



**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y  
FRACCIONES DE HOJAS DE *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M.  
King & H. Robinson.**

**ALVARO AUGUSTO ORJUELA RODRIGUEZ**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A.  
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA  
PRODUCTOS NATURALES U.D.C.A.  
PRONAUDCA  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D. C.  
2015**

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y  
FRACCIONES DE HOJAS DE *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M.  
King & H. Robinson.**

**ALVARO AUGUSTO ORJUELA RODRIGUEZ**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A.  
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA  
PRODUCTOS NATURALES U.D.C.A.  
PRONAUDCA  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D. C.  
2015**

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y  
FRACCIONES DE HOJAS DE *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M.  
King & H. Robinson.**

**ALVARO AUGUSTO ORJUELA RODRIGUEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Químico.**

**RUBÉN DARÍO TORRENEGRA GUERRERO**  
Químico.

Director Trabajo de Grado.

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES UDCA**

**OSCAR EDUARDO RODRIGUEZ AGUIRRE**  
Lic. Química y Biología - M.Sc. – Ph. D.  
Codirector Trabajo de Grado  
**UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A.  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PRODUCTOS NATURALES U.D.C.A.  
PRONAUDCA  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D. C.  
2015**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Bogotá D.C., 2015

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y  
FRACCIONES DE HOJAS DE *CHROMOLAENA PERGLABRA* (B. L. Robinson)  
*R.M. King & H. Robinson.***

**ALVARO AUGUSTO ORJUELA RODRIGUEZ**

**APROBADO**

---

**DRA. CHEYRON CASTELLANOS**  
Decana  
Facultad de Ciencias  
**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y  
AMBIENTALES UDCA**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A.  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PRODUCTOS NATURALES U.D.C.A.  
PRONAUDCA  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D. C.  
2015**

*El presente trabajo está dedicado a las personas más importantes en mi vida, y que más amo:*

*José Alvaro Orjuela y Ilba Nelly Rodríguez mis padres, quienes me ha enseñado con su ejemplo a superar todas las barreras que la vida nos presenta, a querer ser mejor cada día, a entender que no hay nada imposible y que sólo hay que esmerarse para lograr las metas que nos planteamos.*

*A Daniel Ricardo mi hermano y Andrea Camila mi sobrina, porque me brindaron su apoyo, comprensión, paciencia y su compañía, son mi fuente principal de inspiración para cumplir mis metas y sueños.*

*Alvaro Augusto Orjuela Rodríguez*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por las bendiciones recibidas, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y espíritu, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante este proceso académico.

Al Dr. Oscar Eduardo Rodríguez Aguirre por su paciencia, su tiempo, orientación, apoyo brindado, por compartir sus conocimientos, por su gran amistad, por escucharme, por sus sabios consejos y con quién puedo contar siempre.

Al Dr. Rubén Darío Torrenegra por su colaboración y apoyo, por ser una guía en el desarrollo de este proyecto.

A mi familia por estar allí conmigo siempre apoyándome.

A Carlos Alberto Velandia por su apoyo incondicional y sus consejos durante el transcurso de esta última etapa de mi vida, que permitieron mi crecimiento como persona y como profesional.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente me brindaron su ayuda y que me alentaron a seguir adelante a pesar de las dificultades.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>PAG</b>
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
2.1 Justificación .....	5
2.2 Delimitación .....	6
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	7
3.1 Objetivo general .....	7
3.2 Objetivos específicos .....	7
<b>4. MARCO TEORICO</b> .....	8
4.1 4.1 Familia Compositae (Asteraceae) .....	8
4.1.1 Hábitats .....	8
4.1.2 Genero <i>Chromolaena</i> .....	8
4.1.2.1 Etimología .....	9
4.1.2.2 Propiedades biológicas del genero <i>Chromolaena</i> .....	9
4.1.2.3 Propiedades químicas de las <i>Chromolaenas</i> .....	10
4.1.2.4 Ensayos de antioxidantes sobre el género <i>Chromolaena</i> .....	12
4.1.2.5 Descripción taxonómica .....	13
4.1.2.6 <i>Chromolaena perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson .....	13
4.1.2.7 Antecedentes .....	14
4.2 Radicales .....	14
4.2.1 Detención de radicales libres por tiempo .....	15
4.3 Antioxidantes .....	16
4.3.1 Sistemas antioxidantes .....	16
4.3.2 Clasificación de los antioxidantes .....	17
4.3.2.1 Antioxidantes primarios .....	17
4.3.2.2 Antioxidantes secundarios .....	18
4.3.2.3 Antioxidantes terciarios .....	19
4.3.3 Clasificación de los antioxidantes .....	20
4.4 Determinación de la actividad antioxidante .....	21
4.4.1 Medición de la actividad antioxidante .....	21
4.4.2 Ensayo de decoloración del radical 1-1Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH*) .....	22
4.4.3 Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS** .....	24
<b>5. MATERIALES Y METODOS</b> .....	25
5.1 Recolección del material vegetal .....	26



5.2	Extracción .....	26
5.3	Fraccionamiento .....	27
5.4	Instrumentos utilizados .....	27
5.4.1	Evaporador rotativo .....	27
5.4.2	Espectrofotómetro UV/VIS .....	27
5.5	Reactivos y solventes .....	27
<b>6.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>28</b>
6.1	Recolección del material vegetal .....	28
6.2	Obtención de los extractos de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol, fracción petrol, fracción diclorometano, fracción acetato de etilo y fracción metanolica de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson .....	29
6.2.1	Extracción .....	29
6.2.2	Fraccionamiento de los extractos .....	30
6.3	Determinación de actividad antioxidante de los diferentes extractos y fracciones obtenidos .....	32
6.3.1	Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH*) .....	32
6.3.1.1	Preparación de soluciones patrón .....	32
6.3.1.2	Preparación de la curva de referencia .....	33
6.3.1.3	Medición de la actividad antioxidante de los extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson .....	33
6.3.2	Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS*) .....	34
6.3.2.1	Preparación de la soluciones patrón .....	34
6.3.2.2	Preparación de la curva de referencia .....	35
6.3.2.3	Medición de la actividad antioxidante de los extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson .....	35
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS Y FRACCIONES .....</b>	<b>36</b>
7.1	Ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH*) .....	36
7.1.1	Preparación de la curva de referencia .....	37
7.1.2	Coeficiente de inhibición 50 (IC <sub>50</sub> ) .....	37
7.1.2.1	IC <sub>50</sub> Ácido Ascórbico .....	38
7.1.2.2	IC <sub>50</sub> Rutina .....	38
7.1.3	Actividad antioxidante de los extractos de hoja de <i>Ch.a perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson .....	39
7.1.4	Actividad antioxidante de las fracciones de los extractos de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson .....	40

7.1.5	Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC <sub>50</sub> ) de extractos y fracciones de hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH*)	41
7.1.6	Capacidad antioxidante de extractos fracciones de hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el ensayo de DPPH*	42
7.1.7	Actividad antioxidante relativa (AAR)	43
7.2	Ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS <sup>•+</sup> )	44
7.2.1	Preparación de la curva de referencia	44
7.2.2	Coeficiente de inhibición 50 (IC <sub>50</sub> )	46
7.2.2.1	IC <sub>50</sub> Trolox	46
7.2.2.2	IC <sub>50</sub> Rutina	46
7.2.2.3	IC <sub>50</sub> Ácido Ascórbico	47
7.2.3	Actividad antioxidante de los extractos de hoja de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson	48
7.2.4	Actividad antioxidante de las fracciones de los extracto de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.	49
7.2.5	Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC <sub>50</sub> ) de extractos y fracciones de hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)	50
7.2.6	Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el ensayo ABTS <sup>•+</sup> .	51
7.2.7	Actividad antioxidante relativa (AAR)	52
7.3	Comparación del IC <sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los métodos de DPPH* y ABTS <sup>•+</sup>	53
7.4	Comparación de la actividad antioxidante relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> comparadas con el ácido ascórbico	54
7.5	Comparación de la actividad antioxidante relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos del radical DPPH* y de ABTS <sup>•+</sup> comparadas con la Rutina	56
7.6	Comparación de la capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos de decoloración del radical DPPH* y del radical catiónico ABTS <sup>•+</sup> comparadas con la rutina.	57

<b>CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	59
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	60
<b>ANEXOS</b> .....	68

