas que en los bulbos, sin embargo el contenido de alcaloides puede variar ya que este puede depender de varios factores como: las condiciones climáticas, las condiciones del suelo y los depredadores presentes en el hábitad.

7.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

En la tabla 9 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos etanólicos de hojas de *Z. carinata* obtenidos por los métodos: Soxhlet y percolación. Para la interpretación de los de los resultados, se tuvo en cuenta la simbología siguiente: Presencia del metabolito (+) y ausencia del metabolito (-).

Tabla 9. Resultados del Tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de hojas de *Z. carinata*

Prueba	Reactivo	Resultado	
		Soxhlet	Percolación
Alcaloides	Dragendorff	+	+
	Mayer	+	+
	Wagner	+	+
Cardiotónicos	Baljet	+	+
	Kedde	+	+
	Keller-Kiliani	+	+
	Salkowski	+	+
Flavonoides	Liebermann-Burchard	+	+
	Ensayo de Shinoda	+	+
Taninos	Cloruro férrico	+	+
	Solución de gelatina	+	+
	Solución gelatina sal	+	+
Triterpenos y Esteroides	Liebermann- Burchard	+	+
	Salkowski	+	+
Cumarinas volátiles	Papel impregnado con NaOH (observación UV)	+	+
Saponinas	Formación de espuma	+	+
Carotenos	Carr-Price	+	+
Quinonas	Test Bornträger	+	+

7.2.1 Alcaloides

Para la identificación de alcaloides se adicionaron gotas de los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner a filtrados del extracto acuoso previamente acidulado con HCl los cuales produjeron con las sales de estos compuestos, precipitados de color naranja, crema y café respectivamente, siendo estas pruebas positivas para este tipo de metabolitos. Para el EET obtenido por soxhlet se observó una mayor cantidad de precipitado en comparación con el EET por percolación existiendo posiblemente una mayor concentración de alcaloides en dicho extracto.

7.2.2 Cardiotónicos

Estos metabolitos se evidenciaron en los extractos etanólicos ya que estos dieron una coloración naranja con el reactivo de Baljet, y una coloración rojiza con reactivo de Kedde. Con el reactivo de Keller-Kiliani se logró determinar que estos

cardenólidos posiblemente se encuentran ligados glúcidos como D-glucosa, L-Ramnosa y desoxiazúcares.⁵¹ además se pudo identificar el núcleo esteroidal característico en estas estructuras presentando una coloración verde con el reactivo de Liebermann- Burchard y rojo con reactivo de Salkowski.

7.2.3 Flavonoides

En la reacción de Shinoda, al adicionar a los extractos etanólicos magnesio metálico y ácido clorhídrico concentrado se observó una coloración rojiza debido a la formación de complejos entre los flavonoides y el cloruro de magnesio. Para el EET obtenido por soxhlet se observó una mayor coloración en comparación con el EET por percolación extendiendo posiblemente una mayor concentración de flavonoides en dicho extracto. La importancia de estos metabolitos se debe a que presentan un amplio rango de actividad biológica como antiinflamatorios, antioxidantes, antibacterial⁵². En el género *Zephyranthes* se ha reportado la presencia de estos metabolitos como en el estudio de Zhan et al¹⁸ que identificó flavonoides en hojas de *Z. candida* los cuales mostraron un alto potencial antiinflamatorio, por lo anterior hace el género *Zephyranthes* sea de gran interés debido a la diversidad de metabolitos que presenta.

7.2.4 Taninos

Cuando se adicionó unas gotas de tricloruro férrico al 10% al filtrado del extracto acuoso se observó una coloración rojiza característica del complejo tanino-hierro. Además con las soluciones: gelatina y gelatina sal se observó una leve turbidez, siendo estos ensayos positivos para estos compuestos.

7.2.5 Triterpenos y esteroides

Para la identificación de triterpenos y esteroides se utilizaron los reactivos Liebermann- Burchard y Salkowski, los cuales dieron una coloración verde con el reactivo de Liebermann-Burchard y rojo con el reactivo de Salkowski. Existen investigaciones donde reportan la presencia de estos metabolitos en la familia Amaryllidaceae⁵³.

7.2.6 Cumarinas volátiles

Después calentar los extractos etanólicos junto con papel impregnado con NaOH y revelarse con la lámpara Uv se observaron unas manchas de color verde lo cual se evidencia la presencia de estos metabolitos en los extractos.

7.2.7 Saponinas

Cuando se agregó agua caliente en los extractos etanólicos y se agitó vigorosamente se observó la formación de espuma la cual permaneció durante 5 min siendo este ensayo positivo para la presencia estas estructuras.

7.2.8 Carotenos y quinonas

Cuando se adiciono unas gotas del reactivo de Carr-Price a los extractos etanólicos, se observó una coloración azul verdoso siendo este ensayo positivo para estos metabolitos. Y finalmente para quinonas cuando se adiciono NaOH a filtrados clorofórmicos de la muestra se observó una coloración rojiza siendo este ensayo positivo para este tipo de moléculas.

7.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH, ABTS y RANCIMAT y el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en las hojas de *Z. carinata*.

Tabla 10. Resultados de la actividad antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides totales en extractos etanólicos y subfracciones de hojas de *Z. carinata*.

Muestras	Fenoles totales ^a	Flavonoides totales ^b	Actividad captadora DPPH ^c	Actividad captadora ABTS ^d	Actividad protectora Racimat ^e
ETT _s	39,30 ± 0,16	29,17 ± 1,67	619,51 ± 3,05	845,15 ± 5,08	1,11 ± 0,00
Hex _s	32,25 ± 0,70	19,17 ± 1,67	448,71 ± 3,42	865,73 ± 4,80	1,08 ± 0,01
AcOEt _s	59,15 ± 0,79	45,83 ± 1,67	545,90 ± 4,82	774,59 ± 3,92	1,04 ± 0,00
BuOH _s	67,49 ± 0,14	56,94 ± 0,96	482,37 ± 4,09	578,95 ± 3,03	1,01 ± 0,00
Ac _s	28,06 ± 0,57	10,28 ± 1,92	1519,11 ± 9,61	1811,86 ± 10,47	1,01 ± 0,00
ETT _p	33,72 ± 0,16	19,17 ± 1,67	661,29 ± 4,57	914,87 ± 8,91	1,09 ± 0,00
Hex _p	29,68 ± 0,92	15,28 ± 0,96	496,07 ± 4,73	943,71 ± 7,53	1,06 ± 0,00
AcOEt _p	40,96 ± 0,22	34,72 ± 0,96	625,24 ± 2,36	823,72 ± 9,13	1,03 ± 0,00
BuOH _p	51,34 ± 0,39	47,50 ± 1,67	570,85 ± 2,12	679,18 ± 7,15	1,01 ± 0,01
Ac _p	25,06 ± 0,62	6,39 ± 0,96	1612,44 ± 11,81	1907,31 ± 10,91	1,00 ± 0,00
BHT	-	-	16,45 ± 0,61	50,18 ± 0,31	1,19 ± 0,01
AA	-	-	5,11 ± 0,15	52,91 ± 0,48	-
α-T	-	-	14,83 ± 0,19	121,97 ± 0,21	-

Los resultados presentados se expresan como la media de tres determinaciones ± SD. Las muestras que contienen los subíndices con las letras s y p representan las muestras obtenidas con el método soxhlet y percolación respectivamente.

^a Valor expresado en mg ácido gálico/g muestra

^b Valor expresado en mg de quercetina/g muestra

^c Valor expresado en concentración inhibitoria media CI₅₀ µg/mL

^d Valor expresado en concentración inhibitoria media CI₅₀ µg/mL

^e Valor expresado en factor de protección del aceite FP TI_c/TI_s (no tiene unidades).

7.3.1 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH

En la tabla 10 se presentan los valores de la CI_{50} para los extractos y subfracciones evaluados utilizando el ensayo de decoloración del radical DPPH. Para el extracto etanólico y las subfracciones obtenidas por el método soxhlet se encontró que la subfracción de Hex presenta la mayor actividad antioxidante ($CI_{50} = 448,71 \pm 3,42 \mu\text{g/mL}$) y la de menor actividad antioxidante la mostró la subfracción Ac ($CI_{50} = 1519,11 \pm 9,61 \mu\text{g/mL}$). El orden de actividad antioxidante entre las muestras obtenidas por este método fue: Hex > BuOH > AcOEt > EET > AC. Además se encontró que los valores de la CI_{50} en el extracto y subfracciones difieren significativamente $p < 0,05$. Esta diferencia podría ser debido a la polaridad de solventes empleados en el fraccionamiento líquido-líquido ya que estos arrastran metabolitos afines con la polaridad que presente.

Para el extracto etanólico y subfracciones obtenidas por el método de percolación la mayor actividad antioxidante se encontró en la subfracción de Hex ($CI_{50} = 496,07 \pm 4,73 \mu\text{g/mL}$) y la de menor actividad antioxidante la presentó la subfracción Ac ($CI_{50} = 1612,44 \pm 11,81 \mu\text{g/mL}$), el orden de las muestras de mayor a menor actividad antioxidante siguió la misma tendencia a los reportados por el método soxhlet. Además se encontró que los valores de la CI_{50} en el extracto y subfracciones difieren significativamente $p < 0,05$.

