

**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y LA TOXICIDAD DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE DOS TIPOS DE MUESTRAS DE PULPA DEL TOTUMO
(*Crescentia cujete* L).**

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN
QUÍMICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2014**

**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y LA TOXICIDAD DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE DOS TIPOS DE MUESTRAS DE PULPA DEL TOTUMO
(*Crescentia cujete* L).**

EDWIN ROLANDO VALENCIA ANGULO

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

Director
Ph.D JUAN CARLOS ARGOTI BURBANO
PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUIMICA

Asesor
Ph.D. FABIO CABEZAS FAJARDO
PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUIMICA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2014**

Nota de Aceptación

Aceptado

Director



Ph. D JUAN CARLOS ARGOTI BURBANO

Jurado



Ph.D LILIANA MONTALVO VELEZ

Jurado



Ph. D EDIER HUMBERTO PEREZ

Fecha de sustentación: Popayán, 01 de Diciembre de 2.014

CONTENIDO

Resumen	4
Abstract	5
1. Planteamiento del problema	6
2. Marco teórico	7
2.1 Familia Bignoniaceae	7
2.2 Género: <i>Crescentia</i> L.	8
2.3 Especie: <i>Crescentia cujete</i> L	8
2.4 Origen y distribución del totumo <i>Crescentia cujete</i> L	9
2.5 Estudios realizados sobre el totumo	9
2.5.1 Estudios sobre usos tradicionales	9
2.5.2 Estudios químicos y biológicos	10
2.6 Radicales libres	11
2.7 Antioxidantes	13
2.8 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante	15
2.8.1 Método del DPPH	16
2.8.2 Método del ABTS	17
2.9 Determinación del contenido total de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu	18
2.10 Determinación de la actividad toxicológica mediante el ensayo de <i>Artemia salina</i>	19
3. Objetivos	20
4. Reactivos y disolventes	21
5. Metodología	22
5.1 Recolección de material vegetal	22
5.2 Preparación de extractos	22
5.2.1 Proceso de secado	22
5.2.2 Extracción por ultrasonido	22
6. Fraccionamiento	24
7. Métodos de evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres	24
7.1 Método del DPPH	24
7.1.1 Preparación de la recta de calibración	24
7.1.2 Preparación de la solución de DPPH	24
7.1.3 Medida de la actividad antioxidante	24
7.2 Método del ABTS	25

8. Determinación del contenido total de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu	25
9. Determinación de la actividad toxicológica mediante el ensayo de <i>Artemia salina</i>	26
10. Análisis estadístico	26
11. Resultados y discusión	28
11.1 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH	30
11.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ABTS	31
11.3 Determinación del contenido total de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu	33
11.4 Determinación de la actividad toxicológica mediante el ensayo de la <i>Artemia salina</i>	34
11.5 Análisis estadístico	35
12. Conclusiones	40
13. Bibliografía	41
Anexos	48
Anexo 1. Datos correspondientes al análisis estadístico	48
Anexo 2. Datos ensayo DPPH	49
Anexo 3. Datos ensayo ABTS	62
Anexo 4. Datos ensayo de Folin-Ciocalteu	64
Anexo 5. Datos ensayo Artemia salina	66

Resumen

En el municipio de Patía (82 kilómetros al sur de Popayán) el totumo tiene un valor tanto cultural como económico para la gran mayoría de sus habitantes. El fruto del totumo (*Crescentia cujete* L) es recolectado, cocinado y una vez seco, es utilizado generalmente como recipiente para envasar dulce de leche, aprovechándose para el sostenimiento económico de las familias de la región. En los últimos años, este uso ha sido reemplazado por recipientes de madera y de plástico por lo que el aprovechamiento económico del totumo ha disminuido. La pulpa es usada tradicionalmente para el tratamiento del cáncer del cuello uterino, propiedad que ha sido estudiada mediante la determinación del efecto antiproliferativo y apoptótico del extracto en linfocitos humanos cultivados *in vitro* con resultados satisfactorios. Este trabajo busca determinar un potencial valor agregado como antioxidante, reafirmando el conocimiento empírico que se tiene del totumo por parte de los médicos tradicionales de la región. Los estudios de la capacidad antioxidante del totumo desarrollados hasta el momento se han llevado a cabo utilizando el fruto completo y no especifican el uso de la pulpa, además siguen protocolos de extracción convencionales (Calentamiento a reflujo o Soxhlet), es decir, el tratamiento al que se somete la muestra es muy similar al que se usa en medicina tradicional generalmente mediante infusión, y también presenta una diferencia marcada en el protocolo de almacenamiento de las muestras ya que usan temperaturas de -20 °C hasta -80 °C, lo cual hace que se requieran equipos bastante costosos. En otras investigaciones, se menciona el uso de las partes aéreas de esta planta aunque no se especifica el uso de la pulpa, ni el proceso de extracción o protocolo seguido para las pruebas antioxidantes.

En este trabajo se llevó a cabo la determinación de la capacidad atrapadora de radicales libres mediante los métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato). La determinación del contenido total de fenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu y la evaluación de la toxicidad mediante el método de la *Artemia salina* (*A. salina*) de los extractos etanólicos de dos tipos de muestras de la pulpa (una en fresco y otra sometida a un proceso de secado a 40 °C) encontrándose una diferencia marcada en los resultados obtenidos para la actividad antioxidante debido a los tratamientos de extracción siendo superior la actividad para el extracto de la muestra obtenida en fresco. En cuanto a la prueba de toxicidad no se encontró diferencia marcada en cuanto a los tratamientos de preparación de los extractos, ya que ambas muestras mostraron una toxicidad moderada respecto a la *A. salina*. Los resultados de los ensayos de evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres, contenido total de fenoles, y toxicidad frente a *A. salina* mostraron que los extractos en fresco son superiores a los de las muestras secas

Abstract

In Patía municipality (82 kilometers to the south of Popayan) calabash tree (*Crescentia cujete* L) has a cultural and economic value to most of its inhabitants. This plant also has uses in popular medicine of the region. The fruit is harvested, cooked and once it is dried, it is used generally to pack a product obtained from milk which is a type of caramel called “manjarblanco” that serves as a financial support to the families of the region. In the last years the use of the fruit as packaging for the product mentioned above has been replaced for wood and plastic, hence the financial benefit that the families obtained from the fruit has decreased. The fruit’s pulp is used traditionally to treat cervical cancer, property that has been studied through the determination of the antiproliferative and apoptotic effect of the extract on human lymphocytes harvested *in vitro* with satisfying results. This work is looking to determine a potential added value, reaffirming the empirical knowledge about calabash tree thanks to popular medicine. Investigations that have been carried out about the determination calabash tree’s antioxidant capacity have been realized using the full fruit and they do not specified the use of the pulpa, besides they follow protocols of extraction that are conventional ones (reflux heating or Soxhlet), this is, the treatment to which the sample is submitted is very similar to the one that is use in traditional medicine generally through infusion. Another marked difference is the samples’ storage protocol because they use temperatures of -20 °C or below (up to -80 °C) which require very expensive equipment. Other studies mention the use of the aerials parts from this plant although it is not specified the use of the pulp, neither the extraction process nor the protocol followed for the antioxidant tests.

In this work was carried out the determination of the antioxidant activity (DPPH, ABTS) and the toxicity by brine shrimp *Artemia salina* (*A. salina*) method of the ethanolic extracts of two types of samples from calabash tree’s pulp (one fresh and another submitted to a drying process at 40 ° C) finding a marked difference in the results obtained for the antioxidant activity because of the treatments being superior the activity for the extract obtained from the fresh sample. About the toxicity test it was not found a marked difference with regard to the treatments because both samples showed a moderate toxicity regarding *A. salina*. The results from the assays of evaluation of antioxidant capacity, total phenol content and toxicity toward *A. salina* showed that all the fresh extracts are superior to the samples dried at 40 °C.

1. Planteamiento del problema

En la región del Valle del Patía un número representativo de familias derivan su sustento de la recolección de frutos del totumo (*Crescentia cujete* L) de los que elaboran los “mates o puros”, los cuales son comercializados como recipientes para empaque del dulce de leche, sin embargo los productores de este manjar típico han optado por sustituir los “mates o puros” por recipientes elaborados de madera o plástico, situación que ha ocasionado una disminución progresiva en la demanda de estos productos y como consecuencia se afecta la generación de ingresos económicos de los miembros de la agrocadena del totumo. De otro lado se resalta el valor significativo que tiene el totumo en la medicina tradicional de la región del Valle del Patía, por lo que es de gran importancia adelantar procesos de investigación que validen los usos terapéuticos tradicionales, con lo que se permite avanzar en la búsqueda de usos alternativos para las diferentes partes del fruto del totumo que no están siendo aprovechadas; en este caso la pulpa.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS; se cuantificó la cantidad de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y se determinó la actividad toxicológica preliminar mediante el método de *A. salina* de dos muestras de la pulpa del totumo: una en fresco y otra seca a 40 °C con el ánimo de evaluar la influencia del pardeamiento que puede sufrir la pulpa de totumo.

2. Marco teórico

2.1 Familia Bignoniaceae

La familia Bignoniaceae, del orden Lamiales consta de alrededor de 120 géneros y 800 especies. La familia se halla en regiones tropicales de Sur América y África, pero algunas especies son ampliamente cultivadas como ornamentales (Lino von Poser *et al.* 2000). En estudios sistemáticos recientes, las Bignoneaceae están divididas en ocho tribus: Tecomeae, Bignonieae, Crescentieae, Eccremocarpeae, Tourrettieae, Oroxyleae, Coleeae y Schlegeloieae. La última, la cual es una pequeña tribu con solo tres géneros, es considerada como transicional hacia Scrophulariaceae. De las ocho tribus sólo las primeras tres se encuentran en Brasil. Estas son más fácilmente distinguidas por su hábitat y la estructura de la fruta. Generalmente, la Tecomeae tiene frutos dehiscentes perpendiculares al septum, y un hábitat arborescente. La Bignonieae tiene frutos dehiscentes paralelos al septum y todas las especies son vides. La Crescentieae tiene frutos indehiscentes, y las especies son árboles o arbustos (Lino von Poser *et al.* 2000). Las especies de la familia se usan para muchos propósitos tales como la horticultura, fuente de madera, tintes y medicina (Martin *et al.* 2007). La química de los géneros y especies de esta familia se ha estudiado poco. Esta familia es considerada como la segunda más abundante en diversidad de las especies de plantas leñosas (Bittencourt Jr *et al.* 2011). Las Bignoniaceae se caracterizan por la presencia de terpenoides, flavonoides, alcaloides y derivados aromáticos de la vía del ácido shikímico (Simões *et al.* 2013). Pocas especies de esta familia tienen significancia económica fuera de la horticultura (*Bignonia*, *Campsis*, *Catalpa*, *Jacaranda*, *Spathodea*, y *Tabebuia*) aunque numerosas especies han sido usadas por pueblos indígenas como alimento, madera, recipientes, usos medicinales y rituales (Olmstead *et al.* 2009).

En Colombia se pueden encontrar diferentes especies de esta familia. Un género bastante representativo de esta familia es el *Jacaranda*, el cual es interesante desde la perspectiva química y biológica. Se pueden encontrar 5 especies de este género, *Jacaranda caucana* ssp. *caucana*, *Jacaranda copaia* ssp. *spectabilis*, *Jacaranda glabra*, *Jacaranda obtusifolia* ssp. *obtusifolia*, *Jacaranda* spp. (González *et al.* 2006; Jiménez *et al.* 2006; Gachet *et al.* 2009; Jiménez *et al.* 2011). La especie *Jacaranda caucana*, es un árbol, que se usa comúnmente contra el reumatismo, resfriados y enfermedades de la piel (Weniger *et al.* 2001). Otras especies que se pueden encontrar son *Delostoma roseum*, *Tabebuia chrysantha*, *Tabebuia* sp., (Wille *et al.* 2000).

2.2 Género: *Crescentia* L.

El género *Crescentia* L (Bignoneaceae) está representado por alrededor de 6 especies distribuidas en América tropical, Asia y Malasia (Madhukar *et al.* 2013). Actualmente se reconocen 6 especies del género *Crescentia*: *C. alata*, distribuida en México, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, y La India; *C. amazónica* (Brasil, Colombia, Perú, y Venezuela); *C. kujete* de amplia distribución como especie cultivada (Belice, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guayana Francesa, Gabón, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Panamá y Perú); *C. linearifolia*, (Belice, República Dominicana, Haití, Islas de Barlovento, Puerto Rico, Estados Unidos y Las Islas Vírgenes); *C. mirabilis* (Cuba); *C. portoricensis* (Puerto Rico y Estados Unidos). El totumo (*C. kujete*) y el jícaro o cirián (*C. alata*), son dos especies tan similares en su morfología, usos y manejo, que generalmente se describen juntas en los manuales de agroforestería (Calle *et al.* 2011).

2.3 Especie: *Crescentia kujete* L.

Corresponde a arboles de hojas alternas, solitarias o agrupadas en los nudos, de simples a trifolioladas. Poseen hojas perennes y alcanzan alrededor de 6 a 9 metros de altura con una corona amplia e irregular compuesta de ramas de larga extensión cubiertas con hojas brillantes de color verde (Figura 1).

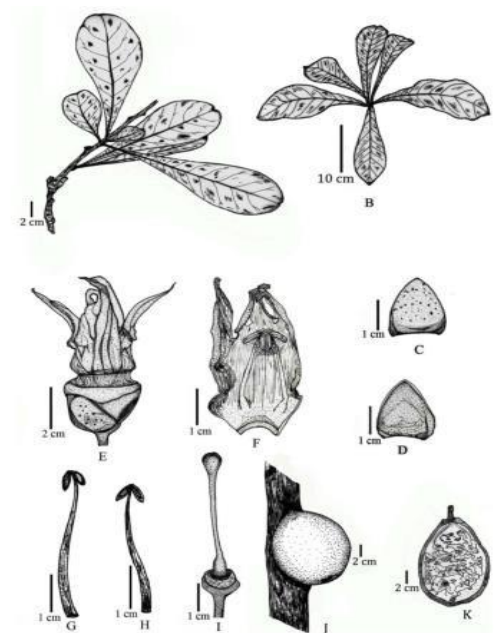


Figura 1. Árbol de Totumo (Izquierda), Partes de la planta (Derecha) A. Ramita; B. Hojas; C. Cáliz superficie dorsal; D. Cáliz superficie ventral; E. Flor; F. Sección vertical de la flor; G. Estambre grande; H. Estambre pequeño; I. Pistilo; J. Fruto; K. Sección vertical del fruto (Madhukar *et al.* 2013).

Sus hojas espatuladas a oblanceoladas, son simples y de diferentes tamaños que van de los 6 a 15 cm de largo, obtusas, agudas o cortantes acuminadas en el ápice, estrechándose hacia la base casi sésil de color verde oscuro, dispuestas en grupo, salen de un mismo punto. Posee grandes flores solitarias, amontonadas laterales o axilares, de color blanco amarillentas con tonalidad verdusca, en forma de campana con pétalos gruesos y de aspecto arrugado. Se agrupan a lo largo de las ramas o sobre el mismo tronco. Tienen un diámetro aproximado de 4 a 7 cm y de 2 a 3 cm de ancho en la parte media. El fruto tiene consistencia dura y formas y tamaños variables. Los hay de forma casi esférica y ovoide-elíptica, que varían en tamaños de entre 10 y 30 cm de diámetro, aunque los hay de hasta 50 cm. El fruto es leñoso, de cascara dura de color verde brillante y de superficie lisa. Cuando está maduro o seco se torna de color gris oscuro. Contiene en su interior una pulpa gelatinosa blanca que encierra numerosas semillas pequeñas, comprimidas, insertadas en placentas esponjosas. Cuando está maduro el fruto, la pulpa se torna de color grisáceo o marrón oscuro. El tallo tiene un diámetro de 20 a 40 cm, de corteza delgada, lisa o ligeramente escamosa y de color castaño claro o gris. En las ramas gruesas se presentan nudos de color de la corteza adulta y a lo largo de ellas ramitas laterales muy cortas en grupos de 3 a 5 con hojas agrupadas en la yema. Este árbol se multiplica por semilla y por esquejes o porciones de tallo.