## LISTA DE IMAGENES

	PAG
Imagen 1. Vías de peroxidación lipídica (Marnett 1999).....	598
Imagen 2. Estructuras correspondientes a los antioxidantes secundarios de los mecanismos de defensa en el organismo humano.....	19
Imagen 3. Estructura del DPPH* antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al., 2012).....	22
Imagen 4. Estructura del ABTS** antes y después de la reacción con el antioxidante (Zuleta et al., 2009).....	25
Imagen 5. Trolox de AcrÕs Organics (Fuente: Autor).....	28
Imagen 6. ABTS de Sigma-Aldrich (Fuente: Autor).....	28
Imagen 7. <i>Chromolaena perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, recolectada el municipio de Tinjaca (Boyacá). (Fuente: Autor).....	29
Imagen 8. Equipo Soxhlet para la extracción de las hojas <i>Chromolaena perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson (Fuente: Autor).....	30
Imagen 9. Rotaevaporador donde se concentran los diferentes extractos de las hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson (Fuente: Auto.....	30
imagen 10. Equipo para la Extracción solido-Líquido con cartucho para el fraccionamiento de los extractos hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).....	31
Imagen 11. Extracto en el cartucho para el fraccionamiento. (Fuente: Autor).....	31
imagen 12. Fotografía, generación del radical ABTS**, en solución sin adición del generador de radicales (Fuente: Autor).....	36
Imagen 13. El radical ABTS** generado químicamente con persulfato de potasio después de un periodo de 48 horas en la oscuridad. (Fuente: Autor).....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PAG</b>
Tabla 1. Ejemplos de metabolitos secundarios aislados de especies del género <i>Chromolaena</i> . (Fuente: Corredor <i>et al.</i> , 2006).....	10
Tabla 2. Mecanismos de acción de algunos antioxidantes (Fuente: Emanuel E. et al 1996.).....	20
Tabla 3. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT. (Fuente: Huang et al., 2005).....	22
Tabla 4. Solventes y reactivos. (Fuente: Autor) .....	27
Tabla 5. Cantidad obtenida de extracto por cada Solvente. (Fuente: Autor).....	30
Tabla 6. Porcentaje de Captación del radical DPPH* empleando Ácido ascórbico. (Fuente: Autor).....	37
Tabla 7. Porcentaje de captación del radical DPPH* empleando rutina (Fuente: Autor).....	37
Tabla 8. Porcentaje de Captación de DPPH* en extractos de hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).....	39
Tabla 9. Porcentaje de Captación de DPPH* en Fracciones de los extracto de hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).....	40
Tabla 10. IC <sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor).....	41
Tabla 11. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor) .....	42
Tabla 12. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor). .....	44
Tabla 13. Porcentaje de captación del radical ABTS** empleando trolox. (Fuente: Autor). .....	45

Tabla 14. Porcentaje de captación del radical ABTS <sup>•+</sup> empleando ácido ascórbico. (Fuente: Autor).	45
Tabla 15. Porcentaje de captación del radical ABTS <sup>•+</sup> empleando rutina. (Fuente: Autor).	45
Tabla 16. Porcentaje de captación de ABTS <sup>•+</sup> en extractos de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).	48
Tabla 17. Porcentaje de Captación de ABTS <sup>•+</sup> en Fracciones de los extractos de hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).	49
Tabla 18. . IC <sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	51
Tabla 19. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	52
Tabla 20. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	53
Tabla 21. Comparación IC <sub>50</sub> en extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. Perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los métodos de decoloración DPPH <sup>*</sup> y ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	54
Tabla 22. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. Perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH <sup>*</sup> y ABTS <sup>•+</sup> con respecto al ácido ascórbico. (Fuente: Autor).	55
Tabla 23. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH <sup>*</sup> y ABTS <sup>•+</sup>	56
Tabla 24. Comparación de la capacidad Actividad Antioxidante Relativa de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH <sup>*</sup> y ABTS <sup>•+</sup>	57

## ÍNDICE DE GRAFICAS

	<b>PAG</b>
Gráfica 1. Curva de referencia del porcentaje de captación de DPPH* v/s concentración de ácido ascórbico. (Fuente: Autor). .....	38
Gráfica 2. Curva de referencia del porcentaje de captación de DPPH* v/s concentración de Rutina. (Fuente: Autor). .....	39
Gráfica 3. Comparación de los extractos de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el método decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor). .....	40
Gráfica 4. Comparación del porcentaje de captación del radical DPPH* de las fracciones de los diferentes extractos de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor). .....	41
Gráfica 5. Comparación IC <sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor). .....	42
Gráfica 6. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor). .....	43
Gráfica 7. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el ensayo de DPPH*. (Fuente: Autor). .....	44
Gráfica 8. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS** v/s concentración de Trolox. (Fuente: Autor). .....	46
Gráfica 9. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS** v/s concentración de Rutina. (Fuente: Autor). .....	47
Gráfica 10. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS*+ v/s concentración de ácido ascórbico. (Fuente: Autor). .....	47
Gráfica 11. Comparación extractos de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el método decoloración del radical ABTS**. (Fuente: Autor). .....	48

Gráfica 12. Comparación de las fracciones de los extractos de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el método decoloración del radical ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	50
Gráfica 13. Comparación IC <sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	51
Gráfica 14. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	52
Gráfica 15. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el ensayo de ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	53
Gráfica 16. Comparación IC <sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los métodos DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	54
Gráfica 17. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> con respecto al ácido ascórbico. (Fuente: Autor).	55
Gráfica 18. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> con respecto a la Rutina. (Fuente: Autor).	56
Gráfica 19. Comparación de la capacidad Actividad Antioxidante Relativa de extractos y fracciones de hojas de <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).	57



## LISTA DE DIAGRAMAS

	<b>PAG</b>
Diagrama 1. Diagrama de trabajo para el estudio fitoquímico de hojas <i>Ch.perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. ....	31
Diagrama 2. Descripción del proceso para obtención de fracciones de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol de hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.....	32
Diagrama 3. Descripción del proceso para la determinación de la actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas <i>Ch. perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson., por el ensayo de decoloración del radical (DPPH*).....	34

## LISTA DE ANEXOS

	<b>PAG</b>
Anexo 1. Cinética del Ácido Ascórbico, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	66
Anexo 2. Cinética de la Rutina, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	66
Anexo 3. Cinética del extracto éter de petróleo, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	67
Anexo 4. Cinética del extracto diclorometano, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	67
Anexo 5. Cinética del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	67
Anexo 6. Cinética del extracto etanólico, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	68
Anexo 7. Cinética de la fracción éter de petróleo del extracto petrol, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	68
Anexo 8. Cinética de la fracción diclorometano del extracto diclorometano, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	68
Anexo 9. Cinética de la fracción acetato de etilo del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	69
Anexo 10. Cinética de la fracción metanólica del extracto etanólico, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....	69
Anexo 11. Cinética Ácido Ascórbico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	69
Anexo 12. Cinética Rutina, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	70
Anexo 13. Cinética Trolox, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	70

Anexo 14. Cinética del extracto éter de petróleo, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	70
Anexo 15. Cinética del extracto diclorometano, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	71
Anexo 16. Cinética del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	71
Anexo 17. Cinética del extracto etanólico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	71
Anexo 18. Cinética de la fracción éter de petróleo del extracto petrol, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	72
Anexo 19. Cinética de la fracción diclorometano del extracto diclorometano, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	72
Anexo 20. Cinética de la fracción acetato de etilo del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	72
Anexo 21. Cinética de la fracción metanólica del extracto etanólico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor) .....	73

## RESUMEN

La determinación de la actividad antioxidantes de los extractos y fracciones de hojas de la especie *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, fue realizada por los dos métodos de decoloración de los radicales DPPH\* y ABTS\*\*+. Ambos métodos se utilizaron sobre los extractos de hojas (eter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol) y fracciones de los extractos de hojas (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol).

Las concentraciones usadas fueron 12.5, 25, 62.5 125 y 250 miligramos de extracto por litro de Metanol. Presentando mayor actividad antioxidante por el método DPPH\* y ABTS\*\*+ a la fracción metanol del extracto etanol con un IC<sub>50</sub> de 1.51 miligramos por litro de metanol por el ensayo de DPPH\* y 20.15 miligramos por litro de metanol para el ensayo de ABTS\*\*+ respectivamente, siguiéndole la fracción de acetato de etilo del extracto acetato de etilo con un IC<sub>50</sub> de 29.90 miligramos de extracto por litro de metanol por el ensayo de DPPH\* y 20.87 miligramos de extracto por litro de litro de metanol por el método ABTS\*\*+.

Las fracciones con los solventes de menor polaridad por ambos métodos no presentan una actividad antioxidante.

La preparación de los extractos y fracciones de hojas de la especie vegetal *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, fue realizada en conjunto por el grupo de investigación de productos naturales PRONAUDCA y la facultad de ingeniería ambiental de la Universidad El Bosque.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los productos naturales provenientes de plantas son valorados por el hombre como fuente de principios activos para uso medicinal (Farnsworth et al., 1992); en la actualidad estos productos vuelven a tomar un lugar preponderante en nuestro entorno. Existen importantes factores que se convierten en el punto de partida para la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural, que puedan contribuir a la disminución en el consumo de productos obtenidos por síntesis química.

Las plantas liberan al medio una gran cantidad de sustancias biológicamente activas denominadas metabolitos secundarios, que generan una serie de interacciones conocidas como aleloquímicas; estas interacciones actúan como antioxidantes, repelentes, antimicrobianos, citotóxicos, etc. Los productos finales de metabolitos secundarios no son esenciales ni de presencia universal en las plantas.