Los valores de actividad antioxidante anormalmente altos obtenidos en las subfracciones apolares de Hex se pueden explicar de acuerdo a la cinética de reacción con el DPPH, la figura 13 muestra la cinética de reacción de las subfracciones de Hex y BuOH obtenidas por el método Soxhlet. Se puede observar que la capacidad atrapadora de radicales DPPH por la subfracción de Hex a los 15 minutos de reacción es más rápida que la subfracción de BuOH, esto podría ser debido a ciertos metabolitos solubles en hexano como triterpenos, carotenos, tocoferoles, los cuales presentan actividad antioxidante debido a la naturaleza química del enlace $\pi-\pi$ ⁵⁴, los cuales utilizarían como mecanismo de capacidad antioxidante la transferencia de electrones siendo está más rápida en comparación con el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno. También se observa que a los 26 minutos de reacción con el DPPH esta subfracción llega a un estado estacionario donde la absorbancia se mantiene casi constante. El mismo efecto cinético se observó con las subfracciones de Hex y BuOH obtenidas por percolación (Anexo 3).

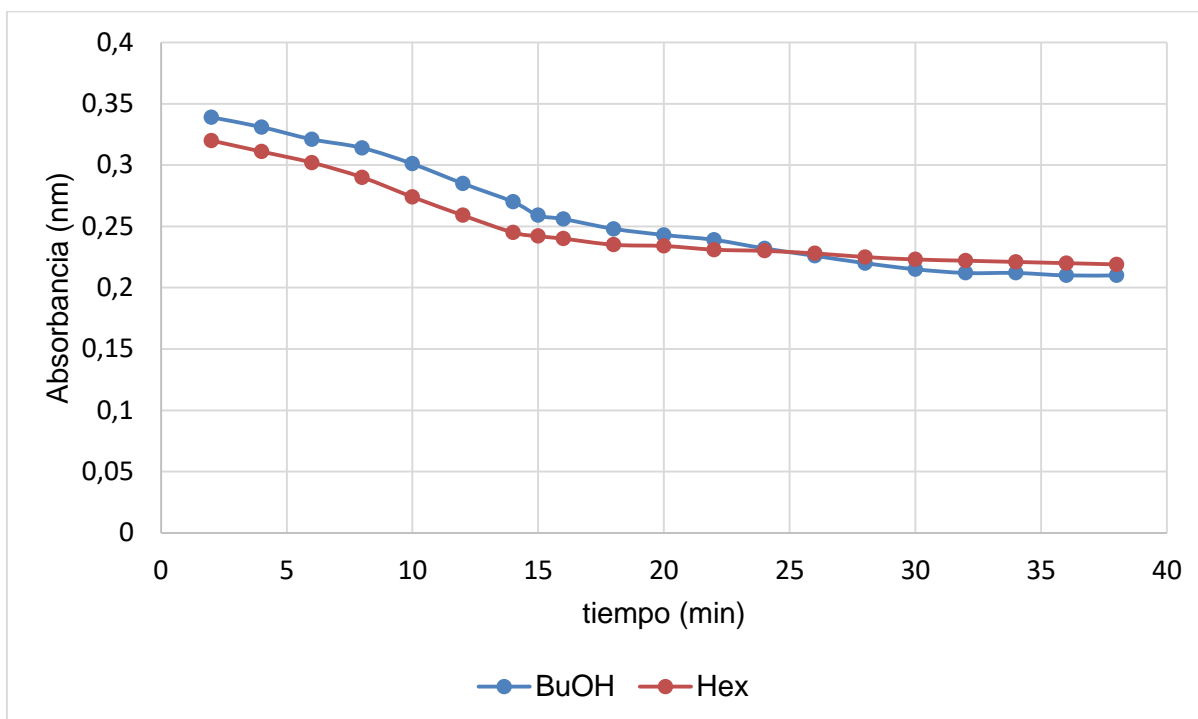


Figura 13. Cinética de la reacción del DPPH y las subfracciones de BuOH y Hex obtenidas por Soxhlet.

Con la subfracción de BuOH se observa una disminución de la absorbancia a medida que aumenta el tiempo de reacción, de tal manera que a partir de los 28 minutos la captación de radicales DPPH \cdot es mayor que en la subfracción de Hex. Este comportamiento cinético podría explicarse debido al tipo de metabolito presente en cada una de las subfracciones. Debido a que en la subfracción de BuOH presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides (ver tabla 10) estos utilizarían como mecanismo de capacidad antioxidante la transferencia de átomos de hidrógeno cuya reacción es lenta debido a que el metanol utilizado para disolver el DPPH \cdot forma enlaces de hidrógeno fuertes con las moléculas fenólicas, interfiriendo así en la liberación de los átomos de hidrógeno⁵⁵. Este mismo comportamiento se observó en el estudio de Saeedi y Hossain⁵⁶ quienes evaluaron la actividad antioxidante en semillas de *Cajanus cajana* presentando la subfracción de hexano la mayor captación de radicales DPPH que la subfracción de butanol, atribuyéndole este efecto al tipo de metabolitos presentes en cada muestra.

Al comparar la actividad antioxidante de los extractos y subfracciones obtenidos por los dos métodos de extracción se encontró que los valores de actividad antioxidante obtenidos por el método soxhlet fueron significativamente mayores que los valores obtenidos por el método de percolación. Esto posiblemente se deba al efecto de la

temperatura utilizada en el método soxhlet la cual ayudaría a una mayor penetración del solvente en el material vegetal, liberando así una mayor concentración de metabolitos.

Respecto a los patrones el ácido ascórbico presentó la mayor actividad antioxidante $CI_{50}=5,11 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$. La alta actividad de esta molécula según Brand-Williams³² es debido a la capacidad de donar dos de sus protones para neutralizar dos moléculas de DPPH, siguiendo una cinética muy rápida. En segundo lugar se encontró el α -T $CI_{50}=14,83 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ un antioxidante lipofílico que según Wageeh et al.⁵⁷ puede donar uno o dos protones, pero el comportamiento cinético es lento en comparación con el AA. Y por último se encontró el BHT $CI_{50}=16,45 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$ ya que esta molécula presenta dos sustituyentes terc-butilo lo que genera un impedimento estérico con los antioxidantes⁵⁷.

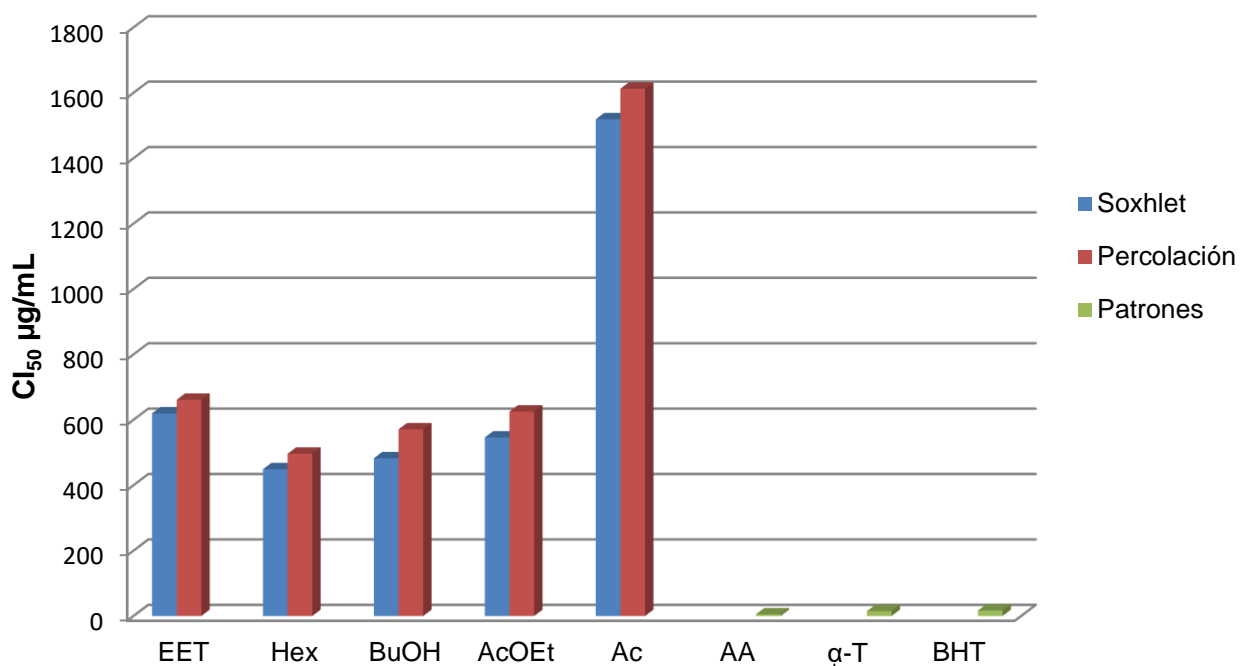


Figura 14. Comparación de la CI_{50} en extractos y subfracciones de hojas de *Z. carinata* obtenidos por el método DPPH

7.3.2 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método ABTS

En la tabla 10 se observa la CI_{50} de los extractos etanólicos y las subfracciones obtenidos por los métodos de extracción soxhlet y percolación, evaluados con el ensayo del catión radical $ABTS^{*+}$. Como se calculó anteriormente para el método del DPPH, la CI_{50} se determinó con la ecuación de la recta, graficando la

concentración Vs el porcentaje de inhibición de los extractos y subfracciones de *Z. carinata*. Para el extracto etanólico total y las subfracciones obtenidas por el método soxhlet, se encontró que la subfracción de BuOH presenta la mayor actividad antioxidante ($CI_{50}=578,95 \pm 3,03 \mu\text{g/mL}$) y la de menor actividad antioxidante la presentó la subfracción Ac ($CI_{50}=1811,86 \pm 10,47 \mu\text{g/mL}$). El orden de actividad antioxidante entre las muestras obtenidas por este método fue: BuOH > AcOEt > EET > Hex > Ac, indicando que los compuestos responsables de dicha actividad son polares a medianamente polares, a excepción de la fracción Ac. El análisis de varianza realizado permitió establecer que existen diferencias significativas ($p<0,05$) entre los resultados de la CI_{50} de las muestras obtenidas por este método.