2.4 Origen y distribución del totumo *Crescentia cujete* L.

El totumo es originario de América y se encuentra cultivado y silvestre en distintas clases de terrenos, en llanuras, bosques y colinas. Puede verse en el sur de los Estados Unidos (Florida), México, América Central, el Caribe y Suramérica. Crece en regiones tropicales por debajo de los 500 msnm, pero también se siembra en zonas subtropicales como las Islas Canarias, España. En Colombia, el totumo se aprovecha en varios departamentos como Antioquia, Atlántico, Bolívar, Chocó, Cundinamarca, Guajira, Cesar, Magdalena, Norte de Santander, Valle, Cauca y los Llanos Orientales. El totumo se adapta a diferentes ecosistemas y se encuentra en las cinco regiones geográficas de Colombia, desde el nivel del mar en la región Caribe hasta los 1500 metros de elevación en la zona andina (Calle *et al.* 2011).

2.5 Estudios realizados sobre el totumo

2.5.1 Estudios sobre usos tradicionales

Se reporta que el totumo en Bolivia (Hajdu *et al.* 2012) se usa para el tratamiento del sistema genitourinario y que también es usado en conjunto con *Hydrocotyle ranunculoides* L., para el tratamiento de desórdenes hepáticos por la comunidad del porvenir en la reserva indígena del bajo Paraguaná. Se reporta además el uso de esta planta en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades respiratorias en la medicina tradicional mexicana (Heinrich *et al.* 1998).

En el amazonas peruano se realizó una encuesta de campo mediante entrevistas a 140 individuos del valle Chazuta sobre el uso de las plantas medicinales y se encontró que la pulpa se usa para el tratamiento de la tos y como vomitivo (Sanz-Biset *et al.* 2009). En un estudio etnobotánico se reporta que se usa la pulpa (interna y externamente) y el tronco del totumo para el tratamiento de enfermedades dermatológicas, del sistema esqueleto-muscular, y problemas respiratorios en Oaxaca, México (Frei *et al.* 1998). La pulpa también se usa para el tratamiento de enfermedades de la piel de perros en Trinidad y Tobago (Lans *et al.* 2000).

Las hojas son usadas tradicionalmente para el tratamiento de leishmaniasis en Ecuador. Estas se usan también para el tratamiento de la tos, la tuberculosis y el asma en Huestesca Potosina, México. Las flores se usan en la medicina tradicional de República Dominicana para regular la menstruación (Ososki *et al.* 2002).

El fruto y la cascara se usan como laxante y purgante (Gupta *et al.* 2005; Medeiros *et al.* 2012). El fruto se usa también para el tratamiento del cáncer (Alonso-Castro *et al.* 2011), para la reducción de la fiebre (Coe 2008), y para el tratamiento de mordeduras de serpiente (fruto verde) (Otero *et al.* 2000).

2.5.2 Estudios químicos y biológicos

La evaluación de las propiedades antibacteriales de *Crescentia cujete* L., se ha realizado (Meléndez *et al.* 2006). En la flor del totumo se detectaron una serie de dimetilsulfoxidos que contienen de dos a cuatro átomos de azufre. Estos compuestos fueron muestreados mediante la técnica headspace e identificados por GC y GC/MS (Bestmann *et al.* 1997).

Se han aislado unas furofuranonaftoquinonas mediante un bioensayo de fraccionamiento dirigido del extracto metiletilcetonico de las virutas de madera seca del totumo (Heltzel *et al.* 1993). Se reportan unos iridoideos y glucósidos iridoideos obtenidos mediante la separación cromatográfica del extracto metanólico del fruto de *Crescentia cujete* L., que se identifican mediante el análisis espectroscópico de resonancia magnética-¹H, ¹³C y espectrometría de masas (Kaneko *et al.* 1997). Se reporta el contenido mineral del fruto del totumo, macronutrientes (Ca, P, K, Mg, Na, Cl, S) y micronutrientes (Mn, Zn, Fe, Cu, Se, Co, Ni, Cr) determinados mediante espectrofotometría de absorción atómica (Ca, P, Mg, K, Na, Zn, Cr, Fe, Mn, Ni, Cu, Se y Co), con la excepción del P y el Se, ya que el P fue analizado mediante un método colorimétrico usando el reactivo molibdovanadato; y el Se, se analizó mediante un espectrofotómetro acoplado a un generador híbrido (FIAS-MHS); el Cl se analizó por titulometría, y el S se analizó mediante turbidimetría (Leterme *et al.* 2006).

Se llevó a cabo la síntesis de un metabolito 3-hidroximetilfuro[3,2-b]nafto[2,3-d]furan-5,10-diona aislado del totumo (Nielsen *et al.* 2009). Se reporta la obtención de unos *n*-alquilglicósidos y una *p*-hidroxibenzoiloxiglucosa del fruto (Kaneko *et al.* 1998).

Se evaluó la actividad antioxidante TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox) y ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) y el contenido polifenólico (Método Folin-Ciocalteu) del extracto acuoso del fruto del totumo (Lizcano *et al.* 2010); teniendo como diferencia con el trabajo presente el tipo de extracto con el que se trabajó, ya que en este caso se utilizó el extracto etanólico y que tampoco se especifica la parte del fruto que usan para realizar el análisis. Se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y la prueba de decoloración del β -caroteno y la citotoxicidad (*A. salina*) del extracto metanólico de las partes aéreas del totumo (David *et al.* 2007). Teniendo en cuenta que con el presente trabajo se difiere en la parte de la planta que se usa y el tipo de disolvente usado para la obtención del extracto.

2.6 Radicales libres

Un radical libre es una especie química (molécula o átomo) que presenta al menos un electrón no apareado. La mayoría de los radicales libres son en extremo reactivos y tienden a asociarse “apareando” el electrón libre.

Los radicales derivados del oxígeno conocidos como Radical Oxygen Species o Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) son altamente reactivas y son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas. Recientemente se les ha implicado en diversos padecimientos como la carcinogénesis, el envejecimiento y con desórdenes de tipo neurológico (Hampel *et al.* 2011) como la epilepsia (Mecocci *et al.* 2012), la enfermedad de Huntington (Wu *et al.* 2011) y el mal de Parkinson (Zana *et al.* 2007). Al formarse los radicales pueden interactuar rápidamente con moléculas orgánicas tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, e incluso con el ADN, provocando en ellas diversas alteraciones estructurales, que conducen a alteraciones de tipo funcional, y de esta manera la fisiología de las células y por consecuencia la de los organismos, se ve afectada.

Los radicales son generados durante el metabolismo oxidativo y la producción de energía en el cuerpo, por lo que hacen parte de diversos procesos de importancia que se llevan a cabo en el organismo. Estos están involucrados en: reacciones catalizadas por enzimas; transporte de electrones en la mitocondria; transducción de señales y expresión de genes; activación de factores de transcripción nuclear; acción antimicrobiana de neutrófilos y macrófagos (Figura 2) (Cadenas *et al.* 2002). Lo anterior muestra que estas sustancias son también benéficas para el organismo, de hecho en las últimas décadas los radicales libres y otras moléculas pequeñas han emergido como reguladores importantes de muchos procesos fisiológicos y patológicos; se ha establecido que a niveles fisiológicos bajos las ROS (junto con las especies reactivas de nitrógeno, RNS) sirven como mensajeros de señalización para mediar varias respuestas biológicas, incluyendo expresión genética, proliferación celular, angiogénesis, inmunidad innata, muerte celular programada y la senectud.

Por otro lado también se conoce que niveles elevados de estas moléculas reactivas de corta vida pueden ejercer efectos adversos mediante la causa de daño oxidativo hacia macromoléculas biológicas y el rompimiento del balance de oxidación reducción (redox) (Fransen *et al.* 2012). En años recientes, una cantidad substancial de evidencias han indicado un papel clave de los radicales libres como, un gran contribuyente del envejecimiento y enfermedades degenerativas del envejecimiento, tales como el cáncer, (Letelier *et al.* 2008; Badarinath *et al.* 2010) enfermedad cardiovascular (Apak *et al.* 2013), cataratas y disfunción cerebral (Atoui *et al.* 2005), y afecciones al sistema inmune (Leong *et al.* 2002).

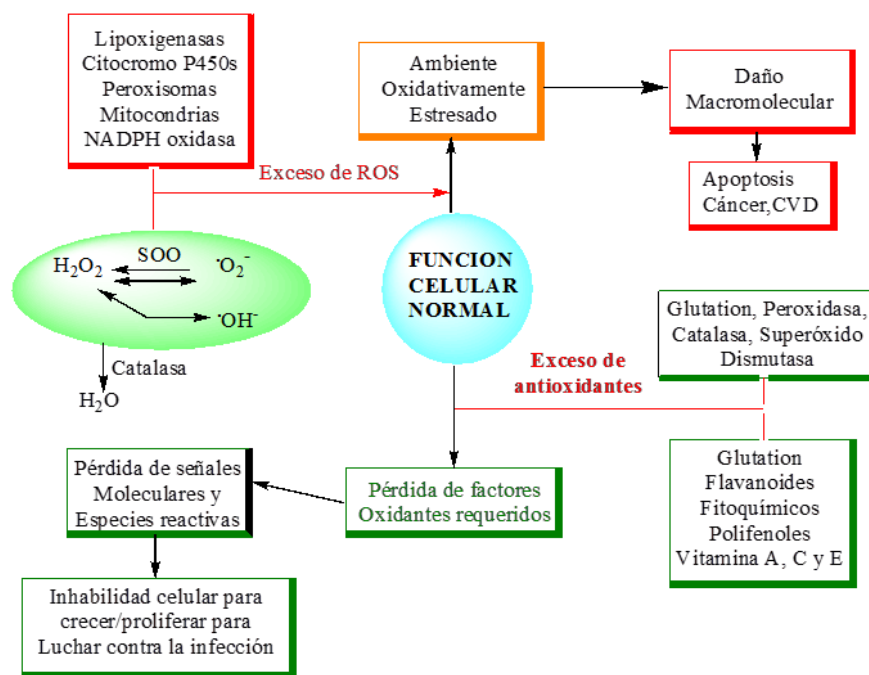


Figura 2. Procesos Bioquímicos en los que están involucrados los Radicales Libres.

Las especies RNS (especies reactivas de nitrógeno) comprenden un rango diverso de compuestos con propiedades distintas y contrastantes, de las cuales la única característica unificadora puede ser que se derivan del óxido nitroso (NO). Se tiene conocimiento de la biología y la bioquímica de algunas RNS específicas, sus efectos sobre la fisiología normal y su contribución potencial hacia enfermedades. Al igual que las ROS, las RNS se derivan de las interacciones de radicales libres generados biológicamente para formar especies más persistentes dando como resultado múltiples efectos biológicos (Patel *et al.* 1999).

Es importante tener en cuenta que los términos ROS/RNS no tienen una definición química específica y pueden incluir radicales libres y especies no-radicalarias. La propiedad general que todos ellos comparten es que las ROS/RNS reaccionan con moléculas biológicas generando cambios en las funciones celulares que pueden contribuir a la señalización celular en condiciones controladas o a la patología de una enfermedad (Martins Chaves *et al.* 2000; Zelikson *et al.* 2013).

2.7 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando se encuentra presente en concentración más baja comparada con la del sustrato oxidable, disminuye o previene significativamente la oxidación del sustrato (Cadenas *et al.* 2002; Atoui *et al.* 2005; Letelier *et al.* 2008). Dicho de otro modo un antioxidante es una molécula capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas.

Los antioxidantes son los encargados de realizar una labor bastante importante dentro de las células, ya que son los que se ocupan de protegerlas contra los radicales libres derivados del oxígeno. Su acción protectora comprende no sólo la captura de estos intermediarios agresivos, sino también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones. Los antioxidantes hacen parte de los mecanismos de protección contra los radicales libres derivados de la activación del oxígeno, los cuales son transformados a productos menos tóxicos o no tóxicos (González-Torres *et al.* 2000). Debe tenerse en cuenta también que si los antioxidantes se encuentran en exceso en el organismo pueden presentar efectos nocivos.

Los antioxidantes se clasifican en dos grupos, el primero es el de los naturales o primarios los cuales son antioxidantes que reaccionan con radicales y los convierten en productos más estables. Los antioxidantes primarios son principalmente de estructura fenólica e incluyen antioxidantes minerales, vitaminas y fitoquímicos. El segundo grupo son los antioxidantes sintéticos o secundarios, los cuales son compuestos fenólicos que desempeñan la función de captura de radicales libres y de detención de reacciones en cadena. Dentro de los antioxidantes secundarios están incluidos el hidroxianisolbutilado (BHA), el hidroxitoluenobutilado(BHT), el propilgalato (PG), el agente metálicoquelante EDTA, la butilhidroquinona terciaria (TBHQ), ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (Gupta *et al.* 2006; Hamid *et al.* 2010). En la figura 3 se muestran las estructuras de los antioxidantes sintéticos comúnmente usados (McCarthy *et al.* 2001; Estévez *et al.* 2006; Focke *et al.* 2012; Shebis *et al.* 2013).

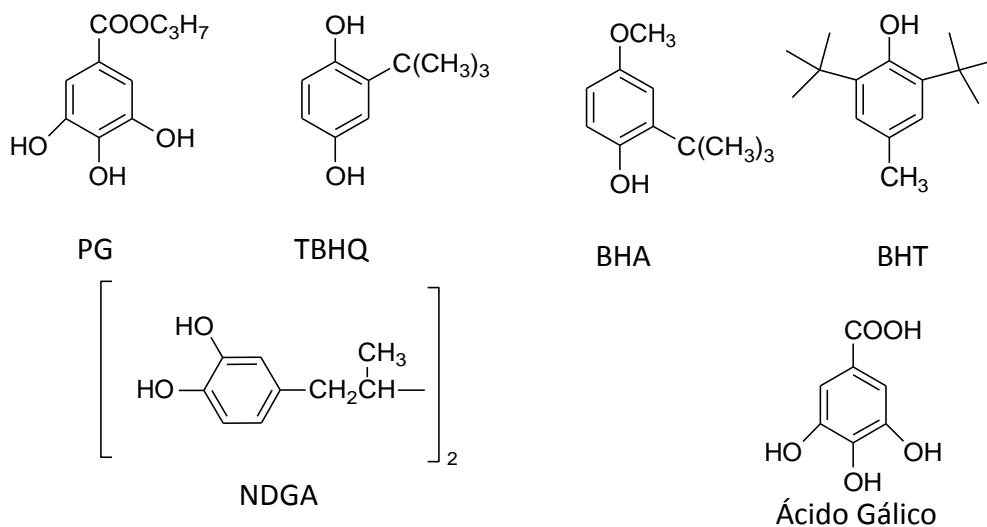


Figura 3. Antioxidantes sintéticos comúnmente usados (Bhardwaj *et al.* ; Noguera-Orti *et al.* 1999; Nivetha *et al.* 2013).

Los antioxidantes sintéticos se han usado ampliamente por muchos años, entre otras aplicaciones se han empleado para preservar y mantener la frescura, el valor nutritivo, el sabor y el color de alimentos tanto vegetales como animales (Nesci *et al.* 2011; Biparva *et al.* 2012). Sin embargo el uso continuado de estas sustancias se ha relacionado con afecciones a la salud. Algunos de ellos causan lesiones que conducen a malformaciones en ratas y hemorragias internas o externas en dosis altas que son lo suficientemente severas como para causar la muerte de ratones y cobayas (McCarthy *et al.* 2001). Debido al hecho que los antioxidantes sintéticos pueden constituir un riesgo potencial para los consumidores, la comunidad científica ha enfocado su esfuerzo hacia la búsqueda de antioxidantes en fuentes naturales (Hygreeva *et al.* ; Lorenzo *et al.* 2013; Aladedunye *et al.* 2014; Barbosa-Pereira *et al.* 2014; Urbančič *et al.* 2014). Otra razón que ha motivado el interés por los antioxidantes naturales, es el hecho que diversos estudios muestran que el consumo frecuente de antioxidantes naturales está asociado con un menor riesgo de enfermedades de tipo: cardiovasculares, mentales, y cáncer, entre otras (Hygreeva *et al.* ; Lorenzo *et al.* 2013; Aladedunye *et al.* 2014; Barbosa-Pereira *et al.* 2014; Urbančič *et al.* 2014). Los antioxidantes naturales son más fácilmente aceptados por los consumidores, se consideran seguros, no requieren pruebas de seguridad para legislaciones, se encuentran en alimentos que las personas han consumido por cientos de años o los han mezclado con ellos para mejorar sus propiedades organolépticas, como en el caso de los condimentos y especias, además de aumentar valor nutricional (Pérez-Jiménez *et al.* 2005; Ozgen *et al.* 2006; Thaipong *et al.* 2006; Pellegrini *et al.* 2007).

