

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL EXTRACTO
ETANÓLICO DEL CADILLO (*Pavonia sepioides*).**

CRISTIAN A. GASCA SILVA

**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
2012**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL EXTRACTO
ETANÓLICO DEL CADILLO (*Pavonia sepioides*).**

CRISTIAN A. GASCA SILVA

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

Director

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

Asesor

M.Sc. FERNANDO HERNÁNDEZ
PROFESOR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Asesor

Dr. JUAN CARLOS ARGOTI
PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

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

2012

Nota de aceptación

Director

Fabio Antonio Cabezas Fajardo
Ph.D

Jurado

Liliana Montalvo Vélez
Ph.D

Jurado

Edier Humberto Pérez
Ph.D

Popayán, 30 de de noviembre de 2012

Dedicatoria

“A mis padres, Aldemar y Ana, por su incondicional apoyo durante los años de mi carrera, a mis hermanos, Bladimir y Danilo, por brindarme su apoyo en mi formación académica”

CRISTIAN GASCA SILVA

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme una familia amorosa, que me dio la oportunidad de adquirir mi formación académica en las Ciencias Químicas.

A mis padres, Ana Elisa Silva y Aldemar Gasca, que con su gran esfuerzo, amor y paciencia, han sido artífices de este gran logro, tanto en el ámbito personal como familiar. A ellos y a mis hermanos, infinitamente agradecidos por sus consejos y por los momentos de alegrías brindados en nuestro hogar.

Al Doctor Fabio Cabezas por su incondicional apoyo, por ser un motivo de inspiración y por darme la oportunidad en trascender en una fraterna relación Estudiante-Amigo-Docente. Por inspirarme a seguir adelante en aquellos momentos de dificultades.

A los docentes evaluadores de este documento de trabajo de grado, por su colaboración en la objetiva evaluación de este escrito.

A los docentes que me permitieron crecer profesionalmente y personalmente, a Dra. Liliana Montalvo, Ms.C. Isabel Bravo, Ms.C. René Zúñiga, Dr. Edier H. Pérez y Dr. Fabio Cabezas, que con su incondicional apoyo, sus oportunos consejos y su inagotable espíritu universitario, me inspiraron para culminar mis estudios y seguir en el camino del crecimiento profesional y personal.

A mis amigos Vianny Plaza, Elena Triana, Jose Luis Valencia, Manuel Mera, Marcela Martínez, Victoria Beltrán, Vanesa Bastidas, por brindarme momentos de alegrías, tristezas, por brindarme una mano amiga en aquellos momentos difíciles de la carrera, por compartir de esos buenos momentos, que serán inolvidables, pues han logrado ubicarse en un lugar especial de mi mente y corazón. A Miguel Parra, por ser más que un amigo, por darme esa inspiración a seguir adelante y a lograr cada una de las cosas que me proponga, por sus consejos y por aquellos buenos momentos vividos, especialmente en la que se convirtió la casa Opita, en la que junto a Jemid, Jesse, Carlos, Carmen, Yeimi, se forjaron amistades y se vivieron momentos inolvidables que serán motivo de alegrías cuando se recuerden esos buenos tiempos.

A aquellas personas que de una u otra forma colaboraron con la realización y culminación de este proyecto, Dra. Laura Torras, Dr. Oscar Mosquera, Dr. Silvio Carvajal, Dr. Juan C. Argoti y Ms.C. Fernando Hernández.

A la Universidad del Cauca y al Departamento de Química por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente en la disciplina de las Ciencias Químicas.

“La amistad autentica es aquella que sin sentir aversión por nadie, prefiere a unos pocos por la medida de sus meritos y virtudes y dentro de esos pocos hace de nuevo una selección para exaltar a los que ocupan el primer lugar en su corazón”

Cristian Gasca Silva

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURA	9
ANEXOS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESÚMEN.....	12
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	15
3.1 FAMILIA MALVACEAE.....	15
3.1.1 Género Pavonia	15
3.1.2 Especie Pavonia sepioides.....	15
3.1.3 Taxonomía de Pavonia sepioides.....	16
3.1.4 Usos etnobotánicos de plantas de la familia <i>Malvaceae</i>	16
3.2 RADICALES LIBRES.....	18
3.3 ESTRÉS OXIDATIVO	19
3.4 ANTIOXIDANTES	20
3.4.1 Vitamina E	21
3.4.2 Vitamina C	22
3.4.3 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS.....	24
3.4.3.1 Butilhidroxitolueno (BHT).....	24
3.4.3.2 Trólox.....	25
3.5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	27
3.5.1 Método del DPPH.....	27
3.5.2 Método del ABTS	28
3.6 MÉTODO DE FOLIN-CIICALTEU (DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES)	29
4 METODOLOGÍA.....	30
4.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS	30
4.2 UBICACIÓN GEOGRAFICA	31
4.3 RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA	31
4.4 EXTRACCIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DEL CADILLO PARA EL ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA	31
4.4.1 Extracción Soxhlet	31
4.4.2 Extracción líquido-líquido	32
4.4.3 Tamizaje Fitoquímico	34

4.5	<i>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DEL CADILLO: ACTIVIDAD ATRAPADORA “IN VITRO” DE RADICALES LIBRES</i>	34
4.5.1	<i>Ensayo de decoloración del Radical DPPH</i>	34
4.5.2	<i>Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}</i>	35
4.6	<i>DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENÓLES TOTALES</i>	37
4.6.1	<i>Ensayo de Folin-Ciocalteu</i>	37
5	<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	38
5.1	<i>EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL CADILLO</i>	38
5.2	<i>TAMIZAJE FITOQUÍMICO</i>	39
5.3	<i>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</i>	40
5.3.1	<i>MÉTODO DEL DPPH</i>	40
5.3.2	<i>MÉTODO DEL ABTS</i>	43
5.4	<i>DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU</i>	45
	<i>CONCLUSIONES</i>	52
	<i>RECOMENDACIONES</i>	53
	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	54

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación taxonómica del cadillo.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 3. Lista de reactivos y equipos.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 4. Pruebas para identificar los núcleos de metabolitos secundarios presentes en el extracto total, según la literatura clásica.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 5. Porcentaje de rendimiento en el fraccionamiento de ET con diferentes solventes.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 6. Resultados obtenidos a partir de tamizaje fitoquímico. * con tratamiento químico, ** sin tratamiento químico.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 7. Resultados experimentales obtenidos para las muestras de Pavonia sepiodes y los patrones antioxidantes por el método del DPPH.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 8. Valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por el método del DPPH.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 9. Resultados experimentales obtenidos para las muestras de Pavonia sepiodes y los patrones antioxidantes por el método del ABTS.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 10. Valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por el método del ABTS.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 11. Resultados obtenidos en la determinación del CFT por el método de Folin-Ciocalteu.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 12. Valores CFT obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 13. Resultados de la evaluación de la AAO por los métodos del DPPH y ABTS, análisis del CFT y análisis del contenido de FT.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 14. Análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 15. Resultados estadísticos de la correlación bivariada de Pearson.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 16. Resultados estadísticos de la correlación bivariada de Spearman.....</i>	<i>50</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Distribución de plantas de la familia Malvaceae¹⁰</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2. Fotografía de Pavonia sepioides.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 3. Mecanismo general de respuesta antioxidante por enzimas endógenas en los seres humanos .</i>	<i>19</i>
<i>Figura 4. Núcleo estructural de los tocoferoles y tocotrienoles³</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5. Estructura del tocoferol y algunos de sus productos de oxidación³</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6. Estructura del ácido ascórbico y sus productos de oxidación y degradación. A pH fisiológico la forma acídica es predominante (ascorbato) a un valor de pKa de 4.25³.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 7. Antioxidantes sintéticos utilizados en las industrias como conservantes.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 8. Mecanismo de reacción propuesto para el BHT con el antioxidante DPPH⁴⁸</i>	<i>26</i>
<i>Figura 9. Estructura química del Trólox y sus productos de oxidación⁵⁷.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 10. Reacción entre el DPPH y un compuesto antioxidante RH</i>	<i>28</i>
<i>Figura 11. Reacción entre el ABTS⁺ y un compuesto antioxidante (ROH)⁶⁶.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 12. Reacción del ácido gálico con molibdeno, componente del reactivo de Folin-Ciocalteu⁷⁴</i>	<i>30</i>
<i>Figura 13. a) Montaje de Extracción Soxhlet. b) Sistema de destilación fraccionada para purificación del etanol. c) Montaje para rota evaporación de ET de Pavonia sepioides.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 14. Fracciones obtenidas por ELL: a)Fhx, b)Fdc, c)Fae, d)Fac</i>	<i>32</i>
<i>Figura 15. Análisis de AAO por el metodo del DPPH. a) Toma de muestras, b) Adición del radical DPPH*, c) Incubación de muestras.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 16. Catió radical ABTS⁺* en buffer fosfatos a pH 7.4.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 17. Máximos de absorción del catión radical ABTS⁺ (a) y del radical DPPH* (b).</i>	<i>36</i>
<i>Figura 18. Representación de los porcentajes de extracción en el fraccionamiento de ET con diferentes solventes</i>	<i>38</i>
<i>Figura 19. Curva de calibración del radical DPPH*</i>	<i>40</i>
<i>Figura 20. Representación de la absorbancia del radical DPPH* en función de la concentración de trólox</i>	<i>42</i>
<i>Figura 21. Representación de los valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por el método del DPPH.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 22. Representación de la absorbancia del radical catión ABTS⁺ en función de la concentración de trólox.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 23. Representación de los valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por el método del ABTS</i>	<i>45</i>
<i>Figura 24. Curva de calibración con ácido gálico</i>	<i>47</i>
<i>Figura 25. Representación de los equivalentes de ácido gálico - EAG (mg)/ g de extracto.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 26. Curva de calibración con hesperidina</i>	<i>48</i>

ANEXOS

<i>Anexo 1. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para ET en el ensayo del DPPH. R: Repetición</i>	<i>59</i>
<i>Anexo 2. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para Fhx en el ensayo del DPPH. R: Repetición</i>	<i>59</i>
<i>Anexo 3. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para Fdc en el ensayo del DPPH. R: Repetición</i>	<i>60</i>
<i>Anexo 4. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para Fae en el ensayo del DPPH. R: Repetición</i>	<i>60</i>
<i>Anexo 5. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para Fac en el ensayo del DPPH. R: Repetición</i>	<i>61</i>
<i>Anexo 6. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para ET en el ensayo del ABTS. R: Repetición.....</i>	<i>61</i>
<i>Anexo 7. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para Fhx en el ensayo del ABTS. R: Repetición.....</i>	<i>62</i>
<i>Anexo 8. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para Fdc en el ensayo del ABTS. R: Repetición.....</i>	<i>62</i>
<i>Anexo 9. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para Fae en el ensayo del ABTS. R: Repetición.....</i>	<i>63</i>
<i>Anexo 10. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para Fac en el ensayo del ABTS. R: Repetición.....</i>	<i>63</i>
<i>Anexo 11. Curvas de Calibración obtenidas a partir de los patrones antioxidantes: Trólox, DL-α-Tocoferol, ácido ascórbico y BHT, por el método del DPPH.....</i>	<i>64</i>
<i>Anexo 12. Curvas de Calibración obtenidas a partir de los patrones antioxidantes: Trólox, DL-α-Tocoferol, ácido ascórbico y BHT, por el método del ABTS.....</i>	<i>65</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

RL:	Radical libre
EROS:	Especies reactivas de oxígeno
SOD:	Superóxido dismutasa
Gpx:	Glutaciona peroxidasa
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
UV:	Ultravioleta
UV-VIS:	Ultravioleta-Visible
SDA:	Semidehidroascorbato
DHA:	Dehidroascorbato
BHT:	Butilhidroxitolueno
BHA:	Butilhidroxianisol
TBHQ:	Ter-butilhidroquinona
DTBHQ:	Di-terc-butilhidroquinona
NADH:	Dihidronicotinamida adenina dinucleótido
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
DPPH:	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EC:	Concentración efectiva
ABTS:	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato
AAO	Actividad antioxidante
TEAC:	Capacidad antioxidante en equivalentes Trólox
Trólox:	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico
ET:	Extracto etanólico total
ELL:	Extracción Líquido-Líquido
Fhx:	Fracción en hexano
Fdc:	Fracción en diclorometano
Fae:	Fracción en acetato de etilo
Fac:	Fracción acuosa
PBS:	Buffer de fosfatos
AO:	Antioxidante
Abs:	Absorbancia
SD:	Desviación estándar
CV:	Coefficiente de variación
PI:	Porcentaje de inhibición
DPPH rem:	DPPH remanente
CFT:	Contenido de fenoles totales
FT:	Flavonoides totales
QCB:	Química de Compuestos Bioactivos
Ec:	Ecuación

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antioxidante en el extracto etanólico del cadillo (*Pavonia sepioides*). La recolección del material vegetal se realizó en el municipio de Popayán en el departamento del Cauca. Las hojas de la planta se secaron en una estufa con control de temperatura y se cortaron en pequeños trozos para ser sometidas a extracción Soxhlet por 24 horas. Transcurrido el tiempo de extracción, se realizó tamizaje fitoquímico en el extracto total, obtenido a partir de la planta. Una porción del extracto etanólico total se llevó a sequedad en un equipo rotaevaporador y se reconstituyó en agua (Fac). La muestra acuosa, se sometió a Extracción Líquido-Líquido (ELL) con disolventes de diferente polaridad: Hexano (Fhx), diclorometano (Fdc), acetato de etilo (Fae). El porcentaje de rendimiento en el fraccionamiento, expresado en porcentaje en peso con respecto al material vegetal seco fue de 51,21%, 32.4%, 0.93% y 15.61% respectivamente.

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó a través de los ensayos del 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato (ABTS). Se confirmó la actividad antioxidante, del extracto etanólico del cadillo y sus fracciones purificadas, por ambos métodos. Aunque los valores difieren en cada técnica, el comportamiento es similar, encontrándose igual nivel de actividad para cada una de las muestras estudiadas. De las cuatro fracciones, Fhx presenta la menor actividad y Fac la mayor actividad. Fdc y Fae presentan valores intermedios de AAO. El extracto total presenta un valor de AAO menor al de la fracción Fhx, como un indicativo de que los compuestos antioxidantes se encuentran menos concentrados en dicho extracto.

El contenido de fenoles totales (CFT) se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Este análisis se contrastó con el análisis complementario del contenido de flavonoides totales, ambos con un comportamiento similar al hallado para la actividad antioxidante. La fracción acuosa presentó el mayor contenido de flavonoides y de fenoles totales

El análisis estadístico bivariado por los test de Pearson y Spearman mostró que hay una correlación lineal positiva, entre los ensayos del DPPH y ABTS, que permiten evaluar la AAO, el contenido de fenoles totales (CFT) y el contenido de flavonoides totales (FT). Los análisis fueron estadísticamente significativos (significancia $\leq 0,005$).

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El oxígeno es una molécula esencial para los seres vivos, sin embargo, durante los procesos metabólicos de tipo aerobio, es inevitable la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) y radicales libres^{1, 2}. Cada una de las especies generadas presentan características oxidantes que generan daños en moléculas como: Proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros^{2, 3}. Pese a que los seres vivos presentan defensas antioxidantes naturales como: enzimas de tipo peroxidasa, catalasa y glutatióna, entre otras, estas se pueden ver limitadas por la elevada producción de EROS, generándose estrés oxidativo celular, producto del desequilibrio entre las especies oxidantes y antioxidantes¹⁻³.

Para contribuir a la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, algunas investigaciones han demostrado que la dieta juega un papel importante debido a la presencia de compuestos bioactivos de origen vegetal, manteniendo el balance en los sistemas biológicos. Algunos de estos compuestos son las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos siguen siendo ampliamente estudiados en los últimos años²⁻⁵. Las evidencias asocian el consumo de productos de origen vegetal con una menor incidencia de enfermedades como: Aterosclerosis, ateromatosis, hipertensión arterial, infarto agudo de miocardio, enfermedades de tipo cancerígeno y neurológico, ya que poseen actividades anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica³⁻⁷.

Con base en lo anterior, resulta de gran importancia buscar e identificar compuestos de características antioxidantes en nuevas fuentes de origen natural, dado su gran aplicabilidad. Con el desarrollo de esta propuesta de investigación, se espera determinar la actividad antioxidante en el extracto etanólico de *Pavonia sepiodes*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad antioxidante en el extracto etanólico del cadillo (*Pavonia sepioides*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar tamizaje fitoquímico en el extracto etanólico total de *Pavonia sepioides*.
- Determinar la actividad antioxidante en el extracto etanólico del cadillo (*Pavonia sepioides*) por los métodos DPPH y ABTS.
- Evaluar el contenido de fenoles totales (CFT) en el extracto etanólico de *Pavonia sepioides* por el método de Folin-Ciocalteu.

3 FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 FAMILIA MALVACEAE

Es una familia predominantemente pantropical, casi cosmopolita, distribuida en regiones templadas y cálidas de ambos hemisferios, según se muestra en la figura 1. Está constituida por 250 géneros y 4200 especies. Son un conjunto de Hierbas, sufrútices, raramente arbustos o árboles (Bastardiopsis) con indumento más o menos denso (pelos frecuentemente estrellados). Estípulas desarrolladas, frecuentemente caducas. Ápice del pecíolo a veces hinchado. Hojas simples, de forma triangular, ovada o cordiforme, o palmatilobada, - secta o -fida, de margen generalmente dentado o aserrado, raramente entero, de base palmatinervada. Flores heteroclamídeas, dialipétalas, 5-meras, actinomorfas. Epicáliz a veces presente, constituido por 3 o 5 bractéolas. Filamentos soldados entre sí en una columna estaminal, libres solamente en la parte apical; anteras numerosas. Mericarpos 5-n, dehiscentes o no, separándose parcial- o totalmente entre sí a la madurez, o cápsulas loculicidas^{8,9}.



Figura 1. Distribución de plantas de la familia Malvaceae¹⁰

3.1.1 Género *Pavonia*

El género *Pavonia* es probablemente el género más abundante dentro de esta familia. De las 250 especies conocidas, 224 se encuentran en América, presentando distribución en las regiones templadas y tropicales. Son hierbas perennes, procumbentes, presentándose como arbustos erguidos, arbustos y ocasionalmente árboles pequeños. Las características distintivas de *Pavonia* en comparación con otros géneros son: Ausencia de nectarios foliares, flores delimitadas por un epicáliz con bractéolas no peltadas, pétalos sin aurícula basal, y esquizocarpos con 5 mericarpos, los cuales carecen de espinas gloquidiatas^{8,9}.

3.1.2 Especie *Pavonia sepioides*

Es una planta perteneciente a la familia **Malvaceae**. Son hierbas o sufrútices que presentan hojas simples o palmatilobadas, dentadas, sus flores frecuentemente grandes, pedunculadas, aparecen solitarias en las axilas de las hojas, en fascículos cimosos o axilares, más raramente en racimos terminales, ocasionalmente en espigas o umbelas con Cáliz y epicáliz constituyendo 10 lóbulos frecuentemente estrechos e iguales entre sí (mismo cuando son desiguales, el epicáliz es bien desarrollado). Los estambres son numerosos, monadelfos, con los filamentos soldados en un tubo por cuyo interior pasa el estilo. Presentan un número de estilos de 10 (dos veces el número de mericarpos), 5 mericarpos con puntas apicales o apéndices, uniseminados, indehiscentes, separándose entre sí a la madurez. El gineceo tiene

un ovario súpero con estilos libres o más frecuentemente soldados y estigmas terminales y capitados o discoideos, decurrentes y alargados. El fruto es una cápsula loculicida o un esquizocarpo^{11,12}. En la figura 2 se observa el cadillo en su estado natural



Figura 2. Fotografía de *Pavonia sepioides*

3.1.3 Taxonomía de *Pavonia sepioides*

La clasificación taxonómica de la planta fué realizada por Frixell & Krapov en el año de 1995¹², según se muestra en la tabla 1. La identificación botánica del ejemplar recolectado en la ciudad de Popayán fué realizada por el Doctor Bernardo Ramírez, Director del Herbario de la Universidad del Cauca, ubicado en el Museo de Historia Natural, encontrándose con las siguientes especificaciones:

P. sepioides

Arbusto, 1m, flores amarillas

“Cadillo”

Popayán, vereda Belén, 1850 msnm

19 de septiembre de 2011

Cristian Gasca Silva

Código de referencia de herbario: 01 (CAUP)

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cadillo

Reino	<i>Plantae</i>
Phylum	Magnoliofita
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Genero	<i>Pavonia</i>
Especie	<i>Pavonia sepioides</i>
Autor Epiteto	Fryxell & Krapov
Determinador	Fryxell, P.A
Fecha determinación	1995

3.1.4 Usos etnobotánicos de plantas de la familia **Malvaceae**

Los usos de preparaciones acuosas han atribuido propiedades medicinales a plantas de la familia Malvaceae, y dentro de ellas se destacan su uso en decocción, en gargarismos,

propiedad refrescante y emoliente, en maceración, uso para combatir la caspa y hacer crecer el cabello¹³⁻¹⁵. La decocción de la raíz ha sido usada como purgante, expectorante y febrífuga^{14, 15}. Las hojas en infusión, en tomas, usados como purgantes y antidiarréicos, en cataplasmas, se usan para calmar el dolor de picaduras de avispas y abejas^{13, 14}. Diferentes Investigaciones han concluido que contienen gran número de metabolitos secundarios como saponinas, antocianinas, flavonoides, cumarinas, taninos, esteroides y alcaloides¹⁵⁻¹⁸.