Para el extracto etanólico y subfracciones obtenidas por el método de percolación la actividad antioxidante más alta se obtuvo en la subfracción de BuOH ($CI_{50}=679,18 \pm 7,15 \mu\text{g/mL}$) y la de menor actividad antioxidante la presentó la subfracción Ac ($CI_{50}=1907,31 \pm 10,91 \mu\text{g/mL}$), el orden de mayor a menor actividad antioxidante siguió la misma tendencia a los reportados por el método soxhlet. Además se encontró que los valores de la CI_{50} en el extracto y subfracciones difieren significativamente ($p<0,05$).

La subfracción de BuOH obtenida por ambos métodos de extracción fue la que presentó la mayor capacidad atrapadora de radicales $ABTS^{\bullet+}$ esto podría estar asociado a compuestos fenólicos como los flavonoides los cuales presentan una alta captación de radicales libres.

Al comparar la actividad antioxidante evaluada por el ensayo de decoloración de catión radical $ABTS^{\bullet+}$ en los extractos y subfracciones obtenidos por los dos métodos de extracción, se encontró que los valores de actividad antioxidante obtenidos por el método soxhlet fueron significativamente mayores que los valores obtenidos por el método de percolación. Respecto a los patrones utilizados como referencia BHT, α -T y AA mostraron valores de CI_{50} de $50,18 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$, $121,97 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$, y $52,91 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ respectivamente siendo el BHT el que presenta la mayor actividad antioxidante.

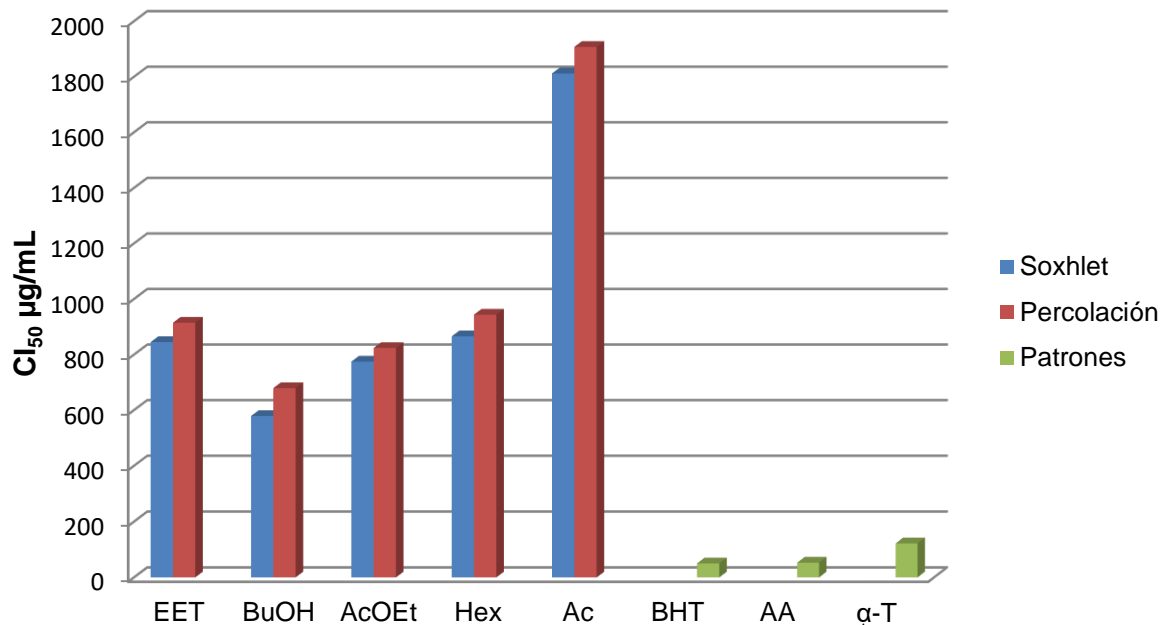


Figura 15. Comparación de la CI_{50} en extractos y subfracciones de hojas de *Z. carinata* obtenidos por el método ABTS⁺

7.3.3 Determinación de la actividad antioxidante mediante el método Rancimat

En la tabla 10 se muestran los factores de protección de los extractos y subfracciones, obtenidos mediante el método Rancimat (flujo de aire 20 L/h, y temperatura 110 °C). Para el EET y subfracciones obtenidas por el método soxhlet se encontró que el EET presentó el mayor factor de protección ($FP = 1,11 \pm 0,00$) y las subfracciones de BuOH ($FP = 1,01 \pm 0,00$) y Ac ($FP = 1,01 \pm 0,00$) el menor factor de protección. El orden de mayor a menor actividad protectora fue: EET > Hex > AcOEt > BuOH = Ac. El análisis estadístico mostró el factor de protección del EET es significativamente mayor al de las demás subfracciones, la subfracción de BuOH y Ac no difieren significativamente.

Para el EET y subfracciones obtenidas por el método de percolación al igual que con el método soxhlet el EET fue el que presentó el mayor factor de protección ($FP = 1,09 \pm 0,00$) y la de menor actividad protectora se obtuvo en las subfracciones de BuOH ($FP = 1,01 \pm 0,01$) y Ac ($FP = 1,00 \pm 0,00$). El orden de mayor a menor actividad protectora siguió la misma tendencia que los reportados por el método soxhlet.

Los extractos etanólicos totales por los dos métodos de extracción fueron los que presentaron la mayor actividad protectora, debido a que estos extractos están constituidos por metabolitos de naturaleza polar y apolar los cuales ayudarían a

proteger a la muestra de la oxidación debido las condiciones drásticas a las que es sometida. La menor actividad protectora en las subfracciones de BuOH y AcOEt, posiblemente se debe a efectos de solubilidad ya que en estas subfracciones es probable que estén presentes metabolitos polares como compuestos fenólicos los cuales son insolubles en la muestra de aceite.

Al comparar los factores de protección de los extractos y subfracciones obtenidos por los dos métodos de extracción se encontró que los factores de protección en el EET, la subfracción de AcOEt, Hex, y Ac obtenidos por soxhlet son significativamente mayores que los factores de protección obtenidos por el método de percolación. El factor de protección de la subfracción de BuOH por los dos métodos de extracción no difiere significativamente.

Respecto al BHT utilizado como patrón de referencia obtuvo un factor de protección de $1,19 \pm 0,01$ siendo este valor 0,08 veces mayor que el del EET obtenido por soxhlet y 0,1 veces mayor que el del EET obtenido por percolación, esta pequeña diferencia hace que los extractos etanólicos de hojas de *Z. carinata* muestren efectos protectores contra la oxidación de lípidos debido a la diversidad de metabolitos presentes en los extractos etanólicos totales.

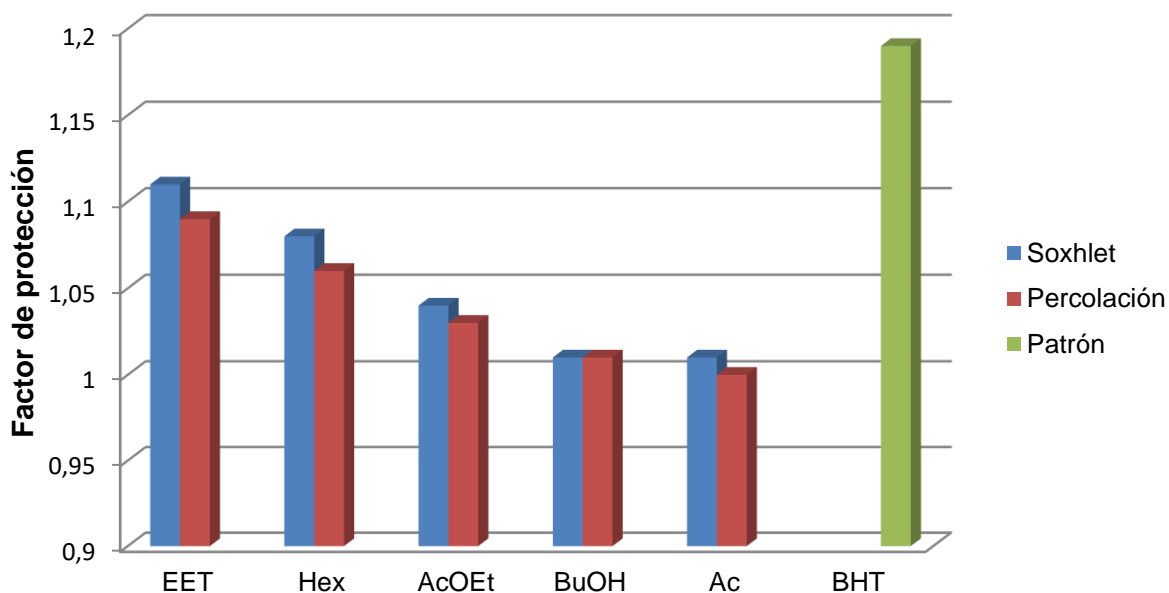


Figura 16. Comparación de los factores de protección en extractos y subfracciones de hojas de *Z. carinata* obtenidos por el método Rancimat.