Desde tiempos antiguos, el uso de las plantas como alimentos y medicinas es parcialmente atribuido a la eficacia biológica de metabolitos secundarios que poseen actividad antioxidante, tales como compuestos fenólicos, vitamina C, E y carotenoides. Los compuestos fenólicos constituyen la clase más abundante de antioxidantes con un total estimado de consumo dietario diario tan alto como 1 g/día, el cual es 10 veces más alto que el consumo de vitamina C y 100 veces más alto que el de la vitamina E

(Ndhlala *et al.* 2010). Las fuentes más importantes de antioxidantes naturales se pueden incluir en diferentes categorías tales como frutas (bayas, cerezas, uvas negras, cítricos, ciruelas, manzanas, peras, kiwi), vegetales (berenjena, achicoria, alcachofa, perejil, ruibarbo, hojas de batata, cebolla amarilla, col rizada, puerro, frijoles, espinaca), harinas (avena, trigo, arroz), té (negro, verde), bebidas alcohólicas (vino rojo, sidra), otras bebidas (jugo de naranja, café, chocolate), y hierbas y especias (romero, salvia, orégano, tomillo, ajedrea, jengibre) (Dimitrios 2006; Sikora *et al.* 2008; Al-Jaber *et al.* 2011).

Muchos estudios epidemiológicos han indicado que un alto consumo de productos provenientes de plantas, está asociado con un riesgo reducido de varias enfermedades crónicas tales como aterosclerosis y cáncer. Estos efectos benéficos se han atribuido parcialmente a compuestos que poseen actividad antioxidante. Los principales antioxidantes de los vegetales son las vitaminas C y E, carotenoides y compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides. Estos antioxidantes eliminan radicales e inhiben la cadena de iniciación o rompen la cadena de propagación (la segunda línea de defensa). La vitamina E y los carotenoides también contribuyen a la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo debido a que inhiben al oxígeno singlete. Los flavonoides así como la vitamina C mostraron actividad protectora hacia el α -tocoferol en el LDL humano y también pueden regenerar la vitamina E del radical α -cromanoxi (Podsędek 2007). Estos compuestos se han relacionado con la prevención de distintos procesos crónicos, como la enfermedad cardiovascular, algunos desórdenes neurológicos y ciertos procesos inflamatorios (Pérez-Jimenez *et al.* 2007). Estos y otros beneficios han hecho que actualmente haya un gran interés por la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes (Podsędek 2007).

2.8 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante

Durante los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos para evaluar la capacidad antioxidante de una sustancia o un extracto, cada uno basado en distintos aspectos, como la reducción de metales (FRAP), la capacidad de atrapamiento de radicales peroxilo (ORAC, TRAP), de radicales hidroxilo (ensayo de la desoxirribosa), de radicales modelo generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (ABTS, DPPH), en la cuantificación de productos generados durante la peroxidación lipídica (TBARs, oxidación de LDLs), etc. (Pérez-Jimenez *et al.* 2007). Algunos de los métodos más comúnmente usados debido a su bajo costo y a que son relativamente fáciles de realizar son: El ABTS que usa el ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) como oxidante; el poder antioxidante reductor férrico (FRAP); el método de atrapamiento del radical libre DPPH (2,2'-difenil-1-picrihidracilo); La capacidad de absorción radical del oxígeno (ORAC); Los potenciales totales de absorción radical (TRAP); y los ensayos fotoquimioluminiscencia (PLC).

La necesidad de usar métodos estandarizados ha dado como resultado una serie de protocolos bio-analíticos, para evaluar la eficacia antioxidante de diversos compuestos que incluyen algunas características básicas comunes tales como: la cuantificación y en algunos casos, la identificación de los compuestos asociados con la actividad antioxidante; la cuantificación de la actividad atrapadora de un radical y la determinación del potencial de reducción formal; la evaluación de la inhibición o el punto final de la oxidación de un lípido en un sistema biológico modelo; y el estudio de la eficiencia de un marcador oxidativo relevante (Litescu *et al.* 2010). No hay un sistema universal capaz de proveer información respecto al poder antioxidante “real”, o la capacidad de un único antioxidante o una mezcla compleja de antioxidantes de una muestra vegetal y una evaluación comparativa de la eficacia antioxidante es difícil de realizar debido a que la actividad depende del sustrato, el medio de reacción, las condiciones de oxidación entre otras (Litescu *et al.* 2010). Los antioxidantes pueden reducir a los radicales principalmente mediante dos mecanismos: La transferencia de un solo electrón (ABTS, FRAP y DPPH) y la transferencia de un átomo de hidrogeno (ORAC y TRAP) (Ozgen *et al.* 2006).

2.8.1 Método del DPPH

La molécula 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Figura 4) se caracteriza por ser un radical libre estable, debido a la delocalización de un electrón libre a través de toda la molécula, con lo cual este no se dimeriza, como es el caso con la mayoría de los otros radicales (Molyneux 2004). Este ensayo está basado en la medición de la habilidad de los antioxidantes para reducir al radical DPPH[•]. Esta capacidad puede ser evaluada mediante resonancia de spin electrónica (EPR) o espectrofotométricamente mediante la medición de la disminución de su absorbancia. Este método es simple, rápido, y solo requiere un espectrofotómetro UV-vis para llevarse a cabo, estas razones explican el hecho de que esta técnica sea ampliamente usada para la evaluación de la capacidad antioxidante (Prior *et al.* 2005).

Cuando el DPPH de color morado, reacciona con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno (AH) se genera la forma reducida del DPPH y este se torna amarillo, lo cual implica una disminución de la absorbancia a 515 nm (Figura 4), este cambio es el principio del método y se puede medir espectrofotométricamente.

En la figura 4 se muestra la reacción de radical DPPH[•], y la molécula donadora AH:

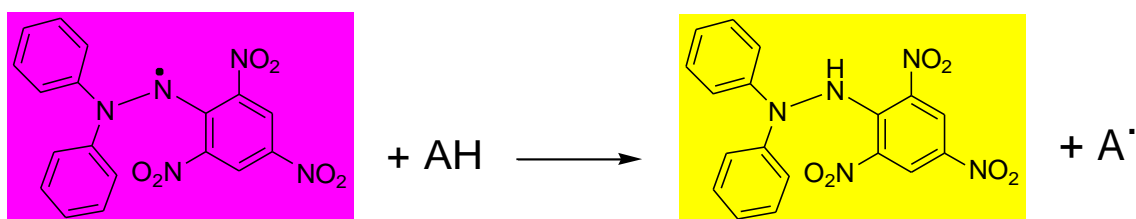


Figura 4. Reacción del DPPH

En los productos se muestra la forma reducida del DPPH[·] (DPPHH) y el radical libre A[·] producido en la primera etapa. Este último radical sufrirá reacciones que controlan la estequiometría total, esto es, el número de moléculas de DPPH reducidas (decoloradas), por una molécula del reductor. La reacción de la figura 4 se usa como modelo de las reacciones que tienen lugar en un sistema de oxidación, tal como la auto oxidación de un lípido u otra sustancia insaturada. El radical DPPH se usa para representar los radicales libres formados en un sistema cuya actividad es reducida o suprimida por la sustancia AH (Bondet *et al.* 1997; Molyneux 2004).

Una forma de expresar los resultados la cual se usa en este trabajo es en términos del porcentaje de DPPH remanente el cual es calculado como sigue:

$$\%DPPH'_{REM} = 100 \times [DPPH']_{REM} / [DPPH']_{T=0} \quad (1)$$

El porcentaje de DPPH[·] Remanente (%DPPH[·]_{REM}) es proporcional a la concentración del antioxidante y la concentración que causa una disminución en la concentración inicial del radical DPPH[·] ([DPPH[·]]) de un 50% se define como EC₅₀ (Prior *et al.* 2005). [DPPH[·]]_{REM} corresponde la concentración remanente del radical DPPH[·].

2.8.2 Método del ABTS

Este método da una medida de la actividad antioxidante de una gran variedad de muestras determinada mediante la decoloración del catión radical ABTS^{·+} a través de la medición de la disminución de la absorbancia del catión radical (porcentaje de inhibición) a 734 nm (Re *et al.* 1999). El radical ABTS^{·+} es reactivo hacia la mayoría de antioxidantes. En este método, la sal diamónica 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) ABTS es convertida en su catión radical ABTS^{·+} mediante la adición de persulfato de potasio. Durante esta reacción el catión radical azul-verdoso oscuro ABTS^{·+} regresa a su forma neutra incolora (Re *et al.* 1999; Prior *et al.* 2005; Floegel *et al.* 2011; Martysiak-Zurowska *et al.* 2012). Debido a que este ensayo es operacionalmente simple es usado ampliamente en muchos laboratorios para la evaluación de la actividad antioxidante (Prior *et al.* 2005). El catión radical ABTS^{·+} es soluble tanto en disolventes acuosos como orgánicos y puede ser usado en múltiples medios para determinar las capacidades antioxidantes de muestras, moléculas y extractos hidrofílicos y lipofílicos (Prior *et al.* 2005).

El grado de decoloración se puede expresar como un porcentaje de inhibición del catión radical ABTS^{·+} ó como una función de la concentración y el tiempo, el cual es calculado en comparación a una curva de calibración de una sustancia estándar (Trolox), preparada bajo las mismas condiciones (Re *et al.* 1999; Prior *et al.* 2005). Mayores valores indican mayor actividad de la muestra (Pérez-Bonilla *et al.* 2006) y se calcula según la fórmula:

$$\%RS = (ABS_{blanco} - ABS_{muestra} / ABS_{blanco}) \times 100 \quad (2)$$

Donde ABS_{blanco} es la absorbancia del blanco y ABS_{muestra} es la absorbancia de la muestra.

Con el fin de producir el catión radical $ABTS^{\cdot+}$, (Figura 4), (Lee *et al.* 2005; Apak *et al.* 2013) el ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) es disuelto en un buffer de fosfato, y es tratado con una solución de persulfato de potasio. La mezcla se almacena a temperatura ambiente en la oscuridad durante 12-16 h hasta que se torna azul-oscuro. Cuando el compuesto o la muestra de extracto es agregado a la mezcla de reacción el radical es reducido en proporción a la concentración de la muestra causando una variación en la coloración, la cual es evaluada espectrofotométricamente (Litescu *et al.* 2010).

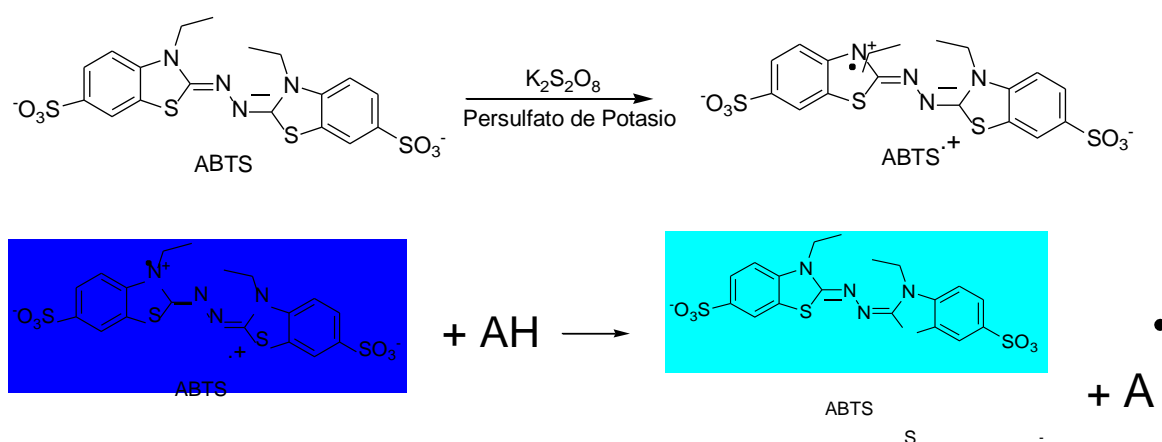


Figura 4. Reacción del ABTS

2.9 Determinación del contenido total de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu

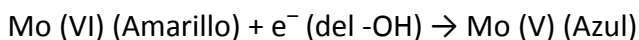
El ensayo de Folin-Ciocalteu (FC) es usado regularmente para determinar el contenido total de fenoles en una gran variedad de muestras vegetales (Lester *et al.* 2012).

Este método está basado en la oxidación de compuestos fenólicos por el reactivo de FC. Dentro de las ventajas del método están su rapidez y facilidad para realizar este ensayo y evaluar sus resultados (Prior *et al.* 2005).

Este método usa un agente oxidante molibdotungstosfórico hiperaniónico (mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno) el cual permite determinar indirectamente los compuestos fenólicos de la muestra en estudio (Lester *et al.* 2012). Los productos de la reducción del óxido metálico tienen un color azul y una amplia absorción de luz con un máximo a 765 nm. Aunque la química de los tungstos y molibdatos es bastante compleja, se sabe que los isopolifosfotungstos en el estado de valencia 6+ del metal y los compuestos de molibdeno son amarillos. Secuencias de reducciones reversibles de uno o dos electrones generan especies azules tales como $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$. En principio, la adición de un electrón a un orbital no enlazante reduce unidades nominales MoO^{4+} a especies isoestructurales azules MoO^{3+} . La intensidad de la luz es

proporcional a la concentración de los fenoles en la muestra evaluada (Prior *et al.* 2005; Rover *et al.* 2013).

La reacción que se lleva a cabo en esta prueba se puede resumir como sigue:



De esta reacción se puede decir que el agente oxidante es un heteropoliácido molibdofosfotungstíco que está comprendido de $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ (heteropolianión: $\text{P}_2\text{Mo}_5\text{W}_{13}\text{O}_{62}^{6-}$), en el cual el centro activo hipotético es Mo(VI) (Apak *et al.* 2013).

Los valores se expresan en términos del patrón utilizado en el proceso el cual es el ácido gálico (por medio de la ecuación de la curva de calibración), esto es, como equivalentes de ácido gálico (GAE)/g muestra seca (Miliauskas *et al.* 2004).

2.10 Determinación de la actividad toxicológica mediante el ensayo de *Artemia salina*

Este bioensayo de letalidad ha sido usado extensivamente en la evaluación primaria de extractos crudos así como compuestos aislados para evaluar la toxicidad hacia los camarones de salmuera (*A. salina*) (Ullah *et al.* 2013). *A. salina* es un crustáceo que pertenece a la subclase *Branchiopoda* del orden Anostraca. Este se halla alrededor del mundo en cuerpos de agua que van de salobre a ultrasalinas. Esta alta tolerancia a un alto rango de salinidad (de 10-20 a 180-220 g/l) lo hace un animal relativamente fácil de criar y estudiar (Colegate *et al.* 1993). El ensayo tiene la gran ventaja de que no se requiere equipo especial para llevarlo a cabo por lo que es relativamente barato. Además de requerir una pequeña cantidad de muestra a evaluar (2-20 mg); la prueba es bastante eficiente y los huevos de *A. salina* pueden ser almacenados por años sin perder su viabilidad (Sorgeloos *et al.* 1978; Santos Pimenta *et al.* 2003; Ullah *et al.* 2013). Con esta prueba básicamente se evalúa la toxicidad de la muestra a evaluar (extracto o compuesto puro) frente a los nauplios (por la etapa de desarrollo) de *A. salina*, la cual provee una indicación de posibles propiedades citotóxicas por parte del material evaluado (Ullah *et al.* 2013). El efecto inhibitor de los extractos se asocia generalmente con los componentes tóxicos presentes en la muestra que poseen propiedades larvicidas y ovicidas (Ullah *et al.* 2013).