En los municipios de Nariño y Tumaco, la especie *Hibiscus rosa-sinensis*, ha sido utilizada comúnmente en para prevenir el paludismo^{14, 15}. De igual manera, ha sido informado por los curanderos de Tumaco en otros usos como antiséptico, prevención de caída del pelo, picaduras de insectos, erisipela en la pierna, malos humores y para la suerte¹⁵. Las flores de *Hibiscus* se usan en Tisana para la tos y para la bronquitis. De el llamado mucílago de las hojas de esta planta se han aislado diferentes compuestos, cuyo mayor constituyente es un polisacárido ácido compuesto de L – rhamnosa, D- Galactosa, ácido de Galacturónico, ácido D- glucorónico, así como varios metil ésteres grasos^{19, 20}. Al extracto etanólico de las flores de esta especie se han atribuido efectos anticonceptivos. Se ha demostrado que este extracto presenta actividad anticonvulsiónante en estudios hechos en ratones, la fracción resultó ser ansiogénica y depresora del sistema nervioso central^{15, 21}. De algunas especies de *Hibiscus* como lo es en *H mutabilis* y *H. furcalus* se han aislado alcaloides, Glicósidos y Flavonoides. El extracto acuoso de estas **Malvaceae** han mostrado tener actividad frente a *Plasmodium falciparum* Cepa ITG-2²⁰. *Hibiscus irtu* registra actividad hipotérmica y sobre el sistema nervioso central en general²⁰.

La planta *Malachra rudis*, de uso común en el municipio de Nariño y Tumaco, específicamente en poblaciones cercanas al río Chagú y la quebrada Cuarasangá, se ha utilizado para prevenir y combatir el paludismo. Las personas toman el tallo y las hojas de la planta y preparan baños con agua caliente, frotándose todo el cuerpo con este material vegetal. Las hojas se preparan con un poco de agua, se frota unas con otras hasta obtener una mezcla de consistencia espesa y se toman porciones de la misma. En Tumaco se usan como implastos medicinales para las inflamaciones¹⁵.

En el municipio de Gigante (Huila), la especie *Malachra rudis*, y en Cartago (Cali- Valle del Cauca) la planta conocida como *Pseudabutilon umbellatum*, han sido reportadas por curanderos de estas regiones en usos tradicionales por preparación de extractos vegetales acuosos para prevenir el paludismo, tomando el agua que queda de hacer cocciones de el tallo, las hojas y la flor para el paludismo. Para el hígado, se frota las hojas y se revuelven en una cantidad de agua hasta obtener una mezcla espesa, la cual se consume¹⁴. *Pavonia fruticosa* ha sido utilizado en el municipio de Nariño y Tumaco para combatir y prevenir el paludismo, la fiebre y enfermedades de la sangre (no reportan uso específico). En Tumaco se usa para normalizar el tránsito intestinal y para regular la menstruación en la mujer. De *Pavonia seilanica* se han aislado saponinas como la pavofilina¹⁵.

En el departamento del Huila (Colombia), el cadillo ha sido usado popularmente para combatir la diarrea, su preparación involucra tomar las hojas de cadillo, agitarlas de forma manual en una cantidad de agua hasta obtener una mezcla espesa y de sabor característica, se ingiere con adición de unas gotas de zumo de limón y quienes lo consumen reiteran en su poder efectivo en la prevención del anterior padecimiento. Tradicionalmente ha sido utilizada para la limpieza del jugo de panela, por formación de una emulsión entre el extracto acuoso de las hojas de cadillo y los sólidos livianos suspendidos presentes en dicho jugo.

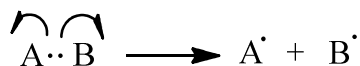
3.2 RADICALES LIBRES

Un radical libre es una especie química que contiene un electrón desapareado en su orbital más externo^{1, 3}. Dicho electrón hace que presente alta inestabilidad química, confiriéndole reactividad oxidante para otras especies que se encuentran cercanas y que reaccionan rápidamente con el radical, por esta razón también son conocidas como especies reactivas, de las cuales, las más importantes a nivel celular son las derivadas de oxígeno y de nitrógeno^{2, 3, 22}. Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son productos formados metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, dotados de un electrón desapareado (radical libre) en un nivel energético superior que les confieren una alta reactividad. Este término ha sido utilizado para referirse tanto a especies radicalarias como a derivados de oxígeno no radicalarios como se muestra en la tabla 2^{3, 7}. La reactividad de los radicales varía dependiendo de la especie que se esté considerando.

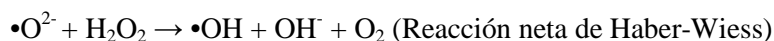
Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno

Radicales	No radicales
Superóxido, O ₂ ^{•-}	Peróxido de Hidrógeno, H ₂ O ₂
Hidroxiilo, OH [•]	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxilo, RO ₂ [•]	Ozono, O ₃
Alcoxilo, RO [•]	Oxígeno singulete ¹ Δg
Hidroperoxilo, HO ₂ [•]	Peroxinitrito, ONOO [•]

Los radicales se pueden formar cuando un enlace covalente se rompe y un electrón se ubica sobre cada átomo, en un proceso conocido como **fisión homolítica**. Si A y B representan dos átomos unidos mediante enlace covalente (• representa el par de electrones), la fisión homolítica se puede representar como:



Los radicales libres también pueden formarse como consecuencia de una reacción metabólica dentro de la célula o formarse de manera espontánea si las condiciones del medio lo permiten^{1, 22}. En este último punto, es de resaltar que las EROS pueden formarse espontáneamente por medio de dos reacciones llamadas de Haber-Wiess o de Fenton. En la reacción de tipo Haber-Wiess una especie reactiva reacciona con un pro-radical y de esa manera se forman varios radicales libres. En una reacción tipo Fenton, un compuesto pro-radical reacciona con un catalizador (generalmente un metal de transición como por ejemplo hierro) para formar los radicales libres^{1, 22, 23}. A continuación se describe la reacción general de Haber-Wiess:



Por su alta reactividad química, los radicales libres son especies fuertemente oxidativas y atacan preferentemente moléculas que contienen dentro de su estructura enlaces dobles carbono-carbono^{3, 22, 24}. De esta forma, aminoácidos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos los cuales componen a las macromoléculas de la célula, pueden ser “atacados” y alterar la función o la

estructura de la misma^{22, 24}. Para que exista un daño en estas unidades biológicas, la reacción de los radicales debe conllevar tres pasos de manera general^{3, 22, 23, 25}: A). **Iniciación**, consiste en la producción inicial de radicales libres, ya sea por alteraciones internas o externas de la célula; B). **Propagación**, se caracteriza por que los radicales libres reaccionan produciendo otras especies radicalarias reactivas, y estas a su vez atacan las macromoléculas diseminando el daño a nivel celular; C). **Terminación**, cuando los radicales reaccionan entre sí y se “inactivan” debido a formación de especies químicas estables y neutras.

En la célula existen varios sistemas que contrarrestan a los radicales libres y que la protegen en contra de su acción deletérea. Dichos mecanismo se clasifican de la siguiente manera^{3, 22, 23}: A). Agentes que remueven los radicales libres por medio de una reacción catalítica con ellos (p. ej. Enzimas antioxidantes); B). Proteínas que minimizan la actividad pro-oxidante de los radicales al contener un metal de transición y llevar a cabo una reacción tipo Fenton controlada (p.ej. ceruloplasmina, hemina); C). Metabolitos que actúan como “atrapadores” de radicales libres, conocidos como agentes antioxidantes (p.ej. Vitaminas E, C y A, Sistema Glutaciona reducida/oxidada, bilirrubina).

Un factor importante a considerar es que los radicales libres no solamente presentan efectos adversos a la salud en sistemas biológicos complejos, y se puede resaltar que presentan efectos fisiológicos de gran importancia como lo son: A) Participación en la regulación de la respuesta inmunológica de defensa (inactivación de virus y eliminación de bacterias y hongos), B) Participación en procesos bioquímicos para la señalización en procesos de transducción etc., por lo que se debe ser cuidadoso al momento de considerar si sus efectos son benéficos o tóxicos, dado que ello va a depender de su concentración y de los mecanismos antioxidantes que los producen^{3, 23, 26}. En los seres humanos el cuerpo ha desarrollado defensas antioxidantes para las especies radicalarias que generan estrés oxidativo a nivel celular, según se muestra en la figura3, entre las que se destacan enzimas como las superóxido dismutasas (SOD), que se encuentran a nivel citoplasmático y mitocondrial y que requieren cobre, zinc y manganeso para catalizar la remoción de los radicales superóxido; las catalasas, encargadas de la remoción del peróxido de hidrógeno, actuando junto con el hierro, así como las glutatión peroxidasas (Gpx) encargadas de remover hidroperóxidos lipídicos y que dependen de selenio^{3, 25, 26}.

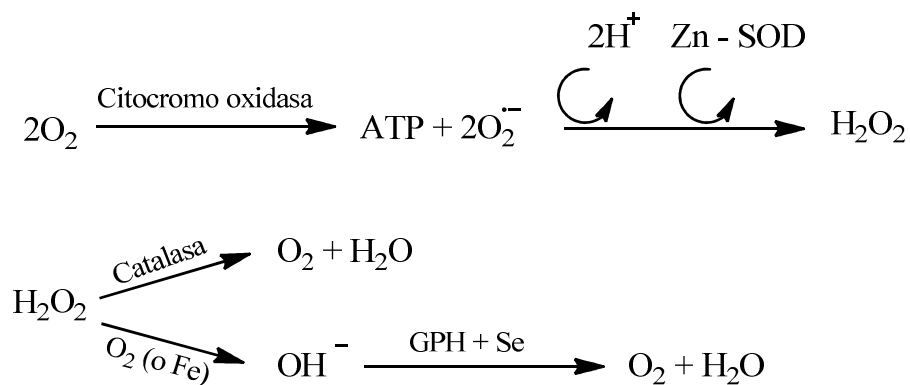


Figura 3. Mecanismo general de respuesta antioxidante por enzimas endógenas en los seres humanos

3.3 ESTRÉS OXIDATIVO

Si bien, ya se han reconocido los radicales libres como causantes de acción deletérea a nivel celular, es conveniente abordar un término utilizado ampliamente cuando se realizan

investigaciones en el campo de los antioxidantes y los radicales libres. Este término hace referencia al desequilibrio entre la formación de especies oxidantes y los sistemas de defensa antioxidante de un organismo, a lo que se conoce como **estrés oxidativo**. El estrés oxidativo se genera cuando el balance está a favor de los radicales libres debido a un aumento en su producción o agotamiento de los niveles de antioxidantes⁷. Las principales causas de estrés oxidativo están asociadas a:

- a. Disminución de los antioxidantes endógenos como la Gpx y la SOD por mutaciones, disminución en el consumo de antioxidantes exógenos, provenientes de alimentos, y enfermedades genéticas que involucran bajos niveles de glutatona y de hierro como en el caso de la enfermedad de Kwashiorkor^{3,4}.
- b. Incremento de la producción de EROS por exposición a niveles elevados de oxígeno, la presencia de toxinas que al ser metabolizadas producen EROS³.

La evidencia de los daños causados por los radicales libres y en particular a EROS está asociada a daños principalmente en el ADN, proteínas, lípidos y ácido úrico, generando daños celulares producto del estrés oxidativo celular³.

3.4 ANTIOXIDANTES

El término antioxidante es ampliamente usado pero no se registra una definición formal establecida. Esta situación ha sido motivo de discusión para gran número de actores científicos y especialistas en áreas de conocimiento de la química, la biología, la medicina, entre otras. A los antioxidantes, también conocidos como inhibidores de la oxidación, se les ha definido como moléculas que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy diversos, los cuales previenen o retardan las reacciones de oxidación y actúan como potentes captadores de radicales libres^{7,27}. Una definición formal de antioxidante indica que es cualquier sustancia la cual cuando está presente en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, demora o previene la oxidación de ese sustrato²⁸. De igual manera se ha reportado a los antioxidantes como moléculas capaces de interrumpir la cadena de radicales cediendo un radical hidrógeno a un radical libre y actuar impidiendo o disminuyendo la formación de dichos radicales²⁹.

Al considerar la participación de las moléculas antioxidantes en la prevención del estrés oxidativo a nivel celular, se han descrito los sistemas de defensa antioxidante nombrados a continuación^{30,31}:

- **Antioxidantes primarios:** Cumplen la función de prevenir la formación de nuevas EROS, convirtiéndolas en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar o evitar su producción a partir de otras moléculas. En este grupo se encuentran las enzimas SOD, Gpx y proteínas que se enlazan a metales como la ferritina y la ceruloplasmina
- **Antioxidantes secundarios:** Participan en la captura de los radicales libres y evitan las reacciones en cadena. Dentro de ellos se encuentran la vitamina E y C, β -caroteno, ácido úrico, bilirrubina, albúmina y ubiquinona.
- **Antioxidantes terciarios:** Son un grupo de moléculas encargadas de la reparación de las biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

3.4.1 Vitamina E

La vitamina E es un “atrapador” de radicales peroxilo, probablemente el más importante (pero no el único) inhibidor de este tipo de unidades químicas en el proceso de peroxidación lipídica en animales^{32, 33}. Este nombre no hace referencia en particular a una sola estructura química, y por el contrario, relaciona un conjunto de 8 formas químicamente distintas (Figura 4)^{3, 34}: *d-α*, *d-β*, *d-γ* y *d-δ* tocoferol y tocotrienol respectivamente. Los tocoferoles tienen tres átomos de carbono asimétricos, que generan ocho isómeros ópticos. Estas estructuras varían en su cadena lateral isoprenoide y en los grupos metilos del anillo cromano. La forma con mayor actividad biológica en animales es R,R,R-*α*-tocoferol también llamado *α*-tocoferol^{3, 35, 36}.

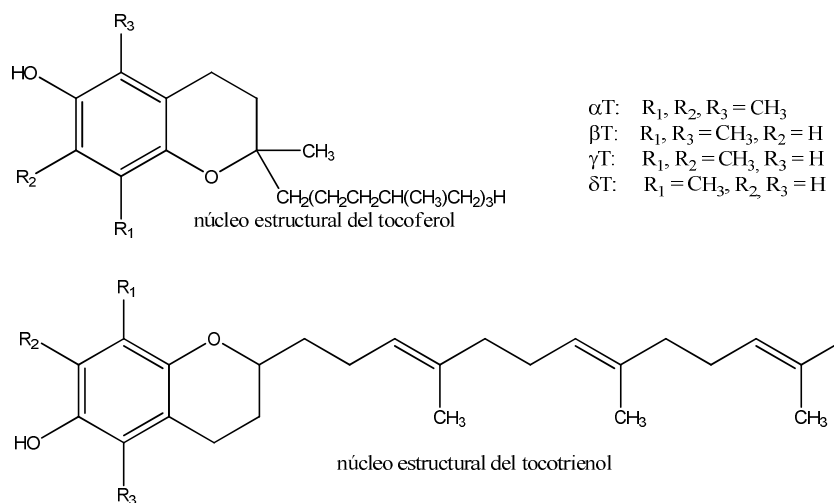


Figura 4. Núcleo estructural de los tocoferoles y tocotrienoles³

En el proceso de captura de los radicales libres de tipo peroxilo, de naturaleza lipídica (LO^*), los tocoferoles y tocotrienoles reaccionan rápidamente formando el radical *α*-tocoferilo. Estos compuestos también reaccionan con oxígeno singlete protegiendo la membrana celular de las especies reactivas de oxígeno. Los productos formados pueden ser reciclados a tocoferol o pueden experimentar procesos de oxidación secundarios por una serie de mecanismos, según se muestra en la figura 5^{3, 28, 35}. En el proceso final de oxidación de la vitamina se forma *α*-tocoferilquinona, la cual es metabolizada por reducción a hidroquinona (que ejerce propiedades antioxidantes) y puede ser conjugada con ácido glucurónico y excretada a través de la bilis o degradada en el hígado como ácido *α*-tocoferónico, seguido por conjugación y excreción en la orina.

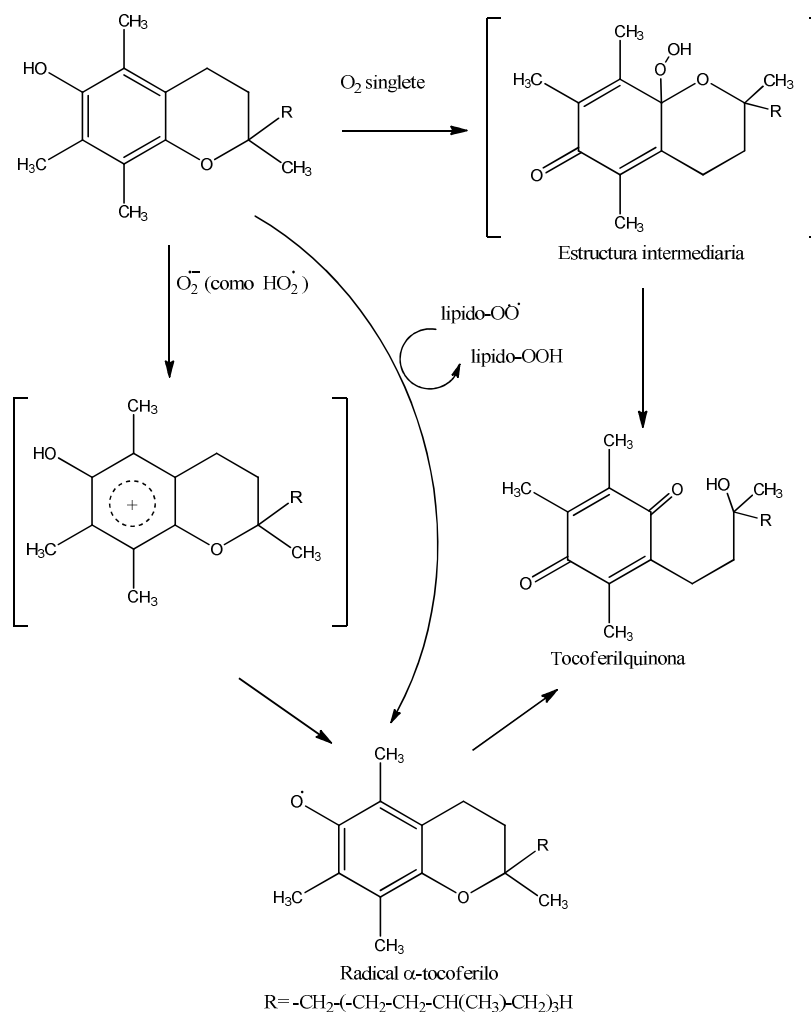


Figura 5. Estructura del tocoferol y algunos de sus productos de oxidación³

Diferentes estudios han demostrado algunas de las actividades biológicas de los tocoferoles y tocotrienoles^{32, 34, 35, 37-41}: A). Presentan capacidad de atrapar radicales libres (oxígeno singlete, radical superóxido y radicales hidroxilo, entre otros) y proteger las membranas lipídicas de la peroxidación. B). Protegen los ácidos nucleicos, enzimas, proteínas estructurales, lípidos, factores de transcripción y otras estructuras moleculares de los efectos perjudiciales de los radicales libres. C). En ausencia de aire, los derivados de la vitamina E son completamente estables al calor y a las bases. Sin embargo, en presencia de aire pueden ser rápidamente oxidados por álcalis e iones metálicos; absorben la luz en la región UV (292-295 nm) y son naturalmente fluorescentes. D). La administración de α -tocoferol ayuda en la prevención de la distrofia muscular en animales modelos, enfermedades hepáticas, enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis.

3.4.2 Vitamina C

La vitamina C, también conocida como ácido ascórbico, es un sólido blanco con gran solubilidad en agua. Presenta dos valores de pKa: pKa₁ de 4.25 y pKa₂ de 11.8. Su papel como antioxidante está basado en la reacción con los radicales de oxígeno y de nitrógeno, como el superóxido, radicales hidroperoxilos, oxígeno singlete y peroxinitrito²⁶.

La donación de un electrón por el ion ascorbato genera semidehidroascorbato (SDA) o radical ascorbilo, el cual puede ser oxidado para formar dehidroascorbato (DHA), según se muestra en la figura 6. El radical ascorbilo es relativamente poco reactivo, no siendo ni fuertemente oxidante, ni fuertemente reductor. Esta pobre reactividad del ascorbilo es la esencia del poder antioxidante del ascorbato, y así, el radical, altamente reactivo, reacciona con el ascorbato y genera un producto menos reactivo (radical ascorbilo), que posteriormente genera productos de oxidación que son metabolizados y excretados a través de la orina³.