7.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

7.5.1 Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

En la tabla 10 se muestra el contenido de fenoles totales en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/g ms) para cada uno de los extractos y subfracciones de *Z. carinata*. Para el EET y subfracciones obtenidas por el método soxhlet se encontró que la subfracción de BuOH presenta el mayor contenido de compuestos fenólicos ($67,49 \pm 0,14$ EAG/g ms) y el que presentó el menor contenido fue la subfracción de Ac ($28,06 \pm 0,57$ EAG/g ms) el orden de mayor a menor contenido de compuestos fenólicos fue: BuOH > AcOEt > EET > Hex > Ac.

El análisis de varianza realizado permitió establecer que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el contenido de fenoles totales entre las subfracciones estudiadas y que estas presentan una buena correlación ($R^2=0,856$) con la actividad antioxidante obtenido con el método ABTS^{•+} indicando que el 85,60% de la actividad captadora de radicales evaluada en las subfracciones es debida a la presencia de compuestos fenólicos. Sin embargo, no se puede considerar que la actividad antioxidante se deba solo a la presencia de compuestos fenólicos, puesto que en su composición química pueden existir otros metabolitos secundarios que debido a su estructura contribuyan a su eficacia antioxidante como el ácido ascórbico, algunos azúcares y aminoácidos.

Para el EET y subfracciones obtenidas por el método de percolación al igual que con el método soxhlet la subfracción de BuOH fue la que presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos ($51,34 \pm 0,39$ mg EAG/g ms) y la subfracción Ac un menor contenido ($25,06 \pm 0,62$ mg EAG/g ms) siguiendo la misma tendencia que los reportados por el método soxhlet. Además se encontró que estas muestras difieren significativamente ($P < 0,05$) y que presentan una buena correlación ($R^2 = 0,900$) entre la actividad antioxidante obtenido con el método ABTS^{•+} indicando que el 90,10% de la actividad captadora de radicales evaluada en subfracciones de hojas de *Z. carinata* es debida a la presencia de compuestos fenólicos.

Al comparar el contenido de fenoles totales en los extractos etanólicos y subfracciones obtenidos por los dos métodos de extracción se encontró que el contenido de fenoles totales obtenidos por el método Soxhlet fueron significativamente mayores que los valores obtenidos por el método de percolación. Estas diferencias podrían ser debido al efecto de la temperatura utilizada en el método soxhlet la cual ayudaría a debilitar las interacciones fenol-proteína y fenol-

polisacárido en el material vegetal, generando mayor transferencia de estos metabolitos al disolvente.

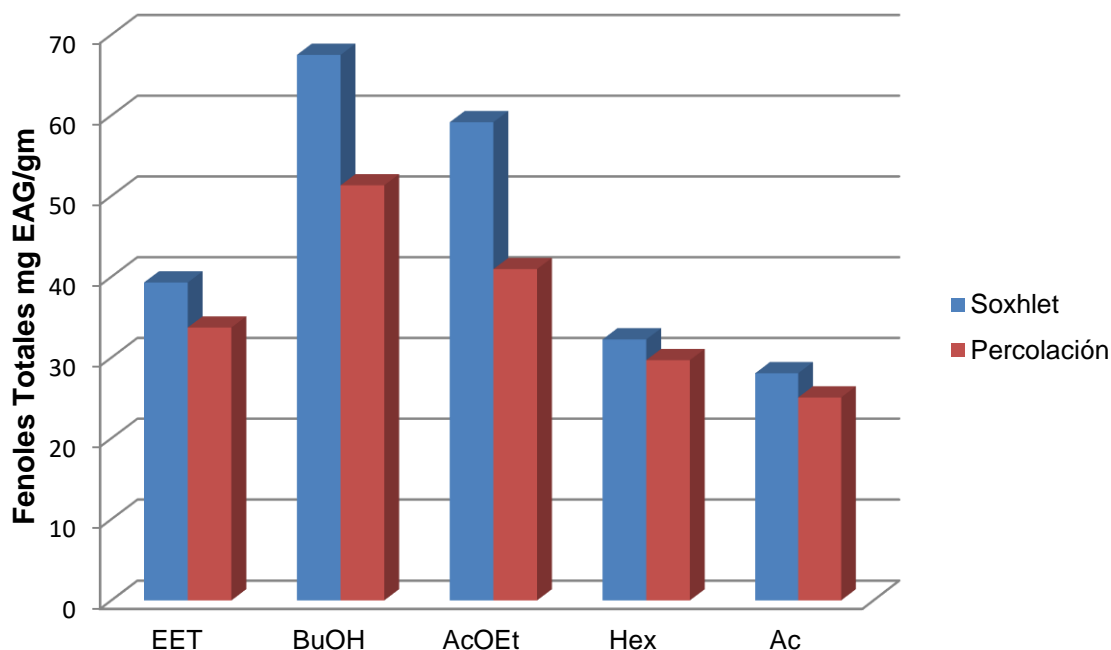


Figura 17. Comparación del contenido de fenoles en extractos y subfracciones de hojas de *Z. carinata*.

7.5.2 Contenido de flavonoides totales por el método tricloruro de aluminio

En el género *Zephyranthes* se han identificado flavonoides tales como: (2S)-7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavan, (2S)-7,4'-dihidroxi-3'-metoxiflavan, (2R,3R)-7-metoxiflavan-3-ol, los cuales presentaron actividad antiinflamatoria^{18 20}. Por lo anterior se decidió cuantificar el contenido de estos metabolitos en los extractos etanólicos y en subfracciones de hojas de *Z. carinata* para determinar si la actividad antioxidante estaba directamente relacionada con el contenido de estas moléculas.

En la tabla 10 se muestra el contenido de flavonoides en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra seca (mg EQ/g ms) para cada uno de los extractos y subfracciones de *Z. carinata*. Para el EET y subfracciones obtenidas por el método soxhlet se puede observar que la subfracción de BuOH presenta el mayor contenido de flavonoides totales ($56,94 \pm 0,96$ mg EQ / g ms) y la subfracción acuosa el de menor contenido ($10,28 \pm 1,96$ mg EQ / g ms). el orden de mayor a menor contenido de flavonoides fue: BuOH > AcOEt > EET > Hex > Ac. El análisis de varianza realizado permitió establecer que existen diferencias significativas ($p \leq$

0.05) en el contenido de flavonoides totales entre las subfracciones estudiadas y que estas presentan una buena correlación ($R^2=0,908$) entre la actividad antioxidante obtenido con el método ABTS^{•+} indicando que el 90,80% de la actividad captadora de radicales evaluada en las subfracciones es debida a la presencia de estos metabolitos.

Para el EET y subfracciones obtenidas con el método de percolación se encontró un mayor contenido de flavonoides en la subfracción de BuOH ($47,50 \pm 1,67$ mg EQ/g ms) y un menor contenido de flavonoides en la subfracción Ac ($6,39 \pm 0,96$ mg EQ/g ms), siguiendo la misma tendencia a los reportados por el método soxhlet. El análisis de varianza realizado permitió establecer que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de flavonoides totales entre las subfracciones estudiadas y que estas presentan una buena correlación ($R^2 = 0,905$) entre la actividad antioxidante obtenido con el método ABTS^{•+} indicando que el 90,50% de la actividad captadora de radicales evaluada en las subfracciones es debida a la presencia de estos metabolitos. Al comparar el contenido de flavonoides en los extractos etanólicos y subfracciones obtenidos por los dos métodos de extracción se encontró que el contenido de flavonoides obtenidos por el método Soxhlet fueron significativamente mayores que los valores obtenidos por el método de percolación, siendo la temperatura un factor importante en la extracción de estas estructuras.