Una actividad importante que se aprovecha de estos metabolitos secundarios presentes en las plantas es la presencia de compuestos antioxidantes; metabolitos que actúan contra los radicales libres. Moléculas que desempeñan un importante papel como mediadores en la regulación de varios procesos. Conocer este tipo de propiedades presentes en las plantas, nos permitiría obtener un nuevo compuesto que favorezca la captura de radicales libres.

Un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evaluación de actividades antioxidantes en extractos de especies Colombianas. Se ha escogido la especie del género *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Rob, que ha mostrado potencialidad medicinal y que prospera en Colombia; a la que se le ha demostrado actividades biológicas como: antiprotozoaria (leishmaniosis y chagas) y citotóxicas y que produce variedad de metabolitos secundarios, a los que se les atribuye las actividades antes descritas. (Rodríguez y Torrenegra ,2007)

En Colombia se reportan veintisiete especies de *Chromolaena* entre las cuales está la *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, que prospera en la zona Cundiboyacense Santander y Bolívar y que pueden ser una especie potencialmente utilizada. Este trabajo busca evaluar la capacidad antioxidante de los extractos y fracciones de diferentes polaridades de las hojas de ésta especie, para poder ser aprovechadas en la formulación de nuevos compuestos cosméticos, fármacos o alimenticios.

El estudio de estas interacciones químicas debe conducirnos hacia unas metas naturales y hacia la búsqueda de mayor información que nos permita aprovechar dicho potencial en beneficio de la humanidad y de los ecosistemas.

Por estas razones expuestas, se generó la necesidad de investigar la actividad antioxidante de estos extractos y fracciones de las hojas de esta planta.

La presente investigación consiste en extraer y fraccionar con solventes de diferente polaridad las hojas de la especie vegetal *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson; y determinar su actividad antioxidante por los métodos de decoloración de radicales libres DPPH\* y decoloración del radical ABTS\*\*.

## 2. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los compuestos de origen vegetal con alguna actividad biológica provienen de los denominados metabolitos secundarios, estas sustancias se han desarrollado durante millones de años a través de evolución, como respuesta a factores externos como ambientales, depredadores, patógenos, interacción planta-animal, protección, entre otros. Ante ello los metabolitos secundarios presentan diversas actividades de tipo químico y biológico, de interés en el sector de alimentos, farmacología, farmacognosia, polímeros, pinturas, cosméticos, agroquímica y toxicología, entre otros. (Hostettmann, K., 1999; Horan, I. et al, 2003).

Del género *Chromolaena*, han identificado compuestos de tipo sesquiterpenos, triterpenos, flavonoides, flavanoles, ácidos grasos de la forma prostaglandina, sesquiterpenlactonas, diterpenos, ent-clerodanos, chalconas metiladas, germacranolidos y derivados del labdano y actividades como: plaguicida, repelente, insecticida, tripanomicida, antibacterial y antimicobacterial; efecto antiprotozoario, antioxidante; citotoxicidad, mutagenicidad, proliferación de queratocitos humanos y proliferación de fibroblastos entre otros.

*De Chromolaena perglabra (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson*, se evidencio la actividad de un flavonoide que induce la muerte celular en células tumorales y proliferación en células normales. (Arango et al 2007)

En los últimos años el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado drásticamente, debido a varias razones como son la baja seguridad que ofrece el consumo de antioxidantes obtenidos por síntesis química, la eficacia antioxidante de una variedad de agentes fitoquímicos, y la idea generalizada de que el consumo de ciertos agentes fitoquímicos pueden afectar de manera positiva la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento; además, la creencia de que los compuestos naturales son innatamente más seguros que los compuestos sintéticos y por consiguiente son comercialmente más aceptados. (Dorman et al., 2004).

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas. (Marwah et al., 2007)

La identificación de antioxidantes en productos naturales, exalta el reciente interés en la promoción de la salud, la conservación de productos alimenticios, fármacos y

cosméticos entre otros productos que dependen de la estabilidad de sus compuestos. La relación que se obtiene entre los radicales y el envejecimiento celular y la estabilidad de los productos, que se reflejan en muchas enfermedades como la arteriosclerosis y enfermedades vasculares relacionadas, etc., y el enranciamiento de productos alimenticios y el deterioro de productos de consumo, se ha traducido en el desarrollo de numerosos ensayos para identificar propiedades que puedan prevenir el daño de estos productos e identificar deficiencias en el organismo, para poder salvaguardar la salud.

Dado los anteriores argumentos toma importancia la búsqueda y la medida de antioxidantes, se han generado una serie de técnicas para la evaluación de los mismos, entre la más usadas están las espectrofotométricas, que se basan en la medida de la reacción con radicales libres estables, tales como son: el catión radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS<sup>•+</sup>), el 2,2- difenil-1-picrilhidracilo (DPPH<sup>\*</sup>)

Ante esto, ésta investigación se enfocó en la evaluación de la actividad antioxidante de extractos y fracciones de diferentes polaridades de las hojas de la especie vegetal *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por los métodos de decoloración de los radicales ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>\*</sup> mediante el uso de la técnica espectrofotométrica UV-VIS (Ultravioleta-Visible).

## **2.1 Justificación**

En Colombia contamos con cerca del 15% del total de especies vegetales a nivel mundial, también contamos con una gran variedad de ecosistemas debido a nuestra ubicación geográfica en la zona ecuatorial, por ello a lo largo de los años se han estudiado las propiedades medicinales de dichas plantas para el tratamiento de enfermedades debido a su amplio uso generación tras generación en diversas comunidades, sin tener en cuenta un principio activo responsable de estas facultades. Hoy en día la búsqueda de compuestos que tengan características antioxidantes, y la tendencia de obtener productos de origen natural, ha conllevado a investigaciones de origen fitoquímico.

Este proceso ha generado la necesidad de encontrar especies vegetales que presenten esta actividad biológica para poder ser aprovechadas en la obtención de nuevos alimentos o fitofármacos. La presente investigación se orienta para el conocimiento biológico de la especie vegetal *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. El propósito fundamental es preparar extractos por extracción fraccionada con solventes de diferentes polaridades de las hojas de la especie seleccionada, evaluarle su actividad antioxidante para una posible aplicación en el campo de la medicina y la farmacología; de esa forma se



pretende comprobar si el uso de ella es similar al de otras especies de uso reconocido con propiedades medicinales.

Se obtendrá información básica y aplicada que podrá ser aprovechada por grupos de investigación multidisciplinarios para el desarrollo de nuevos productos, dentro de una visión de uso sostenible de los recursos vegetales endémicos nativos colombianos. Esta investigación busca evaluar la capacidad antioxidante en los extractos y fracciones de diferentes polaridades en hojas *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.

## **2.2 Delimitación**

En la presente investigación se estudiaron los extractos y fracciones de diferentes polaridades de hojas de la especie vegetal *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, obtenidas por el grupo de investigación de productos naturales PRONAUDCA y la facultad de ingeniería ambiental de la Universidad El Bosque; se determinó por los métodos de decoloración del radical DPPH\* y método de decoloración del radical ABTS\*\* la capacidad antioxidante de fracciones y extractos de hojas de la planta en estudio.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante mediante análisis por los método ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>\*</sup> de extractos y fracciones de hojas de la especie vegetal *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Extraer con solventes de distintas polaridades y obtener fracciones de diferente polaridad de las hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.
- Determinar por método de decoloración de radicales libres DPPH<sup>\*</sup> la actividad antioxidante de los extractos y fracciones de hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.
- Determinar por método de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup> la actividad antioxidante de los extractos y fracciones de hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.

## 4. MARCO DE TEÓRICO

### 4.1 Familia Compositae (Asteraceae)

La familia Asteraceae o Compositae se distribuye en todos los continentes, excepto en el Antártico, y comprende cerca de 24000 especies, por lo cual es considerada la familia de plantas con mayor número de especies descritas en el planeta. Entre las Asteraceae no existen especies marinas y la acuáticas dulceacuícolas muy escasas; suelen ser abundantes en zonas montañosas y zonas áridas, mientras que son escasas en las selvas tropicales bajas (Cabrera 1978). La familia Asteraceae comprende 1535 géneros agrupados 17 tribus en tres subfamilias y, mientras que la clasificación recientemente propuesta por (Funk et al. 2009), con base en caracteres morfológicos y moleculares, reconoce 1600-1700 géneros, 43 tribus y doce subfamilias.

#### 4.1.1 Habitats

La familia está distribuida en todo el planeta, por lo tanto está considerada como cosmopolita, donde las especies de esta gran familia se encuentran desde zonas frías, templadas, sub-tropicales, hasta zonas tropicales. Se encuentran especialmente en regiones áridas, semiáridas abiertas y regiones montañosas de latitudes tropicales.

#### 4.1.2 Genero *Chromolaena*

El género *Chromolaena* pertenece a la tribu Eupatorieae, subtribu Praxelinae (King & Robinson, 1970a; Funk et al., 2009) y comprende cerca de 170 especies (King & Robinson, 1970b; Prusky, 1997; Badillo, 1995; Turner, 1991a, 1991b), de las cuales 27 se registran para la flora colombiana. Este grupo se distribuye entre el nivel del mar y los 3900 m de altitud, desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina, con mayor concentración de especies en Brasil.