Una de las formas más comunes de presentar los resultados es mediante la concentración letal para el 50% (LD₅₀) de la mortalidad después de 6 h de exposición, la LD₅₀ aguda o después de 24 h de exposición, la LD₅₀ crónica, se determina como la medida de toxicidad del extracto o el compuesto. La elección del tiempo, gobernada por la solubilidad del extracto o sustancia, es en gran parte de conveniencia ya que la prueba ha de ser rápida y simple. Así, los extractos polares y las sustancias bastantes solubles en agua, deberían beneficiarse de la exposición más corta, mientras que las concentraciones mucho más bajas, que se pueden obtener con extractos no polares o insolubles requieren los tiempos más largos (Colegate *et al.* 1993).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la capacidad antioxidante y la actividad farmacológica del extracto etanólico de dos muestras de la pulpa del totumo (una en fresco y otra sometida a un proceso de secado a 40 °C).

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1** Obtener el extracto etanólico a partir de dos muestras de pulpa de totumo (muestra fresca y muestra secada en estufa a 40°C) utilizando como método la extracción por ultrasonido.
- 3.2.2** Fraccionar el extracto etanólico total mediante extracción líquido-líquido utilizando disolventes incrementando la polaridad (*n*-hexano, acetato de etilo y *n*-butanol)
- 3.2.3** Evaluar la capacidad antioxidante del extracto total y las fracciones obtenidas utilizando los métodos DPPH y ABTS.
- 3.2.4** Determinar la actividad farmacológica de los extractos polares empleando el bioensayo *Artemia salina*.
- 3.2.5** Cuantificar el contenido total de fenoles mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.

4. Reactivos y disolventes

El alcohol etílico, ácido ascórbico; y metanol, utilizados fueron de la marca JT Baker. El ácido (+)-tartárico, la vainillina, el cloruro de antimonio, el ácido clorhídrico, el ácido acético, el ácido pícrico, el DL- α -tocopherol, y el acetato de etilo utilizados fueron de la marca Merck. El nitrato de bismuto III, el persulfato de potasio, la sal diamonio de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín-6-sufonato) (ABTS), y el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) utilizados fueron de la marca Sigma-Aldrich. El hidróxido de sodio, el ácido cítrico, el hidróxido de potasio, el yoduro de potasio, el ácido bórico, el fosfato dihidrógeno de potasio, el fosfato de sodio dibásico, y el dimetilsulfóxido, utilizados fueron de la marca Carlo Erba . El ácido sulfúrico y el cloruro férrico anhidro, utilizados fueron de la marca Fisher Scientific. El reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu y el ácido gálico, utilizados fueron de la marca Panreac. El cloroformo utilizado fue de la marca Mallinckrodt. La Gelatina utilizada fue de la marca Difco. El ácido-3,5-dinitrobenzoico utilizado fue de la marca Alfa Aesar. El acetato de plomo utilizado fue de la marca Laboratorios Biocroma.

5. Metodología

5.1 Recolección de material vegetal

La recolección de las muestras vegetales se llevó a cabo en el corregimiento de Galíndez, municipio del Patía, Departamento del Cauca (Latitud 01°94'224" N Longitud 77°15'819"W, Altura 601 msnm) y se realizó de forma manual, tomando los frutos de la planta que se encuentren maduros y que no presenten signos de deterioro por insectos. Los frutos se abrieron y se obtuvo la pulpa fresca a partir de la cual se prepararon los extractos como se describe más adelante.

Una muestra de la planta se registró en el herbario de la Universidad del Cauca de la siguiente manera: Cauca: Municipio, Patía, Corregimiento de Galíndez. (27/06/13), E. Valencia 01 (CAUP).

5.2 Preparación de extractos

5.2.1 Proceso de secado

La pulpa se picó en trozos pequeños de un 1 cm aproximadamente de manera uniforme con un cuchillo de acero inoxidable, luego se pesó (1272,00 g), y se introdujo en el horno Memmert, GmbH+co KG 8540 (Schwabach, Alemania) a 40 °C. Esta se pesó periódicamente durante 21 días hasta peso constante (323,32 g, 25,42 % de rendimiento, 74,58% de humedad).

5.2.2 Extracción por ultrasonido

Se tomaron 242,10 g de muestra en fresco y 323,32 g de muestra en seco y se colocaron por separado en sendos balones de 1000 ml adicionándose 500 ml de etanol y se sometieron a extracción mediante ultrasonido en un baño BRANSON 1510 (Danbury, USA), durante 1 hora. Se realizó el proceso de concentración a presión reducida (pasos 1, 2, 3 y 4, Figura 5). Culminada la extracción, se dejó enfriar el extracto etanólico total (ET) de ambas muestras 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. Posteriormente se concentró a presión reducida y finalmente el extracto de ambas muestras se almacenó en un recipiente ámbar, recubierto de papel aluminio (muestra en fresco 15,77 g, 6,51%; muestra en seco 21,77g, 6,73%). El recipiente se conservó en refrigeración a 4°C.



1



2



3



4

Figura 5.Proceso de extracción y concentración de la pulpa del totumo (*C. cujete*). 1. Disección de la pulpa; 2 y 3. Extracción por ultrasonido; 4. Concentración del extracto a presión reducida.

6. Fraccionamiento

Se disolvieron totalmente 14,08 g de extracto etanólico en fresco en 75 mL de agua destilada. A continuación se realizó una extracción líquido-líquido para lo cual se extrajo con hexano (3 x 10 mL); la fase orgánica fue decantada, y se concentró a presión reducida (Hex, 0,22g, 1,55 %). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL); la fase orgánica se decantó, y se concentró a presión reducida (AcOEt, 0,31 g, 2,21%). Posteriormente se realizó la extracción de la fase acuosa con *n*-butanol (3 x 10 mL); la fase orgánica se obtuvo por decantación, y se concentró (But, 0,74 g, 5,24 %); finalmente la fase acuosa restante se concentró a presión reducida (Acu, 7,39 g, 52,54 %).

Para la muestra en seco se disolvieron totalmente 20,02 g de extracto en 50 mL de agua destilada. A continuación se realizó una extracción líquido-líquido para lo cual se extrajo con hexano (3 x 10 mL); la fase orgánica fue decantada, y se concentró a presión reducida (Hex, 0,35 g, 1,74 %), la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL); la fase orgánica se decantó, y se concentró a presión reducida (AcOEt, 0,48 g, 2,40%). Posteriormente se realizó la extracción de la fase acuosa con *n*-butanol (3 x 10 mL); la fase orgánica se obtuvo por decantación, y se concentró (But, 0,80 g, 4,00 %); finalmente la fase acuosa restante se concentró a presión reducida (Acu, 8,93 g, 44,60 %).

7. Métodos de evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres

7.1 Método del DPPH

7.1.1 Preparación de la recta de calibración

Se preparó una curva de calibración con varias disoluciones de DPPH[•] en metanol con concentraciones comprendidas entre $2 \cdot 10^{-5}$ M y $8 \cdot 10^{-5}$ M, y se tomaron medidas de absorbancia a 515 nm con las que se preparó una recta de calibración.

7.1.2 Preparación de la solución de DPPH

Se preparó una disolución de DPPH[•] en metanol de absorbancia 0.800 ± 0.020 , para lo cual se disolvieron 2.9 mg de DPPH[•] en MeOH (100 mL), se midió la absorbancia (a 515 nm) y se fueron añadiendo pequeñas porciones de MeOH hasta que se consiguió la absorbancia deseada. La concentración exacta de la disolución se calculó por interpolación del valor de absorbancia sobre la curva de calibración.

7.1.3 Medida de la actividad antioxidante

Las concentraciones de los extractos y fracciones para llevar a cabo el ensayo de evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres fueron 2300, 2280, 2260, 2240, 2220, 2200 ppm para la muestra en seco y de 1875, 1850, 1825, 1800, 1775, 1750 ppm, para la muestra en fresco, para el patrón ácido ascórbico fueron de 0,5, 1, 2, 5, 10 ppm, y para el patrón Tocoferol fueron de 3, 5, 7, 20, 25 ppm. Todas las concentraciones descritas anteriormente se obtuvieron después de que se realizó un

ensayo preliminar con un rango de concentraciones más amplio el cual fue de 1000 a 20 ppm para las muestras en fresco y en seco y de 100 a 5 ppm para los patrones. Los extractos se prepararon por triplicado y el blanco fue una mezcla de 2 mL de disolución metanólica de DPPH[•] con 1 mL de metanol.

La capacidad atrapadora de radicales libres de cada extracto etanólico (y del ácido ascórbico y el tocoferol como patrones), se determinó mediante la medida espectrofotométrica de la habilidad de las muestras evaluadas para decolorar el radical libre modelo DPPH[•]. Esta actividad se determinó usando el método empleado por (Brand-Williams *et al.* 1995) y modificado como previamente lo reportó (Argoti *et al.* 2011). Soluciones metanólicas de cada muestra y de los patrones a diferentes concentraciones (dependiendo de su actividad) se mezclaron en una cubeta de 1 cm de paso óptico con 2 mL de una solución metanólica de DPPH[•]. El triplicado de las muestras se agitó y se incubó por 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente, y la disminución en la absorbancia a 515 nm se midió usando un espectrofotómetro UV-Génesis 6 (Madison, USA). La actividad antioxidante se expresó en términos de la concentración de los extractos (ppm) requerida para disminuir la concentración inicial del DPPH en un 50% (EC₅₀). El porcentaje de DPPH remanente después de 15 min de reacción, se calculó usando la ecuación (1) y se graficó contra la concentración del extracto (ppm) y se estableció una curva con el fin de calcular el EC₅₀.

7.2 Método del ABTS

Para los extractos y las fracciones se prepararon concentraciones de 5000 ppm para la muestra en fresco y de 7000 ppm para la muestra en seco. Los patrones se prepararon todos a 500 ppm (Tocoferol, Ácido Ascórbico, y Trolox). Estas concentraciones se definieron después de realizarse un ensayo preliminar y se utilizaron concentraciones para la muestra en seco de 10000, 7000, 4000 ppm y de 10000, 5000, 3000 ppm para la muestra en fresco y 130 ppm para el ácido ascórbico, 150 para el Trolox y 120 ppm para el tocoferol. Todas las muestras se prepararon por triplicado. Como blanco se empleó el disolvente con el que se preparó el extracto.

El catión radical se generó mediante la reacción del ABTS con persulfato de potasio de acuerdo a la literatura (Pérez-Bonilla *et al.* 2006), y la solución de ABTS^{•+} se diluyó con una solución salina de buffer fosfato (PBS) a una absorbancia de $0,800 \pm 0,3$ a 734 nm. El triplicado de las muestras se agitó y se incubó por 5 min en la oscuridad, el cambio de absorbancia se midió por espectrofotometría. La actividad antioxidante de las muestras evaluadas, se expresó como el porcentaje de atrapamiento de radicales (%RS), después de 5 min se calculó de acuerdo a la ecuación (2).

8. Determinación del contenido total de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu

El contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de las muestras se determinó mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu, basado en el procedimiento de (Miliauskas *et al.* 2004) usando ácido gálico como patrón. Una curva de calibración se graficó con varias soluciones metanólicas de ácido gálico a diferentes concentraciones (0.12 mg/mL-0.024 mg/mL) y sus absorbancias se midieron por espectrofotometría. Se tomaron, 2 mL de una solución 0,2N del reactivo de Folin-Ciocalteu y 0,4 mL de

solución metanólica de cada uno de los extractos de las muestras (tres réplicas para cada muestra) a concentraciones de 1500 y 2000 ppm se mezclaron en una cubeta de 1 cm de paso óptico. Después de incubación en la oscuridad a temperatura ambiente por 5 min, se agregaron 1,6 mL de una solución acuosa (0,0075 g/mL) de carbonato de sodio. La mezcla final se agitó y luego se incubó por 1 h en la oscuridad a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia a 760 nm. El contenido de compuestos fenólicos en cada muestra se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de extracto usando la ecuación:

$$C = c \cdot V / m$$

Donde c (ppm) es la concentración de ácido gálico obtenida de la curva de calibración ($y = 0,0076x + 0,086$, $r^2=0,99$), V (L) es el volumen de la solución del extracto evaluado y m (g) es el peso del extracto seco de cada una de las muestras.

9. Determinación de la actividad toxicológica mediante el ensayo de *Artemia salina*

Este ensayo comienza de 48 horas después de la siembra de los quistes (larvas o nauplios de *A. salina*). Se prepararon concentraciones de cada extracto de 200, 400, 500, 600, 800, y 1000 ppm. Se colectaron 10 nauplios, usando una pipeta Pasteur y una mínima cantidad de agua de mar. Los nauplios muertos se contaron después de 6 h (LC₅₀ agudo) y de 24 h (LC₅₀ crónico), este procedimiento se realiza por triplicado usándose en total 30 nauplios para cada extracto. Los nauplios se consideran muertos si permanecen inmóviles en el fondo del recipiente (Colegate *et al.* 1993). Se llevó a cabo una serie paralela de ensayos con una solución estándar de dicromato de potasio (800, 600, 400 ppm) y el blanco. Para la determinación del LC₅₀ agudo y LC₅₀ crónico los valores obtenidos en el conteo antes mencionado se procesaron mediante software DL₅₀ Hans Dahnners que permite determinar el valor correspondiente a cada LC₅₀.

10. Análisis estadístico

Los resultados de todos los ensayos se expresaron como el promedio de tres medidas \pm desviación estándar (SD). Se desarrolló además un estudio de correlación entre los resultados obtenidos con DPPH y ABTS, con los del contenido de fenoles totales mediante un análisis estadístico. Para este fin se organizó el triplicado de los datos para Folin-Ciocalteu, ABTS y DPPH, representados como los diferentes tratamientos y numerados de 1 a 10 (anexo 1), seguido a esto y para comprobar la normalidad de los datos se usó la prueba de Shapiro Wilk la cual se muestra en la sección de resultados y discusión (tabla 2). Teniendo en cuenta el resultado obtenido en la comprobación de la normalidad (ver sección de resultados y discusión), se prosiguió con la aplicación de una prueba paramétrica de varianza (ANOVA) con el fin identificar si los datos presentan o no una diferencia significativa. Teniendo en cuenta el resultado del análisis de varianza posterior a esta se aplicó la prueba de Tukey con el fin de determinar entre que grupos de datos hay una diferencia significativa y finalmente se realizó la prueba de correlaciones de Pearson, la cual muestra si hay una correlación

entre los tratamientos, esta prueba más específicamente puede ser positiva o negativa y se entiende como una relación lineal, es decir, si la correlación es positiva los valores de ambos parámetros aumentan y si la correlación es negativa, a medida que aumenta el uno, el otro disminuye (entendiéndose como una recta de pendiente negativa). Este análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS.

11. Resultados y discusión

A continuación se muestra la tabla 1 donde se resumen los datos obtenidos en cada uno de los ensayos realizados. En esta se muestra el rendimiento del extracto expresado como g extracto/g muestra seca, los valores de la actividad antioxidante para DPPH expresados como EC_{50} (ppm) \pm SD, los valores de la capacidad antioxidativa para ABTS expresados como actividad atrapadora de radicales (%RS) \pm SD, los valores del contenido total de fenoles expresados como mg GAE/g extracto \pm SD y los valores de letalidad frente *A. salina* expresados como LC_{50} (ppm) \pm SD. Esta tabla muestra los datos para ambas muestras (en seco y en fresco) tanto para sus extractos totales como para cada una de sus fracciones, además de los resultados obtenidos con los patrones usados en la determinación de la capacidad antioxidante (ácido ascórbico o vitamina C, tocoferol o vitamina E y trolox).