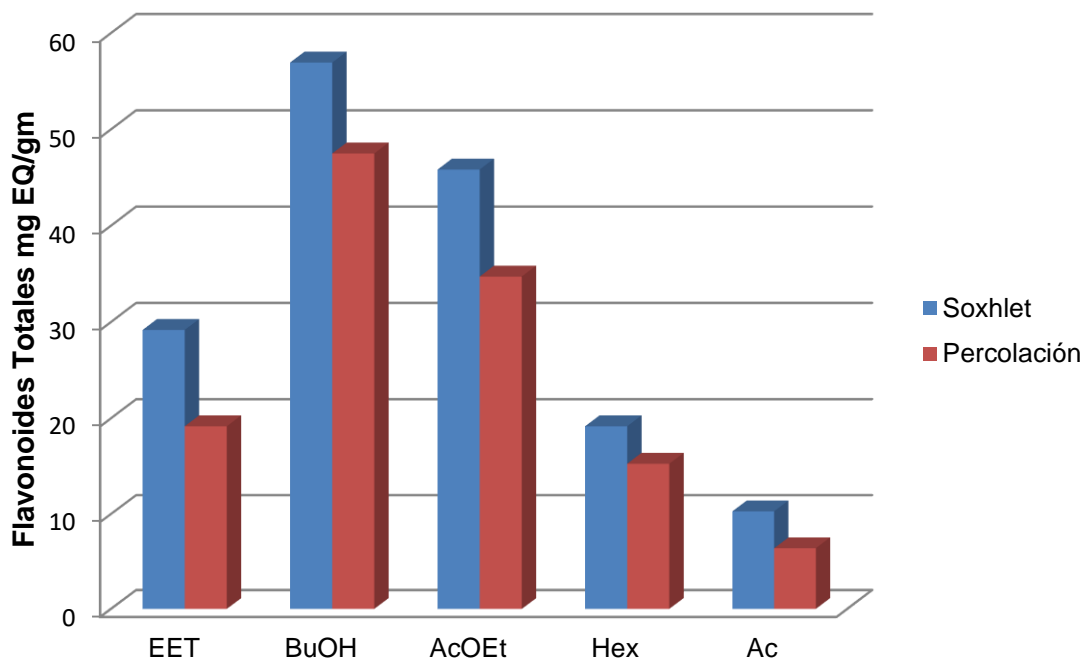


Figura 18. Comparación del contenido de flavonoides totales en extractos y subfracciones de hojas de *Z. carinata*

7.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

7.6.1 Determinación de la actividad citotóxica mediante el bioensayo con *Artemia franciscana*

En la tabla 11 se muestra la cocentración letal media CL₅₀ de los extractos etanolicos totales, subfracciones y fracción de alcaloides mediante el bioensayo frente a *A. franciscana* evaluados a las 6 y 24 horas de exposición.

Tabla 11. Resultados de la actividad citotóxica obtenidos mediante el bioensayo frente a *A. franciscana*.

Muestras	Actividad citotóxica ^a	
	6 horas	24 horas
EET _s	328,61 ± 1,04	188,80 ± 1,25
Hex _s	569,22 ± 3,45	255,24 ± 4,23
AcOEt _s	814,67 ± 5,56	635,15 ± 3,45
BuOH _s	>1500	850,89 ± 5,15
Ac _s	>1500	>1500
FA _s	130,83 ± 5,22	83,22 ± 4,14
EET _p	490,54 ± 1,62	197,37 ± 4,91
Hex _p	658,56 ± 4,45	333,67 ± 4,56
AcOEt _p	893,23 ± 3,18	696,89 ± 5,23
BuOH _p	>1500	998,90 ± 6,12
Ac _p	>1500	>1500
FA _p	138,20 ± 3,59	88,19 ± 2,92
K ₂ Cr ₂ O ₇	83,75 ± 6,77	15,52 ± 5,63

Los resultados presentados se expresan como la media de tres determinaciones ± SD. Las muestras que contienen los subíndices con las letras s y p representan las muestras obtenidas con el método soxhlet y percolación respectivamente.

^a Valor expresado en concentración letal media CL₅₀ µg/mL

7.6.2 Concentración letal media CL_{50} a las 6 horas de exposición

Las muestras evaluadas en este ensayo se clasificaron según su toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones del programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)⁵⁸. Para el EET y subfracciones obtenidos por el método soxhlet se encontró que el EET tuvo la mayor actividad citotóxica ($CL_{50}=328,61 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$) clasificándose como moderadamente tóxico. Se encontró que uno de los principales metabolitos causantes de dicha citotoxicidad fueron los alcaloides los cuales resultaron siendo 2,51 veces más citotóxicos que el EET. Respecto a las subfracciones se encontró que la de Hex y AcOEt fueron ligeramente tóxicos y la de BuOH y Ac se consideraron relativamente inocuos. El análisis de varianza realizado permitió establecer que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con la CL_{50} entre las muestras estudiadas.

Para el EET y subfracciones obtenidos por el método de percolación se encontró que el EET al igual que el método soxhlet presentó la mayor actividad citotóxica ($CL_{50}=490,54 \pm 1,62 \mu\text{g/mL}$) clasificándose como moderadamente tóxico. Los alcaloides obtenidos por este método resultaron siendo 3,55 veces más citotóxicos que el EET, siendo estos uno de los principales causantes de dicha citotoxicidad. Respecto a las subfracciones se encontró que la de Hex y AcOEt fueron ligeramente tóxicos, y la de BuOH y Ac se consideraron relativamente inocuos. La CL_{50} del EET y subfracciones presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Al comparar la CL_{50} de los extractos etanólicos y subfracciones obtenidos por los dos métodos de extracción se encontró que los valores de citotoxicidad obtenidos por el método Soxhlet fueron significativamente mayores que los valores obtenidos por el método de percolación. Esto posiblemente se deba a la temperatura utilizada en la obtención de los extractos etanólicos, lo cual ayudaría a una mayor extracción de metabolitos como los alcaloides. La CL_{50} de la fracción de alcaloides obtenidos por los dos métodos de extracción no presentaron diferencias significativas. Respecto al dicromato de potasio utilizado como control positivo presentó una alta actividad citotóxica ($CL_{50}=83,75 \pm 6,77 \mu\text{g/mL}$) clasificándose como altamente tóxico.

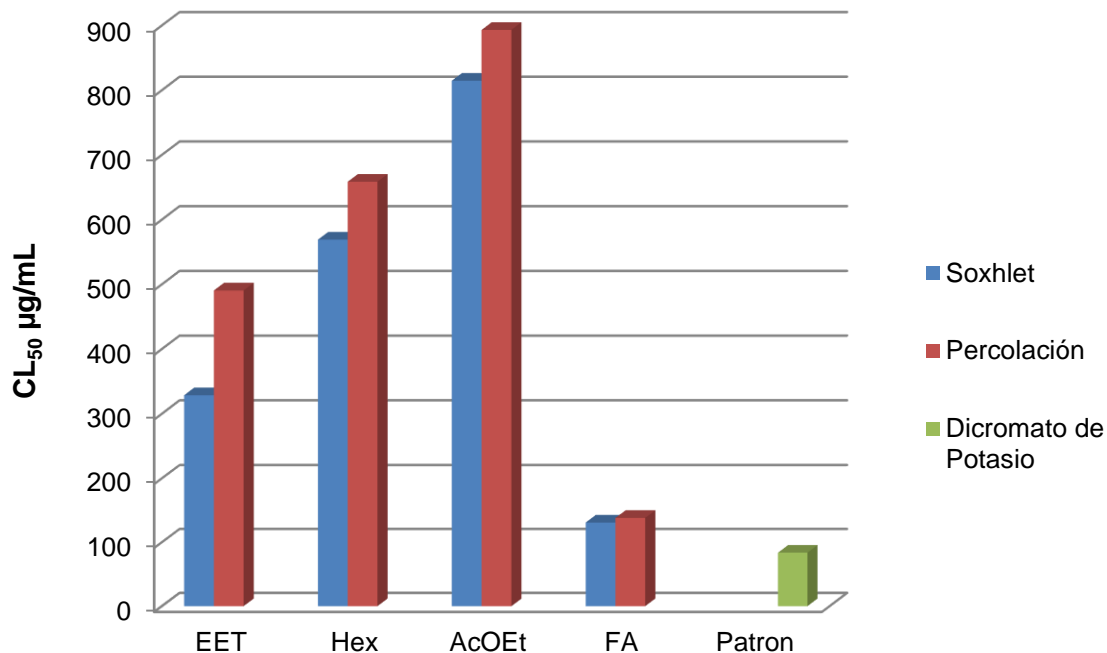


Figura 19. Comparación de la CL₅₀ de los extractos y subfracciones a las 6 horas de exposición.

7.6.3 Concentración letal media CL₅₀ a las 24 horas de exposición

A las 24 horas de exposición se puede observar que en todas las muestras analizadas la CL₅₀ disminuye, presentándose por lo tanto una mayor actividad citotóxica. El EET obtenido por el método soxhlet se clasificó como moderadamente tóxico (CL₅₀= 188,80 ± 1,25 µg/mL) y los alcaloides obtenidos en este extracto presentaron una CL₅₀= 83,22 ± 4,14 µg/mL clasificándose como altamente tóxicos. Respecto a las subfracciones se encontró que la de Hex fue moderadamente toxica, y las subfracciones de AcOEt y BuOH se clasificaron como ligeramente toxicas. La subfracción Ac fue relativamente inocua. La CL₅₀ del EET y subfracciones obtenidas por este método presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

El EET obtenido por el método de percolación se clasificó como moderadamente tóxico (CL₅₀=197,37 ± 4,91 µg/mL), los alcaloides obtenidos en este extracto presentaron una CL₅₀=88,19 ± 2,92 µg/mL clasificándose como altamente tóxicos. Respecto a las subfracciones se encontró que la de Hex fue moderadamente tóxica, y las subfracciones de AcOEt y BuOH se clasificaron como ligeramente tóxicas. La subfracción Ac fue relativamente inocua. La CL₅₀ del EET y subfracciones obtenidas por este método presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Al comparar la CL₅₀ de los extractos etanólicos y subfracciones obtenidos por los dos métodos de extracción se encontró que los valores de citotoxicidad obtenidos por el método Soxhlet fueron significativamente mayores que los valores obtenidos por el método de percolación, esto posiblemente se deba a la temperatura utilizada en la obtención de los extractos etanólicos lo cual ayudaría a una mayor extracción de metabolitos como los alcaloides. La CL₅₀ de la fracción de alcaloides obtenidos por los dos métodos de extracción no presentaron diferencias significativas. Respecto al dicromato de potasio utilizado como control positivo presentó una CL₅₀=15,52 ± 5,63 µg/mL clasificándose igualmente que a las 6 horas como altamente tóxico.