Las especies de *Chromolaena* se reconocen morfológicamente por ser hierbas, arbustos o, raras veces, lianas, con hojas opuestas, sin florescencias de capítulos corimbosos o tirsoideos, raramente solitarios, involucre cilíndrico alargado con filarias decrecientes, fuertemente imbricadas y con el ápice coloreado, las cuales permanecen agrupadas hasta después de la antesis, cuando se abren y desprenden dejando el receptáculo completamente desnudo; el estilo es glabro y no se engrosa en su base, las ramas estigmáticas son lineales o ligeramente engrosadas distalmente, el aquenio es prismático y generalmente presenta cinco costillas; el papo presenta abundantes cerdas escábridas y persistentes (King & Robinson, 1970; Bremer, 1994). De acuerdo con King & Robinson (1970), *Chromolaena* se diferencia de los demás géneros de Praxelinae por presentar

papo con numerosas cerdas capilares escábridas, receptáculo liso a ligeramente convexo, así como corolas con tubo delgado y lóbulos tan largos como anchos.

Este género de *Chromolaena* es una planta herbácea con arbustos erectos o dispersos en el suelo, distribuida en Colombia, la especie en estudio se encuentra en el departamento de Cundinamarca, Valle del Cauca, Antioquia y Boyacá, cuyo origen es silvestre.

#### **4.1.2.1 Etimología**

*Chromolaena* proviene del griego *chroma* que significa color y *laina* que significa capa, lo cual hace referencia a las filarias coloreadas observadas en algunas especies del género.

#### **4.1.2.2 Propiedades biológicas del género *Chromolaena***

Durante los últimos años, las especies de *Chromolaena* han sido estudiadas en Colombia en el campo de la fitoquímica y la medicina, dado su potencial como productora de sustancias antifúngicas, antibacterianas y antitumorales. Así por ejemplo, Sanabria-Galindo et al. (1989), Sanabria-Galindo & Carrero (1995), Rodríguez-A. & Torrenegra (2007) y García-Sánchez et al. (2008) aislaron y corroboraron la efectividad de sustancias responsables de la actividad antimicótica y antibacteriana en *Chromolaena tequendamensis*, *Chromolaena tacotana*, *Chromolaena perglabra*, *Chromolaena subscandens* y *Chromolaena bullata*, respectivamente. Rodríguez-Aguirre. (2008) evaluó los compuestos químicos y potencial de los extractos, fracciones o sustancias puras en actividad antiparasítica (Chagas y Leishmaniasis), actividad citotóxica y antitumoral de *Chromolaena perglabra*, *Chromolaena tacotana*, *Chromolaena bullata*, *Chromolaena subscandens*, *Chromolaena leivensis* y *Chromolaena scabra*, encontrando que estos poseen potencial para ser utilizados en medicina.

Entre las sustancias aisladas de *Chromolaena scabra* se encuentran Esteres de ácidos grasos: Hexadecanoato de metilo, Hexadecanoato de etilo, Linoleato de etilo, 9, 12, 15 Octadecatrienoato de etilo, Octadecanoato de etilo. Terpenos: Fitol Esteroles: Estigmasterol; 7,16-dien-3-Estigmasterol; 7,25-dien-3-Estigmasterol gamma Sitosterol y beta Sitosterol; Fenoles simples: Catecol, Flavonoides: Quercetina Mientras que de las flores se identificaron: los esteroles Estigmasterol y gamma Sitosterol. (Garzon 2008)

En relación con lo anterior vale la pena señalar que de acuerdo con lo registrado, algunas especies de *Chromolaena* son utilizadas en la medicina popular de Colombia, así por ejemplo, tenemos que en Cundinamarca, *Chromolaena leivensis* es utilizada como diurético o en remedios caseros anticancerígenos y contra la

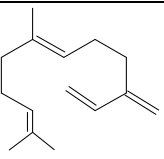
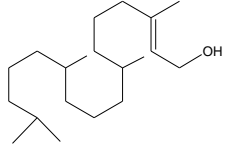
sífilis Por su parte *Chromolaena odorata* es utilizada en Nariño como remedio para el paludismo, en el Cauca se emplea para quitar dolores neurálgicos; para ello se toma en infusión o se realizan masajes sobre la parte del cuerpo adolorida, en San Andrés Islas con las hojas se prepara un té que se toma para el dolor del cuerpo o del estómago y en el Huila se toma en infusión como descongestionante y se utiliza además como cataplasma antirreumático. (Rodríguez, C. Betsy. 2013)

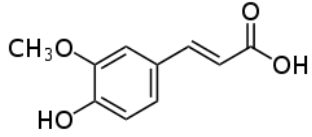
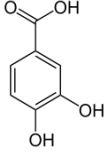
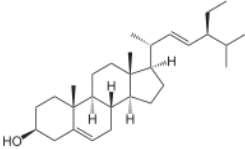
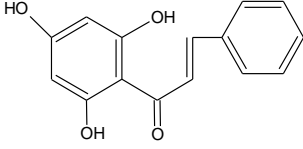
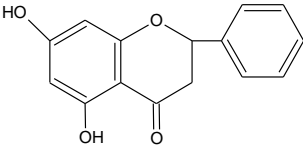
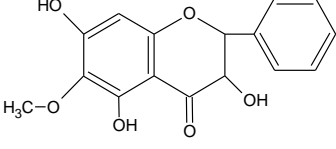
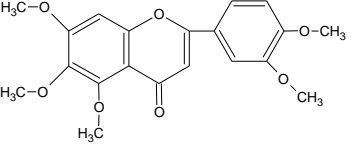
Así mismo, se encontró que *Chromolaeba tacotana* es considerada como una hierba medicinal ya que sus hojas machacadas con agua y aplicadas sobre una herida tienen acción coagulante, específicamente en el Huila esta especie es utilizada para calmar el dolor de estómago, dolores bajos (matriz) y la vaginitis , mientras que *Chromolaena subscandens* en Cundinamarca se utiliza para aliviar las inflamaciones. (Rodríguez, C. Betsy., 2013)

Con respecto a la *Chromolaena bullata* se identificó que un flavonoide (CB2) induce la activación de células dendríticas humanas, este proceso es fundamental para identificar y determinar si este flavonoide posee actividad antitumoral o inmunorreguladora.

#### 4.1.2.3 Propiedades químicas de las *Chromolaenas*

El Grupo de Investigación Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ) ha desarrollado estudios de especies del género *Chromolaena*, estudiando específicamente la, *Chromolaena subscandens*, (Guzman et al. 2007) *Chromolaena perglabra* (Rodriguez 2007) y *Chromolaena tacotana* (Rodriguez et al 2005). A continuación en la tabla 1 se consignan diferentes compuestos químicos entre ellos flavonoides, lactonas sesquiterpénicas y triterpenos identificados en especies del género *Chromolaena*.

Estructura y nombre	Tipo	Fuente
 <p><math>\beta</math>-farneseno</p>	Sesquiterpenoide	<i>C. amottiana</i> <i>C. pseudoinsignis</i> <i>C. corymbosa</i>
	Diterpenoide	<i>C. pseudoinsignis</i> <i>C. christieana</i>

Fitol		
 <p>Ácido ferúlico</p>	Ácido hidroxicinámico	<i>C. odorata</i> .
 <p>Ácido protocatéquico</p>	Ácido hidroxicinámico	
 <p>Estigmasterol</p>	Triterpenoide	<i>C. chasleae</i> <i>C. christiana</i>
 <p>5,7-dihidroxicalcona</p>	Chalcona	<i>C. chasleae</i>
 <p>5,7-dihidroxi flavanona</p>	Flavanona	<i>C. chasleae</i>
 <p>5,7-dihidroxi-6 –metoxi-flavanonol</p>	Flavanonol	<i>C. chasleae</i>
 <p>5,6,7,4',5'-pentametoxiflavona</p>	Flavona	<i>C. heteroclinium</i>

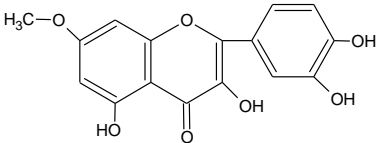
 <p>5,4',5'-trihidroxi -7-metoxiflavonol</p>	Flavonol	<i>C. meridensis</i>
---	----------	----------------------

Tabla 1. Ejemplos de metabolitos secundarios aislados de especies del género *Chromolaena*.  
(Fuente: Autor).

#### 4.1.2.4 Ensayos de antioxidantes sobre el género *Chromolaena*

Del género *Chromolaena* se han desarrollado diferentes pruebas identificando la actividad antioxidante de algunas de las plantas de este género, varias de estas pruebas se han desarrollado por el método de actividad de radicales libres, método de decoloración de radicales DPPH\*, por el método FRAP y ABTS\*+.