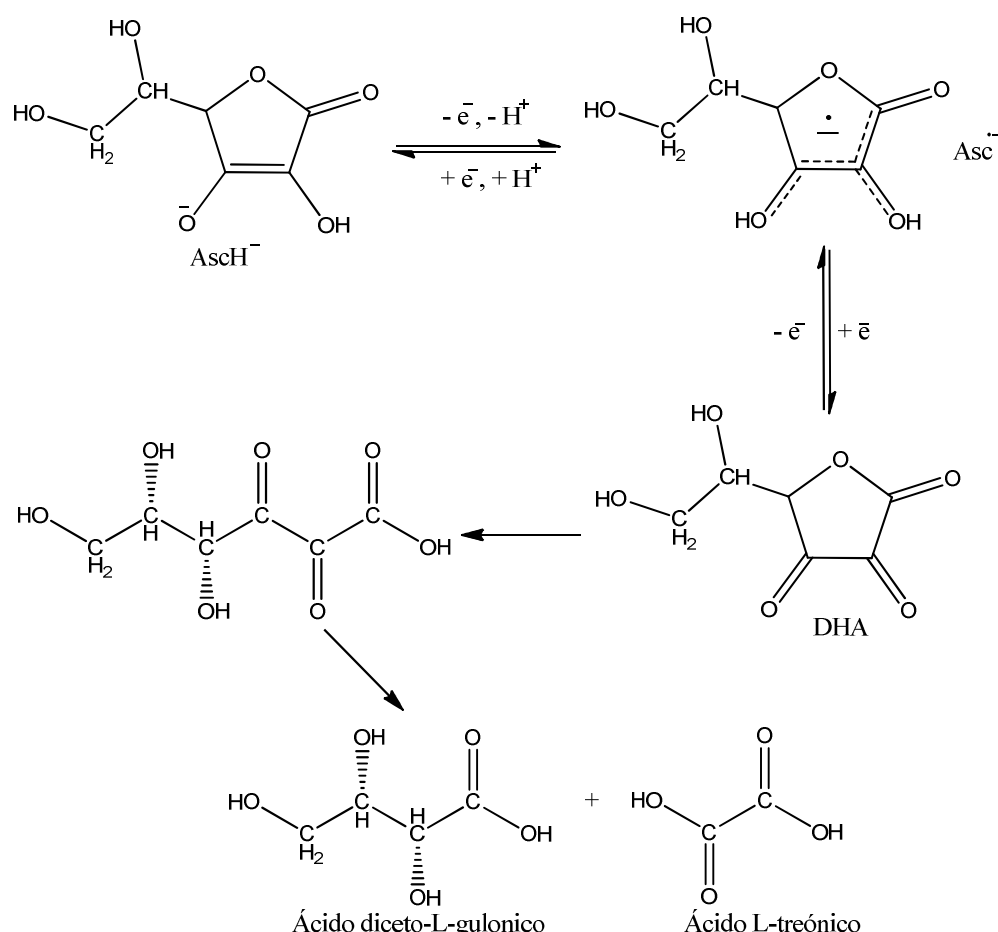


Figura 6. Estructura del ácido ascórbico y sus productos de oxidación y degradación. A pH fisiológico la forma ácida es predominante (ascorbato) a un valor de pKa de 4.25³.

Diversas investigaciones han permitido concluir sobre algunas actividades biológicas nombradas a continuación: A) Inhibe la agregación plaquetaria, la inhibición de la proliferación de músculo liso y la neutralización de los peroxinitritos y oxisulfuro²⁶. B) protege contra el daño oxidativo al DNA, proteínas y contra la peroxidación lipídica, el último como un estudio a partir de especies presentes en el humo del cigarrillo. Otro papel importante es la renovación de α -tocoferol, en cooperación con la vitamina E, al unirse con el radical α -tocoferilo. La regeneración de la capacidad antioxidante del ácido ascórbico requiere la unión con los sistemas reductores no radicales como glutatión o niacina (NADH y NADPH)⁴². C) Estudios epidemiológicos señalan al ácido ascórbico como benéfico en la prevención de cáncer, enfermedades cardiovasculares y cataratas; también disminuye la tensión arterial, mejora la integridad del tejido vascular e incrementa su capacidad de

relajación, aunque no existe una dosis recomendada para alcanzar estos objetivos y no se han obtenido efectos positivos en todos los estudios clínicos^{3,43}.

Dado que la vitamina C es un compuesto redox activo, puede actuar como antioxidante o como prooxidante bajo ciertas circunstancias, como en la presencia de los metales de transición³³. Los productos generados por estas reacciones incluyen radicales de lípidos que propagan la peroxidación de grasas y los radicales hidroxilos. También, se ha especulado que altos consumos de vitamina C disminuyen la absorción de selenio, que funciona como un importante cofactor de la enzima Gpx²⁶. Algunos autores han sugerido que la disminución en la concentración de vitamina C a nivel ocular, que se observa con el envejecimiento, pudiera ser responsable de la menor actividad de algunas enzimas antioxidantes, causantes de cataratas y degeneración macular^{3,26}.

3.4.3 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Los antioxidantes sintéticos se usan industrialmente como aditivos. Estos antioxidantes retrasan o previenen los procesos oxidativos que causan el deterioro de los alimentos, el endurecimiento del caucho, el cambio de color y enranciamiento de los aceites y grasas, etc. Butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) y di-terc-butilhidroquinona (DTBHQ) son antioxidantes utilizados en las industrias agro-alimentaria, cosmética y de plásticos como conservantes (Figura 7)²⁶.

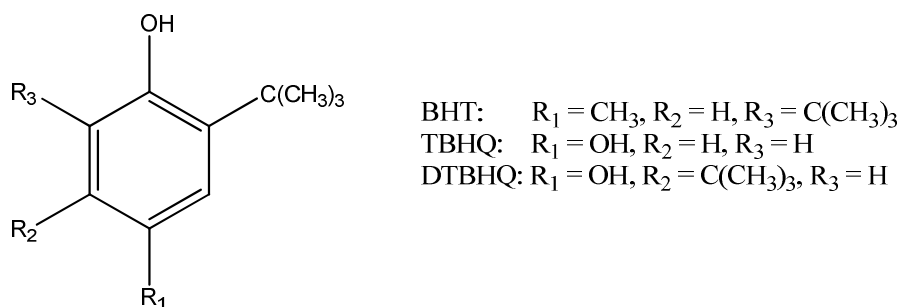


Figura 7. Antioxidantes sintéticos utilizados en las industrias como conservantes

El objetivo principal de la industria alimentaria a nivel mundial, es remplazar los antioxidantes sintéticos por productos de origen vegetal, de naturaleza fenólica, como los flavonoides, hidroxitirosol, entre otros, como una estrategia para prevenir posibles efectos colaterales a la salud de los seres humanos, principales usuarios de este tipo de productos^{3,33}. Los resultados de estudios científicos sobre el consumo de este tipo de aditivos en la salud humana han sido controversiales; algunos de estos muestran una relación directa entre su presencia y los efectos cancerígenos, mientras que otros no muestran ninguna relación y enfatizan en posibles efectos antioxidantes en los animales⁴⁴⁻⁴⁷. A continuación se describen las características generales de dos tipos de antioxidantes sintéticos con funcionalidades similares en el área de estudio de la actividad antioxidante en ensayos In vitro, ellos son el BHT y el Trólox.

3.4.3.1 Butilhidroxitolueno (BHT)

El BHT, compuesto que responde a al nombre 2,6-di-t-butil-4-metilfenol, es un antioxidante sintético de gran aplicabilidad para la preservación de productos de consumo humano a partir de la industria cosmética, alimenticia, farmacéutica,

polimérica, entre otras. Pese a que su uso ha sido motivo de discusión por algunos científicos por los efectos colaterales que puede generar a la salud humana, no hay efectos de mayor relevancia a considerar por su uso, por lo cual actualmente, y en conjunto al BHA (Butil hidroxianisol), se constituye en uno de los más ampliamente usados^{3, 23, 33}.

Con base en sus propiedades antioxidantes, resulta de gran aplicabilidad su utilización como compuesto inhibidor de radicales libres en estudios *In vitro* e *In vivo*, por lo que ha sido utilizado ampliamente para dicho propósito^{3, 24, 48-54}.

En la figura 8⁴⁸, se muestra el mecanismo de reacción propuesto para la reacción entre el BHT y el DPPH, un compuesto radical de color violeta que se decolora a amarillo pálido a medida que se presenta la inhibición por la presencia del antioxidante de referencia. En este mecanismo se resalta que una mol de BHT reduce aproximadamente 3 mol de DPPH*, incluso si reacciona muy lentamente (después de 5 horas a 20°C). El mecanismo de reacción propuesto sugiere tres pasos de reacción BHT/DPPH: Después de la primera reacción, la especie radicalaria del BHT, se puede convertir en una especie fenólica (paso a) por donación de un segundo átomo de hidrógeno, o después, una regeneración del grupo hidroxilo por dimerización, puede reaccionar por segunda vez con el DPPH para producir una estructura bi-quinonoide (paso b). El tercer paso (paso c) involucra un acomplejamiento formándose una estructura con gran estabilidad.

3.4.3.2 Trólox

Es un antioxidante sintético análogo a la vitamina E, que ha sido estudiado por su acción antioxidante por un gran número de investigadores en una variedad de sistemas^{42, 43, 55, 56}.

La estructura química de la molécula de Trolox exhibe los requerimientos para una efectiva acción antioxidante^{3, 33, 42}: Posee una estructura cromanol, figura 9, la cual confiere su actividad y un grupo carboxilo que incide en su solubilidad moderada en agua; al comparar esta propiedad con la vitamina E, resulta en una ventaja, debido a que esta es liposoluble. Además de ello, tiene naturaleza fenólica, con un éter cíclico cuyo átomo de oxígeno se encuentra en la posición para (a), confiriéndole estabilización estereoelectrónica a la molécula, a partir de la cual se forma el radical fenoxilo (b) cuando reacciona con un radical peroxilo. En este proceso hay transferencia del átomo de hidrógeno al radical activo formado en el átomo de oxígeno de la molécula⁵⁷.

El Trólox es efectivo en la preservación de alimentos^{58, 59}, inhibe los procesos oxidativos por radicales en proteínas y enzimas⁵⁶ y previene la pérdida de los receptores serotonina y dopamina en membranas a nivel cerebral en animales^{42, 43}. Hay algunas evidencias de su actividad en contra de los daños celulares causados por radicales libres especialmente cuando está conjugado a lactosilfenilpiranosido^{55, 56, 60-62}. La peroxidación del colesterol en dipalmitoilfosfatidilcolina es inhibida efectivamente por este antioxidante, lo que sugiere su efectividad en contra de la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad⁶³.

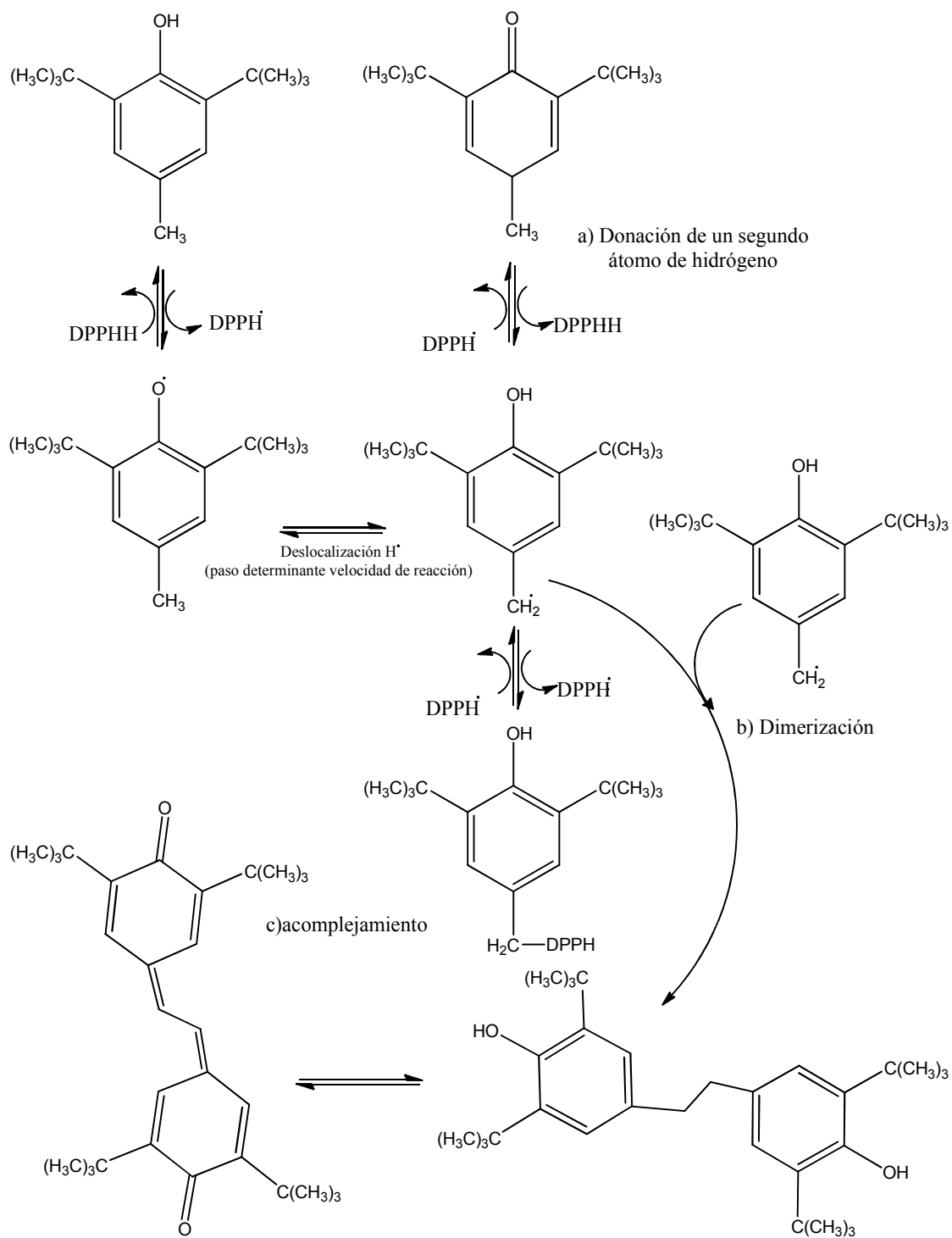


Figura 8. Mecanismo de reacción propuesto para el BHT con el antioxidante DPPH⁴⁸

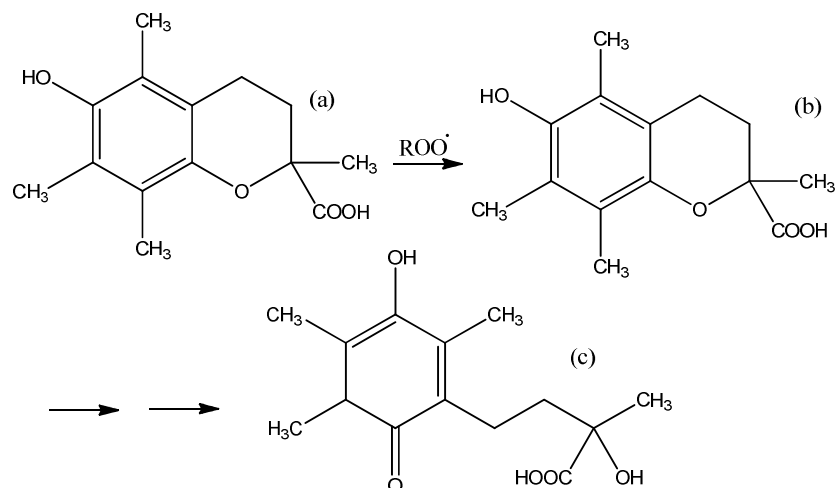


Figura 9. Estructura química del Trólox y sus productos de oxidación⁵⁷

3.5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se han desarrollado varios métodos espectrofotométricos para la determinación del potencial antioxidante de diferentes sistemas bioquímicos. Estos métodos son de rápida aplicación, escasa manipulación de material biológico y bajas necesidades instrumentales, por lo que su aplicación es en la mayoría de los casos sencilla^{3, 47}. La eficacia antioxidante de las muestras analizadas se compara con patrones conocidos como ácido ascórbico o Trólox. Algunos utilizan el retraso en la oxidación como parámetro de la actividad antioxidante, otros analizan la capacidad de captación del radical libre o reducción del ión metálico o catión radical. Los métodos que se mencionan a continuación son ampliamente usados en diferentes estudios de la capacidad antioxidante de sistemas biológicos (como plasma sanguíneo o tejidos), tanto de extractos y compuestos aislados de especies vegetales como productos derivados de procesos industriales^{7, 24, 50, 58, 64-66}.

3.5.1 Método del DPPH

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (α, α -difenil- β -picril-hidrazilo), DPPH se caracteriza por ser un radical libre estable en virtud de la deslocalización de un electrón sobre toda la estructura molecular, de modo que ésta no dimeriza, como sería el caso de la mayoría de los radicales libres⁵¹. Es poco soluble en agua, por lo que para los análisis antioxidantes se preparan soluciones en etanol ó metanol. El primero en utilizar el método de DPPH fue Marsden Blois en 1958⁶⁷, utilizando la cisteína como modelo antioxidante, y actualmente se aplica la metodología descrita por Brand-Williams en el año 1955⁵⁰, y en la que se emplea una solución del radical DPPH en metanol.

La evaluación de la capacidad antioxidante por este método proporciona información sobre la reactividad de los compuestos antioxidantes con un radical libre^{2, 3, 24}. Este método se basa en la reducción del radical DPPH* al reaccionar con los antioxidantes presentes en la muestra (Figura 10)^{24, 68}. El radical DPPH genera una fuerte banda de absorción a 517 nm en la región visible y cuando el electrón desapareado del radical se aparea con un electrón o un radical hidrógeno del compuesto antioxidante, la absorción disminuye, pasando la solución de un color violeta a un color amarillo claro debido a la presencia del grupo picriilo. El grado de disminución en la absorbancia es una medida del poder antioxidante de los extractos vegetales que contienen los compuestos antioxidantes^{68, 69}.

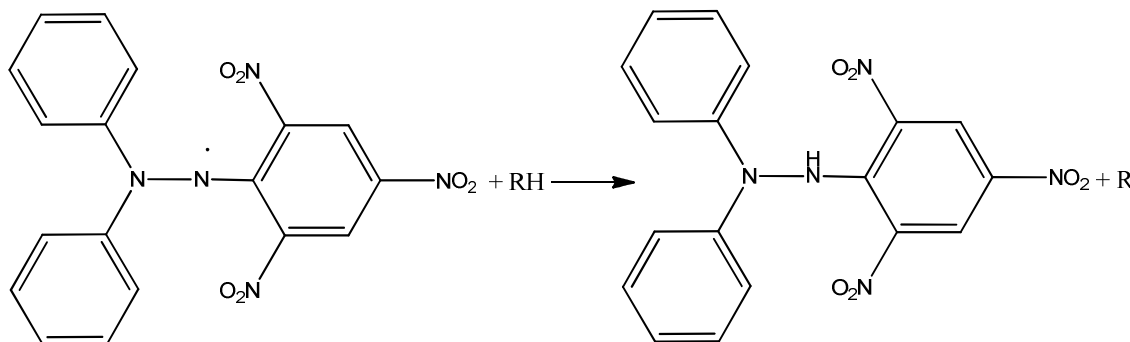


Figura 10. Reacción entre el DPPH y un compuesto antioxidante RH

Éste método colorimétrico, es aplicable para antioxidantes liposolubles e hidrosolubles, y para determinar el grado en que el antioxidante logra reducirse, se determina el parámetro EC_{50} (Concentración efectiva al 50 %), que indica la cantidad de antioxidante necesaria para reducir el 50% de los radicales presentes en la solución. Los tiempos de reacción son variables dependiendo de la naturaleza de los antioxidantes^{2, 68}. En particular, las moléculas pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen aparentemente una mayor actividad antioxidante por este método^{2, 68, 69}. En general la reacción puede medirse en un intervalo de tiempo de 2 a 15 minutos, en el que se espera que la mayoría de sustancias antioxidantes completen la reacción con el DPPH. Transcurrido este tiempo, se puede hacer seguimiento de la reacción en intervalos de 5 minutos hasta que las variaciones de absorbancia estén cercanas a 0.003/minuto, lo cual indica que la reacción ha terminado^{65, 69, 70}.

3.5.2 Método del ABTS

El método del ABTS, recibe su nombre por el compuesto 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolína-6-sulfónato), también se le conoce como ensayo TEAC, por sus siglas en inglés “Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”^{2, 3}. Se basa en la inhibición por los antioxidantes del radical catiónico verde-azulado $ABTS^{+}$ [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazolina-6-sulphonato)] que se genera por reacción directa con persulfato de potasio; presenta una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie de máximos de absorción secundarios a 645, 660, 734, 815 y 820 nm^{2, 68, 69}. Como patrón se emplea el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trólox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E^{2, 22, 66, 68}.

Dependiendo de la variante del método utilizada se emplean distintas longitudes de onda, aunque las más frecuentes son 415 y 734 nm. Para su desarrollo se suelen emplear dos estrategias; inhibición y decoloración^{2, 66, 68}.

El método original emplea metamioglobina y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para generar ferrilmioglobina, la cual reacciona con el ABTS para producir el radical $ABTS^{+}$, la muestra a analizar se añade antes de la formación del $ABTS^{+}$, constituyéndose en un ensayo de inhibición⁷¹. Este orden de adición de los reactivos ha hecho que el método sea criticado, ya que posibles interferencias de los antioxidantes con el sistema de generación de radicales puede llevar a una estimación de los valores de actividad antioxidante por debajo de los reales⁵². La modificación que propone Re *et al* en 1999 de este método⁶⁶ implica la producción directa del cromóforo azul/verde $ABTS^{+}$ por la reacción entre ABTS y

peroxodisulfato de potasio. La adición de antioxidantes al catión preformado en el medio de reacción convierte esta técnica en una estrategia de decoloración. El grado de decoloración se puede medir a diferentes longitudes de onda, como se ha comentado, siendo la habitual la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm, e indica el porcentaje de inhibición del radical $ABTS^{+}$ como capacidad de reducción del antioxidante. Este porcentaje de inhibición determina la actividad antioxidante como función de la concentración y del tiempo, en comparación con la reactividad relativa del patrón estándar, Trólox, bajo las mismas condiciones. Este método espectrofotométrico es válido para el estudio de antioxidantes hidrofílicos, lipofílicos o sanguíneos, compuestos puros y extractos alimentarios⁷². En la figura 11 se muestra el mecanismo de reacción general entre el radical $ABTS^{+}$ y un antioxidante⁶⁶.