La importancia de la alta citotoxicidad de los extractos etanólicos y de la fracción de alcaloides obtenida por los dos métodos de extracción se debe a que pueden ser utilizados para diferentes actividades biológicas como: anticancerígenos, antifúngicos, antibacteriales, antivirales, además la obtención de estos metabolitos es de gran importancia ya que estos son muy utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer dada su actividad farmacológica como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa.

7.7 CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA

Al observar en los resultados obtenidos para actividad antioxidante y citotóxica en las muestras analizadas de hojas de *Z. carinata*, se encontró que la subfracción de BuOH obtenida por los dos métodos de extracción presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales. Además, estas subfracciones fueron las que presentaron la mayor actividad antioxidante por el método ABTS, mostrando como la captación de radicales DPPH en estas subfracciones a los 15 minutos de reacción no fue completa, debido a que a mayores tiempos de reacción continuaba captando radicales libres presentando por lo tanto una mayor actividad antioxidante en comparación con las demás subfracciones. La actividad citotóxica en estas subfracciones resultó siendo no tóxica a las 6 horas y ligeramente tóxica a las 24 horas. Indicando que los metabolitos contenidos en esta subfracción presentan baja actividad citotóxica y alta actividad antioxidante, por lo que dicha subfracción puede ser utilizada como fuente natural de antioxidantes, y como potencial antiinflamatorio debido a su contenido de flavonoides.

Los extractos etanólicos totales obtenidos por los dos métodos de extracción presentaron la mayor actividad antioxidante mediante el método Rancimat, obteniendo los mayores factores de protección del aceite de ajonjolí. La actividad citotóxica en los extractos fue moderadamente tóxica a las 6 y 24 horas. Indicando

que los metabolitos presentes en los extractos etanólicos presentan buena actividad antioxidante y buena actividad citotóxica por lo que podrían ser utilizados en la industria alimentaria o la industria farmacéutica.

La subfracciones de Hex presentaron baja actividad antioxidante y menor contenido de fenoles y flavonoides totales. La actividad citotóxica en estas muestras resultó siendo ligeramente tóxica a las 6 horas y moderadamente tóxica a las 24 horas. Indicando que los metabolitos presentes en dicha subfracción presentan baja actividad antioxidante y alta actividad citotóxica, por lo que pueden ser utilizadas como anticancerígena, antifúngica o antibacteriana.

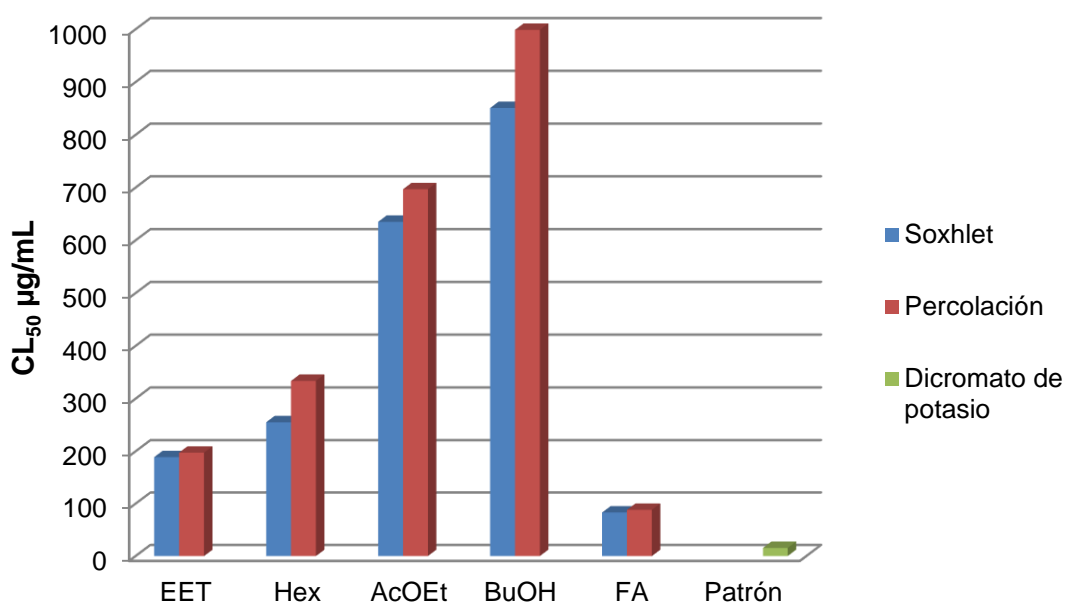


Figura 20. Comparación de la CL_{50} de los extractos etanólicos y subfracciones a las 24 horas de exposición.

8. CONCLUSIONES

8.1 Las hojas de *Z. carinata* presentan una gran variedad de metabolitos, entre los que destacan: alcaloides, cardiotónicos, taninos, flavonoides, triterpenos y esteroides, cumarinas volátiles, saponinas, carotenos y quinonas.

8.2 La actividad antioxidante mediante los ensayos colorimétricos DPPH·y ABTS⁺ obtenida en el EET y subfracciones por el método soxhlet fueron mayores en comparación con el EET y subfracciones por percolación.

8.3 El EET obtenido por soxhlet tuvo una mayor actividad protectora frente al aceite de ajonjolí en comparación con las fracciones y el EET obtenido por percolación.

8.4 Se encontró un mayor contenido de fenoles y flavonoides en el extracto etanólico y subfracciones obtenidos por el método soxhlet encontrándose la mayor concentración en la subfracción de BUOH.

8.5 La actividad citotóxica en los extractos etanólicos y subfracciones obtenidos por el método soxhlet a las 6 y 24 horas de exposición fue mayor en comparación con los extractos y subfracciones obtenidos por el método de percolación.

8.6 Los alcaloides totales obtenidos por los dos métodos de extracción presentaron una potente actividad citotóxica siendo estos metabolitos uno de los principales causantes de dicha citotoxicidad en los extractos etanólicos totales.

8.7. La subfracción de BuOH presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales, generando una mayor actividad antioxidante evaluada con los métodos DPPH Y ABTS. La actividad citotóxica de esta subfracción resultó siendo ligeramente tóxica, por lo tanto se puede utilizar como fuente natural de antioxidantes.

9. RECOMENDACIONES

9.1 Se recomienda continuar con la evaluación de la actividad antioxidante en los extractos etanólicos y subfracciones y realizar un seguimiento más amplio en el tiempo de reacción del DPPH con el objetivo de observar si estos siguen siendo más activos.

9.2 Realizar la identificación y caracterización de flavonoides de hojas de *Z. carinata* y pruebas biológicas para que sean utilizados en el campo farmacológico.

9.3 Realizar estudios de toxicidad con los alcaloides de *Z. carinata* utilizando células tumorales con el fin de aplicarlos posiblemente para el tratamiento de diferentes enfermedades como el cáncer, Así mismo se recomienda realizar ensayos de inhibición enzimática principalmente con acetilcolinesterasa y mirar su potencial para el tratamiento de la enfermedad de Alzhéimer.

9.4 Realizar la caracterización y cuantificación de los alcaloides en hojas de *Z. carinata* para así tener un conocimiento más amplio de estos metabolitos.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Dahlgren M. A Revised System of Classification of the Angiosperms. *Bot J the Linnean Soc.* 1980;80(2):91-124.
2. Stevens P. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website, 12, Julio 2012 Consultado el 16 de mayo de 2016 en <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
3. Bastida J, Berkov S, Torras L, et al. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Adv Pharm Sci.* 2011:65–100.
4. Cabezas F, Argoti J, Martínez S, Codina C, Bastida J, Viladomat F. Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis Amazonica*, *E. Grandiflora*, *Caliphruria Subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. *Sci Tech.* 2007:237-241.
5. Boulos L. *Medicinal Plants of North Africa Reference Publications.*; 1983.
6. Robineau L. *Recherche Scientifiques et Usage Populaire Des Plantes Médicinales Dans La Région Des Caraïbes.* (Enda-Caribe, ed.). Tela, Honduras.; 1989.
7. Villar L, Palacin J, Calvo C, Gomez D, Montserrat G. *Plantas Medicinales Del Pirineo Aragonés Y Demás Tierras Oscences.* Excma. Huesca, España; 1987.
8. Winter E. *Mexico's Ancient and Native Remedies.* (Fournier, ed.). México; 1972.
9. Fernandez J. A new specie of *Zephyranthes* Herb. sl (Amaryllidaceae, Hippeastreae) with notes on the genus in Colombia. *Rev Acad Colomb Cienc.* 2004;28(107):177-186.
10. Meerow A, Fay M, Guy C, Li Q, Zaman F, Chase M. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid RBCL and TML-F sequences of data. *Amer J Bot.* 1999;86:1325–1345.
11. Knight A. *A Guide to Poisonous House and Garden Plants.* En A. Knight, *A Guide to Poisonous House and Garden Plants.*; 2007.
12. Standley PC& JAS. Flora of Guatemala. In: *Fieldiana Bot.* ; 1952:103-145.
13. Kojima K, Mutsuga M, Inoue M, Ogihara Y. Two alkaloids from *Zephyranthes carinata*. *Phytochemistry.* 1998;48(7):1199-1202.
14. Zhan G, Zhou J, Liu R, et al. Galanthamine, Plicamine, and Secoplicamine Alkaloids from *Zephyranthes candida* and Their Anti-acetylcholinesterase and Anti-inflammatory Activities. *Nat Prod.* 2015;79(4):760–766.