- En 1992 Irobi et al en 2000, en 2001 Phan et al, en 2004 y Suksamrarn et al, realizaron análisis al género *Chromolaena*, a las especies *Chromolaena odorata*, *C. hirsute* y *C. moritziana* donde se evaluaron diferentes actividades de cada una de ellas entre estas están su actividad pesticida, repelente, antiprotozoaria, insecticida, tripanocida, anti-bacterial, antimicrobacterial, citotóxica, antioxidante, mutagénica, de proliferación de keratocitos humanos y proliferación de fibroblastos entre otras.
- En el año 2000 investigadores de la Universidad de Port Harcourt, de la facultad de ciencias, del departamento de bioquímica de Nigeria conformada por Igboh et al., identificaron el perfil químico de la *Chromolaena odorata*.
- En el año 2001 un grupo de profesionales del Hospital de Singapore, del departamento de cirugía plástica y del departamento de farmacia de la universidad nacional de Singapore y del Laboratorio Jodrell, Jardín Botánico Real de Kew, Surrey, de Inglaterra, conformado por Toan-Thang Phan et al., hallaron los compuestos fenólicos de *Chromolaena odorata* que pueden proteger las células de la piel cultivada del daño oxidativo: Implicaciones para la curación de heridas cutáneas.
- Desde el 2003, 2004 y el 2006 Taleb-Contini et al, estudio las propiedades de dos diferentes especies de *Chromolaena*, la *Ch. Squalida* y la *Ch. Hirsuta*, donde identifico propiedades antimicrobianas y antioxidantes.
- En el 2007 un grupo de estudiantes del Federal University of Technology, Nigeria, conformado por Akinmoladun, et al., desarrollaron un proyecto

sobre los constituyentes fitoquímicos y propiedades antioxidantes de las hojas de *Chromolaena odorata*.

- A finales del 2010 un grupo de estudiantes del instituto de Roland de ciencias farmacéuticas, de Berhampur, India, conformado por K. Srinivasa Rao, et al., evaluaron la actividad antioxidante total del contenido de compuesto fenólicos de la *Chromolaena odorata* por el ensayo de TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox).

#### 4.1.2.5 Descripción taxonómica

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliatae</i>
<b>Subclase</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Orden</b>	<i>Asterales</i>
<b>Familia</b>	<i>Asteraceae (Compositae)</i>
<b>Tribu</b>	<i>Eupatorieae</i>
<b>Género</b>	<i>Chromolaena</i>
<b>Especie</b>	<i>Chromolaena perglabra</i> (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.

#### 4.1.2.6 *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson

Arbusto hasta 2 m de altura. Esta especie se caracteriza entre las *Chromolaena* presentes en Colombia por tener ramas y sin florescencias glabras, lámina foliar por la haz lisa, glabra y nítida, margen aserrada, capítulos generalmente sésiles en glomérulos 3-5 capitulados y 5-6 flósculos por capítulo. Su mayor afinidad se presenta con *Chromolaena baccharidifolia*; no obstante, se aparta de ésta por el menor número de flósculos y el menor número de filarias; adicionalmente presenta peciolos más cortos (hasta 1.8 cm vs. hasta 2.5 cm de largo), lámina foliar nunca glandulosa por la haz, rara vez glandulosa por el envés (vs. lámina foliar a veces glandulosa por la haz, siempre glandulosa por el envés), capítulos sésiles o con pedicelos hasta 0.3 cm de largo (vs. capítulos sésiles o con pedicelos hasta 1.1 cm de largo) y corola con tubo de mayor longitud (1.2-3 mm vs. 1-1.2 mm).

*Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson crece en áreas intervenidas de bosque alto andino dominado por robles, bordes de bosque, bordes de carretera o caminos. (Rodríguez, C. Betsy., 2013)

Esta especie endémica de Colombia. Se registra en la región Andina en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Santander, entre los 1990 - 3000m.



Un registro sitúa a una *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson en el departamento de Bolívar, sobre los 500m, alejándose así del centro de mayor concentración de las poblaciones de esta especie y del límite inferior reconocido para ésta en el territorio nacional.

#### **4.1.2.7 Antecedentes**

En *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, Rodríguez Aguirre Oscar. & Torrenegra Rubén encontraron extractos y fracciones de diferente polaridad que presentaron una actividad moderada frente a amastigotes de *L. panamensis* (Leishmaniosis) y epimastigotes *T. cruzi* (Chagas), además encontraron extractos y fracciones Petrol para hojas y tallos que presentan alta toxicidad frente a células U937. (Rodríguez y Torrenegra, 2007)

#### **4.2 Radicales**

Un radical libre, por definición, es una molécula o simplemente un átomo con un electrón no apareado, convencionalmente simbolizado por un punto sobre la molécula o átomo. (Parker et al 2002)

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicálicas, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS).

Las formas en las que actúa un radical en un sistema biológico, son por medio de los procesos oxidativos, cabe señalar que la oxidación de moléculas biológicas no

siempre es un proceso dañino. Hay algunas funciones fisiológicas, que dependen de la formación de productos oxidados, por ejemplo los resultados de la oxidación lipídica enzimática en la formación de prostaglandinas biológicamente activas y otros compuestos biológicamente activos, etc. Sin embargo, "el cóctel de radicales libres" puede ser una causa de potentes eventos dañinos, y por lo tanto, el organismo tiene que desarrollar potentes sistemas de protección anti-radical. Tradicionalmente, estos sistemas se denominan sistemas antioxidantes. (Yu, 2008)

Los radicales libres juegan un papel muy importante en muchos procesos biológicos incluyendo secuencia de reacciones metabólicas, señales celulares, respuesta inmune y variedad de condiciones patológicas y fisiológicas (Ansari. et al. 1997). Los radicales libres son generados en medio biológicos como un resultado de reacciones asociadas con reacciones biológicas, que involucran oxígeno en el metabolismo.

#### **4.2.1 Detección de radicales libres por tiempo**

Los radicales libres son altamente reactivos e inestables comparados con su similar ion. La presencia de los electrones no apareados tiene una consecuencia sobre su reactividad en general es muy alta de tal especie. Esto, por supuesto, refleja el deseo genuino de la especie "radical" para alcanzar el estado energético más favorable mediante el acoplamiento de su espín desapareado formando un nuevo enlace entre dos átomos. En consecuencia, muchas de las reacciones que se encadenan, ocurren tan pronto como las dos especies que reaccionan, se demoran en conocerse. (Timofeevich. 2005)

La detección y cuantificación de estas especies es crítica para descifrar la secuencia de reacciones celulares y entender los mecanismos de la enfermedad y su función. Las reacciones de radicales libres son generalmente muy rápidas y por lo tanto, escapan en un experimento a cualquier detección directa en un proceso in vivo en tiempo real. Afortunadamente las constantes de velocidad absoluta es una propiedad inherente de cualquier sistema reactivo particular, por lo tanto en modelos in vitro se podrá determinar el recipiente "biológico" adecuado y la forma adecuada de identificar su presencia en este recipiente, lo que falta es saber la forma en la que ocurren e intervienen los radicales libres en los procesos biológicos. (Armstrong et al. 1998)

Desde el punto de vista científico, la reacción de un radical, a través de un proceso de difusión controlada, con sustratos que se encuentran presentes en una concentración, la reacción se presenta en un periodo de tiempo de milisegundos, por lo tanto cualquier técnica para el estudio directo de las reacciones rápidas, en consecuencia debe haber un sistema de detección rápida, para el análisis de la

cinética del radical (solo entonces se permite ver cómo actúa el radical), una característica que debe poseer el radical para ser estudiado, es que debe poseer una característica perceptible, de hecho, la mayoría de los radicales son de color, no necesariamente en la parte visible del espectro, pero las regiones del IR y UV son igualmente accesibles por los modernos estudios de tiempo para resolver la espectroscopia óptica. En principio, como cualquier otra propiedad detectable con una resolución de tiempo apropiado es adecuado (Baxendale J. et al. 1982).

### **4.3 Antioxidantes**

Los Antioxidantes son compuestos los cuales pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Los antioxidantes se dividen en dos categorías principalmente que son: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides así como el ácido ascórbico. Los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butil – hidroxianisol y Butil - hidroxitolueno) han sido utilizados como antioxidantes desde principios del siglo pasado. Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y se ha restringido su uso debido a su carcinogenicidad. Debido a esto, el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado considerablemente ya que la capacidad de actuar como antioxidante se ha demostrado en el laboratorio y mencionado en la literatura.

Muchos antioxidantes naturales, en especial los flavonoides, muestran un amplio rango de efectos biológicos incluyendo funciones antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadores. Una terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales provenientes de las plantas<sup>8</sup>. La actividad antioxidante y su relación con la propiedad curativa de una gran cantidad de plantas medicinales han sido reportadas en diversas investigaciones.

#### **4.3.1 Sistemas antioxidantes**

Los sistemas antioxidantes, son usados en el sistema fisiológico como protección de radicales, donde se encuentran numerosos compuestos de diversas estructuras, como enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, etc.), antioxidantes endógenos de bajo peso molecular (glutatión, ácido úrico, etc.), antioxidantes exógenos.