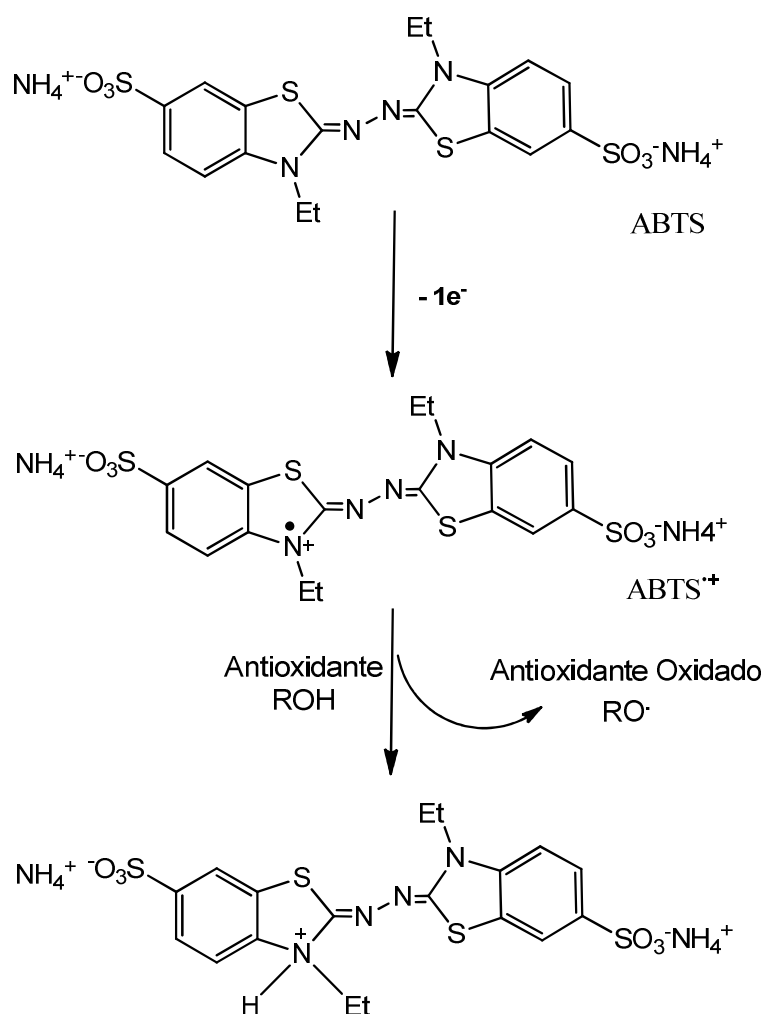


Figura 11. Reacción entre el $ABTS^{+}$ y un compuesto antioxidante (ROH)⁶⁶.

3.6 MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU (DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES)

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes^{2, 73, 74}. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene ácido fosfomolibdico y fosfotungstico,

en el que el molibdeno se encuentra con estado de oxidación VI (coloración amarilla: Complejo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); el compuesto reacciona con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico^{74, 75}. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno y molibdeno $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula^{2, 73-75}. El contenido de fenoles totales es cuantificado por espectrofotometría, a una longitud de onda de 760 nm, con base a una curva de calibración con patrón de ácido gálico^{73, 74, 76}. En la figura 12 se observa la reacción general del ácido gálico con molibdeno, componente del reactivo de Folin-Ciocalteu.

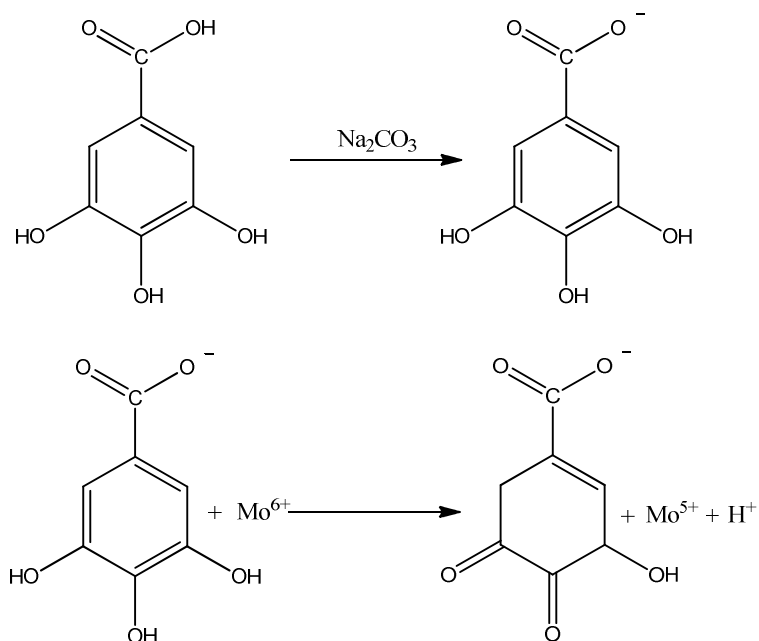


Figura 12. Reacción del ácido gálico con molibdeno, componente del reactivo de Folin-Ciocalteu⁷⁴

Este método se emplea con frecuencia para el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos y extractos procedentes de plantas, al tratarse de un parámetro que generalmente muestra una estrechacorrelación con diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante, principalmente con los métodos del DPPH y ABTS^{77, 78}. Así, cuando se evalúan las propiedades antioxidantes, el análisis de fenoles totales constituye un método complementario al análisis cromatográfico de los principales grupos de compuestos fenólicos que caracterizan a cada variedad de productos de origen natural, a la vez que proporciona información valiosa a la hora de seleccionar aquellas con mayor potencial antioxidante.

4 METODOLOGÍA

4.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS

En el desarrollo del proceso investigativo, enmarcado en la evaluación de la actividad antioxidante en el extracto etanólico del cadillo (*Pavonia sepioides*), se utilizaron los equipos, reactivos y solventes grado analítico, mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Lista de reactivos y equipos

REACTIVOS	Magnesio Ácido clorhídrico concentrado (37%) Ácido pícrico Etanol 96% Hidróxido de sodio Cloruro férrico Ácido sulfúrico Concentrado Anhídrido acético Cloroformo Sulfato ferroso Ácido acético glacial Ácido nítrico concentrado (66%) Yoduro de potasio Nitrato de bismuto pentahidratado Metanol (Grado HPLC) Hidróxido de amonio Cloruro de mercurio Hidróxido de potasio	Ácido 3,5-dinitrobenzónico m-dinitrobenceno Tricloruro de antimonio Gelatina Merck Vainillina Ácido tartárico Ácido bórico 2,2-difenil-1-picrilhidracilo Butilhidroxitolueno Vitamina E 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6sulfonato Ácido ascórbico Persulfato de potasio Trolox Ácido gálico Reactivo de Folin-Ciocalteu Carbonato de sodio
EQUIPOS	Espectrofotómetro ultravioleta visible GENESIS 6 Equipo agitador vortex Thermolyne Balanza analítica Rota evaporador Buchi Watherbath B-480 Bomba de vacío	Plancha de calentamiento y agitación Lámpara ultravioleta UV GL-58 handheld 254/365nm Campana de extracción Estufa con control de temperatura

4.2 UBICACIÓN GEOGRAFICA

La planta del cadillo se colectó en el municipio de Popayán, Vereda Belén, sector alterno vía al municipio de Pitalito/Huila, altura de 1860 m.s.n.m, con una temperatura que oscila entre los 12.3°C y 25.7°C, entre los 02°26'260'' de latitud norte y 076°36'01.7'' de longitud oeste, E: 16°. Su clima predominantemente es frío y presenta un régimen pluviométrico bimodal, con un nivel anual de lluvias medias de 2119.4 mm⁷⁹.

4.3 RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA

La recolección de las hojas se realizó de forma manual, tomando aquellas que no presenten signos de deterioro significativo (Ejemplar de herbario 01-CAUP). Seguidamente se sometieron a secado a 40 °C en una estufa con control de temperatura y se almacenaron en bolsas plásticas para los análisis pertinentes.

4.4 EXTRACCIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DEL CADILLO PARA EL ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA

4.4.1 Extracción Soxhlet

El procedimiento de extracción se realizó en un equipo Soxhlet, según se muestra en la figura 13(a), tomando 82.4868 g de las muestras de hojas de cadillosecas⁷⁰. Previo a la extracción se realizó la rectificación del etanol a utilizar por medio de una destilación fraccionada según se muestra en la figura 13 (b). Culminada la extracción, se dejó enfriar el extracto etanólico total (ET) a temperatura ambiente y se filtró a través de un papel filtro Whatman, con el propósito de eliminar restos de sólidos procedentes del material vegetal. El ET se llevó a sequedad en un equipo rotaevaporador según se muestra en la figura 13(c), y se

almacenó en un recipiente ámbar, recubierto de papel aluminio. El recipiente se conservó en refrigeración a 4°C.

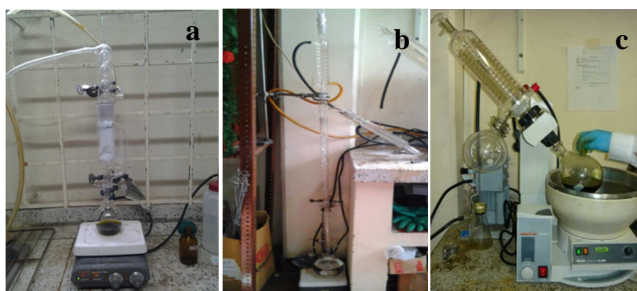


Figura 13. a). Montaje de Extracción Soxhlet. b) Sistema de destilación fraccionada para purificación del etanol. c) Montaje para rota evaporación de ET de *Pavonia sepioides*

4.4.2 Extracción líquido-líquido

A partir del extracto etanólico total, llevado a sequedad, se realizó el procedimiento de fraccionamiento y extracción según se muestra en el Esquema 1⁷⁰. Para ello, se tomó 1g de ET al cual se adicionaron 30 mL de agua destilada (EC1). Se agitó vigorosamente en un equipo Vortex y se depositó en un embudo de separación.

Debido a que no hubo dilución total, se realizó la dilución del material no soluble con 10 mL de Hexano, que se adicionaron posteriormente al embudo de separación. Se agitó suavemente la mezcla por un tiempo de 1.5 minutos y se dejó reposar por 2 minutos observándose la separación de dos fases. La fase orgánica se separó y se almacenó en un recipiente ámbar.

El procedimiento se realizó dos veces más con 10 mL de hexano (método de extracciones sucesivas), se mezclaron las fracciones en hexano (Fhx) y el extracto acuoso crudo (EC2), fue sucesivamente particionado con diclorometano y acetato de etilo (de igual forma a la partición con hexano), obteniéndose la fracción en diclorometano (Fdc), la fracción en acetato de etilo (Fae) y la fracción acuosa (Fac) respectivamente (Figura 14).

Cada una de las fracciones obtenidas se llevó a sequedad y se almacenó a una temperatura de 4°C. A partir de las fracciones obtenidas y el ET, se prepararon soluciones madre de 1000µg/mL para los análisis de actividad antioxidante y determinación de CFT.

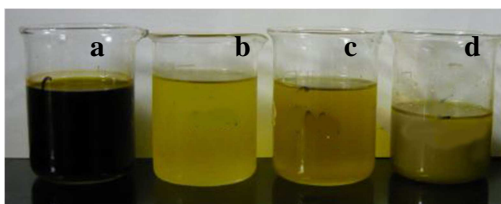
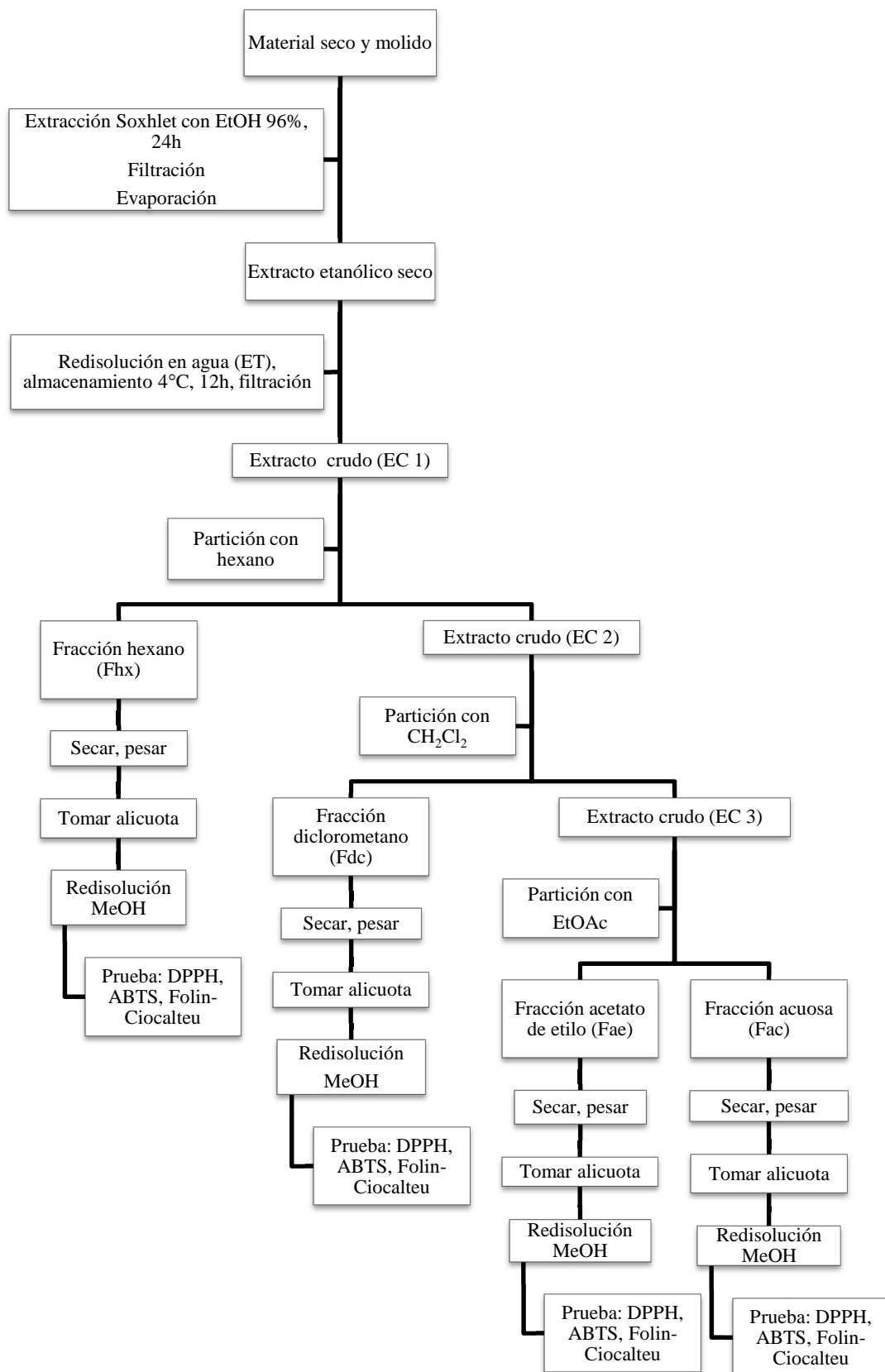


Figura 14. Fracciones obtenidas por ELL: a)Fhx, b)Fdc, c)Fae, d)Fac



Esquema 1. Procedimiento de extracción y fraccionamiento del extracto etanólico del cadillo⁷⁰

4.4.3 Tamizaje Fitoquímico

Las pruebas para la determinación de metabolitos secundarios se realizaron siguiendo la metodología clásica^{80, 81}, según se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Pruebas para identificar los núcleos de metabolitos secundarios presentes en el extracto total, según la literatura clásica.

METABOLITO	ENSAYO	METABOLITO	ENSAYO
ALCALOIDES	Reacción en tubo <ul style="list-style-type: none"> • Dragendorff * • Mayer • Wagner 	TANINOS	Reacción en tubo <ul style="list-style-type: none"> • Ensayo con cloruro férrico • Solución de gelatina • Solución de gelatina y sal • Solución salina
CARDIOTÓNICOS (Ensayo por TLC con revelador de SbCl ₃)	Reacción en tubo <ul style="list-style-type: none"> • Reactivo de Baljet * • Reactivo de Kedde * • Reactivo de Raymond-Marthoud * • Reactivo de Keller – Kiliani • Reactivo de Liebermann – Burchard • Reactivo de Salkowski 	SAPONINAS	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de espuma • Análisis por TLC: reactivo vainillina - ácido sulfúrico
CUMARINAS VOLÁTILES	<ul style="list-style-type: none"> • Volátiles en papel impregnado con NaOH (observación UV) • Análisis por TLC: Tolueno: Éter (1:1), saturado con ácido acético 10% 	TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	<ul style="list-style-type: none"> • Liebermann - Burchard • Salkowski • Análisis por TLC: Benceno: Acetato de etilo (86:14)
FLAVONOIDES	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo con Mg y HCl • Análisis por TLC: Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: Agua (100:11:11:27) 	DERIVADOS ANTRACÉNICOS LIBRES	<ul style="list-style-type: none"> • Reacción Bomtraeger • Análisis por TLC: Acetato de etilo: metanol: agua (40:40:20)

*: Análisis por TLC

4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DEL CADILLO: ACTIVIDAD ATRAPADORA “IN VITRO” DE RADICALES LIBRES

4.5.1 Ensayo de decoloración del Radical DPPH

Se aplicó la metodología reportada en la literatura⁷⁰, con algunas modificaciones. La disolución metanólica del radical DPPH se preparó disolviendo 2.9 mg de DPPH en 100 mL de metanol, el valor de absorbancia se ajustó en 0.800 ± 0.03 ($\lambda = 515$ nm). La concentración

exacta de la disolución se calculó por interpolación del valor de la absorbancia en una recta de calibración preparada con la solución del radical DPPH^{*}, en un rango de concentraciones de 2x10⁻⁵ M - 8x10⁻⁵ M.

El análisis de muestras (figura 15) se realizó de la siguiente manera: 2,4 mL de solución metanólica del radical DPPH^{*}, se mezcló en una cubeta de plástico desechable con 1,2 mL de disolución metanólica de la muestra a evaluar (concentraciones de 10-1000 µg/mL), se agitó y mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad hasta efectuar la medida de absorbancia en un espectrofotómetro a 515 nm (figura 17 (b)). Las medidas se tomaron transcurridos 15 minutos de reacción. Se desarrollo el mismo procedimiento para el análisis de los patrones antioxidantes BHT, ácido ascórbico y DL- α -tocoferol.

El cálculo de la capacidad atrapadora de radicales libres por el método de DPPH, expresado como porcentaje de decoloración del radical en presencia del extracto etanólico total y las respectivas fracciones purificadas de la planta (análisis por triplicado), se realizó empleando la ecuación 1:

$$\% \text{ decoloración} = \left(1 - \frac{\text{abs muestra}}{\text{abs control}} \right) \times 100 \text{(Ec:1)}$$



Figura 15. Análisis de AAO por el método del DPPH. a) Toma de muestras, b) Adición del radical DPPH^{*}, c) Incubación de muestras

4.5.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

La actividad antioxidante de los extractos y fracciones purificadas se midió como la capacidad de captura del catión radical ABTS, siguiendo una ligera modificación del método reportado en la literatura⁶⁶.

Se preparó la disolución en buffer fosfato (pH 7,4) del radical catión ABTS^{•+} por reacción de 50 mL de una disolución de ABTS en PBS (2 mM) con 200 µL de disolución de K₂S₂O₈ en agua deionizada (70 mM), la mezcla permaneció en oscuridad y a temperatura ambiente durante 16-17 horas antes de ser usada (Figura 16). La disolución de ABTS^{•+} preparada se diluyó con buffer hasta ajustar el valor de la absorbancia a 0.800 ± 0.03 ($\lambda = 734$ nm). En la figura 17 (a) se muestran los máximos de absorción del radical de interés. El buffer de fosfato se obtuvo por disolución de 205 mg de NaCl, 6,5 mg de KH₂PO₄, 35 mg de Na₂HPO₄ y 3,5 mg de KCl en 0,25 L de agua deionizada.

El análisis de muestras se realizó de la siguiente manera: 950 µL de una solución en PBS (tampón fosfato, pH = 7.4) del radical catión ABTS^{•+} se mezcló en una celda de plástico desechable con 50 µL de una solución metanólica de la muestra a evaluar (concentración de 5-250 µg/mL), se agitó e incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5 minutos y

se registró el valor de absorbancia en el espectrofotómetro a 734 nm. El blanco se preparó a partir de 950 μL de disolución en PBS de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ y 50 μL de PBS. Se desarrollo el mismo procedimiento para el análisis de los patrones antioxidantes BHT, ácido ascórbico y DL- α -tocoferol.