15. Chilpa R, Berkov S, Ortega S, et al. Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from zephyranthes concolor. *Molecules*. 2011;16(11):9520-9533.
16. Aslam N, Ma S, Rehman S, Iqbal J, Mt A, Maqsood Z. Pharmacognotic Evaluation, phytochemical screening and pharmacological activities of Zephyranthes Citrina. *Biol aliend Sci*. 2016;5(8):1983-1995.
17. Luo Z, Wang F, Zhang J, et al. Cytotoxic alkaloids from the whole plants of zephyranthes candida. *J Nat Prod*. 2012;75(12):2113-2120.
18. Zhan G, Zhou J, Liu T, Zheng G, Aisa HA, Yao G. Flavans with potential anti-inflammatory activities from Zephyranthes candida. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;1:8-11.
19. Cortes N, Alvarez R, Osorio EH, Alzate F, Berkov S, Osorio E. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;102:222-228.
20. Ghosal S, Singh K, Srivastava S. Flavans from zephyranthes Flava. *Chem Pharm Umversity, Banaras Hindu*. 1985;24(I):151-153.
21. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed. (Kelvin J, Davies A, eds.). Oxford University Press.; 1989.
22. Sánchez V, Méndez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*.. 2013;20(3):161-168.
23. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. (Kelvin J, Davies A, eds.). Oxford University Press.; 2007.
24. Tsao R, Dengb Z. Separation Procedures for Naturally Occurring Antioxidant Phytochemicals. *J Chromatogr*. 2004;812:85–99.
25. Ramalho V, Jorge N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. *Quim Nov*. 2006;29:755-760.
26. Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*. 2005;140(1):47-52.
27. Doria E, Buonocore D, Focarelli A, Marzatico F. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxidative Med Cell Longevity*. 2012:13.
28. Page H, Salmon A, Leiser S, et al. Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroplast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2009;46:1109-1118.

29. Clarkson P. Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci.* 1995;35:131-141.
30. Huang D, Ou B, Prior R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chemistry.* 2005;53:1841–1856.
31. Craft B, Kerrihard A, Amarowicz R, Pegg R. Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *J Food Sci.* 2012;11(2):148-173.
32. Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci Technol.* 1995;28(1):25-30.
33. Miller N, Rice C, Davies M, Gopinathan V, Milner A. A Novel Method for Measuring antioxidant Capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993;84(4):407-412.
34. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-1237.
35. Velasco J, Andersen ML, Skibsted LH. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chem.* 2004;85(4):623-632.
36. Daniels R, Kim H, David M. Hydrogenation and interesterification effects on the oxidative stability and melting point of soybean oil. *J Agric Food Chem.* 2006;54:6011-6015.
37. Paucar LM. Estabilidad a la oxidación de grasas y aceites por el Método Rancimat. *Univ Nac del St.* 2011:1-17.
38. Villanueva E, Glorio P, Baquerizo M. Estabilidad oxidativa y estimación de la vida útil del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Sci Agropecu.* 2015;6(3):155-163.
39. Foling O, Ciocalteu V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *J Biol Chem.* 1927;73(2):627-648.
40. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chem.* 1999;64:555-559.
41. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, McLaughlin J. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Med.* 1982;45(5):31-34.
42. Leon J. *Botanica de los cultivos trópicos.* Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Agroamérica. 2000:25-27.

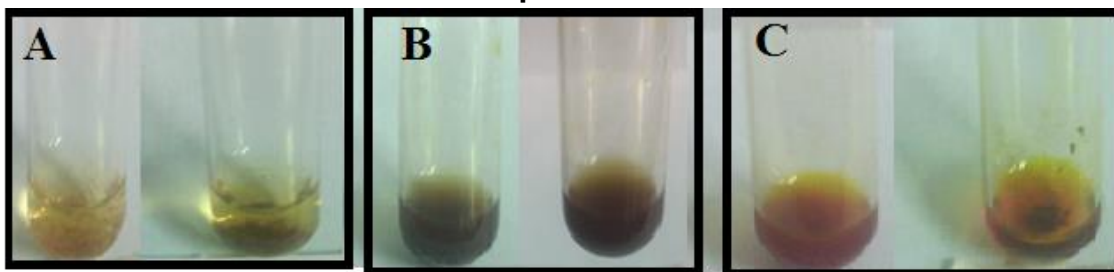
43. Pérez O, Lazo F. Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev Protección Veg.* 2010;22(1):34-43.
44. Kassem FF, Hammada AM, Motta A. Nobilisin A and B, two masanane - type alkaloids from *Clivia nobilis*. *Phytochemistry.* 1999;51:40-44.
45. Sanabria A, López S. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas.* 1997;26:15-19.
46. Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci.* 2006;79(21):2056-2068.
47. Läubli M, Bruttel P. Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the rancimat method. *J Am Oil Chem Soc.* 1986;63(6):792-795.
48. Singleton V. L JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult.* 1965;16:144-158.
49. Sharapin N. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos.* (CYTED CI, ed.). Santafé de Bogotá, DC, Colombia.; 2000.
50. Cortes N, Posada R, Alvarez R, et al. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sci.* 2015;122:42-50.
51. Martínez AM. Esteroides cardiotónicos. *Univ antioquia.* 2002;46 (3)(3):20.
52. Hossain MA, Shah MD, Gnanaraj C, Iqbal M. In vitro total phenolics , flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil , various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. *Asian Pac J Trop Med.* 2011;4(9):717-721.
53. Soto M, Leiva M. Estudio exomorfológico y fitoquímico de los bulbos de dos especies endémicas del Perú de Amaryllidaceae. *Arnaldoa.* 2015;22(1):269 – 288.
54. Liu C, Yen M, Tsang S, Gan K, Hsu H, Lin C. Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *Food Chem.* 2010;118(3):751-756.
55. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 2009;113(4):1202-1205.
56. Saeedi A, Hossain M. Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2015;5(4):316-321.

57. Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, et al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *Eur J Med Chem.* 2015;101:295-312.
58. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. 1995:61-2, 214-25.

11 ANEXOS

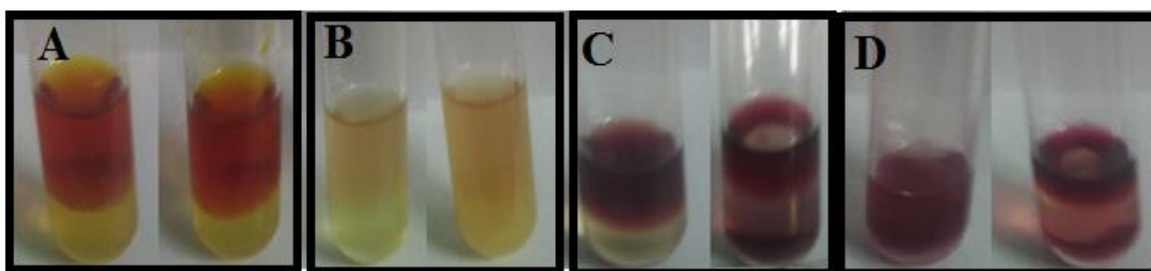
Anexo 1. Fotografías del tamizaje fitoquímico el tubo de lado izquierdo corresponde al EET por percolación y el de lado derecho pertenece al EET por soxhlet.

Pruebas para alcaloides



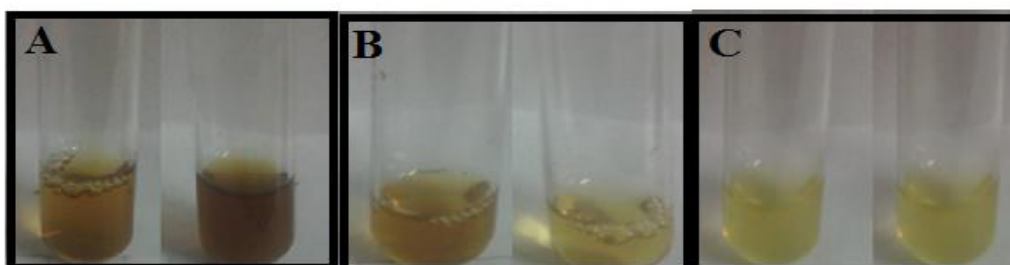
A Reactivo Wagner **B** Reactivo Mayer **C** Reactivo Dragendorff

Prueba para cardiotonicos



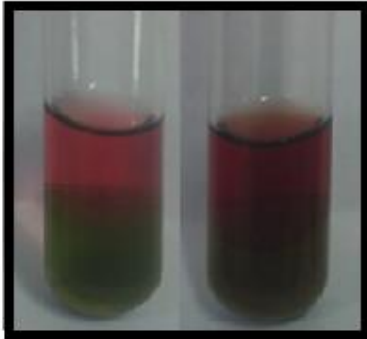
A Reactivo de Baljet **B** Reactivo de Kedde **C** Reactivo de Salkowski **D** reactivo de Keller