Tabla 1. Valores de rendimiento, capacidad atrapadora de radicales libres DPPH, ABTS, Contenido total de fenoles y letalidad obtenidos para el totumo (*C. cujete*)

Extracto	Muestra	Rendimiento de extracto ^a	DPPH-Actividad Antioxidante ^b	ABTS- actividad atrapadora ^c	Contenido total de fenoles ^d	Letalidad con <i>A. salina</i> ^e
En Seco	Extracto total	25,42	2253 ± 54,0	47,02 ± 2,52	0,015 ± 0,00058	433.31 ± 0.025
	Fracción hexano	1,55	3401 ± 80,5	8,63 ± 0,075	0,0039 ± 0,0001	
	Fracción acetato	2,21	2699 ± 72,1	37,78 ± 0,075	0,0099 ± 0,0002	
	Fracción butanol	5,24	2741 ± 110,7	19,48 ± 0,075	0,0080 ± 0,0002	
	Fracción acuosa	52,54	2456 ± 16,5	13,86 ± 0,075	0,0123 ± 0,0006	
En Fresco	Extracto total	25,06	1746 ± 76,6	52,21 ± 1,53	0,026 ± 0,00058	416.49 ± 0.015
	Fracción hexano	1,74	2675 ± 92,2	9,93 ± 0,459	0,011 ± 0,00023	
	Fracción acetato	2,40	1903 ± 2,6	39,61 ± 0,459	0,020 ± 0,00023	
	Fracción butanol	4,00	2187 ± 14,2	23,01 ± 0,459	0,018 ± 0,00015	
	Fracción acuosa	44,6	2289 ± 12,5	15,69 ± 0,346	0,017 ± 0,001	
	Ácido Ascórbico		7,32 ± 2,86	55,76 ± 0,003		
	Tocoferol		17,04 ± 1,10	43,09 ± 0,002		
	Trolox			56,10 ± 0,003		

^a Rendimiento de extracto expresado como g extracto/g muestra seca

^b Valores expresados como EC₅₀ (ppm) ± SD

^c Valores expresados como actividad atrapadora de radicales ABTS (%RS) ± SD

^d Valores expresados como mg GAE/g extracto ± SD

^e Valores expresados como LC₅₀ (ppm)

11.1 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH

La información concerniente al ensayo preliminar, las medidas del blanco, la curva de calibración, las concentraciones en el rango de trabajo, los porcentajes de inhibición, el porcentaje de DPPH remanente, para los extractos totales, los patrones y las fracciones para las muestras en fresco y en seco, y la demás información que se utilizó para obtener los resultados discutidos en esta sección se muestran en la sección de anexos (anexo 2, tablas 1-13).

Los resultados de la actividad antioxidante para el ensayo del DPPH se expresaron en términos del EC_{50} . Así entre menor sea el valor, mayor es la actividad de la muestra. Las actividades obtenidas estuvieron en el rango de 2253 ppm (para el extracto total en seco) a 3401 ppm (para la fracción hexano en seco) y de 1746 ppm (para el extracto total en fresco) a 2675 ppm (para la fracción de hexano en fresco) tal como se muestra en la tabla 1. Los mejores resultados de actividad atrapadora de radicales libres DPPH para el extracto etanólico en fresco se obtuvieron para el extracto total ($EC_{50}=1746$ ppm) seguido por la fracción de acetato ($EC_{50}=1903$ ppm), lo cual probablemente se debe a que las sustancias responsables de la actividad antioxidante (los fenoles) se encuentran en mayor concentración en estas muestras, esto se podrá corroborar en los resultados obtenidos con en el ensayo de Folin-Ciocalteu. Las muestras que menor actividad atrapadora de radicales DPPH presentaron fueron la fracción de hexano en seco ($EC_{50}=3401$ ppm) seguido de la fracción de butanol en seco ($EC_{50}=2741$ ppm), esto es probablemente debido a que el contenido de fenoles en estas muestras debe ser bastante bajo, este resultado al igual que el mencionado anteriormente se podrá corroborar con los resultados obtenidos para el ensayo de Folin-Ciocalteu.

En el trabajo de (David *et al.* 2007) se llevó a cabo la evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres DPPH con los extractos metanólicos de las partes aéreas del totumo; al comparar sus resultados ($EC_{50}=10300$ ppm) con los obtenidos en este trabajo ($EC_{50}=1746$ ppm, tabla 1) se puede apreciar una gran diferencia en los EC_{50} obtenidos, la cual indica que la concentración requerida para eliminar el 50% de los radicales DPPH es aproximadamente 6 veces más efectiva para el extracto total en fresco (10300 ppm vs 1746 ppm) y aproximadamente 4 veces más efectiva para el extracto total en seco (10300 ppm vs 2253 ppm). La diferencia podría justificarse debido a que los extractos evaluados corresponden a diferentes partes de la planta, lo cual implica que los extractos obtenidos a partir de la pulpa presentan un potencial antioxidante más alto, que el de las partes aéreas evaluadas. Lo anterior indica que a pesar de que el proceso de pardeamiento afecta los resultados obtenidos aun así se obtienen mejores resultados que en los estudios de actividad antioxidante antes realizados con el totumo.

Al comparar los resultados de actividad atrapadora de radicales libres del extracto total y las fracciones versus los patrones se puede observar que la capacidad atrapadora de los extractos preparados en las condiciones antes descritas (ver sección de metodología) es muy baja, lo cual se puede justificar debido a que los estándares son sustancias de comprobada y reconocida actividad antioxidante, por lo que al

comparar los resultados obtenidos de EC_{50} para las muestras evaluadas con los de los patrones, se observa una actividad superior por parte de los patrones. Lo anterior permite deducir que la actividad antioxidante de la pulpa del totumo está en un punto intermedio, es decir, su capacidad atrapadora de radicales libres es menos efectiva que la de los patrones pero es más efectiva que la del reporte bibliográfico antes mencionado. Por tanto si se toman precauciones respecto al proceso de pardeamiento que sufren ambas muestras se puede aprovechar el potencial antioxidante que posee la pulpa del totumo, el cual se pudo evidenciar gracias a la superioridad en los valores de EC_{50} de las muestras evaluadas en este trabajo frente al estudio de evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres antes mencionado. Debido a lo anterior es recomendable evaluar la capacidad antioxidante con la previa inhibición del proceso de pardeamiento enzimático, ya que si este proceso se evita los resultados probablemente mejoren. Lo anterior se puede asegurar porque los mejores resultados se obtuvieron para la muestra menos pardeada, es decir, para el extracto etanólico en fresco (tabla 1).

No fue posible realizar comparaciones de los resultados obtenidos en este trabajo para la especie *Crescentia cujete* L respecto a otras especies del mismo género (*Crescentia* L), debido a que no hay reportes de la determinación de la actividad antioxidante por este método para las mismas.

11.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ABTS

La información concerniente a los datos generales, el ensayo preliminar, las medidas del blanco, las concentraciones en el rango de trabajo, los porcentajes de atrapamiento de radical, para los extractos totales, los patrones y las fracciones para las muestras en fresco y en seco, y la demás información que se utilizó para obtener los resultados discutidos en esta sección se muestran en la sección de anexos (anexo 3, tablas 1-4).

El ensayo del ABTS se expresó en términos del porcentaje de atrapamiento del radical ABTS (%RS). Así entre mayor sea %RS mejor es la actividad de la muestra estudiada. Los %RS obtenidos estuvieron en el rango de 8,63 para la fracción de hexano en seco a 47,02 % para el extracto total en seco y de 9,93 % para la fracción de hexano en fresco y 52,21 % para el extracto total en fresco (Tabla 1). Los mejores resultados de actividad atrapadora de radicales libres ABTS para el extracto etanólico en fresco se obtuvieron para el extracto total (%RS=52,21 %) seguido por la fracción de acetato (%RS=39,61 %).), lo cual probablemente se debe a que los compuestos fenólicos que son los responsables de la actividad antioxidante, se encuentran en mayor concentración en estas muestras, esto se podrá corroborar en los resultados obtenidos con el ensayo de Folin-Ciocalteu. Las muestras que menor actividad atrapadora de radicales ABTS presentaron fueron la fracción de hexano para ambas muestras (8,63% muestra en seco y 9,93 % muestra en fresco); esto es probablemente debido a que el contenido de fenoles en estas muestras debe ser bastante bajo, este resultado al igual que el mencionado anteriormente se podrá corroborar con los resultados obtenidos para el contenido de fenoles totales en estas muestras.

En el trabajo de (Lizcano *et al.* 2010) se llevó a cabo la evaluación de la actividad atrapadora de radicales ABTS del extracto del fruto del totumo obtenido mediante infusión; al compararlos sus resultados (1.1 μmol de Trolox/g muestra seca) con los obtenidos en este trabajo (13,30 μmol de Trolox/g muestra seca, para el extracto en fresco y 9,09 μmol de Trolox/g muestra seca, para el extracto en seco) se puede apreciar que se obtuvieron mejores resultados en el presente trabajo, siendo la muestra en fresco 12 veces más efectiva para atrapar los radicales ABTS y la muestra en seco 8 veces más efectiva. Lo anterior se da probablemente debido a que la información reportada tiene como diferencia marcada la forma en que se obtiene el extracto, ya que es obtenido mediante una infusión, y usa como solvente agua. Otra cosa que se debe tener en cuenta es que aunque se reporta el uso del fruto no se especifica que parte de este se usa para la determinación de la capacidad antioxidante, ya que el fruto incluye la cascara, la pulpa y las semillas; por lo tanto lo que esto indica es que la pulpa del totumo es probablemente mucho más efectiva como antioxidante que el resto de componentes del fruto.

Al comparar los resultados de actividad atrapadora de radicales libres ABTS del extracto total y las fracciones versus los patrones se puede observar que la capacidad atrapadora de los extractos preparados en las condiciones descritas en la metodología son bastante similares (tabla 1); aunque si se tienen en cuenta las concentraciones requeridas de las muestras para alcanzar una actividad atrapadora de radicales libres cercanas al 50% son mucho más elevadas (5000 ppm, para la muestra en fresco y 7000 ppm para la muestra en seco) que las de las sustancias de referencia (500 ppm para cada uno), se puede explicar que los patrones son mucho más efectivos que las muestras de la pulpa del totumo evaluadas; esto se debe a que los estándares son sustancias de comprobada y reconocida actividad antioxidante. Teniendo en cuenta que la actividad de atrapadora de radicales ABTS, resultó ser superior en el presente trabajo respecto al reporte bibliográfico antes mencionado, se puede decir que la actividad antioxidante de la pulpa del totumo, se encuentra en un punto intermedio y que además se obtuvo un resultado bastante interesante para el extracto etanólico en fresco, a pesar de que probablemente hay una influencia marcada por parte del proceso de pardeamiento. La superioridad en los valores de %RS de las muestras evaluadas en este trabajo frente a los estudios previamente realizados permite explicar que la pulpa del totumo posee un potencial antioxidante que puede ser aprovechado, siempre y cuando se tomen precauciones en cuanto al proceso de pardeamiento que sufren ambas muestras, siendo mucho menor el efecto del proceso para la muestra en fresco, para la cual se obtuvieron mejores resultados. Por lo tanto es recomendable evaluar la capacidad antioxidante con la previa inhibición del proceso de pardeamiento enzimático, ya que si este proceso se evita los resultados probablemente mejoren. Lo anterior se puede asegurar porque los mejores resultados se obtuvieron para la muestra menos pardeada (tabla 1).

No fue posible realizar comparaciones de los resultados obtenidos en este trabajo para la especie *Crescentia cujete* L respecto a otras especies del mismo género (*Crescentia* L), debido a que no hay reportes de la determinación de la actividad antioxidante por este método para las mismas.

11.3 Determinación del contenido total de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu

Los datos obtenidos para la curva de calibración con el patrón ácido gálico, el contenido de fenoles totales para los extractos totales de ambas muestras y para sus fracciones y la demás información que se utilizó para obtener los resultados discutidos en esta sección se muestran en el anexo 4 (tablas 1-3).

Este método colorimétrico se usó para la determinación de los fenoles totales en los extractos totales y las fracciones de las muestras en fresco y en seco. El contenido de fenoles totales se expresó como mg GAE/g extracto. Así entre mayor sea el contenido de fenoles totales mejor es la actividad de la muestra estudiada. El contenido de fenoles totales se obtuvo en un rango de 0,004mg GAE/g extracto para la fracción de hexano en seco a 0,015 mg GAE/g extracto para el extracto total en seco y de 0,011 para la fracción de hexano en fresco a 0,026 para el extracto total en fresco (Tabla 1). Los mejores resultados se obtuvieron para el extracto total en fresco (0,026 mg GAE/g extracto) seguido por la fracción de acetato en fresco (0,020 mg GAE/g extracto). Los resultados más bajos se obtuvieron para la fracción de hexano tanto para la muestra en seco como para la muestra en fresco (0,0039 mg GAE/g extracto y 0,011 mg GAE/g extracto, respectivamente, tabla 1). Lo anterior permite apreciar que los mejores resultados están asociados con las muestra cuya polaridad es alta, y que los resultados más bajos se obtuvieron para las muestras donde la polaridad es bastante baja.

Este resultado está en correspondencia con los obtenidos para las actividades antioxidantes determinadas con DPPH y ABTS ya que la actividad antioxidante se podría atribuir principalmente a la presencia de compuestos de tipo fenólico, es decir, estas medidas están relacionadas de forma proporcional (Rover *et al.* 2013). La polaridad de los medios en los que se realizan los ensayos DPPH y ABTS está asociada con la naturaleza polar de los fenoles que se evalúan en este método por lo que se espera que haya correspondencia entre los resultados obtenidos en estos ensayos, es decir, que entre mayor sea el contenido de fenoles en una muestra mayor actividad antioxidante esta deberá presentar. Esto se podrá confirmar con los resultados obtenidos en el análisis estadístico que se discute más adelante, por el momento se puede observar en los resultados discutidos hasta aquí que hay una correspondencia entre los resultados obtenidos en este ensayo y los obtenidos en ABTS y DPPH; es decir, a mayor actividad antioxidante mayor contenido de fenoles o viceversa a menor actividad antioxidante menor contenido de fenoles (tabla 1).

11.4 Determinación de la actividad toxicológica mediante el ensayo de la *Artemia salina*

Los datos generales que se obtuvieron para este ensayo a diferentes tiempos (6 h y 24 h) y la demás información que se utilizó para obtener los resultados discutidos en esta sección se muestran en la sección de anexos (Anexo 5).

Los resultados se expresan en términos del parámetro LC_{50} , el cual representa la dosis letal que se requiere para matar la mitad de los crustáceos presentes en el medio de reacción. Los resultados obtenidos para el LC_{50} crónico (medición hecha a las 24 h, tabla 1) fue mejor para la muestra en Fresco (416.49 ppm) que para la muestra en Seco (433.31 ppm). Lo anterior indica que en el extracto total en fresco se encuentran en mayor concentración las sustancias responsables de la citotoxicidad presentes en la pulpa del totumo. En este caso también la muestra en fresco (la menos pardeada), es la que da mejores resultados por lo que se puede afirmar que aunque probablemente el proceso de pardeamiento que sufre la muestra a lo largo del proceso este influyendo en la habilidad de la pulpa del totumo para actuar sobre los nauplios de *A. salina*, los resultados obtenidos son bastante interesantes y permiten inferir que la pulpa del totumo posee un potencial citotóxico que vale la pena explotar.

En el trabajo realizado por (David *et al.* 2007) se llevó a cabo la evaluación de la toxicidad con el extracto metanólico de las partes aéreas del totumo; al comparar sus resultados ($LC_{50}=723.3$ ppm) con los obtenidos en este trabajo (416.49 ppm, para el extracto en fresco y 433.31 ppm, para el extracto en seco) se puede apreciar que se obtuvieron valores mejores en el presente trabajo, siendo ambas muestras aproximadamente 2 veces más efectivas para matar los nauplios de *A. salina*. Esto implica que la pulpa del totumo es más efectiva desde el punto de vista toxicológico que las partes de la planta evaluadas por los investigadores (David *et al.* 2007), los cuales reportan el uso de las partes aéreas del totumo, pero no especifican que parte se usa para la determinación de la actividad toxicológica frente a *A. salina*, ya que las partes aéreas incluyen el fruto, el tallo, las hojas y las flores. Con esto lo que se quiere enfatizar es que los componentes de cada parte de una planta pueden variar lo cual influye en los resultados obtenidos. A pesar de la influencia del proceso de pardeamiento se puede ver que los valores obtenidos para este ensayo son bastante buenos ya que superan los obtenidos en las investigaciones previamente realizadas, por lo que se puede afirmar que la pulpa del totumo posee un potencial citotóxico que puede ser aprovechado e incluso mejorado si se toman medidas respecto al proceso de pardeamiento con el fin de evitar su influencia en el potencial biológico que la pulpa presenta.