Se preparó una curva de calibración con Trólox 5mM (0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 μM), se tomó 950 μL del reactivo catión radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ y se adicionó 50 μL de las soluciones preparadas previamente, se agitó e incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 734 nm. La capacidad captadora de radicales libres (porcentaje de inhibición) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - [(A_{fe} - A_{be}) - (A_{ie} - A_{be})]}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (\text{Ec: 2})$$

Donde:

- A_{control} : Absorbancia del control
- A_{ie} : Absorbancia inicial
- A_{fe} : Absorbancia final
- A_{be} : Absorbancia del blanco de los extractos

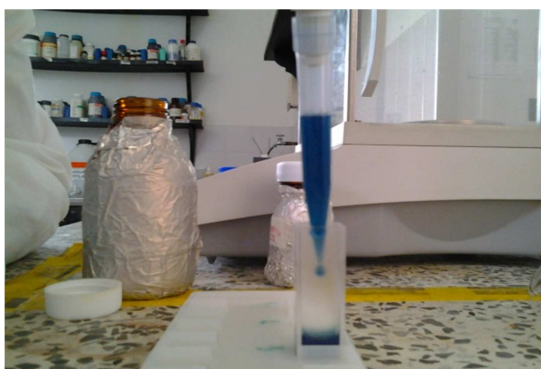


Figura 16. Catión radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ en buffer fosfatos a pH 7.4

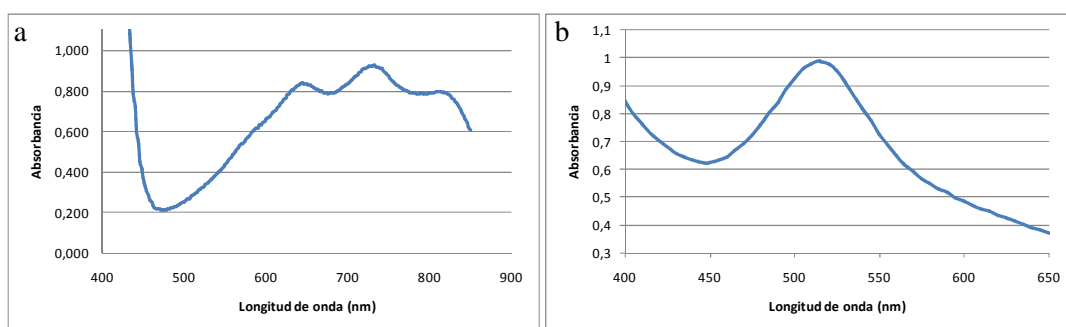


Figura 17. Máximos de absorción del catión radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ (a) y del radical DPPH^{\cdot} (b).

Los resultados obtenidos a partir del análisis por el método de ABTS se expresaron en valor TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*). El valor TEAC se determinó por medio de la curva de calibración con el estándar Trólox, para lo cual se realizó un gráfico de absorbancia contra concentración (ppm) y se realizó el análisis por regresión lineal, realizando los cálculos según se expresa mediante las ecuaciones 3 y 4.

$$A_{trolox} = m * [trolox] \text{ (Ec: 3)}$$

$$TEAC_{extracto} = \frac{A_{extracto}}{m} * d \text{ (Ec: 4)}$$

Donde

- m= Pendiente de la curva estándar
- [Trólox]= Concentración de Trólox
- d= Factor de dilución

4.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENÓLES TOTALES

4.6.1 Ensayo de Folin-Ciocalteu

El contenido de fenoles totales (CFT) en el extracto etanólico de la planta y cada una de sus fracciones se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, empleando ácido gálico como estándar de un compuesto fenólico⁷⁶. Una curva de calibración se preparó con soluciones metanólicas de estándar de diferente concentración (15-75 µg/mL), y el valor de absorbancia se registró en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

Los análisis de muestras se realizaron de la siguiente manera: 2 mL de solución acuosa de reactivo de Folin-Ciocalteu (0,2 equiv L⁻¹) y 0,4 mL de solución metanólica del extracto, en un rango de concentración de 100 a 1000 µg/mL, se mezclaron e incubaron por 5 minutos en la oscuridad. Posteriormente se adicionó 1,6 mL de solución acuosa de carbonato de sodio (75 g/L), se agitó e incubó en la oscuridad por una hora y se registró el valor de absorbancia a 760 nm.

El contenido de compuestos fenólicos se expresó como miligramos de ácido gálico por gramo en peso seco de extracto. El cálculo se realizó usando la ecuación 5:

$$C = \frac{c \times V}{m} \text{ (Ec: 5)}$$

Donde *c* es la concentración de ácido gálico (µg/mL) en el extracto (Establecida por regresión lineal), *V* es el volumen en mL del extracto y *m* es el peso seco en gramos del extracto etanólico de la planta.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL CADILLO

La extracción Soxhlet se constituye en una herramienta principal para la obtención de extractos alcohólicos a partir de muestras vegetales, como en el caso de la planta estudiada. Transcurridas las dieciséis(16) horas de extracción se obtuvo el extracto etanólico total (ET) del cadillo, que fue concentrado en un equipo rotaevaporador hasta obtener el extracto seco.

Con el propósito de determinar la naturaleza, polar o apolar, de los posibles metabolitos responsables de la actividad antioxidante, se realizó el fraccionamiento de una alícuota de ET (reconstituida en agua) con solventes de diferente polaridad(hexano, diclorometano y acetato de etilo). Los porcentajes de extracción se muestran en la tabla 5. Los niveles de material extractable a partir de cada una de las fracciones con los diferentes solventes mostraron variabilidad, así, los rendimientos expresados en porcentaje en peso con respecto al material vegetal seco fueron de 32.4%, 0.93%, 15.61% y 51.21% para Fhx, Fdc, Fae y Fac respectivamente. En la figura18 se representan los porcentajes de extracción para cada una de las fracciones.

Tabla 5. Porcentaje de rendimiento en el fraccionamiento de ET con diferentes solventes.

Fracción	muestra (g)	porcentaje
ET	1,0012	100,00
Fhx	0,3228	32,24
Fdc	0,0093	0,93
Fae	0,1563	15,61
Fac	0,5127	51,21
% Sólidos totales		9,66
% humedad		76,8

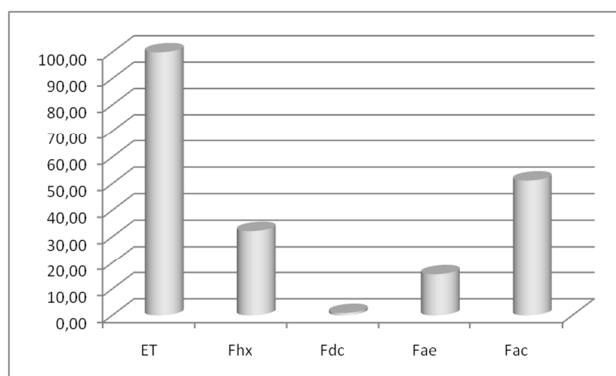


Figura 18. Representación de los porcentajes de extracción en el fraccionamiento de ET con diferentes solventes

5.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico, constituido en una herramienta fundamental en el estudio de productos químicos de origen natural, permitió dar una primer apreciación sobre los posibles tipos de compuestos presentes en *Pavonia sepiodes*. De las pruebas efectuadas para determinar cualitativamente la presencia de algunos metabolitos secundarios, constituidas principalmente en pruebas colorimétricas, se logró identificar la presencia de flavonoides, cumarinas, cardiotónicos y triterpenos y esteroides. Los resultados de este procedimiento se resumen en la tabla 6.

Con base en el objetivo principal de la propuesta investigativa, enmarcada en la evaluación de la actividad antioxidante de la planta, se puede prever que la presencia de dicha actividad puede estar asociada a estos compuestos, principalmente a aquellos de naturaleza fenólica como lo son los flavonoides. Pese a que no se encuentran reportes científicos en esta especie, diferentes autores^{2, 16, 22}, concluyen que la AO está asociada a este tipo de metabolitos. De igual manera, y acorde a la naturaleza polar de cada uno de ellos, se puede prever su presencia en las fracciones con mayor carácter polar como lo es el caso de Fac.

Tabla 6. Resultados obtenidos a partir de tamizaje fitoquímico. * con tratamiento químico, ** sin tratamiento químico

GRUPO FUNCIONAL	ENSAYO (Reacción en tubo y/o análisis por TLC)	RESULTADO	
ALCALOIDES	Dragendorff	-	
	Mayer	-	
	Wagner	-	
CARDIOTÓNICOS (Ensayo por TLC con SbCl ₃ - positivo)	Reactivo de Baljet	-	
	Reactivo de Kedde	-	
	Reactivo de Raymond-Marthoud	-	
	Reactivo de Keller - Kiliani	+	
	Reactivo de Liebermann - Burchard	-	
	Reactivo de salkowski	+ (Núcleo esteroideal)	
CUMARINAS VOLÁTILES	Volátiles en papel impregnado con NaOH (Observación UV)	+	
	TLC: Tolueno/eter 1.1, saturado con ácido acético 10%	+	
FLAVONOIDES	Ensayo con Mg y HCl	-	
	Análisis POR TLC	**	UV 254 nm: + UV 365 nm: +
		*Reactivo citrobórico	+
TANINOS	Ensayo con cloruro férrico	-	
	Solución de gelatina	-	
	Solución de gelatina y sal	-	
	Solución salina	-	
SAPONINAS	Formación de espuma y análisis por tlc con reactivo Vainillina-ácido sulfúrico	-	
TRITERPENOS Y ESTEROIDES	Liebermann - Burchard	+	
	Salkowski	+	
	TLC: benceno/acetato de etilo (86/14)	+	
DERIVADOS ANTRACÉNICOS LIBRES	Reacción Bomtraeger	-	
	TLC	*	-
		**	-

5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.3.1 MÉTODO DEL DPPH

Se determinó la capacidad de captura del radical libre DPPH, evaluando cada extracto y cada control a concentraciones diferentes, según la metodología explicada previamente. La implementación del método del DPPH para evaluar la AAO en el extracto del cadillo, se constituyó en una herramienta de gran utilidad para cumplir este objetivo. La concentración inicial del radical DPPH^{*} (30.1 ppm \pm 0,3) en el medio de reacción se calculó por interpolación a partir de la curva de calibración con soluciones de diferente concentración de DPPH^{*}, en un rango de concentración de 8-30 μ g/mL (Figura 19).

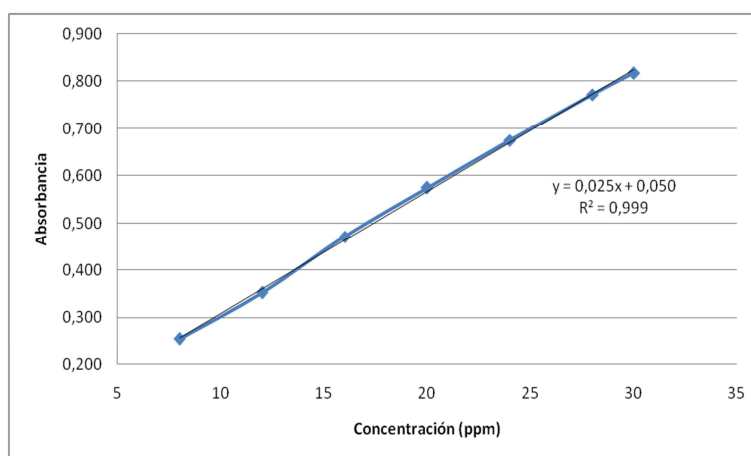


Figura 19. Curva de calibración del radical DPPH^{*}

A partir del valor de absorbancia obtenido para ET y cada una de las fracciones purificadas, y tomando datos promedio para cada ensayo, se encontró el porcentaje de inhibición y el DPPH remanente, es decir, la cantidad de DPPH que no reaccionó con los compuestos antioxidantes en cada una de las muestras. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Se observó que la absorbancia es menor para niveles de concentración mayores de cada una de las muestras, debido a que se encuentran más concentrados los compuestos AO que pueden donar un electrón al radical DPPH^{*}, lo que genera disminuciones en el valor de absorbancia producto de su inhibición. En este caso se debe considerar que la disminución de la absorbancia dependerá de la actividad antirradicalaria del antioxidante, así como también de la velocidad de reacción del DPPH^{*} y el mismo AO. De acuerdo a lo anterior se observó una disminución en el valor del PI y un aumento en los valores de DPPH remanente con la disminución de la concentración de las muestras estudiadas.

Al representar el valor de DPPH remanente contra concentración se logró determinar la concentración efectiva en la que se inhibe el 50% del radical formado, parámetro denominado EC₅₀. A partir de los valores obtenidos para cada una de las muestras, se linealizó y halló la ecuación de la recta. Reemplazando en Y el valor por 50%, se determinó cada uno ellos. Los resultados también se expresaron como capacidad antioxidante en equivalentes Trólox o TEAC por sus siglas en inglés "*Trólox equivalent antioxidant capacity*", para ello, se extrapoló el valor de absorbancia en una curva de calibración con Trólox como antioxidante de referencia (figura 20) y se expresaron los valores como TEAC mg Trólox/ g de extracto para las muestras y para los patrones se expresaron como TEAC mg/g de sustancia utilizada. El patrón de referencia

trólox presentó una linealidad de 0,994 en un rango de concentración de 5-30 ppm. Los resultados se reportan en la tabla 8 y las figuras se muestran en los anexos 1-5,11.

Tabla 7. Resultados experimentales obtenidos para las muestras de *Pavonia sepiodes* y los patrones antioxidantes por el método del DPPH

[ppm]	Abs	SD	CV	PI	DPPH rem	[ppm]	Abs prom	SD	CV
ET					TRÓLOX				
300	0,200	0,00100	0,500	64,91	28,85	30	0,093	0,0009	0,948
250	0,221	0,00058	0,261	61,17	32,95	20	0,198	0,0010	0,505
200	0,255	0,00058	0,226	55,20	39,49	15	0,264	0,0012	0,438
150	0,286	0,00100	0,350	49,82	45,38	10	0,327	0,0006	0,176
100	0,314	0,00100	0,318	44,91	50,77	5	0,404	0,0017	0,429
50	0,341	0,00058	0,169	40,12	56,03	DL-α-TOCOFEROL			
Fhx					40	0,090	0,0010	1,111	
300	0,225	0,0006	0,256	60,47	33,72	30	0,183	0,0012	0,632
250	0,262	0,0010	0,382	54,04	40,77	20	0,298	0,0012	0,388
200	0,296	0,0015	0,515	48,01	47,37	15	0,371	0,0006	0,156
150	0,331	0,0006	0,174	41,87	54,10	10	0,443	0,0015	0,345
100	0,370	0,0010	0,270	35,09	61,54	5	0,497	0,0074	1,484
50	0,419	0,0010	0,239	26,49	70,96	ÁCIDO ASCÓRBICO			
Fdc					30	0,091	0,0032	3,520	
80	0,287	0,0006	0,201	49,59	45,64	20	0,286	0,0120	4,196
60	0,303	0,0020	0,660	46,84	48,65	15	0,375	0,0015	0,408
40	0,318	0,0010	0,314	44,21	51,54	10	0,479	0,0015	0,319
20	0,336	0,0025	0,748	40,99	55,06	5	0,561	0,0015	0,272
10	0,344	0,0015	0,444	39,59	56,60	BHT			
5	0,351	0,0000	0,000	38,42	57,88	100	0,304	0,0003	0,110
Fac					80	0,345	0,0015	0,443	
80	0,292	0,0012	0,396	48,83	46,47	60	0,401	0,0002	0,048
60	0,305	0,0006	0,190	46,55	48,97	40	0,456	0,0052	1,140
40	0,315	0,0006	0,183	44,68	51,03	20	0,507	0,0044	0,860
20	0,328	0,0012	0,352	42,40	53,53	10	0,525	0,0037	0,703
10	0,336	0,0010	0,298	41,05	55,00	CURVA DE CALIBRACIÓN CON DPPH			
5	0,342	0,0006	0,169	40,06	56,09	30	0,818	0,0000	0,000
Fac					28	0,772	0,0025	0,326	
100	0,273	0,0021	0,762	52,05	42,95	24	0,675	0,0015	0,226
90	0,279	0,0025	0,903	51,11	43,97	20	0,575	0,0015	0,266
70	0,289	0,0015	0,529	49,36	45,90	16	0,471	0,0057	1,220
50	0,298	0,0010	0,336	47,72	47,69	12	0,352	0,0036	1,013
30	0,307	0,0010	0,326	46,14	49,42	8	0,255	0,0010	0,399
10	0,317	0,0010	0,315	44,39	51,35				

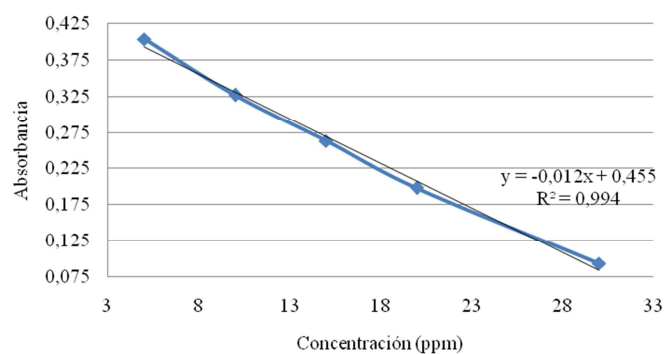


Figura 20. Representación de la absorbancia del radical DPPH* en función de la concentración de trolox

Tabla 8. Valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por el método del DPPH

MUESTRA	TEAC mg Trolox/g extracto	EC ₅₀ (µg/mL)
ET	21,2±0,8	105±01
Fhx	2,4±0,3	185,3±0,3
Fdc	2,2±0,9	51,7±0,9
Fae	0,37±0,02	51 ±01
Fac	27,2±0,4	24,6±0,4
Ác.ascórbico	8,5±0,1*	18,6±0,1
α -Tocoferol	11,7±0,1*	20,4±0,1
BHT	4,2±0,1*	96,2±0,1

*Valor TEAC mg Trolox/g de sustancia

En las fracciones de ET purificadas se encontró un mayor valor EC₅₀ para Fhx de 105±01 µg/mL y un menor valor para Fac de 24.6±0.4 µg/mL. Fdc y Fae mostraron valores intermedios de 51.7±0.9 µg/mL y 51±01 µg/mL respectivamente. La eficiencia antioxidante de estas fracciones las determina la menor concentración capaz de inhibir el 50% del radical en un tiempo determinado. Resulta interesante destacar que la fracción polar Fac, por la naturaleza del tipo de compuestos que contiene, sea quien presente la mayor actividad en comparación con las demás, y particularmente con Fhx, que contiene sustancias de naturaleza hidrofóbica principalmente. Aunque el extracto ET de la planta presenta un valor de EC₅₀ mayor en comparación con las fracciones purificadas (105±01), se puede destacar que en él se encuentran menos concentrados los compuestos responsables de dicha actividad y pueden presentarse efectos sinérgicos que contribuyan a la misma. Los valores TEAC presentaron un comportamiento similar a los de concentración efectiva, siendo mayores para Fac y ET (27,2±0,4 y 21,2±0,8 respectivamente). El menor valor TEAC lo mostró Fae constituyéndose en una fracción con bajo contenido de compuestos antioxidantes. Los patrones utilizados como referencia: BHT, ácido ascórbico y DL-α-tocoferol mostraron valores TEAC de 4.2±0.1, 8.5±0.1 y 11,7±0,1 respectivamente. La mejor respuesta antioxidante la mostró el BHT, cuya actividad puede estar asociada a un fenómeno de hiperconjugación en el radical fenoxilo formado en el proceso de transferencia del protón, debido a la naturaleza de los ter-butilos en posición orto al grupo OH, dándole una alta estabilidad al radical, lo que permite ceder el electrón con mayor facilidad para inhibir el radical DPPH*, además de considerar factores

estereoquímicos que favorecen el acercamiento al centro activo del radical^{49, 54}. En la figura 21 se representan los valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por este método.

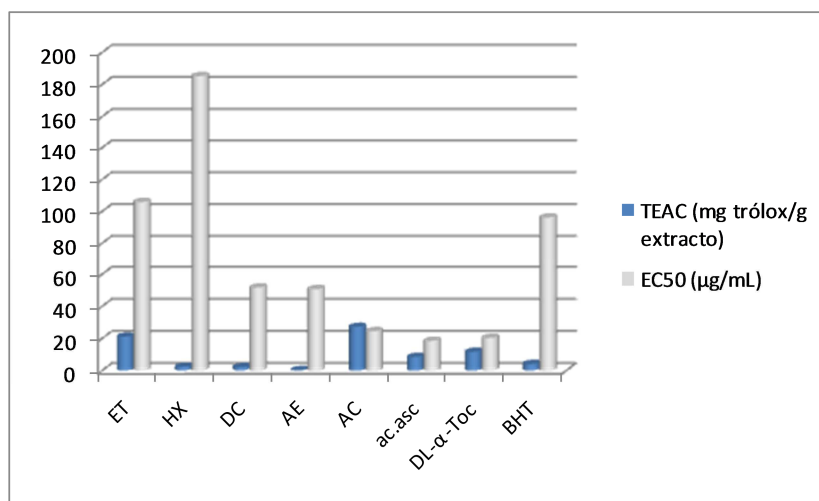


Figura 21. Representación de los valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por el método del DPPH

5.3.2 MÉTODO DEL ABTS

Se llevó a cabo la determinación de la actividad inhibidora del catión radical ABTS, evaluando cada uno de los extractos obtenidos y los controles a concentraciones diferentes, según la metodología explicada previamente, se realizó cada ensayo con 3 repeticiones cada uno.