## 4.3.2 Clasificación de los antioxidantes

### 4.3.2.1 Antioxidantes primarios

Los llamados antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas especies reactivas de oxígeno. Esto se consigue convirtiendo las especies reactivas de oxígeno en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas. En este grupo se destacan las siguientes enzimas (Katalinic et al., 2005)

Las glutatión peroxidadas (GPx), son dos enzimas selenio dependientes puesto que este las mantiene activas (Cemeli et al., 2009). Para que ejerzan su acción detoxificante por la reducción del  $H_2O_2$  o los ROOH. La glutatión peroxidasa (GPx) está ampliamente distribuida en los tejidos humanos y animales. Su forma reducida glutatión (GSH) dona electrones y se encuentra a concentraciones intracelulares a menudo en el rango milimolar. Las GPx son consideradas enzimas con la mayor capacidad de remover peróxidos encontrados en el tejido humano.

La catalasa participa en el metabolismo del  $H_2O_2$ , está presente en la mayoría de los órganos del cuerpo. Aunque su afinidad por el  $H_2O_2$  es inferior a la que muestra la GPx, bajo condiciones de sobreproducción puede asumir el papel preponderante en la eliminación del  $H_2O_2$ , ésta cataliza la reducción de  $H_2O_2$  a  $O_2$  y  $H_2O$ . A altas concentraciones de  $H_2O_2$ , la catalasa tiene la capacidad de reducirlo, puesto que la catalasa requiere dos moléculas de  $H_2O_2$  para llevar a cabo la su reducción; por el contrario, a bajas concentraciones de  $H_2O_2$  decrece su eficiencia (Cemeli et al., 2009).

Este grupo de antioxidantes primarios se completa con: el sistema de las tiorredoxinas, que incluye las tiorredoxinas y la tiorredoxina reductasa, las cuales soportan muchos procesos cruciales para la función celular, proliferación celular, defensa antioxidante y regulación redox (Arnér, 2009), las transferrinas, regulan la producción extracelular de hierro y así previenen la oxidación de los tejidos (Kim et al., 2008), la lactoferrina, la cual tiene la capacidad de capturar iones de hierro libre lo cual le confiere muchas propiedades de antioxidante (Mulder et al., 2008).

La ferritina, proteína que funciona capturando el hierro libre intracelular que puede convertirse en tóxico para la células (MacKenzie et al., 2008), la ceruloplasmina y las albúminas representan el antioxidante más predominante presente en el plasma, el cual está expuesto a estrés oxidativo continuo (Roche et al., 2008).

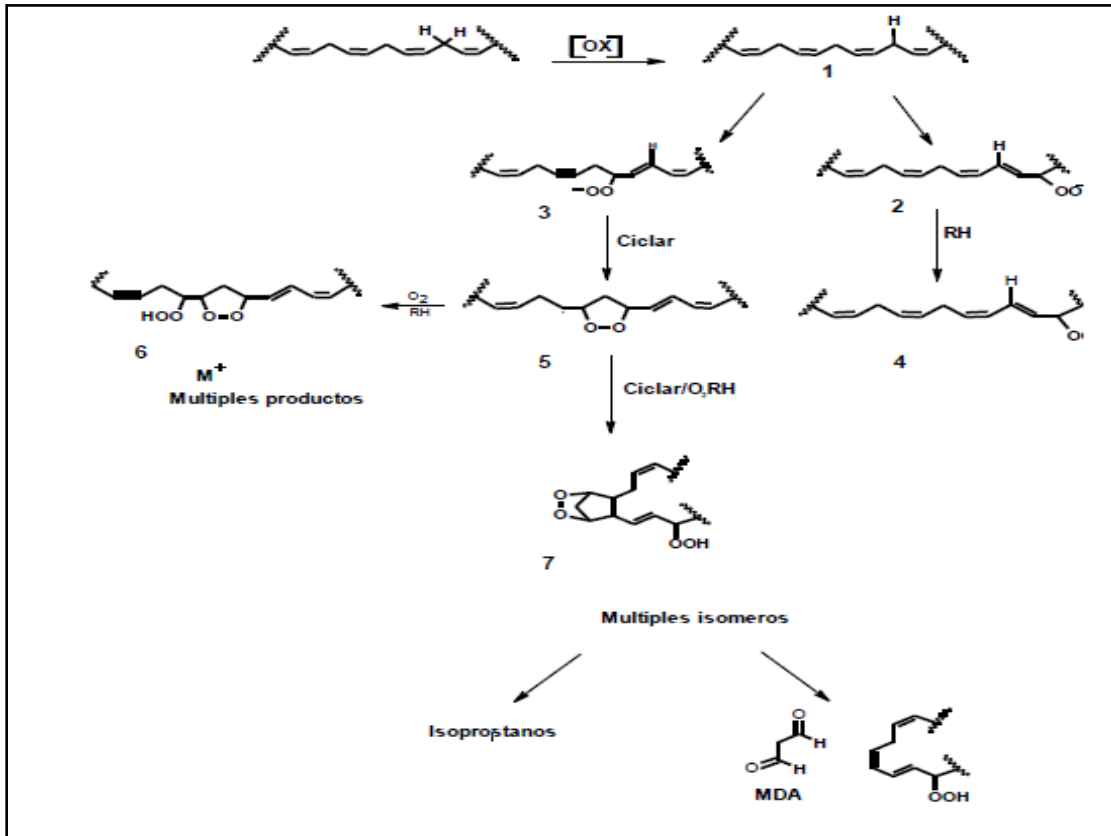


Imagen 1. Vías de peroxidación lipídica (Marnett 1999).

#### 4.3.2.2 Antioxidantes secundarios

Los antioxidantes secundarios capturan los radicales y evitan las reacciones en cadena. Ejemplos de ellos son la vitamina E y C,  $\beta$ -caroteno y sustancias endógenas con capacidad antioxidante, entre las cuales se encuentran glutatión urato, bilirrubina y ubiquinona, sus estructuras se muestran en la figura 5 (Doria et al., 2012).

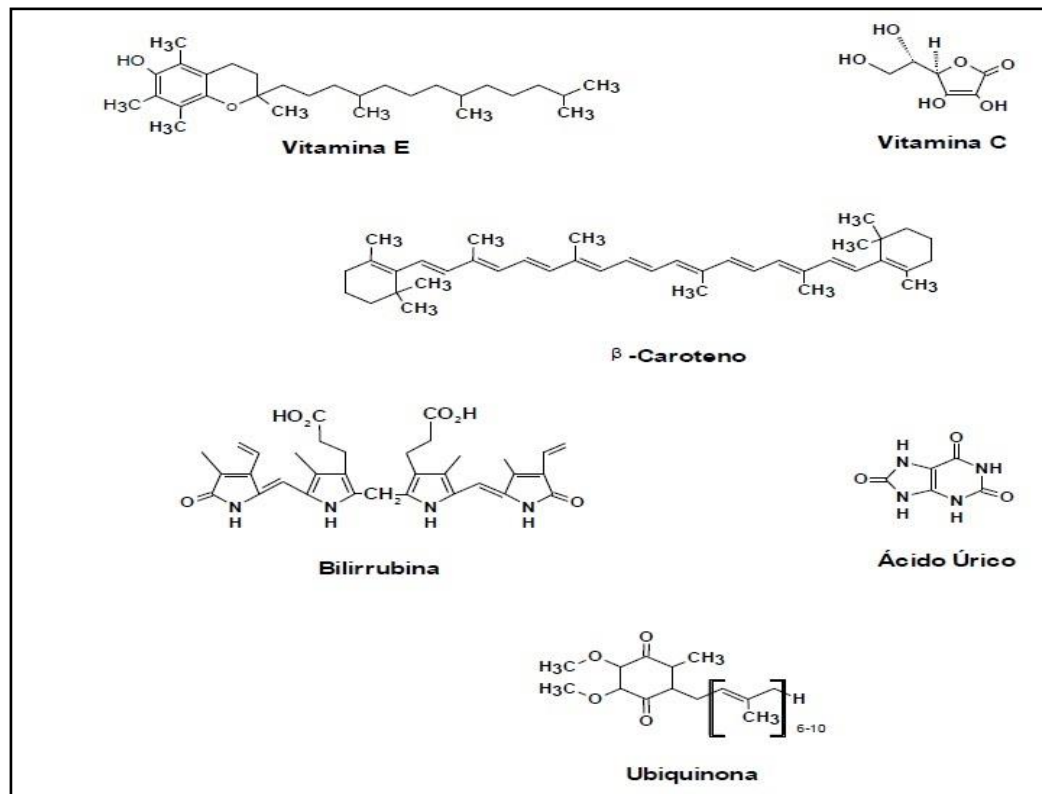


Imagen 2. Estructuras correspondientes a los antioxidantes secundarios de los mecanismos de defensa en el organismo humano. (Podsedeck, 2007)

La vitamina C, presenta muchas actividades biológicas en el cuerpo humano; se ha encontrado que esta puede reducir los niveles de proteína C-reactiva, un marcador de la inflamación y posiblemente un anunciador de enfermedades del corazón (Podsedeck et al., 2007).