No fue posible realizar comparaciones de los resultados obtenidos en este trabajo para la especie *Crescentia cujete* L respecto a otras especies del mismo género (*Crescentia* L), debido a que no hay reportes de la determinación de la actividad toxicológica por este bioensayo para las mismas.

11.5 Análisis estadístico

La prueba de Shapiro-Wilk se realizó con el fin de determinar si los datos se ajustaban o no a la normalidad. Esto es importante determinarlo debido a que si los resultados se ajustan a la normalidad el resto de pruebas que se aplican para el análisis estadístico deben ser paramétricas, o si los datos no se ajustan a la normalidad el resto de pruebas que se aplican para el análisis estadístico deben ser no paramétricas. La prueba de Shapiro-Wilk mostró que la mayoría de los datos se ajustaban a la normalidad ($p > 0.05$, tabla 2); lo cual permitió continuar el resto del análisis mediante la aplicación de pruebas paramétricas.

Tabla 2. Pruebas de normalidad

	Tratamiento	Shapiro-Wilk			
		Estadístico	gl	Sig.	
Folin (GAE mg/g)	fresco Total	1,000	3	1,000	
	Seco Total	0,750	3	0,000	
	Fracción Acuosa Fresco	0,750	3	0,000	
	Fracción Acuosa Seco	0,750	3	0,000	
	Fracción Butanol Fresco	1,000	3	1,000	
	Fracción Butanol Seco	1,000	3	1,000	
	Acetato Fresco	1,000	3	1,000	
	Acetato Seco	1,000	3	1,000	
	Hexano fresco	1,000	3	1,000	
	Hexano Seco	1,000	3	1,000	
	%RS (ABTS)	fresco Total	,988	3	0,790
		Seco Total	0,897	3	0,375
Fracción Acuosa Fresco		0,891	3	0,357	
Fracción Acuosa Seco		0,750	3	0,000	
Fracción Butanol Fresco		0,994	3	0,856	
Fracción Butanol Seco		0,750	3	0,000	
Acetato Fresco		0,992	3	0,833	
Acetato Seco		0,750	3	0,000	
Hexano fresco		0,994	3	0,856	
Hexano Seco		0,750	3	0,000	
EC50 ppm (DPPH)		fresco Total	0,788	3	0,087
		Seco Total	0,774	3	0,053
	Fracción Acuosa Fresco	0,995	3	0,868	
	Fracción Acuosa Seco	0,824	3	0,174	
	Fracción Butanol Fresco	0,907	3	0,407	
	Fracción Butanol Seco	0,899	3	0,382	
	Acetato Fresco	0,893	3	0,363	
	Acetato Seco	0,983	3	0,747	
	Hexano fresco	0,996	3	0,880	
	Hexano Seco	0,891	3	0,358	

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la prueba paramétrica ANOVA, en la cual se observa que las variables determinadas Folin-Ciocalteu, %RS (ABTS) y EC₅₀ (DPPH) presentan diferencia significativa ($p < 0.05$) en función de los diferentes tratamientos. Esto demuestra la importancia de realizar diferentes ensayos, ya que si no se hubiese obtenido diferencia significativa en función de los tratamientos esto indicaría que da lo mismo aplicar un solo ensayo o varios.

Tabla 3. Anova

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Folin (GAE mg/g)	Inter-grupos	0,001	9	0,000	152,912	0,000
	Intra-grupos	0,000	20	0,000		
	Total	0,001	29			
%RS	Inter-grupos	6944,975	9	771,664	5589,472	0,000
	Intra-grupos	2,761	20	0,138		
	Total	6947,736	29			
EC ₅₀ (ppm)	Inter-grupos	6288166,833	9	698685,204	166,887	0,000
	Intra-grupos	83731,333	20	4186,567		
	Total	6371898,167	29			

Para saber entre cuáles tratamientos está la diferencia se aplicó la prueba de Tukey (tablas 4-6).

En cuanto a los resultados obtenidos para la prueba de Tukey estos están organizados para todos los casos (Folin-Ciocalteu, %RS (ABTS) y EC₅₀ (DPPH)) de forma que el grupo 1 es el que tiene la menor diferencia significativa respecto a los demás, el grupo 8 es el que más diferencia significativa presenta respecto a los demás y entre los que se encuentran en un mismo grupo no hay diferencia significativa. Lo que esta prueba estadística permite determinar es la validez de haber realizado cada uno de los estudios que aquí se contrastan debido a que si no se hubiese encontrado diferencia significativa entre los datos no tendría sentido haber realizado los diferentes ensayos. Por tanto el hecho de que se encuentren diferencias significativas sirve para corroborar la validez de cada uno de los ensayos realizados.

Para Folin-Ciocalteu (tabla 4) el que menos diferencia significativa presenta respecto a los demás es la fracción de hexano en seco y la muestra que mayor diferencia significativa presenta respecto a los demás es el extracto total en fresco. Para los demás casos del ensayo de Folin-Ciocalteu se observa que no hay diferencia significativa entre la fracciones de butanol y acetato en seco, tampoco hay diferencia significativa entre las fracciones de acetato, hexano y acuosa en seco, lo mismo se encontró para la fracción acuosa en seco y el extracto total en seco. De igual manera no hay diferencia significativa entre el extracto total en seco y la fracción acuosa en

fresco. Tampoco se encontró diferencia significativa entre las fracciones acuosas y butanol en fresco. Y por último tampoco hubo diferencia entre las fracciones de butanol y acetato en fresco. En los resultados obtenidos para esta prueba se puede observar que los resultados que mayor diferencia significativa presentan son los que mayor contenido de fenoles presentaron, es decir, el extracto total en fresco y la fracción de acetato en fresco (tabla 4), es decir, se puede ver que entre mayor es el contenido total de fenoles, mayor diferencia significativa presentan los resultados.

Tabla 4. Prueba de Tukey para Folin-Ciocalteu

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Hexano Seco	3	0,00400							
Fracción Butanol Seco	3		0,00800						
Acetato Seco	3		0,01000	0,01000					
Hexano fresco	3			0,01100					
Fracción Acuosa Seco	3			0,01233	0,01233				
Seco Total	3				0,01433	0,01433			
Fracción cuosa Fresco	3					0,01667	0,01667		
Fracción Butanol Fresco	3						0,01800	0,01800	
Acetato Fresco	3							0,02000	
fresco Total	3								0,02600
Sig.		1,000	0,223	0,099	0,223	0,099	0,713	0,223	1,000

Para el caso del ABTS (tabla 5) el que menos diferencia significativa presenta respecto a los demás es la fracción de hexano en seco y la muestra que mayor diferencia significativa presenta respecto a los demás es el extracto total en fresco. Para los demás casos del ensayo de ABTS se observa que hay diferencia significativa respecto a todos. En los resultados obtenidos para esta prueba se puede observar que los resultados que mayor diferencia significativa presentan son los que mayor actividad atrapadora de radicales presentaron (tabla 5), es decir, se puede ver que entre mayor es la capacidad atrapadora de radicales de la muestra, mayor diferencia significativa presentan los resultados.

Tabla 5. Prueba de Tukey para ABTS

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hexano Seco	3	8,58									
Hexano fresco	3		9,89								
Fracción Acuosa Seco	3			13,81							
Fracción cuosa Fresco	3				15,68						
Fracción Butanol Seco	3					19,43					
Fracción Butanol Fresco	3						23,05				
Acetato Seco	3							37,73			
Acetato Fresco	3								39,56		
Seco Total	3									47,02	
fresco Total	3										52,21
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Para el DPPH (tabla 6) las muestras que menos diferencia significativa presentaron respecto a los demás, fueron el extracto total en fresco y la fracción de acetato en fresco y la muestra que mayor diferencia significativa presenta respecto a los demás es la fracción de hexano en seco. Para los demás casos del ensayo DPPH se observa que no hay diferencia significativa entre la fracción de butanol en fresco, el extracto total en seco y la fracción acuosa en fresco, tampoco hay diferencia significativa entre la fracción acuosa en fresco y la fracción acuosa en seco, lo mismo se encontró para la fracciones acetato en seco, butanol en seco y la de hexano en fresco. Para esta prueba se encontró que los datos que menor diferencia significativa presentan son los que mayor actividad antioxidante presentaron, es decir, el extracto total en fresco y la fracción de acetato en fresco. Lo anterior se debe a que en el ensayo del DPPH los mejores resultados están asociados con los valores más bajos, mientras que la prueba de Tukey organiza los datos, de forma que el dato que mayor diferencia significativa presente sea el mayor de todos. Esto indica que no siempre el resultado que mayor diferencia significativa presenta es el que ha presentado los mejores resultados en una prueba determinada.

Tabla 6. Prueba de Tukey para DPPH

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05				
		1	2	3	4	5
fresco Total	3	1746				
Acetato Fresco	3	1903				
Fracción Butanol Fresco	3		2187			
Seco Total	3		2223			
Fracción Acuosa Fresco	3		2291	2291		
Fracción Acuosa Seco	3			2446		
Acetato Seco	3				2707	
Fracción Butanol Seco	3				2741	
Hexano fresco	3				2789	
Hexano Seco	3					3393
Sig.		0,151	0,628	0,160	0,850	1,000

Mediante la prueba de correlaciones de Pearson (tabla 7), se encontró que hay una correlación positiva y bastante significativa entre el contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu) y el porcentaje de atrapamiento de radicales (ABTS), lo que indica que a mayor contenido de fenoles mejor es el porcentaje de atrapamiento de radicales (%RS). Se encontró también que hay una correlación negativa y bastante significativa entre el contenido de fenoles totales y el EC₅₀ (DPPH), lo cual se debe a que entre mayor es el contenido de fenoles en la muestra de trabajo, menor es la concentración que se requiere de esta, para eliminar el 50% de los radicales presentes en el medio de reacción. Para se puede apreciar para ambos casos que hay concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de la capacidad antioxidante, por lo que se puede decir que se realizaron de forma adecuada y que se confirma lo que se afirmó en la discusión del ensayo de Folin-Ciocalteu, que hay correspondencia entre los ensayos de actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales de la muestra.

Tabla 7. Correlaciones de Pearson

		Folin (GAE mg/g)	Porcentaje RS	EC50 (ppm)
Folin (GAE mg/g)	Correlación de Pearson	1	0,645(**)	-0,942(**)
	Sig. (bilateral)	.	0,000	0,000
	N	30	30	30

12. Conclusiones

Los mejores resultados obtenidos para la determinación de la actividad antioxidante tanto para el ensayo de DPPH como para el ensayo ABTS se obtuvieron para las muestras del extracto total en fresco y la fracción de acetato en fresco.

El mayor contenido de fenoles totales se encontró en las muestras del extracto total en fresco y la fracción de acetato en fresco, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos para actividad antioxidante (DPPH y ABTS).

El ensayo de Folin-Ciocalteu y los resultados del análisis estadístico (correlaciones de Pearson) permitieron evidenciar el hecho de que las muestras con mayor contenido de fenoles son las que arrojaron mejor potencial antioxidante (extracto total en fresco y fracción de acetato en fresco).

A pesar de que todos los procesos dan indicios de ser marcadamente afectados por el proceso de pardeamiento, los resultados obtenidos con los diferentes ensayos realizados mostraron que la pulpa del totumo posee un potencial antioxidante y citotóxico que puede ser aprovechado.

El potencial antioxidante de la pulpa del totumo posiblemente esté siendo disminuido por el proceso de pardeamiento enzimático, el cual si es inhibido podría arrojar mejores resultados, ya que los obtenidos en el presente ensayo superaron considerablemente a los reportados en la literatura.

13. Bibliografía

- Al-Jaber, N. A., A. S. Awaad and J. E. Moses (2011). "Review on some antioxidant plants growing in Arab world." Journal of Saudi Chemical Society **15**(4): 293-307.
- Aladedunye, F. and B. Matthäus (2014). "Phenolic extracts from *Sorbus aucuparia* (L.) and *Malus baccata* (L.) berries: antioxidant activity and performance in rapeseed oil during frying and storage." Food Chemistry **159**(0): 273-281.
- Alonso-Castro, A. J., M. L. Villarreal, L. A. Salazar-Olivo, M. Gomez-Sanchez, F. Dominguez and A. Garcia-Carranca (2011). "Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies." Journal of Ethnopharmacology **133**(3): 945-972.
- Apak, R., S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek and K. Güçlü (2013). "Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)." Pure and Applied Chemistry **85**(5): 957-998.
- Argoti, J. C., S. Salido, P. J. Linares-Palomino, B. Ramírez, B. Insuasty and J. Altarejos (2011). "Antioxidant activity and free radicalscavenging capacity of a selection of wild-growing Colombian plants." Journal of the Science of Food and Agriculture **91**: 2399–2406
- Atoui, A. K., A. Mansouri, G. Boskou and P. Kefalas (2005). "Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile." Food Chemistry **89**(1): 27-36.
- Badarinath, A. V., K. Mallikarjuna Rao, C. Madhu Sudhana Chetty, S. Ramkanth, T. V. S. Rajan and K. Gnanaprakash (2010). "A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations." International Journal of PharmTech Research **2**(2): 1276-1285.
- Barbosa-Pereira, L., G. P. Aurrekoetxea, I. Angulo, P. Paseiro-Losada and J. M. Cruz (2014). "Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef." Meat Science **97**(2): 249-254.
- Bestmann, H. J., L. Winkler and O. v. Helversen (1997). "Headspace analysis of volatile flower scent constituents of bat-pollinated plants." Phytochemistry **46**(7): 1169-1172.
- Bhardwaj, V., P. Sharma, M. S. Chauhan and S. Chauhan "Micellization, interaction and thermodynamic study of butylated hydroxyanisole (synthetic antioxidant) and sodium dodecyl sulfate in aqueous-ethanol solution at 25, 30 and 35 °C." Journal of Saudi Chemical Society(0).
- Biparva, P., M. Ehsani and M. R. Hadjmohammadi (2012). "Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples." Journal of Food Composition and Analysis **27**(1): 87-94.
- Bittencourt Jr, N. S., E. Pereira Jr and P. d. S. São-Thiago (2011). "The reproductive biology of *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae), a characteristic tree of the South American savannah-like "Cerrado" vegetation." Flora **206**(872-886).
- Bondet, V., W. Brand-Williams and C. Berset (1997). "Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method." LWT - Food Science and Technology **30**(6): 609-615.

- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier and C. Berset (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." LWT - Food Science and Technology **28**(1): 25-30.
- Cadenas, E. and L. Packer (2002). Handbook of Antioxidants.
- Calle, Z., E. Murgueitio Restrepo and L. M. Botero (2011). "El totumo: Árbol de las américas para la ganadería moderna." Revista Carta FEDEGAN **122**: 64-73.
- Coe, F. G. (2008). "Rama midwifery in eastern Nicaragua." Journal of Ethnopharmacology **117**(1): 136-157.
- Colegate, S. M. and R. J. Molyneux (1993). Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination CRC Press, Inc.
- David, J. P., M. Meira, J. M. David, H. N. Brandão, A. Branco, M. d. F. Agra, M. R. V. Barbosa, L. P. de Queiroz and A. M. Giuliatti (2007). "Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants." Fitoterapia **78**: 215–218.
- David, J. P., M. Meira, J. M. David, H. N. Brandão, A. Branco, M. de Fátima Agra, M. R. V. Barbosa, L. P. de Queiroz and A. M. Giuliatti (2007). "Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants." Fitoterapia **78**(3): 215-218.
- Dimitrios, B. (2006). "Sources of natural phenolic antioxidants." Trends in Food Science & Technology **17**(9): 505-512.
- Estévez, M., S. Ventanas and R. Cava (2006). "Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pâté." Meat Science **74**(2): 396-403.
- Floegel, A., D.-O. Kim, S.-J. Chung, S. I. Koo and O. K. Chun (2011). "Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods." Journal of Food Composition and Analysis **24**(7): 1043-1048.
- Focke, W. W., I. V. D. Westhuizen, A. B. L. Grobler, K. T. Nshoane, J. K. Reddy and A. S. Luyt (2012). "The effect of synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel." Fuel **94**(0): 227-233.
- Fransen, M., M. Nordgren, B. Wang and O. Apanasets (2012). "Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1822**(9): 1363-1373.
- Frei, B., M. Baltisberger, O. Sticher and M. Heinrich (1998). "Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous uses." Journal of Ethnopharmacology **62**(2): 149-165.
- Gachet, M. S. and W. Schühly (2009). "Jacaranda—An ethnopharmacological and phytochemical review." Journal of Ethnopharmacology **121**(1): 14-27.
- González-Torres, M. C., M. Betancourt-Rule and R. Ortiz-Muñiz (2000). "Daño Oxidativo y Antioxidantes." Bioquímica **25**(1): 3-9.
- González, C., L. E. Urrego and J. I. Martínez (2006). "Late quaternary vegetation and climate change in the Panamá Basin: palynological evidence from marine cores ODP 677B and TR 163-38." Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology **234**(1): 62-80.
- Gupta, M. P., P. N. Solís, A. I. Calderón, F. Guinneau-Sinclair, M. Correa, C. Galdames, C. Guerra, A. Espinosa, G. I. Alvenda, G. Robles and R. Ocampo (2005). "Medical ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panamá." Journal of Ethnopharmacology **96**(3): 389-401.
- Gupta, V. K. and S. K. Sharma (2006). "Plants as natural antioxidants." Natural Product Radiance **5**(4): 326-334.

- Hajdu, Z. and J. Hohmann (2012). "An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia." Journal of Ethnopharmacology **139**(3): 838-857.
- Hamid, A. A., O. O. Aiyelaagbe, L. A. Usman and O. M. Ameen (2010). "Antioxidants: its medicinal and pharmacological applications " African Journal of Pure and Applied Chemistry **4**(8): 142-151.
- Hampel, H., D. Prvulovic, S. Teipel, F. Jessen, C. Luckhaus, L. Frölich, M. W. Riepe, R. Dodel, T. Leyhe, L. Bertram, W. Hoffmann and F. Faltraco (2011). "The future of Alzheimer's disease: The next 10 years." Progress in Neurobiology **95**: 718-728.
- Heinrich, M., A. Ankli, B. Frei, C. Weimann and O. Sticher (1998). "Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance." Social Science & Medicine **47**(11): 1859-1871.
- Heltzel, C. E., A. A. Leslie Gunatilaka, T. E. Glass and D. G. I. Kingston (1993). "Furofuranonaphthoquinones: bioactive compounds with a novel fused ring system from *crescentia kujete*." Tetrahedron **49**(31): 6757-6762.
- Hygreeva, D., M. C. Pandey and K. Radhakrishna "Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products." Meat Science(0): 1-40.
- Jiménez, J.-J., T. Decaëns, E. Amézquita, I. Rao, R. J. Thomas and P. Lavelle (2011). "Short-range spatial variability of soil physico-chemical variables related to earthworm clustering in a neotropical gallery forest." Soil Biology and Biochemistry **43**(5): 1071-1080.
- Jiménez, J. J., T. Decaëns and P. Lavelle (2006). "Nutrient spatial variability in biogenic structures of *Nasutitermes* (Termitinae; Isoptera) in a gallery forest of the Colombian 'Llanos'." Soil Biology and Biochemistry **38**(5): 1132-1138.
- Kaneko, T., K. Ohtani, R. Kasai, K. Yamasaki and M. D. Nguyen (1998). "*n*-Alkyl glycosides and *p*-hydroxybenzoyloxy glucose from fruits of *Crescentia kujete*." Phytochemistry **47**(2): 259-263.
- Kaneko, T., K. Ohtani, R. Kasai, K. Yamasaki and D. Nguyen Minh (1997). "Iridoids and iridoid glucosides from fruits of *Crescentia kujete*." Phytochemistry **46**(5): 907-910.
- Lans, C., T. Harper, K. Georges and E. Bridgewater (2000). "Medicinal plants used for dogs in Trinidad and Tobago." Preventive Veterinary Medicine **45**(3-4): 201-220.
- Lee, Y., J. Yoon and U. V. Gunten (2005). "Spectrophotometric determination of ferrate (Fe(VI)) in water by ABTS." Water Research **39**: 1946-1953.
- Leong, L. P. and G. Shui (2002). "An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets." Food Chemistry **76**: 69-75.
- Lester, G. E., K. S. Lewers, M. B. Medina and R. A. Saftner (2012). "Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: assay interference by ascorbic acid." Journal of Food Composition and Analysis **27**(1): 102-107.
- Letelier, M. E., A. Molina-Berríos, J. Cortés-Troncoso, M. Holst, K. Palma, M. Montoya, D. Miranda and V. González-Lira (2008). "DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules." Toxicology in Vitro **22**: 279-286.
- Leterme, P., A. Buldgen, F. Estrada and A. M. Londoño (2006). "Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia." Food Chemistry **95**(4): 644-652.

- Lino von Poser, G., J. Schripsema, A. T. Henriques and S. Rosendal Jensen (2000). "The distribution of iridoids in Bignoniaceae." Biochemical Systematics and Ecology **28**(4): 351-366.
- Litescu, S. C., S. Eremia and G. L. Radu (2010). Methods for the determination of antioxidant capacity in food and raw materials, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media
- Lizcano, L. J., F. Bakkali, M. Begoña Ruiz-Larrea and J. Ignacio Ruiz-Sanz (2010). "Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use." Food Chemistry **119**(4): 1566-1570.
- Lizcano, L. J., F. Bakkali, M. B. Ruiz-Larrea and J. I. Ruiz-Sanz (2010). "Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use." Food Chemistry **119**: 1566-1570.
- Lorenzo, J. M., R. M. González-Rodríguez, M. Sánchez, I. R. Amado and D. Franco (2013). "Effects of natural (grape seed and chestnut extract) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage "chorizo"." Food Research International **54**(1): 611-620.
- Madhukar, V. K., S. K. Srivastava and N. K. Dubey (2013). "Revision of Genus *Crescentia* L. (Bignoniaceae) in India " American Journal of Plant Sciences **4**: 1164-1168.
- Martin, F., A.-E. Hay, L. Corno, M. P. Gupta and K. Hostettmann (2007). "Iridoid glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae)." Phytochemistry **68**: 1307-1311.
- Martins Chaves, M. r., E. Rocha-Vieira, A. Pereira dos Reis, R. de Lima e Silva, N. C. Gerzstein and J. A. Nogueira-Machado (2000). "Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to age." Mechanisms of Ageing and Development **119**(1-2): 1-8.
- Martysiak-Zurowska, D. and W. Wenta (2012). "A comparison of abts and dpph methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk." ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria **11**(1): 83-89.
- McCarthy, T. L., J. P. Kerry, J. F. Kerry, P. B. Lynch and D. J. Buckley (2001). "Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties." Meat Science **58**(1): 45-52.
- Mecocci, P. and M. C. Polidori (2012). "Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Biochimica et Biophysica Acta **1822**: 631-638.
- Medeiros, M. F. T. and U. P. de Albuquerque (2012). "The pharmacy of the Benedictine monks: The use of medicinal plants in Northeast Brazil during the nineteenth century (1823–1829)." Journal of Ethnopharmacology **139**(1): 280-286.
- Meléndez, P. A. and V. A. Capriles (2006). "Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico." Phytomedicine **13**(4): 272-276.
- Miliauskas, G., P. R. Venskutonis and T. A. van Beek (2004). "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts." Food Chemistry **85**(2): 231-237.
- Molyneux, P. (2004). "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." Songklanakarin Journal of Science and Technology **26**(2): 211-219.

- Ndhlala, A. R., M. Moyo and J. V. Staden (2010). "Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? ." Molecules **15**: 6905-6930.
- Nesci, A., P. Barra and M. Etcheverry (2011). "Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize, using synthetic antioxidants and natural phytochemicals." Journal of Stored Products Research **47**(3): 231-237.
- Nielsen, L. B., R. Slamet and D. Wege (2009). "The synthesis of 3-hydroxymethylfuro[3,2-*b*]naphtho[2,3-*d*]furan-5,10-dione, a novel metabolite isolated from *Crescentia cujete*." Tetrahedron **65**(23): 4569-4577.
- Nivetha, S. and D. V. Roy (2013). "Effect of natural and synthetic antioxidants on oxidative stability of FAMES obtained from *hevea brasiliensis*." Journal of Energy Chemistry **22**(6): 935-941.
- Noguera-Orti, J. F., R. M. Villanueva-Camañas and G. Ramis-Ramos (1999). "Direct injection of edible oils as microemulsions in a micellar mobile phase applied to the liquid chromatographic determination of synthetic antioxidants." Analytica Chimica Acta **387**(2): 127-134.
- Olmstead, R. G., M. L. Zjhra, L. G. Lohmann, S. O. Grose and A. J. Eckert (2009). "A molecular phylogeny and classification of bignoniaceae." American Journal of Botany **96**(9): 1731-1743.
- Ososki, A. L., P. Lohr, M. Reiff, M. J. Balick, F. Kronenberg, A. Fugh-Berman and B. O'Connor (2002). "Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions." Journal of Ethnopharmacology **79**(3): 285-298.
- Otero, R., R. Fonnegra, S. L. Jiménez, V. Núñez, N. Evans, S. P. Alzate, M. E. Garcia, M. Saldarriaga, G. Del Valle, R. G. Osorio, A. Diaz, R. Valderrama, A. Duque and H. N. Vélez (2000). "Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: traditional use of plants." Journal of Ethnopharmacology **71**(3): 493-504.
- Ozgen, M., R. N. Reese, A. Z. Tulio Jr, J. C. Scheerens and A. R. Miller (2006). "Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**: 1151-1157.
- Patel, R. P., J. McAndrew, H. Sellak, C. R. White, H. Jo, B. A. Freeman and V. M. Darley-Usmar (1999). "Biological aspects of reactive nitrogen species." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1411**(2-3): 385-400.
- Pellegrini, N., G. Galaverna, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, O. V. Brenna, R. N. Bennett and F. Brighenti (2007). "Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents." Journal of the Science of Food and Agriculture **87**: 103-111.
- Pérez-Bonilla, M., S. Salido, T. A. van Beek, P. J. Linares-Palomino, J. Altarejos, M. Nogueras and A. Sánchez (2006). "Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood." Journal of Chromatography A **1112**: 311-318.
- Pérez-Jimenez, J. and F. Saura-Calixto (2007). "Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas " V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones: 1150-1160.
- Pérez-Jiménez, J. and F. Saura-Calixto (2005). "Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 5036-5040.

- Podsędek, A. (2007). "Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review." LWT - Food Science and Technology **40**(1): 1-11.
- Prior, R. L., X. Wu and K. Schaich (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." Journal of agricultural and food chemistry **53**: 4290-4302.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." Free Radical Biology and Medicine **26**(9–10): 1231-1237.
- Rover, M. R. and R. C. Brown (2013). "Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method." Journal of Analytical and Applied Pyrolysis **104**(0): 366-371.
- Santos Pimenta, L. P., G. B. Pinto, J. A. Takahashi, L. G. F. e Silva and M. A. D. Boaventura (2003). "Biological screening of annonaceous brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test)." Phytomedicine **10**: 209–212.
- Sanz-Biset, J., J. Campos-de-la-Cruz, M. A. Epiquién-Rivera and S. Cañigueral (2009). "A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon)." Journal of Ethnopharmacology **122**(2): 333-362.
- Shebis, Y. and D. Iluz (2013). "Natural antioxidants: function and sources " Food and Nutrition Sciences **4**(643-649).
- Sikora, E., E. Cieřlik and K. Topolska (2008). "The sources of natural antioxidants." ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria **7**(1): 5-17.
- Simões, l. r., g. m. Maciel, g. c. Brandão, j. d. s. Filho, a. b. Oliveira and r. o. Castilho (2013). "Chemical constituents of *Distictella elongata* (Vahl) Urb. (Bignoniaceae)." Anais da Academia Brasileira de Ciências (Annals of the Brazilian Academy of Sciences) **85**(3): 873-879.
- Sorgeloos, P., R.-V. D. Wielen and G. Persoone (1978). "The use of *Artemia* nauplii for toxicity test-a critical analisis." Ecotoxicology and enviromental safety **2**: 249-255.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos and D. Hawkins Byrne (2006). "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts." Journal of Food Composition and Analysis **19**(6–7): 669-675.
- Ullah, M. O., M. Haque, K. F. Urmi, A. H. M. Zulfiker, A. E. Synthi, M. Begum and K. Hamid (2013). "Anti-bacterial activity and brine shrimp lethality bioassay of methanolic extracts of fourteen different edible vegetables from Bangladesh." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine **3**(1): 1-7.
- Urbančič, S., M. H. Kolar, D. Dimitrijević, L. Demšar and R. Vidrih (2014). "Stabilisation of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato with rosemary extract during deep-fat frying." LWT - Food Science and Technology **57**(2): 671-678.
- Weniger, B., S. Robledo, G. J. Arango, E. Deharo, R. Aragón, V. Muñoz, J. Callapa, A. Lobstein and R. Anton (2001). "Antiprotozoal activities of Colombian plants." Journal of Ethnopharmacology **78**(2–3): 193-200.
- Wille, M., J. A. Negret and H. Hooghiemstra (2000). "Paleoenvironmental history of the Popayán area since 27 000 yr bp at Timbio, Southern Colombia." Review of Palaeobotany and Palynology **109**(1): 45-63.
- Wu, T.-Y., C.-P. Chen and T.-R. Jinn (2011). "Traditional Chinese medicines and Alzheimer's disease." Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology **50**: 131-135.

- Zana, M., Z. Janka and J. Kálmán (2007). "Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease." Neurobiology of Aging **28**: 648-676.
- Zelickson, B. R., S. W. Ballinger, L. J. Dell'Italia, J. Zhang and V. M. Darley-Usmar (2013). Reactive oxygen and nitrogen species: interactions with mitochondria and pathophysiology. Encyclopedia of Biological Chemistry. W. J. Lennarz and M. D. Lane. Waltham, Academic Press: 17-22.

Anexos

Anexo 1. Datos correspondientes al análisis estadístico.