En el método del catión-radical ABTS^{•+}, se midió la disminución de la absorbancia luego de cinco (5) minutos, después de iniciada la reacción. Inicialmente la solución del catión-radical presentó una coloración azul intensa que se fue atenuando a medida que transcurría el tiempo, como producto de la reacción con los antioxidantes presentes en la muestra problema. Así como para los datos obtenidos del ensayo con el radical DPPH, se tomaron los datos promedio para cada ensayo y con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición para las diferentes concentraciones de cada extracto evaluado, obteniéndose así los resultados para cada extracto.

La disminución en la intensidad de la coloración se vio reflejada en los valores de absorbancia, debido a que a mayores concentraciones de la muestra problema se observó mayor decoloración (tabla 9). Al determinar los porcentajes de inhibición se puede observar que a mayores concentraciones hay un mayor porcentaje de inhibición como producto de las mayores concentraciones de antioxidantes presentes en la muestra.

Al representar el porcentaje de inhibición de cada una de las muestras contra la concentración, se halló la ecuación de la recta y a partir de esta se determinó la concentración efectiva que inhibe el 50% del radical ABTS^{•+} en el medio de reacción. Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante en equivalentes trólox o TEAC, para ello, se extrapoló el valor de absorbancia en una curva de calibración con trólox como antioxidante de referencia (figura 22) y se expresaron los valores como TEAC mg trólox/g de extracto para las muestras y para los patrones se expresaron como TEAC mg trólox/g de sustancia utilizada. El patrón de referencia presentó una linealidad de 0,995 en un rango de concentraciones de 10-100 ppm. Los resultados se reportan en la tabla 10 y las figuras se muestran en los anexos 6-10,12.

Tabla 9. Resultados experimentales obtenidos para las muestras de Pavonia sepoides y los patrones antioxidantes por el método del ABTS

[ppm]	Abs	SD	CV	PI	[ppm]	Abs prom	SD	CV
ET					TRÓLOX			
250	0,286	0,00100	0,350	62,07	100	0,441	0,00000	0,000
100	0,414	0,00153	0,369	45,14	80	0,489	0,00117	0,239
50	0,457	0,00173	0,379	39,39	60	0,555	0,00252	0,453
10	0,489	0,00153	0,312	35,10	40	0,620	0,00100	0,161
5	0,502	0,00173	0,345	33,42	20	0,687	0,00448	0,653
Fhx					10	0,731	0,00534	0,730
DL-α-TOCOFEROL								
250	0,365	0,00200	0,548	51,59	100	0,507	0,00000	0,000
100	0,501	0,00153	0,305	33,60	80	0,561	0,00300	0,535
50	0,546	0,00577	1,058	27,63	60	0,594	0,00372	0,625
10	0,573	0,00252	0,439	24,05	40	0,660	0,00173	0,262
5	0,590	0,00208	0,353	21,71	20	0,706	0,00287	0,407
Fdc					10	0,730	0,00192	0,264
					ÁCIDO ASCÓRBICO			
250	0,223	0,00153	0,686	70,47	100	0,175	0,00000	0,000
100	0,343	0,00153	0,445	54,47	80	0,306	0,00058	0,189
50	0,390	0,00153	0,391	48,23	60	0,401	0,00153	0,381
10	0,421	0,00153	0,363	44,12	40	0,536	0,00115	0,215
5	0,437	0,00100	0,229	42,04	20	0,666	0,00115	0,173
Fae					10	0,704	0,00084	0,119
					BHT			
250	0,217	0,00115	0,531	71,18	100	0,334	0,00252	0,754
100	0,336	0,00100	0,298	55,44	80	0,419	0,00250	0,598
50	0,385	0,00115	0,300	48,89	60	0,489	0,00483	0,988
10	0,418	0,00115	0,276	44,61	40	0,561	0,00115	0,206
5	0,433	0,00058	0,133	42,53	20	0,646	0,00208	0,322
Fac					10	0,700	0,00551	0,786
250	0,192	0,00100	0,521	74,54				
100	0,312	0,00153	0,490	58,66				
50	0,361	0,00153	0,423	52,08				
10	0,393	0,00100	0,254	47,88				
5	0,409	0,00100	0,244	45,76				

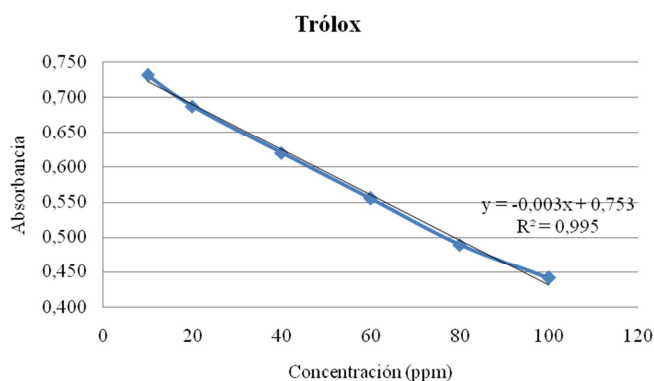


Figura 22. Representación de la absorbancia del radical catión ABTS^{•+} en función de la concentración de trólox.

Tabla 10. Valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por el método del ABTS

MUESTRA	TEAC mg Trólox/g extracto	EC ₅₀ (µg/mL)
ET	38,9±0,4	144,7±0,4
Fhx	8,8±0,3	238,4±0,3
Fdc	11,3±0,6	66,6±0,6
Fae	4,6±0,5	61,1±0,5
Fac	26,11±0,3	32,8±0,3
Ác.ascórbico	84,3±0,1*	62,4±0,1
α -Tocoferol	27,1±0,1*	142,7±0,1
BHT	59,8±0,1*	88,8±0,1

*Valor TEAC mg Trólox/g de sustancia

En las fracciones de ET purificadas se encontró un mayor EC₅₀ para Fhx de 238.4±0.3 µg/mL y un menor valor para Fac de 32.8±0.3 µg/mL. Fdc y Fae mostraron EC₅₀ intermedios de 66.6±0.6 µg/mL y 61.1±0.5 µg/mL respectivamente. Al igual que los resultados obtenidos por el método del DPPH, la fracción polar Fac presenta la mayor actividad en comparación con las demás fracciones, y particularmente en comparación con Fhx. El extracto total de la planta presentó un valor EC₅₀ de 144.7±0.4. Los valores TEAC presentaron un comportamiento similar a los reportados para la EC₅₀, siendo mayores para ET y Fac (38.9±0.4 y 26,11±0,3 respectivamente). El menor valor TEAC, 4,6±0,5, lo mostró Fae constituyéndose en una fracción con bajo contenido de compuestos antioxidantes, en acuerdo a los resultados del método del DPPH. Los patrones utilizados como referencia: BHT, ácido ascórbico y DL-α-tocoferol mostraron valores TEAC de 59.8±0.1, 84.3±0.1 y 27,1±0,1 respectivamente. En la figura 23 se representan los valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por este método.

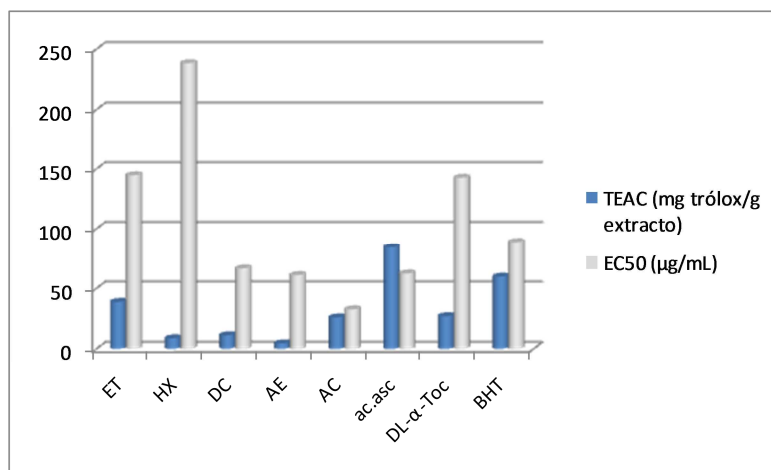


Figura 23. Representación de los valores TEAC y EC₅₀ obtenidos por el método del ABTS

5.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la producción de un compuesto coloreado al reaccionar el reactivo que toma el nombre de esta técnica con el carbonato de sodio y los compuestos fenólicos presentes en la muestra. La intensidad de la coloración es proporcional al contenido de compuestos fenólicos en las muestras evaluadas, y su magnitud se determinó a través de los

valores de absorbancia registrados a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados a partir de esta técnica se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Resultados obtenidos en la determinación del CFT por el método de Folin-Ciocalteu

[ppm]	Abs	SD	CV	[ppm]	Abs prom	SD	CV
ET				Fae			
1000	0,832	0,0025	0,302	1000	0,902	0,0023	0,256
750	0,654	0,0031	0,467	750	0,725	0,0025	0,347
500	0,402	0,0045	1,123	500	0,480	0,0079	1,654
250	0,202	0,0040	2,004	250	0,274	0,0017	0,632
100	0,110	0,0031	2,786	100	0,126	0,0021	1,648
Fhx				Fac			
1000	0,125	0,0015	1,225	1000	0,985	0,0026	0,269
750	0,110	0,0012	1,047	750	0,803	0,0025	0,313
500	0,099	0,0010	1,010	500	0,560	0,0030	0,536
250	0,085	0,0021	2,459	250	0,339	0,0020	0,590
100	0,075	0,0015	2,028	100	0,164	0,0026	1,613
Fdc				CURVA DE CALIBRACIÓN CON ÁCIDO GÁLICO			
1000	0,925	0,0035	0,380	25	0,133	0,00158	1,182
750	0,736	0,0042	0,566	35	0,221	0,00336	1,515
500	0,504	0,0035	0,696	45	0,362	0,00379	1,048
250	0,267	0,0036	1,350	65	0,591	0,00233	0,395
100	0,109	0,0015	1,397	75	0,742	0,00287	0,387

Con base en lo reportado en la tabla 11, se puede observar que el valor de absorbancia aumenta a medida que aumenta la concentración del extracto o fracción evaluada obtenida a partir del EET del cadillo. De esta manera, a mayores concentraciones de extracto, mayor será el contenido de compuestos de naturaleza fenólica que puedan generar el compuesto coloreado. Según los resultados obtenidos, la fracción Fhx mostró los menores valores de absorbancia a diferentes concentraciones. Los mayores valores de absorbancia se encontraron para Fac, debido a que en ella se encuentran la mayor parte de compuestos de naturaleza fenólica que pueden contribuir a la actividad antioxidante por donación de un electrón a partir de los grupos hidroxilo de los anillos fenólicos, más susceptibles a dicha actividad. Con valores intermedios de absorbancia se encontraron las fracciones Fdc y Fae.

Con el propósito de expresar los resultados en términos de equivalentes de ácido gálico, se realizó una curva de calibración con este patrón en un rango de concentraciones de 25-75 ppm, encontrándose un coeficiente de correlación R^2 de 0.996 (figura 24). Por medio de esta ecuación y con los valores de absorbancia obtenidos para cada extracto evaluado, se obtuvo la concentración de fenoles totales presentes en cada extracto, expresado como mg ácido gálico/g extracto seco. Los resultados se muestran en la tabla 12.

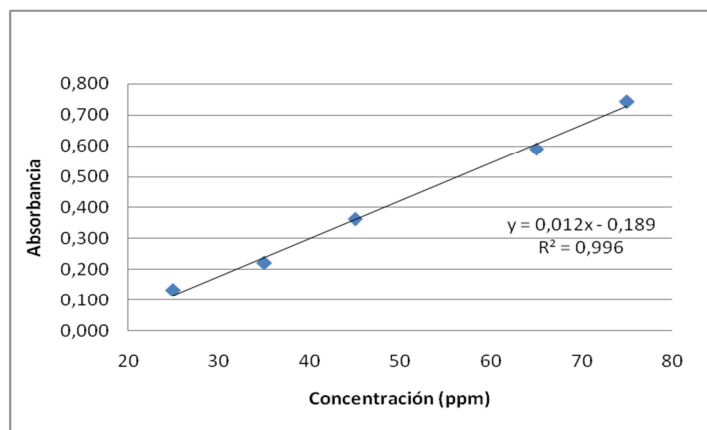


Figura 24. Curva de calibración con ácido gálico

Tabla 12. Valores CFT obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu

MUESTRA	CFT (mg ácido gálico/g extracto)
ET	38,7±0,2
Fhx	5,2±0,1
Fdc	21,4±0,1
Fae	8,4±0,2
Fac	49,1±0,1

El valor CFT expresado en mg ácido gálico /g extracto fue mayor para la fracción acuosa (49,1±0,1) y para ET (38,7±0,2). Los resultados obtenidos están acorde a la mayor actividad antioxidante obtenida para Fac y ET hallados por los métodos del DPPH y ABTS, según se muestra en la tabla 13. Fdc presenta un valor intermedio de 21,4±0,1 y Fae y Fhx presentan menores valores de CFT de 8,4±0,2 y 5,2±0,1. En la figura 25 se representan los valores CFT de las muestras de *Pavonia sepioides* estudiadas.

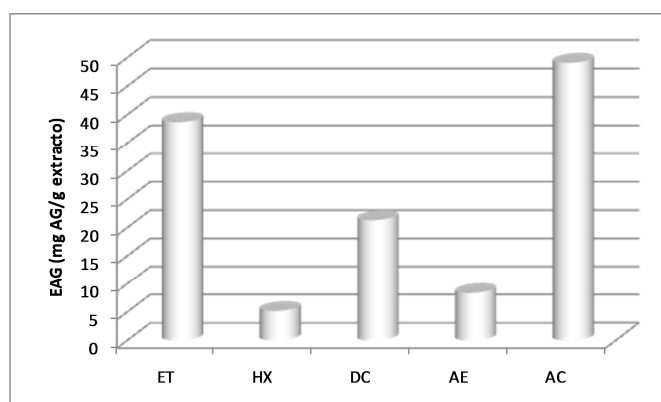


Figura 25. Representación de los equivalentes de ácido gálico - EAG (mg)/ g de extracto

Conocida el valor de CFT para el extracto total del cadillo y cada una de las fracciones purificadas, y reconociendo la naturaleza fenólica de estos compuestos, se propuso realizar un análisis complementario al trabajo propuesto en el proyecto de grado. Este análisis consistió en determinar el contenido de flavonoides totales (FT) por reacción directa con tricloruro de aluminio, según el método descrito por Kumazawa *et al* con algunas modificaciones⁸². De esta manera, 500 μ L de solución metanólica de cada uno de los extractos se hizo reaccionar con un volumen igual de $AlCl_3$ al 2%. Transcurrida 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se registró el valor de absorbancia a una longitud de onda de 376 nm. Se realizó una curva de calibración con hesperidina en un rango de concentración de 15-75 μ g/mL (figura 26) obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.994. El contenido de FT se expresó en mg equivalentes de hesperidina/g de extracto.

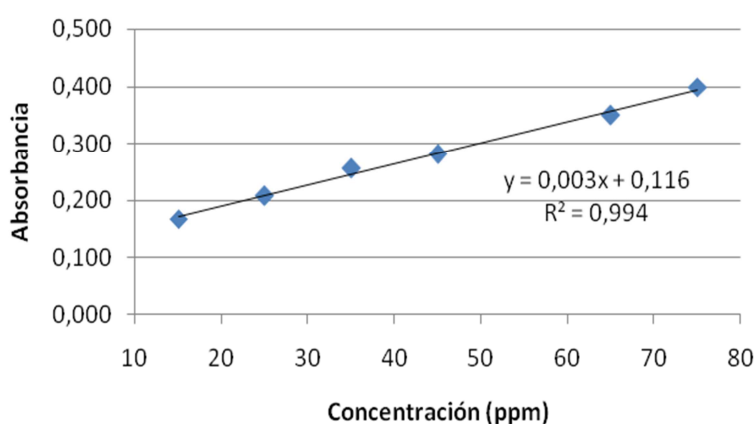


Figura 26. Curva de calibración con hesperidina

En la tabla 14 se resumen los resultados de la evaluación de actividad antioxidante, por los métodos DPPH y ABTS, además del análisis CFT y FT de cada una de las muestras.

Tabla 13. Resultados de la evaluación de la AAO por los métodos del DPPH y ABTS ,análisis del CFT y análisis del contenido de FT.

MÉTODO	DPPH		ABTS		CFT	FT
	TEAC mg Trolox/g extracto	EC ₅₀ (μ g/mL)	TEAC mg Trólox/g extracto	EC ₅₀ (μ g/mL)		
ET	21,2 \pm 0,8	105 \pm 01	38,9 \pm 0,4	144,7 \pm 0,4	38,7 \pm 0,2	8,9 \pm 0,1
Fhx	2,4 \pm 0,3	185,3 \pm 0,3	8,8 \pm 0,3	238,4 \pm 0,3	5,2 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
Fdc	2,2 \pm 0,3	51,7 \pm 0,9	11,3 \pm 0,6	66,6 \pm 0,6	21,4 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1
Fae	0,37 \pm 0,02	51 \pm 01	4,6 \pm 0,5	61,1 \pm 0,5	8,4 \pm 0,2	0,33 \pm 0,02
Fac	27,2 \pm 0,4	24,6 \pm 0,4	26,11 \pm 0,3	32,8 \pm 0,3	49,1 \pm 0,1	13,8 \pm 0,1
Ác.ascórbico	8,5 \pm 0,1*	18,6 \pm 0,1	84,3 \pm 0,1*	62,4 \pm 0,1	----	----
α -Tocoferol	11,7 \pm 0,1*	20,4 \pm 0,1	27,1 \pm 0,1*	142,7 \pm 0,1	----	----
BHT	4,2 \pm 0,1*	96,2 \pm 0,1	59,8 \pm 0,1*	88,8 \pm 0,1	----	----

*TEAC mg Trólox/g de sustancia

Los ensayos ABTS y DPPH reflejan la capacidad que posee un antioxidante para donar protones en un medio fisiológico o en un medio alcohólico (siendo en este caso metanólico). Las dos metodologías pueden diferenciar la capacidad para atrapar radicales libres que posee un antioxidante; sin embargo el ensayo con DPPH es mucho más selectivo que el método con ABTS. Se ha descrito que la conformación espacial del ABTS dificulta el acercamiento al sitio activo por parte de los antioxidantes, debido al alto impedimento estérico que presenta. Esta propiedad le ha dado vigencia a la técnica utilizando el DPPH y permite diferenciar satisfactoriamente los antioxidantes atrapadores de radicales libres en una muestra problema. Con el propósito de evaluar si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para cada uno de los extractos por los métodos DPPH, ABTS, CFT y FT, se realizó el análisis estadístico por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Tabla 15). Se encontró que el extracto total y cada una de las fracciones difieren uno de otro significativamente ($p=0,01$), con un valor de significancia de 0,009 en cada uno de los casos.

Tabla 14. Análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis

	TEAC-ABTS	TEAC-DPPH	CFT	FT
Chi-cuadrado	13,524	13,548	13,500	13,500
gl	4	4	4	4
Sig. asintót.	,009	,009	,009	,009

Con base en los resultados mostrados en la tabla 14, se puede evidenciar que por medio de ambos métodos cuyo fundamento es la captura de electrones (DPPH y ABTS), se logró corroborar el nivel de actividad antioxidante que presenta cada extracto y fracción estudiada, porque en ambos métodos se obtienen los mismos resultados en cuanto a nivel de actividad, siendo el extracto Fhx el menos activo y el extracto Fac el más activo. Pese a que ET no presenta un EC_{50} mayor al obtenido con Fac, su valor indica de igual manera una buena actividad AAO que se debe tener en cuenta para investigaciones futuras relacionadas.

Al comparar los resultados de AAO obtenidos por los métodos del DPPH y el ABTS se encuentra que para alcanzar una inhibición del radical DPPH del 50%, es necesaria una concentración de extracto más baja que las concentraciones necesarias para inhibir el 50% del radical ABTS⁺. El método del ABTS no permite diferenciar extractos que contienen buenos compuestos antioxidantes como la gran mayoría de técnicas, debido a la estabilidad del catión-radical ABTS⁺, una estructura que reacciona fácilmente con cualquier tipo de compuestos reductores mediante un mecanismo de transferencia de electrones. De esta manera, la sensibilidad de la técnica se ve disminuida en comparación con la del DPPH. Diferentes investigadores han concluido que los ensayos de evaluación por el método del ABTS son poco confiables y de baja reproducibilidad, por lo que no se recomienda realizarlos sin contrastarlo con otro método, con el cual se pueda corroborar los resultados obtenidos^{29, 67, 75, 78}. En el presente trabajo, se efectuó la evaluación de la actividad antioxidante a través de dos métodos de captura de electrones, mencionados a lo largo del mismo, con lo que se logra corroborar el nivel de actividad de cada extracto.

Con el propósito de identificar si hay una correlación entre los resultados obtenidos para cada método, se realizó la prueba de asociación de Pearson (tabla 16) y la prueba de asociación de Spearman (Tabla 17). De esta manera, según Pearson, el valor TEAC hallado por el método del ABTS se correlaciona linealmente con el valor TEAC hallado por el método del DPPH en un 87,2% (coeficiente de correlación (R) de 0,872). La correlación con el CFT y FT es de 83,9% (R=0,839) y 80,9% (R=0,809) respectivamente. Los coeficientes de correlación entre los demás

métodos fueron superiores al 80% ($R > 80\%$), lo que muestra la asociación entre los resultados obtenidos en la evaluación de la AAO, el CFT y el contenido de FT en cada uno de los casos.