La vitamina E pertenece a los antioxidantes liposolubles, su actividad biológica incluye tocoferoles, tocotrienoles, especialmente  $\alpha$ -tocoferol. La reacción predominante responsable de la actividad antioxidante del tocoferol es la donación de átomos de hidrógeno, donde se forma el radical tocoperoxil, como se muestra en la figura 6 (Podsedeck, et al., 2007).

#### 4.3.2.3 Antioxidantes terciarios

Son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas endonucleasa apurinica/apirimidínica y polimerasa  $\beta$ , reparadoras del ADN (Page et al., 2009) y la metionina sulfóxido redutasa.

Los antioxidantes juegan un papel importante previniendo o aliviando afecciones crónicas, incluyendo cáncer, alteraciones cardiovasculares, cataratas, arteriosclerosis, diabetes, asma, hepatitis, artritis e inmunodeficiencia (Siddhuraju et al., 2007). Estos reducen el daño oxidativo a los componentes celulares causados por las ERO. El uso de los antioxidantes sintéticos en productos alimenticios está bajo estricta regulación, debido a la incertidumbre sobre su seguridad. Por esta razón hay un interés creciente en los antioxidantes naturales para atenuar el daño oxidativo (Jaitak et al., 2010), puesto que estos antioxidantes derivados de plantas funcionan como captadores de oxígeno singlete y triplete, eliminadores de peróxidos e inhibidores de enzimas (Choi, 2002).

### 4.3.3 Clasificación de los antioxidantes

Con respecto al mecanismo de acción, los antioxidantes se pueden dividir en los siguientes siete grupos. (Tabla 2).

Tipo de antioxidante	Mecanismo de acción	Ejemplo de antioxidante
<b>Los antioxidantes que rompen las cadenas por reacción con radicales peroxilo</b>	Estos son compuestos reductores con relativamente enlaces O-H y enlaces N-H débiles, que reaccionan fácilmente con los radicales peroxilo para la formación de radicales intermedios de baja actividad.	Fenoles Naftoles Hidroquinonas Aminofenoles Diaminas
<b>Los antioxidantes que rompen las cadenas por reacción con radicales alquilo.</b>	Estos son compuestos, que aceptan fácilmente los radicales alquilo. Estos antioxidantes son eficaces en concentraciones muy bajas de di-oxígeno y en polímeros sólidos.	Quinonas Nitronas Radicales estables nitroxilo y nitrocompuestos carotenoides
<b>Antioxidantes que descomponen hidroperóxido.</b>	Estos son compuestos que reaccionan con hidroperóxidos sin la formación de radicales libres.	Sulfuros Fosfitos Carbamatos Algunos complejos de metales Proteínas Aminoácidos
<b>Antioxidantes que desactivan metales.</b>	Ligando compuestos metálicos a compuestos inactivos	Óxidos de hidroperóxidos Diaminas Hidroxiácidos
<b>Cadena cíclica, terminación por los antioxidantes.</b>	En otras palabras, la terminación de la cadena se produce como un proceso cíclico catalítico (los antioxidantes se regeneran en las reacciones de terminación de la cadena). La terminación de la cadena múltiple puede tener lugar, por ejemplo, en los polímeros.	aminas aromáticas, los radicales nitroxilo, y compuestos que poseen metales de valencia variable
<b>Los inhibidores de la</b>	Algunos antioxidantes pueden interactuar	Antraceno

<b>acción combinada.</b>	con los radicales R* y RO <sub>2</sub> *. Sin embargo, una molécula de inhibidor puede tener dos o más grupos funcionales, cada uno de los que puede someterse a su propia reacción.	Metilenequinona Carbonatos Tiofosfatos
<b>Sinergismo de varios antioxidantes.</b>	Cuando dos inhibidores mutuamente mejoran sus efectos inhibitorios, es una acción sinérgica.	Ácido cítrico Ácido ascórbico

Tabla 2. Mecanismos de acción de algunos antioxidantes (Fuente: Emanuel E. et al., 1996.).

## 4.4 Determinación de la actividad antioxidante

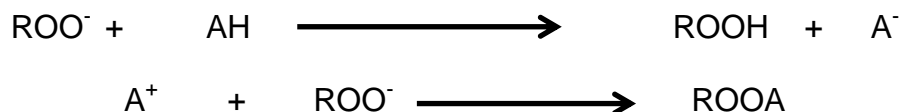
### 4.4.1 Medición de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado (Clarkson 1995), la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante.

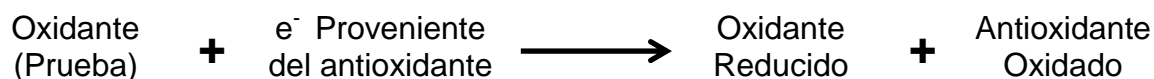
La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test in vitro para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presenten diferentes variaciones puede dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método y otro.

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

1. Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).



2. Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET).



Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción.



La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante.

Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Huang et al., 2005).

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes in vitro utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH\* es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS\*\* se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados.

ENSAYO	CATEGORIA
Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS**)	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*)	
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	
N,N- dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)	
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC.)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP).	
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico.	
Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL).	

Tabla 3. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT. (Fuente: Huang et al., 2005).

#### 4.4.2 Ensayo de decoloración del radical 1-1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH\*)

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH\* para aceptar un átomo de hidrógeno (H<sup>+</sup>) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH\*) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización

del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nanómetros. Cuando la solución de DPPH\* reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.

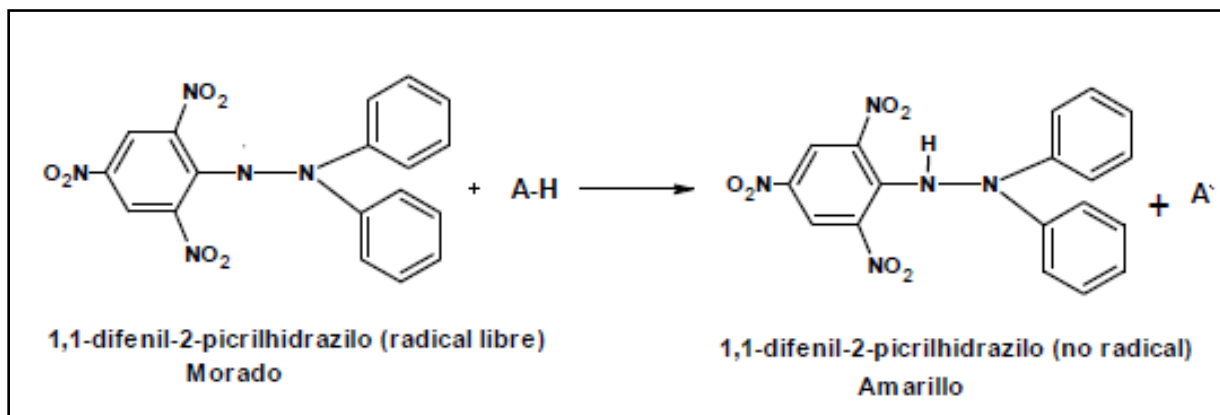


Imagen 3. Estructura del DPPH\* antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al., 2012)

Los resultados del ensayo DPPH\* se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria ( $IC_{50}$ ), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH\* al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor  $IC_{50}$  cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH\* usado (Deng et al. 2011).

El ensayo DPPH\* tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran:

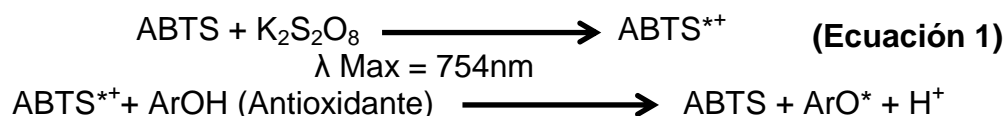
- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.
- DPPH\* es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH\*. Esto se evidencia en el tiempo necesario para determinar el  $IC_{50}$  que van en un rango de 1.15 min (ácido ascórbico) a 103 min (Rutina).

- La reacción cinética entre el DPPH\* y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH\*, por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC<sub>50</sub>.

#### 4.4.3 Ensayo de decoloración con el radical catiónico Acido 2,2'-Azino-bis-3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>)

Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio.

La generación del radical ABTS<sup>•+</sup> constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS<sup>•+</sup> estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re et al., 1998).



La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS<sup>•+</sup> implica la producción directa del cromóforo ABTS<sup>•+</sup> verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS<sup>•+</sup> está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

El radical ABTS<sup>•+</sup> es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los antocianos, reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. Además radical generado químicamente

(persulfato potásico), fue validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente.