Tabla de organización de datos

Folin-Ciocalteu (GAE mg/g)	%RS (ABTS)	EC ₅₀ (DPPH)	Tratamiento
0,027	52,85	1787	1
0,025	52,3	1794	1
0,026	51,49	1658	1
0,015	46,61	2253	2
0,014	47,15	2256	2
0,014	47,29	2161	2
0,017	15,29	2303	3
0,016	15,95	2278	3
0,017	15,82	2292	3
0,012	13,86	2438	4
0,013	13,73	2465	4
0,012	13,86	2435	4
0,017	22,61	2198	5
0,018	23,53	2171	5
0,019	23,01	2192	5
0,007	19,35	2657	6
0,008	19,48	2701	6
0,009	19,48	2867	6
0,019	40	1900	7
0,02	39,08	1905	7
0,021	39,61	1904	7
0,011	37,78	2718	8
0,01	37,78	2630	8
0,009	37,65	2773	8
0,01	9,41	2885	9
0,011	9,93	2783	9
0,012	10,33	2701	9
0,005	8,5	3454	10
0,004	8,63	3302	10
0,003	8,63	3424	10

GAE mg = miligramos equivalente de ácido gálico

g = gramos

%RS = Porcentaje de inhibición de radiales

EC₅₀ = concentración equivalente a la inhibición del 50% del radical DPPH

Anexo 2. Datos ensayo DPPH

Tabla 1. Datos de ensayo preliminar DPPH

[ppm]	Abs prom.	PI (%)	%DPPH rem
Extracto en Seco			
DPPH inicial	0,813		
Blanco	0,568		
1000	0,436 ± 0,010	23,30	76,30
500	0,493 ± 0,005	13,10	86,63
200	0,528 ± 0,002	7,00	92,84
100	0,537 ± 0,004	5,50	94,39
50	0,547 ± 0,003	3,70	96,24
20	0,555 ± 0,002	2,30	97,67
Extracto en Fresco			
DPPH inicial	0,799		
Blanco	0,548		
1000	0,355 ± 0,008	35,30	64,09
500	0,405 ± 0,004	26,20	73,38
200	0,426 ± 0,005	22,30	77,34
100	0,436 ± 0,003	20,40	79,26
50	0,444 ± 0,002	19,00	80,68
20	0,451 ± 0,003	17,70	81,98
Curva de Calibración DPPH			
8,40	0,248 ± 0,008		
12,00	0,324 ± 0,005		
16,20	0,428 ± 0,006		
20,40	0,553 ± 0,009		
24,60	0,653 ± 0,010		
28,56	0,775 ± 0,010		
30,00	0,818 ± 0,016		

[ppm]= concentración de la muestra en partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

%DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

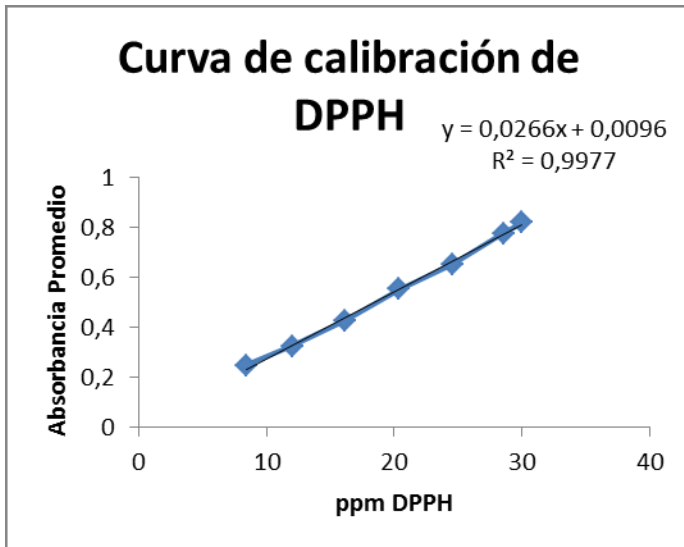


Figura 1. Curva de calibración DPPH

Tabla 2. Concentraciones para rango de trabajo:

Muestra	Concentraciones ppm					
	En seco →	2300	2280	2260	2240	2220
En fresco →	1875	1850	1825	1800	1775	1750

ppm = partes por millón

Tabla 3. Ensayo DPPH con los extractos totales en el rango de trabajo

[ppm]	Absprom.	PI (%)	%DPPH rem
Extracto en Seco			
DPPH inicial	0,814		
Blanco	0,566 ± 0,006		
2300	0,231 ± 0,002	59,3 ± 0,37	39,71 ± 7,51
2280	0,246 ± 0,005	56,7 ± 0,91	42,28 ± 8,70
2260	0,275 ± 0,003	51,5 ± 0,44	47,59 ± 8,55
2240	0,303 ± 0,012	46,7 ± 2,08	52,54 ± 7,80
2220	0,335 ± 0,002	41 ± 0,27	58,33 ± 10,59
2200	0,362 ± 0,004	36,3 ± 0,74	63,05 ± 11,84
Extracto en Fresco			
DPPH inicial	0,798		
Blanco	0,547 ± 0,004		
1875	0,195 ± 0,002	64,5 ± 0,38	34,37 ± 6,55
1850	0,216 ± 0,003	60,6 ± 0,56	38,27 ± 7,40
1825	0,237 ± 0,002	56,7 ± 0,28	42,3 ± 7,58
1800	0,266 ± 0,003	51,4 ± 0,56	47,68 ± 8,45
1775	0,294 ± 0,002	46,4 ± 0,37	52,82 ± 9,73
1750	0,314 ± 0,004	42,7 ± 0,73	56,54 ± 10,93

[ppm]= concentración de la muestra en partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 4.Ensayo DPPH con el patrón Ácido Ascórbico

Patrón	Parámetro		Concentraciones ppm	Abs prom	PI (%)	%DPPH rem
Ácido Ascórbico			0,5	0,499 ± 0,007	4,65 ± 2,0	95,27 ± 2,05
	Abs DPPH	0,816 ± 0,005	1	0,497 ± 0,005	5,09 ± 0,9	94,81 ± 0,91
	Abs Blanco	0,524 ± 0,004	2	0,464 ± 0,017	11,46 ± 3,8	88,33 ± 3,87
			5	0,345 ± 0,156	34,12 ± 30,1	65,24 ± 30,70
			10	0,172 ± 0,077	67,22 ± 15,0	31,53 ± 15,30

[ppm]= concentración de la muestra en partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 5. Ensayo DPPH con el patrón Tocoferol

Patrón	Parámetro		Concentraciones ppm	PI (%)	%DPPH rem
Tocoferol			3	6,55 ± 1,6	93,33 ± 1,66
	Abs prom DPPH	0,816 ± 0,007	5	13,11 ± 1,4	86,65 ± 1,46
	Abs prom Blanco	0,534 ± 0,005	7	19,54 ± 4,4	80,1 ± 4,51
			20	57,12 ± 3,7	41,84 ± 3,71
			25	73,53 ± 5,6	25,12 ± 5,70

ppm= partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 6.Ensayo DPPH fracción acuosa en seco

Muestra	Fracción	Parámetro		Concentraciones ppm	PI (%)	%DPPHrem	
En Seco				2200	1,26	98,72	
				2220	3,59	96,35	
	Acuosa	Absorbancia prom DPPH	0,815	2240	8,08	91,78	
		Absorbancia prom Blanco	0,557	2260	11,49	88,31	
					2280	15,98	83,74
					2300	19,75	79,91

ppm= partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 7. Ensayo DPPH fracción butanólica en seco

Muestra	Fracción	Parámetro		Concentraciones ppm	PI (%)	%DPPHrem
En Seco				2200	0,38	99,61
				2220	2,3	97,65
	Butanólica	Absorbancia prom DPPH	0,803	2240	4,41	95,5
		Absorbancia prom Blanco	0,521	2260	6,14	93,74
				2280	7,87	91,98
				2300	9,21	90,61

ppm= partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 8. Ensayo DPPH fracción en acetato de etilo en seco

Muestra	Fracción	Parámetro		Concentraciones ppm	PI (%)	%DPPHrem	
En Seco				2200	13,21	86,53	
				2220	14,79	84,92	
	Acetato	Absorbancia prom DPPH	0,786	2240	16,17	83,51	
		Absorbancia prom Blanco	0,507	2260	17,55	82,11	
					2280	18,93	80,7
					2300	20,51	79,09

ppm= partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 9. Ensayo DPPH fracción en hexano en seco

Muestra	Fracción	Parámetro		Concentraciones ppm	PI (%)	%DPPHrem	
En Seco				2200	1,49	98,49	
				2220	2,23	97,73	
	Hexano	Absorbancia prom DPPH	0,811	2240	3,16	96,78	
		Absorbancia prom Blanco	0,538	2260	4,09	95,84	
					2280	4,65	95,27
					2300	5,39	94,51

ppm= partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 10. Ensayo DPPH fracción acuosa en fresco

Muestra	Fracción	Parámetro		Concentraciones ppm	PI (%)	%DPPHrem
En Fresco				1750	1,69	98,28
				1775	3,18	96,76
	Acuosa	Absorbancia prom DPPH	0,809	1800	5,99	93,9
		Absorbancia prom Blanco	0,534	1825	8,24	91,61
				1850	10,11	89,7
				1875	12,55	87,22

ppm= partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 11. Ensayo DPPH fracción butanólica en fresco

Muestra	Fracción	Parámetro		Concentraciones ppm	PI (%)	%DPPHrem	
En Fresco				1750	4,31	95,61	
				1775	7,24	92,62	
	Butanólica	Absorbancia prom DPPH	0,789	1800	9,59	90,23	
		Absorbancia prom Blanco	0,511	1825	12,13	87,63	
					1850	15,26	84,44
					1875	16,83	82,85

ppm= partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 12. Ensayo DPPH fracción en acetato en fresco:

Muestra	Fracción	Parámetro		Concentraciones ppm	PI (%)	%DPPHrem	
En Fresco				1750	24,29	75,26	
				1775	28,65	70,82	
	Acetato	Absorbancia prom DPPH	0,819	1800	32,64	66,76	
		Absorbancia prom Blanco	0,527	1825	36,05	63,28	
					1850	40,23	59,03
					1875	44,97	54,19

ppm= partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Tabla 13. Ensayo DPPH Fracción en hexano en fresco

Muestra	Fracción	Parámetro		Concentraciones ppm	PI (%)	%DPPHrem
En Fresco				1750	2,64	97,31
				1775	3,87	96,06
	Hexano	Absorbancia prom DPPH	0,785	1800	5,46	94,45
		Absorbancia prom Blanco	0,568	1825	6,51	93,37
				1850	7,57	92,3
				1875	8,98	90,87

ppm= partes por millón.

Abs prom= Absorbancia promedio

PI (%)= porcentaje de inhibición

% DPPH rem= porcentaje de DPPH remanente

Anexo 3. Datos ensayo ABTS

Tabla 1. Ensayo ABTS preliminar para escoger concentración de trabajo

Abs ABTS	0,828		
Abs Blanco	0,756		
Muestra	Concentración (ppm)	Absorbancia	%RS
En Seco	10000	0,375	50,40
	7000	0,398	47,35
	4000	0,545	27,91
En Fresco	10000	0,321	61,23
	5000	0,356	52,91
	3000	0,449	40,61

%RS= Porcentaje de inhibición de radiales

Abs = Absorbancia

Tabla 2. Ensayo ABTS con la concentración de trabajo

Abs ABTS	0,819						
Abs Blanco	0,738						
Muestra	Concentración (ppm)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs prom	%RS	SD
Fresco	5000 (Triplicado)	0,348	0,352	0,358	0,353	52,21	0,005
Seco	7000 (Triplicado)	0,394	0,39	0,389	0,391	47,02	0,003

Abs = Absorbancia

Abs prom = Absorbancia promedio

%RS = Porcentaje de inhibición de radiales

SD = desviación estándar

Tabla 3. Ensayo ABTS con los patrones (Ácido Ascórbico, Tocoferol y Trolox)

Abs ABTS	0,802						
Abs Blanco	0,779						
Muestra	Concentración ppm (Triplicado)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Absprom	%RS	SD
Ácido Ascórbico	500	0,347	0,342	0,345	0,345	55,76	0,003
Trolox	500	0,342	0,340	0,342	0,341	56,10	0,002
Tocoferol	500	0,446	0,443	0,443	0,444	43,09	0,003

Abs = Absorbancia

Abs prom = Absorbancia promedio

%RS = Porcentaje de inhibición de radicales

SD = desviación estándar

Tabla 4. Ensayo ABTS con las fracciones:

	Abs ABTS	0,819		
	Abs Blanco	0,765		
Muestra	Fracción	Concentración (ppm)	Absorbancia	%RS
En Seco	Acuosa	7000	0,659	13,86
	Butanol	7000	0,616	19,48
	Acetato	7000	0,476	37,78
	Hexano	7000	0,699	8,630
En Fresco	Acuosa	5000	0,645	15,69
	Butanol	5000	0,589	23,01
	Acetato	5000	0,462	39,61
	Hexano	5000	0,689	9,93

Abs = Absorbancia

%RS = Porcentaje de inhibición de radicales

Anexo 4. Datos ensayo de Folin-Ciocalteu

Tabla 1. Curva de calibración con el patrón ácido gálico

[]Ácido Gálico	Abs 1	Abs 2	Abs 2	AbsProm	SD
75	0,65	0,66	0,67	0,66	0,010
65	0,58	0,59	0,6	0,59	0,010
55	0,485	0,469	0,565	0,506	0,051
45	0,425	0,418	0,432	0,425	0,007
35	0,347	0,349	0,348	0,348	0,001
25	0,276	0,278	0,268	0,274	0,005
15	0,207	0,2	0,222	0,21	0,011

[] = concentración

Abs = Absorbancia

Abs prom = Absorbancia promedio

SD = desviación estándar

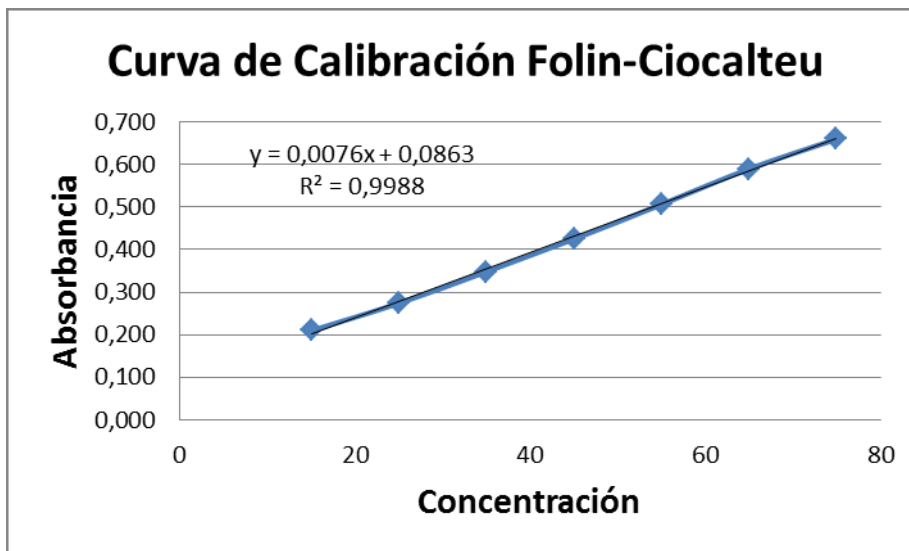


Figura 1. Curva de calibración fenoles totales

Tabla 2. Ensayo Folin-Ciocalteu con los extractos totales (en fresco y en seco)

Muestra	[ppm] (Triplicado)	AbsProm	SD	mg GAE/ g extracto
En Seco	1500	0,236	0,002	0,015
	2000	0,263	0,002	0,017
En Fresco	1500	0,258	0,002	0,026
	2000	0,290	0,004	0,033

[ppm] = concentración en partes por millón

Abs prom = Absorbancia promedio

SD = desviación estándar

mg GAE = miligramos equivalentes de ácido gálico

Tabla 3. Ensayo Folin-Ciocalteu con las fracciones

Muestra	Concentraciones ppm	mg GAE acuosa	mg GAE butanol	mg GAE acetato	mg GAE hexano
Fracciones SECO	1501	0,012	0,008	0,010	0,004
	1499	0,013	0,008	0,010	0,005
	1500	0,012	0,008	0,010	0,004
Fracciones Fresco	Concentraciones ppm	mg GAE acuosa	mg GAE butanol	mg GAE acetato	mg GAE hexano
	1500	0,017	0,018	0,020	0,011
	1496	0,016	0,018	0,020	0,010
	1505	0,017	0,018	0,020	0,011

mg GAE= miligramos equivalentes de ácido gálico/g extracto

Anexo 5. Datos ensayo *Artemia salina*

Tabla de datos ensayo *Artemia salina* LC₅₀ agudo (6h) y crónico (24 h)

muestra	# nauplios	concentración (dosis) ppm	# nauplios muertos (6 h)	# nauplios muertos (24 h)	LC ₅₀ (6 h) ppm	LC ₅₀ (24 h) ppm
	30	1000	30	30	603,65	433,31
	30	800	20	28		
En Seco	30	600	13	24		
	30	500	9	20		
	30	400	6	14		
	30	200	0	0		
	30	0	0	0		
	30	1000	30	30	563,36	416,49
	30	800	25	28		
En Fresco	30	600	13	25		
	30	500	10	22		
	30	400	8	15		
	30	200	0	0		
	30	0	0	0		

= número de

ppm = partes por millón

LC₅₀ = concentración letal para el 50% de los nauplios