Tabla 15. Resultados estadísticos de la correlación bivariada de Pearson

		TEAC-ABTS	TEAC-DPPH	CFT	FT
TEAC-ABTS	Correlación de Pearson	1	,872(**)	,839(**)	,809(**)
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,000
	N	15	15	15	15
TEAC-DPPH	Correlación de Pearson	,872(**)	1	,951(**)	,989(**)
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,000
	N	15	15	15	15
CFT	Correlación de Pearson	,839(**)	,951(**)	1	,966(**)
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,000
	N	15	15	15	15
FT	Correlación de Pearson	,809(**)	,989(**)	,966(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	
	N	15	15	15	15

Los resultados del análisis del análisis bivariado de Spearman muestran, al igual que Pearson, que hay una correlación lineal positiva, estadísticamente significativa, entre los resultados obtenidos por cada uno de los métodos. En este caso, los coeficientes de correlación son menores, pero su tendencia es similar indicando que los resultados obtenidos tienden a una correlación de tipo lineal.

Tabla 16. Resultados estadísticos de la correlación bivariada de Spearman

			TEAC-ABTS	TEAC-DPPH	CFT	FT
Rho de Spearman	TEAC-ABTS	Coefficiente de correlación	1,000	,785(**)	,783(**)	,872(**)
		Sig. (bilateral)	.	,001	,001	,000
		N	15	15	15	15
	TEAC-DPPH	Coefficiente de correlación	,785(**)	1,000	,683(**)	,866(**)
		Sig. (bilateral)	,001	.	,005	,000
		N	15	15	15	15
	CFT	Coefficiente de correlación	,783(**)	,683(**)	1,000	,854(**)
		Sig. (bilateral)	,001	,005	.	,000
		N	15	15	15	15
	FT	Coefficiente de correlación	,872(**)	,866(**)	,854(**)	1,000
		Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	.
		N	15	15	15	15

Según diversas investigaciones^{19, 21, 24, 78}, la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales, es de gran utilidad para promover una mayor investigación y correlacionar esta actividad con otras importantes, como lo son la actividad antiinflamatoria, actividad farmacológica, actividad citotóxica y genotóxica, entre otras. Los resultados presentados para los métodos de evaluación de AAO (ABTS y DPPH) concuerdan con los obtenidos en la determinación de fenoles totales presentes en cada extracto, lo que permite realizar una primer apreciación de que la actividad antioxidante exhibida por cada uno de los extractos evaluados en el presente trabajo, está relacionada con la cantidad de compuestos fenólicos que cada uno de éstos posee. Pese a que no es posible deducir con precisión cuáles son los compuestos responsables de la actividad antioxidante de los extractos promisorios, como en el caso de Fac y ET principalmente, se conoce que los flavonoides son en parte responsables de esta actividad, teniendo en cuenta los numerosos estudios que reportan las diferentes actividades que presentan esta clase de compuestos, que son los principales descritos como potentes antioxidantes.

CONCLUSIONES

Se logró la obtención del extracto etanólico total del cadillo mediante extracción Soxhlet y el fraccionamiento de una alícuota del extracto etanólico total (reconstituido en agua), mediante extracción líquido-líquido con solventes de diferente polaridad (Hexano, diclorometano y acetato de etilo). Los niveles de material extractable a partir de cada una de las fracciones con los diferentes solventes mostraron variabilidad, así, los rendimientos expresados en porcentaje en peso con respecto al material vegetal seco fueron de 32.4%, 0.93%, 15.61% y 51.21% para Fhx, Fdc, Fae y Fac respectivamente.

Con base en los resultados obtenidos a partir del tamizaje fitoquímico se identificó la presencia de metabolitos secundario del tipo flavonoides, cumarinas, cardiotónicos, triterpenos y esteroides. A estos compuestos puede estar asociada la actividad antioxidante del extracto etanólico del cadillo.

Se confirmó la actividad antioxidante, del extracto etanólico del cadillo y sus fracciones purificadas, por los métodos del DPPH y ABTS. Aunque los valores difieren en cada técnica, el comportamiento es similar, encontrándose igual nivel de actividad para cada una de las muestras estudiadas. De las cuatro fracciones, Fhx presenta la menor actividad y Fac la mayor actividad. Fdc y Fae presentan valores intermedios de AAO. El extracto total presenta un valor de AAO menor al de la fracción Fhx, como un indicativo de que los compuestos antioxidantes se encuentran menos concentrados en dicho extracto.

Los valores TEAC calculados por los dos métodos antioxidantes, presentaron un comportamiento similar. La mayor actividad antioxidante se presenta en la fracción acuosa en la cual se encuentran compuestos de naturaleza polar, como lo son los fenoles, polifenoles y los flavonoides, entre otros.

Las curvas de calibración realizadas con los patrones antioxidantes presentaron un coeficiente de correlación superior a 0.990. Según el método del ABTS, El trólox, el BHT, ácido ascórbico y DL- α -tocoferol tienen un comportamiento lineal entre un rango de concentración de 10-100 $\mu\text{g/mL}$, mientras que por el método del DPPH el comportamiento lineal se encuentra en un rango de concentración de 5-30 $\mu\text{g/mL}$ para trólox y ácido ascórbico, de 5-40 $\mu\text{g/mL}$ para DL- α -tocoferol y de 10-100 $\mu\text{g/mL}$ para BHT.

El análisis estadístico bivariado de Pearson y Spearman permitió concluir que hay una correlación lineal positiva, entre los ensayos del DPPH y ABTS, que permiten evaluar la AAO, el contenido de fenoles totales (CFT) y el contenido de flavonoides totales (FT). Los análisis fueron estadísticamente significativos (significancia $\leq 0,005$), presentando coeficientes de correlación mayores a 0.800 en el test de Pearson y mayores a 0.700 en el test de Spearman.

La evaluación de la AAO en el cadillo, contribuyó en la investigación científica de algunas propiedades químicas del extracto de la planta, que ha sido utilizada tradicionalmente por comunidades del departamento del Huila y del Cauca. Este trabajo se convirtió en un punto de partida para continuar con diferentes estudios que puedan proponer usos medicinales y aprovechamiento para la salud humana.

RECOMENDACIONES

Realizar una comparación entre la actividad antioxidante y los métodos de extracción de los constituyentes, en hojas de *Pavonia sepioides*, por Extracción Soxhlet y por la técnica de ultrasonido, que se constituye en una técnica que no requiere calentamiento y que puede contribuir a conservar las propiedades de las moléculas antioxidantes sin mayores cambios.

Debido a que los ensayos del ABTS y DPPH se constituyen en métodos de evaluación de la AAO In Vitro a partir de radicales libres de origen sintético, se podría proponer la evaluación de dicha actividad mediante los ensayos con enzimas de tipo Superóxido Dismutasa (SOD) y Glutaciona Peroxidasa (Gpx), como una primera aproximación de actividades a nivel biológico a partir del extracto de esta planta.

Conocida las actividades antioxidantes del extracto total del Cadillo y cada una de las fracciones purificadas, se puede encaminar el estudio hacia la determinación estructural de los metabolitos responsables de dicha actividad, a partir de las fracciones purificadas Fac y Fdc, que presentaron valores de AAO mayor e intermedio respectivamente. Este análisis se puede realizar mediante las técnicas HPLC-MS/MS, RMN ^1H y ^{13}C , en conjunto con análisis espectroscópicos bidimensionales. Actualmente, el grupo de investigación QCB, cuenta con el convenio de cooperación interinstitucional con la Universidad de Barcelona, donde se desarrollarán los análisis HPLC-MS/MS en las fracciones más activas de esta planta.

Con base en los resultados obtenidos en la determinación del nivel de fenoles totales y el contenido de flavonoides totales, se pueden enfocar los estudios para identificar algunas actividades biológicas. Actualmente, el grupo de investigación en genética adelanta estudios de actividad citotóxica y genotóxica en el extracto etanólico total del cadillo. En el grupo QCB se propone una primera aproximación de actividad farmacológica mediante el ensayo con *Artemia franciscana*, un crustáceo que por sus características biológicas, proporciona un modelo eficaz y simple para la evaluación de dicha actividad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boveris, A., La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars pharmaceutica* **2005**, 46, (1), 85-92.
2. García, A. F. J. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Murcia, Universidad de Murcia. Tesis Doctoral Europea, 2005.
3. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press Oxford: 1999; Vol. 3.
4. ÁUTRET, M.; BEHÁR, M., Pluricarenal child's syndrome (Kwashiorkor) and its prevention in Central America. **1955**.
5. Vaziri, N. D., Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension* **2004**, 13, (1), 93-99.
6. García, J. L., Uso de antioxidantes para prevenir enfermedad cardiovascular. Metaanálisis de ensayos clínicos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **2009**, 47, (1), 7-16.
7. Álvarez, E.; Jiménez, O.; Posada, C.; Rojano, B.; Gil, J.; García, C.; Durango, D., Actividad Antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). *Vitae* **2008**, 165-172.
8. Grings, M.; Krapovickas, A.; Boldrini, I. I., A New Species of *Pavonia* (Malvaceae) from Southern Brazil. *Systematic Botany* **2011**, 36, (2), 419-423.
9. Fryxell, P. A., On some Brazilian Malvaceae of Martius, published by Colla in 1833. *Taxon* **1976**, 589-593.
10. Stevens, P. Angiosperm Phylogeny Website. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb> (Agosto 2012),
11. Zentrum des Datenverbundnetzes der Schweizer Flora, C., Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Chambésy. *Vollzug Umwelt*.
12. KRAPOVICKAS, A., 3 BÓNPLANDIA. *Bonplandia* **1977**, 3, 25.
13. González, C.; Casco, S.; Ayala, N., Clado Angiospermas Basales y Magnolioides. **2009**.
14. CRÚZ, B. N.; CERÓN, P.; HERNÁNDEZ, E., *Las plantas y el territorio: clasificación, usos y concepciones en los andes colombianos*. Editorial Abya Yala: 1996.
15. BLAIR, S.; MADRIGAL, B., *Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa pacífica colombiana*. Universidad de Antioquia: 2005.
16. Afolayan, A. J.; Aboyade, O. M.; Sofidiya, M. O., Total phenolic content and free radical scavenging activity of *Malva parviflora* L.(Malvaceae). *Journal of Biological Science* **2008**, 8, (5), 945-949.
17. Li, L.; Sattler, I.; Deng, Z.; Groth, I.; Walther, G.; Menzel, K. D.; Peschel, G.; Grabley, S.; Lin, W., A-seco-oleane-type triterpenes from *Phomopsis* sp. (strain HKI0458) isolated from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. *Phytochemistry* **2008**, 69, (2), 511-517.
18. Maganha, E. G.; Halmenschlager, R. C.; Rosa, R. M.; Henriques, J. A. P.; Ramos, A. L. L. P.; Saffi, J., Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry* **2010**, 118, (1), 1-10.
19. De las Heras, B.; Slowing, K.; Benedí, J.; Carretero, E.; Ortega, T.; Toledo, C.; Bermejo, P.; Iglesias, I.; Abad, M.; Gómez-Serranillos, P., Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of ethnopharmacology* **1998**, 61, (2), 161-166.
20. Hritcu, L.; Foyet, H. S.; Stefan, M.; Mihasan, M.; Asongalem, A. E.; Kamtchouing, P., Neuroprotective effect of the methanolic extract of *Hibiscus asper* leaves in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Journal of ethnopharmacology* **2011**, 137, (1), 585-591.
21. Ranilla, L. G.; Kwon, Y. I.; Apostolidis, E.; Shetty, K., Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for

- hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource technology* **2010**, 101, (12), 4676-4689.
22. Mosquera, O.; Niño, O. J.; Correa, M.; Buitrago, D. C., Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica* **2005**, 1, (27).
 23. Salinas, J. G., ¿ Qué sabe usted acerca de... radicales libres? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **2006**, (004), 69-73.
 24. Gutiérrez Zavala, Á.; Ledesma Rivero, L.; García García, I.; Grajales Castillejos, O., Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública* **2007**, 33, (1), 0-0.
 25. Rodríguez Perón, J. M.; Menéndez López, J. R.; Trujillo López, Y., Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar* **2001**, 30, (1), 15-20.
 26. Olguín, C.; Meléndez, M.; Zúñiga, R.; Pasquetti, C., Antioxidants and atherosclerosis. *Revista de Endocrinología y Nutrición* **2004**, 12, (4), 199-206.
 27. Romero Alvira, D.; Villalba Martín, M.; Mur Villaplana, M.; Cabeza Lambán, F.; Guerrero Navarro, L.; Simal Gil, E., Importancia de los antioxidantes en la alimentación humana. *Medicina Clínica* **1990**, 94, (2), 69-75.
 28. Ohkatsu, Y.; Kajiyama, T.; Arai, Y., Antioxidant activities of tocopherols. *Polymer degradation and stability* **2001**, 72, (2), 303-311.
 29. Domínguez i Pedrós, A., Estudio de la capacidad antioxidante de hojas de Ginkgo biloba. **2011**.
 30. Gordon, M. H., The mechanism of antioxidant action in vitro. *Food antioxidants* **1990**, 1, 1-18.
 31. Monroy Vázquez, A.; Totosaus, A.; González González, L. R.; García Martínez, I., Antioxidantes I. Chile ancho (*Capsicum annum* L grossum sendt.) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.) como fuentes naturales de antioxidantes. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar* **2007**, (6), 6.
 32. Horvath, G.; Wessjohann, L.; Bigirimana, J.; Monica, H.; Jansen, M.; Guisez, Y.; Caubergs, R.; Horemans, N., Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Albert Lavallee). *Plant Physiology and Biochemistry* **2006**, 44, (11), 724-731.
 33. Halliwell, B. In *How to characterize an antioxidant: an update*, 1995; 1995; pp 73-101.
 34. Horvath, G.; Wessjohann, L.; Bigirimana, J.; Jansen, M.; Guisez, Y.; Caubergs, R.; Horemans, N., Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* **2006**, 67, (12), 1185-1195.
 35. Wu, J.; Croft, K., Vitamin E metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* **2007**, 28, (5), 437-452.
 36. Yoshida, Y.; Niki, E.; Noguchi, N., Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and physics of lipids* **2003**, 123, (1), 63-75.
 37. Öncel, I.; Yurdakulol, E.; Keleş, Y.; Kurt, L.; Yıldız, A., Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants. *Acta Ecológica* **2004**, 26, (3), 211-218.
 38. Okita, M., Chronic hepatic disease and dietary instruction. *Hepatology research* **2004**, 30, 92-95.
 39. Berrougui, H.; Cloutier, M.; Isabelle, M.; Khalil, A., Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* **2006**, 184, (2), 389-396.
 40. Upston, J. M.; Kritharides, L.; Stocker, R., The role of vitamin E in atherosclerosis. *Progress in lipid research* **2003**, 42, (5), 405.
 41. Nevin, K.; Rajamohan, T., Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. *Food chemistry* **2006**, 99, (2), 260-266.

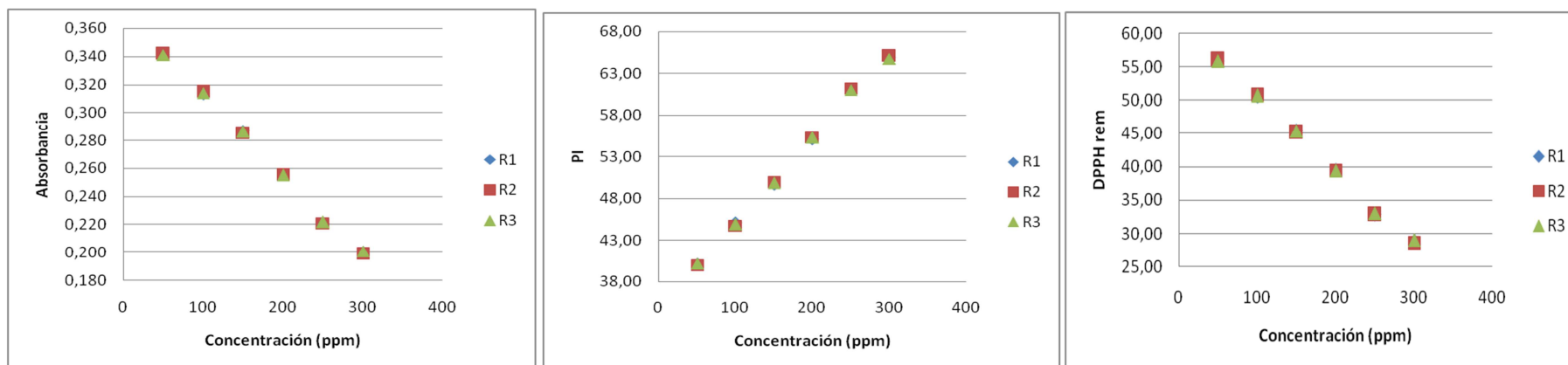
42. Britt, S. G.; Chiu, V. W. S.; Redpath, G. T.; Vandenberg, S. R., Elimination of ascorbic acid-induced membrane lipid peroxidation and serotonin receptor loss by Trolox-C, a water soluble analogue of vitamin E. *Journal of Receptors and Signal Transduction* **1992**, 12, (2), 181-200.
43. Ramassamy, C.; Girbe, F.; Christen, Y.; Costentin, J., Ginkgo biloba extract EGb 761 or trolox C prevent the ascorbic acid/Fe²⁺ induced decrease in synaptosomal membrane fluidity. *Free Radical Research* **1993**, 19, (5), 341-350.
44. Goldstein, S.; Meyerstein, D.; Czapski, G., The Felton Reagents. *Free radical biology & medicine* **1993**, 15, 435-445.
45. Alonso, I. A.; Aviñó, J. P. N.; Moya, J. R. L., Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* **2007**, 16.
46. DEVLIN, T., Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. In 2 ed.; Mathews, C. K. y. V. H., K. E., Ed. Pearson Educación: New Jersey (USA), 1999.
47. Halliwell, B., How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research* **1990**, 9, (1), 1-32.
48. Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C., Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *LWT-Food Science and Technology* **1997**, 30, (6), 609-615.
49. Rojano, B.; Gaviria, C.; Gil, M.; Sáez, J.; Schinella, G.; Tournier, H., Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae* **2008**, 15, (1), 173-181.
50. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* **1995**, 28, (1), 25-30.
51. Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol* **2004**, 26, (2), 211-219.
52. Ronald, L.; Wu, X.; Schaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, 53, (10), 4290-4302.
53. Niederländer, H. A. G.; van Beek, T. A.; Bartasiute, A.; Koleva, I. I., Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1210, (2), 121-134.
54. Nishiyama, T.; Sakita, K.; Fuchigami, T.; Fukui, T., Antioxidant activities of fused heterocyclic compounds, xanthene-2, 7-diols with BHT or catechol skeleton. *Polymer degradation and stability* **1998**, 62, (3), 529-534.
55. Massey, K. D.; Burton, K. P., Free radical damage in neonatal rat cardiac myocyte cultures: effects of alpha-tocopherol, Trolox, and phytol. *Free radical biology & medicine* **1990**, 8, (5), 449.
56. Wu, T. W.; Hashimoto, N.; Wu, J.; Carey, D.; Li, R. K.; Mickle, D. A. G.; Weisel, R. D., The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. *Biochemistry and Cell Biology* **1990**, 68, (10), 1189-1194.
57. Ross, L.; Barclay, C.; Artz, J. D.; Mowat, J. J., Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ¹⁴C tracer and product studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1995**, 1237, (1), 77-85.
58. Cort, W.; Scott, J.; Araujo, M.; Mergens, W.; Cannalunga, M.; Osadca, M.; Harley, H.; Parrish, D.; Pool, W., Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1975**, 52, (6), 174-178.
59. Metwally, M.; Moore, J., Oxygen uptake during the γ -irradiation of fatty acids. *International Journal of Radiation Biology* **1987**, 52, (2), 253-267.
60. Casini, A.; Ferrali, M.; Pompella, A.; Maellaro, E.; Comporti, M., Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *The American journal of pathology* **1986**, 123, (3), 520.

61. Persoon-Rotherth, M.; Egas-Kenniphaas, J.; Van der Valk-Kokshoorn, E.; Mauve, I.; Van der Laarse, A., Prevention of cumene hydroperoxide induced oxidative stress in cultured neonatal rat myocytes by scavengers and enzyme inhibitors. *Journal of molecular and cellular cardiology* **1990**, *22*, (10), 1147-1155.
62. Suttorp, N.; Toepfer, W.; Roka, L., Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **1986**, *251*, (5), C671-C680.
63. Barclay, L. R. C.; Cameron, R.; Forrest, B.; Locke, S.; Nigam, R.; Vinqvist, M., Cholesterol: free radical peroxidation and transfer into phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1990**, *1047*, (3), 255-263.
64. Arnao, M.; Cano, A.; Acosta, M., Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Research* **1999**, *31*, (Supplement 1), 89-96.
65. Milardović, S.; Iveković, D.; Grabarić, B. S., A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry* **2006**, *68*, (2), 175-180.
66. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *26*, (9), 1231-1237.
67. Blois, M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **1958**.
68. PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. In *Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas*, 2007; 2007.
69. Ayoola, G.; Coker, H.; Adesegun, S.; Adepoju-Bello, A.; Obaweya, K.; Ezennia, E.; Atangbayila, T., Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **2008**, *7*, (3), 1019-1024.
70. Parejo, I.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Rosas-Romero, A.; Flerlage, N.; Burillo, J.; Codina, C., Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of agricultural and food chemistry* **2002**, *50*, (23), 6882-6890.
71. Miller, N.; Rice-Evans, 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. *Clinical science (London, England: 1979)* **1993**, *84*, (4), 407.
72. Sánchez-Moreno, C., Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* **2002**, *8*, (3), 121-137.
73. Rojas, D.; Narváez, E.; Restrepo, L., Evaluación del contenido de vitamina C, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*psidium guajava l.*) de las variedades pera, regional roja y regional blanca In *Memorias red-alfa lagrotech comunidad europea: Cartagena (Colombia)*, 2008.
74. Singleton, V.; Rossi, J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16*, (3), 144-158.
75. Gutiérrez, D.; Ortiz, C.; Mendoza, A. In *Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal*, 2008; 2008; pp M220-1108.
76. Argoti, J. C.; Salido, S.; Linares Palomino, P. J.; Ramírez, B.; Insuasty, B.; Altarejos, J., Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of a selection of wild-growing Colombian plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2011**, *91*, (13), 2399-2406.
77. Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V.; Bitsch, R., Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research* **2002**, *36*, (2), 177-187.
78. Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H., Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences* **2004**, *74*, (17), 2157-2184.