Prueba para taninos



A. Cloruro férrico **B.** Gelatina **C.** Gelatina-sal

Pruebas para Flavonoides



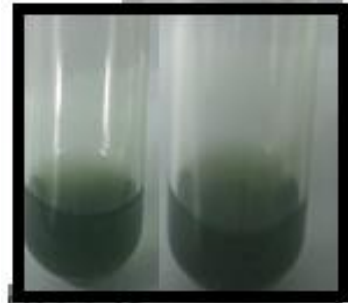
Ensayo de Shinoda

Prueba para Quinonas



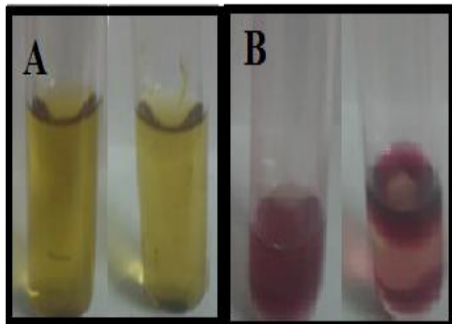
Solución de NaOH

Prueba para Carotenos



Reactivo de Carr-Price

Prueba para triterpenos y esteroides



A. Reactivo de Liebermann-Burchard

B. Reactivo de Salkowski

Prueba para saponinas



Agitación con agua caliente

Anexo 2. Actividad citotóxica

Las muestras evaluadas en este ensayo se clasificaron según su toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones del programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)

Tabla 1. Clasificación de toxicidad según CYTED

Nº	Categoría	CL₅₀ (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 toxico	1000-1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

Anexo 3. Actividad antioxidante

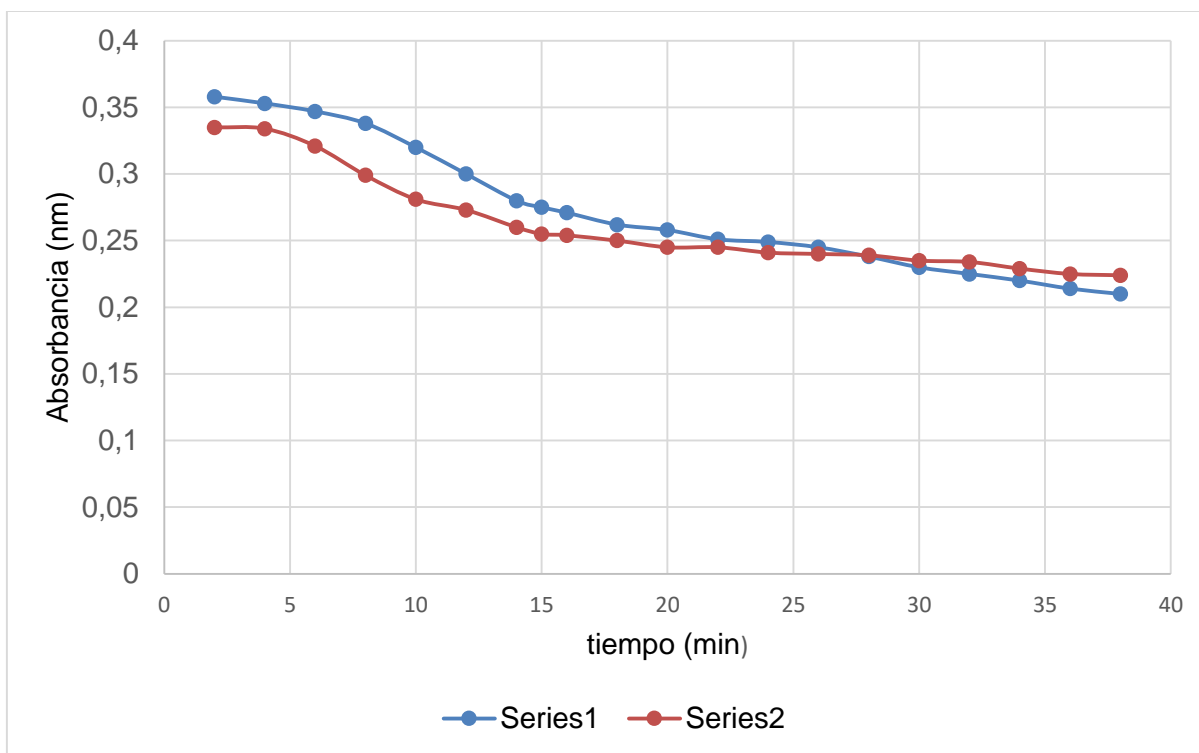


Figura 1. Reacción del DPPH y las fracciones BuOH y Hex obtenidas por percolación.

Mayor velocidad de reacción en la subfracción de Hex con el DPPH, en comparación con la subfracción de BuOH, debido a los metabolitos presentes en cada subfracción. Hex trasferece de electrones y BuOH transferece átomos de hidrógeno.

Anexo 4. Cuantificación de fenoles totales

Tabla 2. Curva de calibración de ácido gálico utilizada para la determinación de fenoles totales en los extractos etanólicos totales y subfracciones de hojas de *Z. carinata* por el método Folin-Ciocalteu

Concentración ppm	A1	A2	A3	Abs promedio	SD	%CV
75	0,506	0,505	0,497	0,503	0,005	0,98
65	0,436	0,433	0,434	0,434	0,002	0,35
55	0,389	0,394	0,391	0,391	0,003	0,64
45	0,320	0,319	0,318	0,319	0,001	0,31
35	0,232	0,234	0,236	0,234	0,002	0,85
25	0,162	0,164	0,163	0,163	0,001	0,61
15	0,086	0,087	0,088	0,087	0,001	1,15

ppm: Concentración partes por millón, **A**: Absorbancia, **Abs**: Absorbancia, **SD**: Desviación estándar, **CV**: Coeficiente de variación

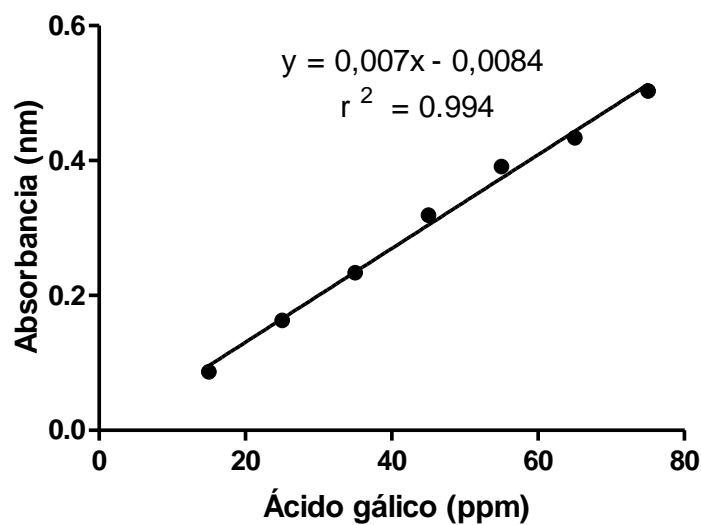


Figura 2. Curva de calibración fenoles

Anexo 5. Cuantificación de flavonoides totales

Tabla 2. Curva de calibración de quercetina utilizada para la determinación de flavonoides totales en los extractos etanólicos totales y subfracciones de hojas de *Z. carinata* por el método tricloruro de aluminio.

Concentración ppm	A1	A2	A3	Abs promedio	SD	%CV
300	0,177	0,176	0,175	0,176	0,001	0,57
240	0,131	0,130	0,131	0,131	0,001	0,44
180	0,109	0,110	0,111	0,110	0,001	0,91
120	0,071	0,072	0,070	0,071	0,001	1,41
60	0,033	0,034	0,034	0,034	0,001	1,71
30	0,020	0,019	0,021	0,020	0,001	5,00
8	0,008	0,007	0,008	0,008	0,001	7,53

ppm: Concentración partes por millón, **A:** Absorbancia, **Abs:** Absorbancia, **SD:** Desviación estándar, **CV:** Coeficiente de variación.

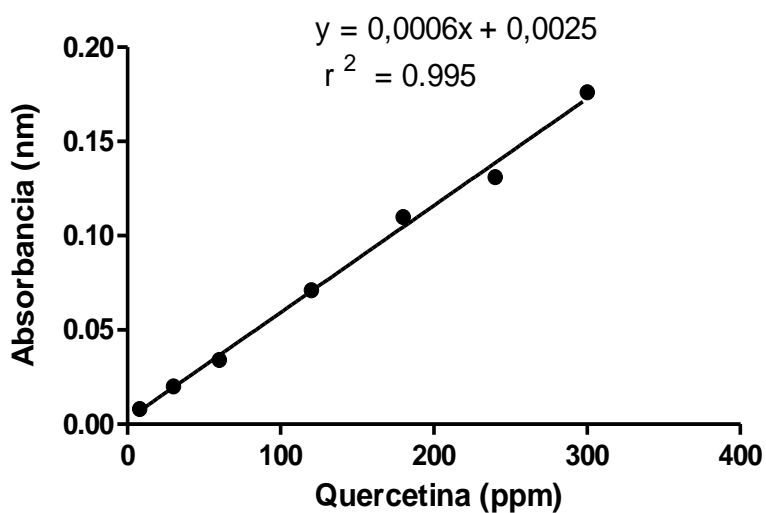


Figura 3. Curva de calibración quercetina