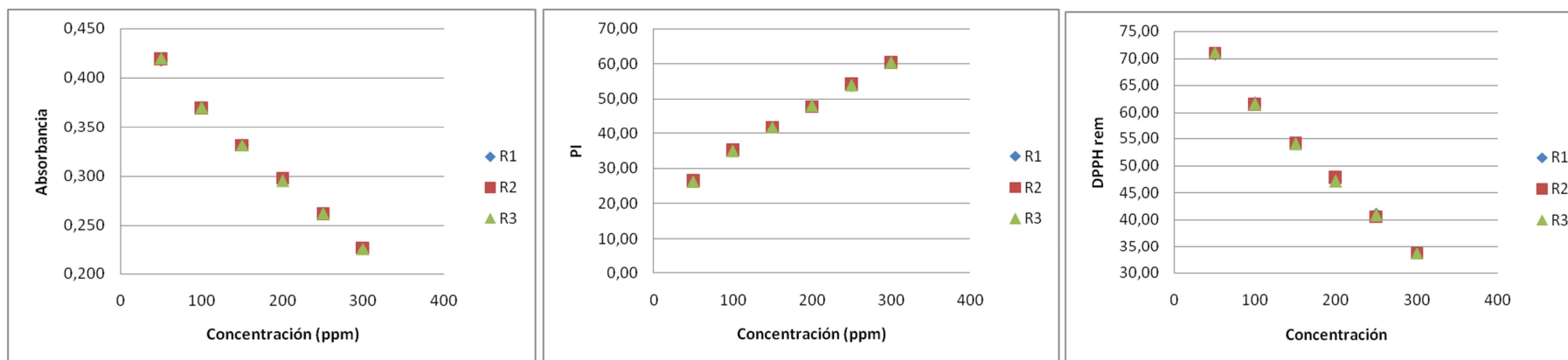
79. Alcazar, C.; Díaz, S.; Salgado, B.; Ramírez, B. In *Estructura y composición de un relicto de bosque subandino, Popayán, Colombia*, 2002; 2002.
80. DOMINGUEZ, X., Métodos de investigación fitoquímica. *Editorial Limusa* **1985**, 57-60.
81. Harborne, A., *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Thomson Science ed.; Springer: 1998; Vol. 3.
82. Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T., Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry* **2004**, 84, (3), 329-339.

ANEXOS

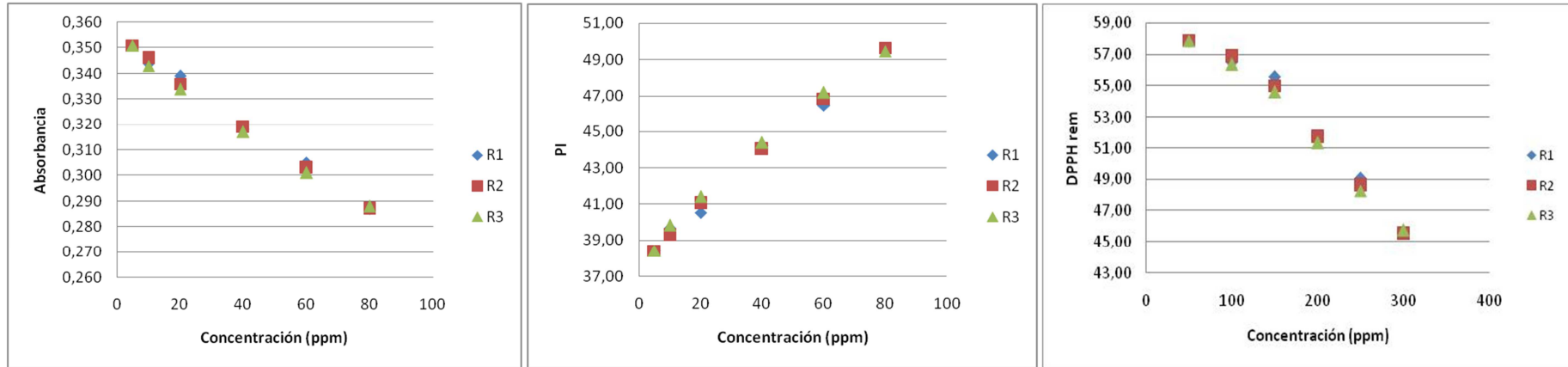
Anexo 1. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para ET en el ensayo del DPPH. R: Repetición



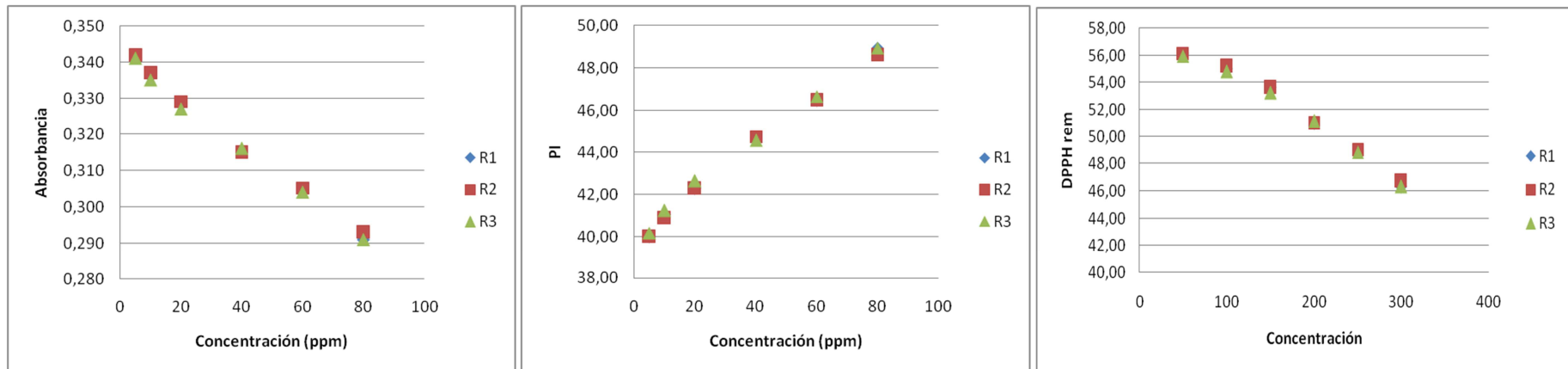
Anexo 2. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para Fhx en el ensayo del DPPH. R: Repetición



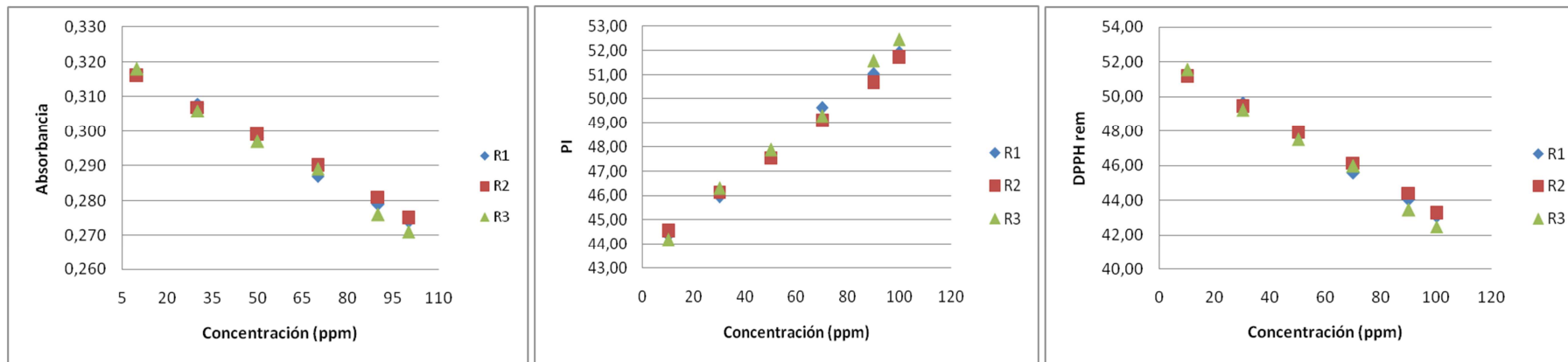
Anexo 3. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para Fdc en el ensayo del DPPH. R: Repetición



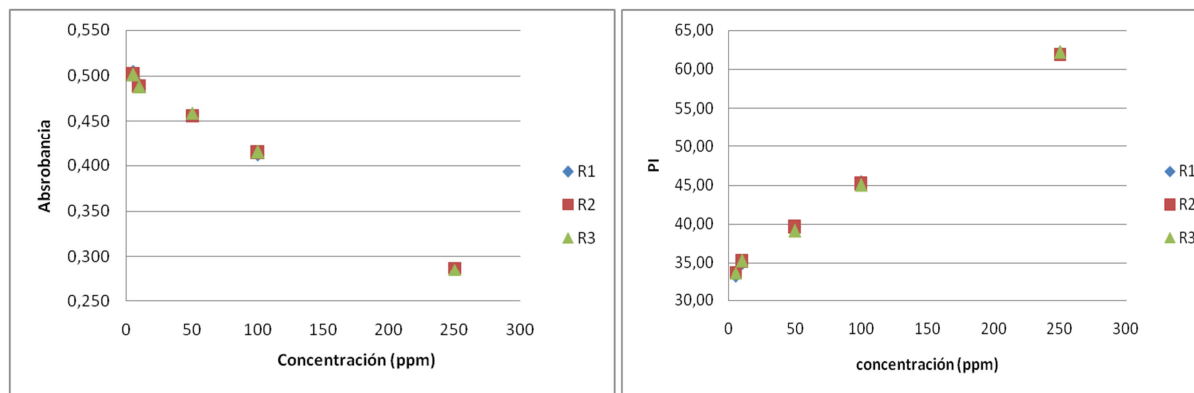
Anexo 4. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para Fae en el ensayo del DPPH. R: Repetición



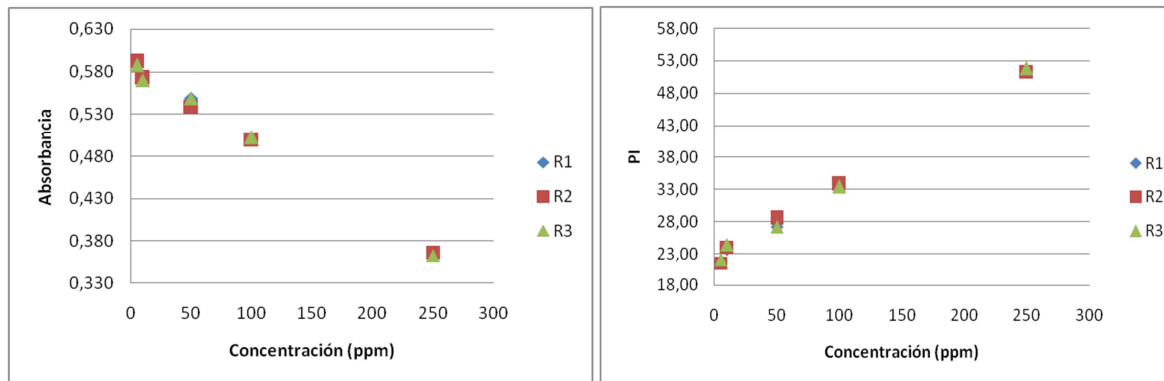
Anexo 5. Representación de la absorbancia, PI y DPPH rem vs concentración, para Fac en el ensayo del DPPH. R: Repetición



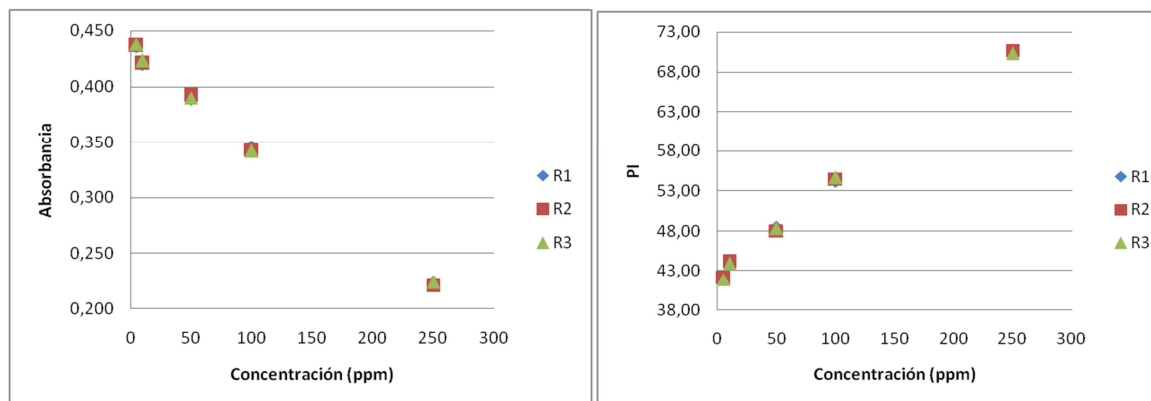
Anexo 6. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para ET en el ensayo del ABTS. R: Repetición



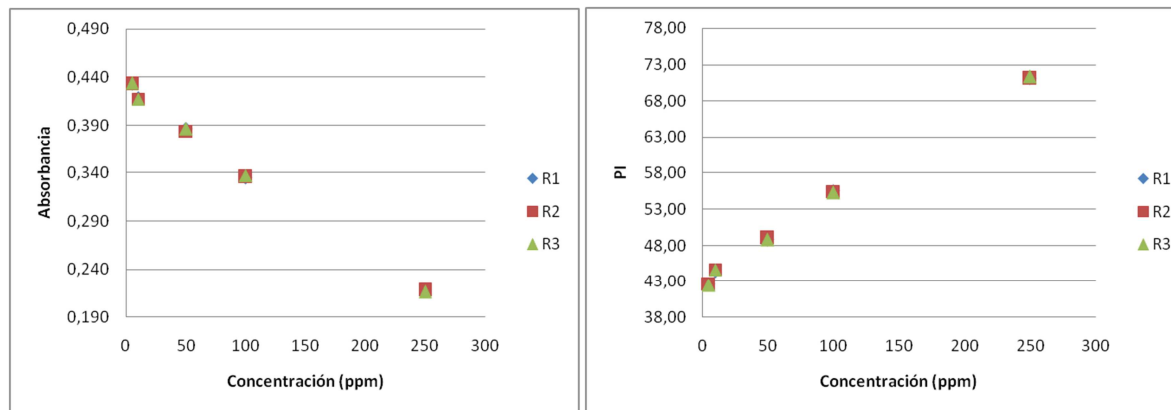
Anexo 7. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para Fhx en el ensayo del ABTS. R: Repetición



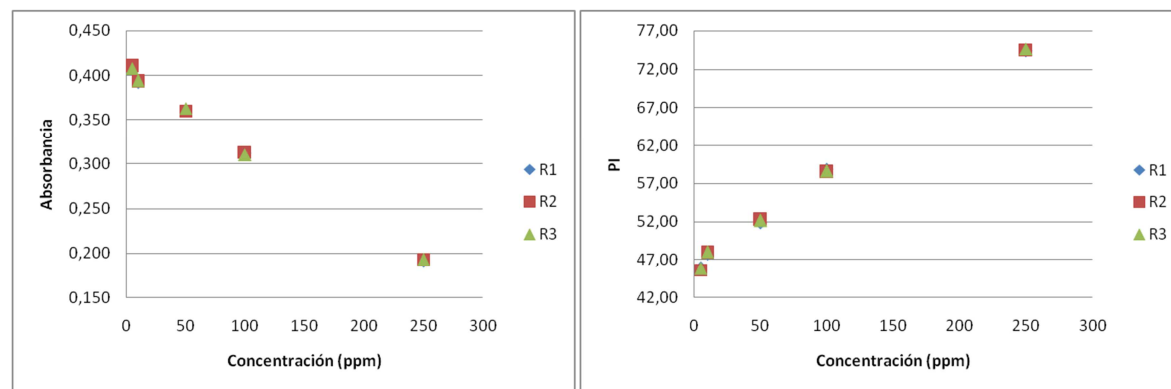
Anexo 8. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para Fdc en el ensayo del ABTS. R: Repetición



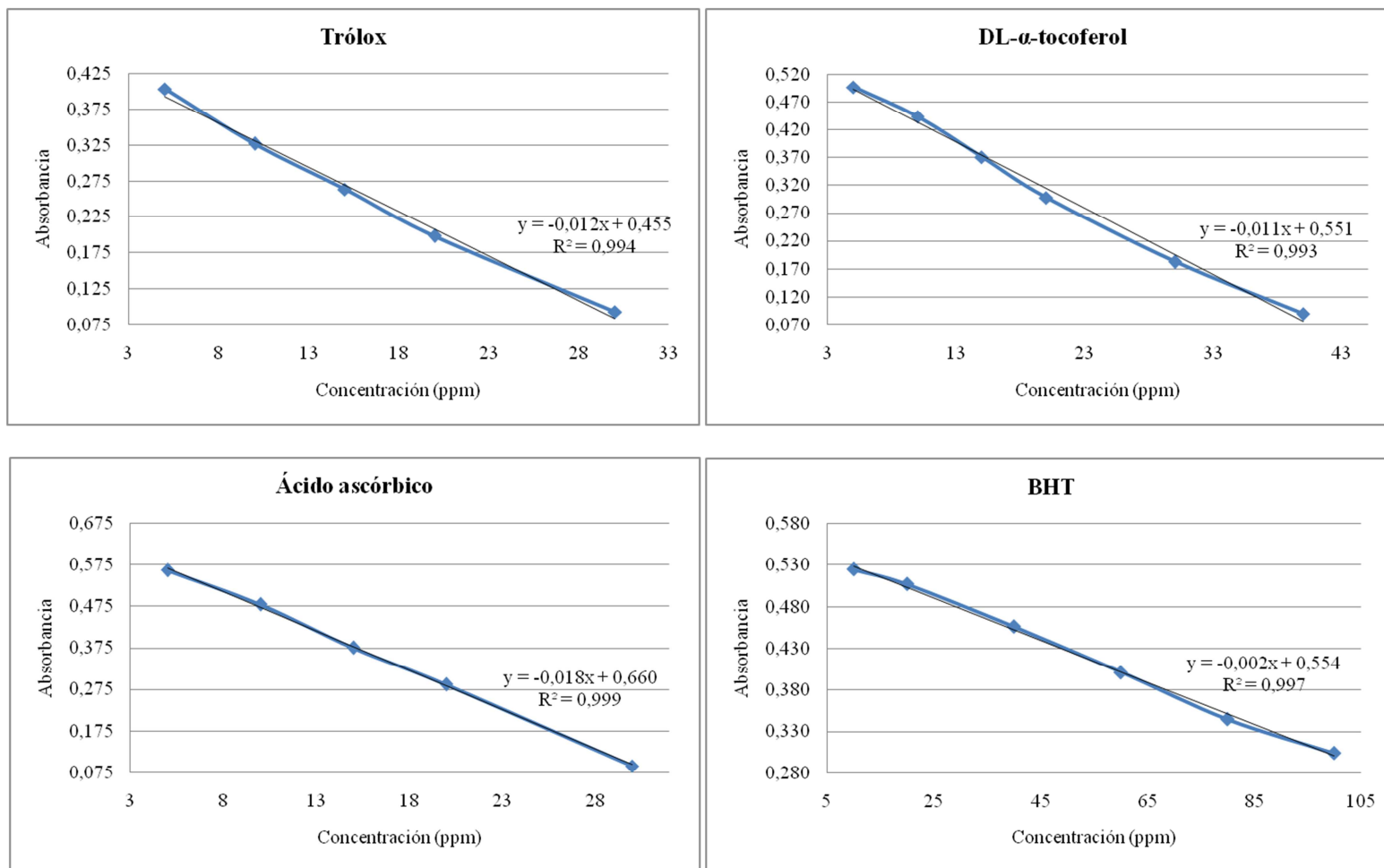
Anexo 9. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para Fae en el ensayo del ABTS. R: Repetición



Anexo 10. Representación de la absorbancia y PI vs concentración, para Fac en el ensayo del ABTS. R: Repetición



Anexo 11. Curvas de Calibración obtenidas a partir de los patrones antioxidantes: Trólox, DL- α -Tocoferol, ácido ascórbico y BHT, por el método del DPPH



Anexo 12. Curvas de Calibración obtenidas a partir de los patrones antioxidantes: Trólox, DL- α -Tocoferol, ácido ascórbico y BHT, por el método del ABTS