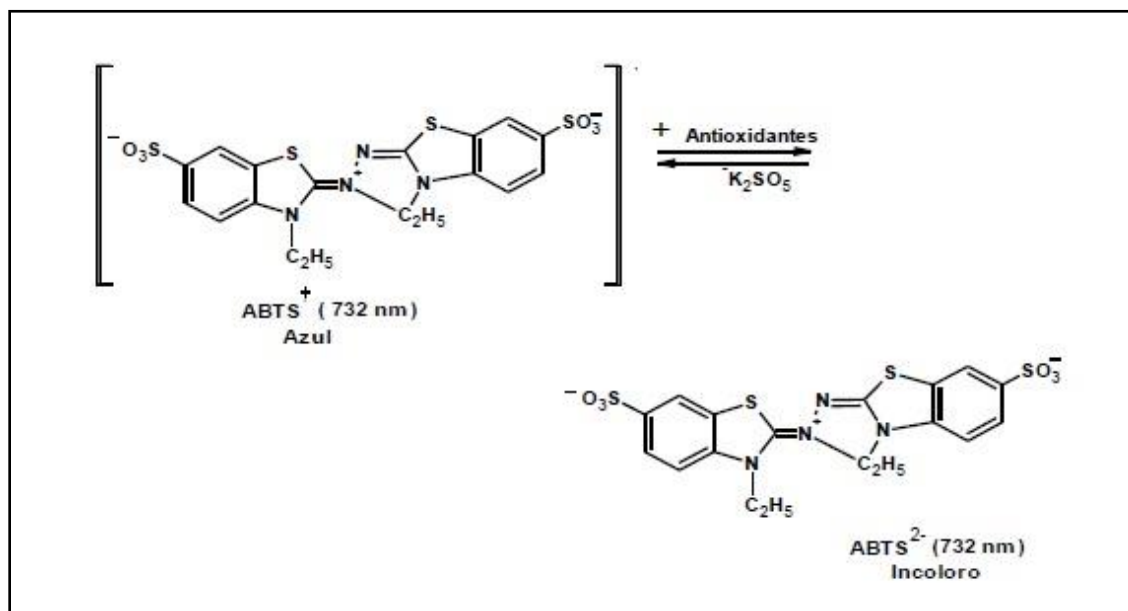


Imagen 4. Estructura del ABTS<sup>•+</sup> antes y después de la reacción con el antioxidante. (Zuleta et al., 2009).

La capacidad antioxidante se calcula como el porcentaje de captación DPPH\*, según la fórmula de (Yen and Duh. et al., 1994) (ecuación 2):

$$\frac{\% \text{ de captación DPPH}^*}{\% \text{ de captación ABTS}^{•+}} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde  $A_{\text{inicial}}$  es la absorbancia de control a tiempo 0 min y  $A_{\text{final}}$  es la absorbancia del antioxidante a tiempo 10 min. El % de captación DPPH\* es proporcional a la concentración de antioxidantes, y la concentración que provoca una disminución en la concentración inicial de DPPH\*. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo pueden reaccionar con lentitud o incluso puede ser inerte al DPPH\* debido al impedimento estérico.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, se basa en utilizar la metodología de recolección, extracción, fraccionamiento y determinación de la actividad antioxidante para cada uno de los anteriores.

## 5.1 Recolección del material vegetal

La recolección de la planta debe realizarse teniendo en cuenta el siguiente procedimiento (BILBAO, 1997):

- Debe anotarse la fecha, el hábitat donde se encontró y el estado (Ejemplo: en floración) de la planta.
- Se separa una muestra testigo que será enviada al Herbario para obtener el registro taxonómico y un código de la planta.
- La planta se divide en sus correspondientes partes (Flores, Hojas, Tallos, Raíces) y se deja secar a la sombra una temperatura promedio de 40°C, para que la planta retenga un contenido de humedad no mayor del 10%.
- El material vegetal se debe pasar por un molino limpio en el cual se va a obtener el material final con que se empieza a trabajar.

## 5.2 Extracción

Las técnicas de extracción más comunes son las de maceración, extracción Soxhlet y reflujo, con solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, etanol) y posterior concentración a presión reducida (Cannell R. 1998, Pasto D. et al. 1974).

La extracción sólido-líquido, es el método más utilizado para extraer productos naturales de sus fuentes, utilizando solventes que disuelvan el compuesto deseado, dejando los que sean insolubles con este solvente en la fuente natural.

Este proceso se maneja en un equipo denominado Soxhlet que comprende de un balón de destilación en donde se deposita el solvente que es calentado y evaporado para pasar por una conexión exterior al condensador, del cual cada gota que pasa por este cae a una cámara donde se encuentra el material sólido a extraer; ahí se va depositado el solvente que realiza el proceso de extracción. Cuando el solvente alcanza un nivel superior al de la válvula interior, genera un proceso de sifón que cae en el balón de destilación, allí se deposita el solvente a arrastra el material deseado. Este ciclo se repite varias veces hasta extraer todo el material necesario, que queda depositado en el balón de destilación (Ocampo C., et al. 2008).

Así, se puede determinar que las únicas desventajas de este proceso son la gran cantidad de solvente a utilizar y la lentitud de este, por lo cual se recomienda

contar con un sistema de refrigeración continua para mantener estable el sistema (Sogorbs, et al. 2004).

### 5.3 Fraccionamiento

Los métodos más utilizados para la separación de metabolitos secundarios de una fuente natural, se ven desarrollado en técnicas cromatográficas, descritas como la separación de los componentes de una mezcla, que se encuentran en dos fases, que pueden ser estacionarios o móviles. Los estacionarios pueden ser en columnas, capas finas o películas delgadas sobre algún “soporte cromatográfico”; y la fase móvil puede ser líquida o gaseosa (Anaya L, 2004).

### 5.4 Instrumentos utilizados

#### 5.4.1 Evaporador rotativo

Equipo de destilación JANKE & KUNKEL RV 06 - ML, para concentrar a baja temperatura y presión.

#### 5.4.2 Espectrofotómetro UV/VIS.

Los espectros UV se realizaron en un espectrofotómetro Spectronics 21D 6405 UV/VIS, con celdas de volumen reducido 1.5 mL.

### 5.5 Reactivos y solventes

Todos los solventes fueron grado reactivo de Merck, los compuestos patrón para determinar la actividad antioxidante fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y AcrÕs organic, tales como:

<b>SOLVENTES Y REACTIVOS</b>	<b>USO</b>
Éter de Petróleo.	Extracción y fraccionamiento de material vegetal.
Diclorometano.	Extracción y fraccionamiento de material vegetal.
Acetato de Etilo.	Extracción y fraccionamiento de material vegetal.
Etanol (Alcohol Etilico).	Extracción de material vegetal.
Metanol (Alcohol Metílico).	Fraccionamiento de material vegetal, ejecución de métodos de actividad antioxidante.
Ácido 2,2'- azino-bis-(3-etiltiazolina-	Ejecución de métodos de actividad

bencenosulfónico-6) (ABTS <sup>•+</sup> ).	antioxidante.
2,2-difenil- 1–picrilhidracilo (DPPH*).	Ejecución de métodos de actividad antioxidante.
Ácido-6-hidroxi-2 ,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX C).	Ejecución de métodos de actividad antioxidante.
Ácido ascórbico (Vitamina C).	Ejecución de métodos de actividad antioxidante.
Persulfato de potasio.	Ejecución de métodos de actividad antioxidante.
Rutina (quercetin-3-rutinósido ) (fuente patrón de laboratorio)	Ejecución de métodos de actividad antioxidante.

Tabla 4. Solventes y reactivos. (Fuente: Autor)



Imagen 5. Trolox de AcrOs Organics (Fuente: Autor).



Imagen 6. ABTS de Sigma-Aldrich (Fuente: Autor).

## 6 PARTE EXPERIMENTAL

La realización de la presente investigación comprendió varias etapas: recolección del material vegetal, obtención de extractos y fracciones de diferente polaridad partiendo del material vegetal previamente identificado, determinación de la actividad antioxidante por decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH\*) y decoloración del radical Acido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico (ABTS<sup>•+</sup>)

### 6.1 Recolección del material vegetal

Se recolectó el material vegetal a orillas de la carretera en el kilómetro 21 en la vía que conduce al municipio de Ráquira, departamento de Boyacá, en las coordenadas 5°34'8"N, 73°40'20"O, tomando la planta completa en estado de floración, una muestra testigo fue enviada al Herbario Nacional de Colombia para su identificación taxonómica, donde fue clasificada como *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson., con numero Col 498196.

Se secaron y molieron las hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson obteniéndose 652 g, que fueron sometidos a extracción.



Imagen 7. *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, recolectada el municipio de Tinjaca (Boyacá). (Fuente: Autor).

## **6.2 Obtención de los extractos de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol, fracción petrol, fracción diclorometano, fracción acetato de etilo y fracción metanólica de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.**

Los extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, fueron obtenidos en los laboratorios de la facultad de Ingeniería Ambiental de la universidad El Bosque, bajo la supervisión del grupo de investigación de productos naturales PRONAUDCA, de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

### **6.2.1 Extracción**

El proceso de extracción se realizó a partir del material previamente secado y molido. Teniendo una cantidad inicial de 652 g de hojas secas y molidas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, este material vegetal se ingresó al equipo Soxhlet, donde se realizó la extracción Sólido- Líquido, durante 8 días, a temperatura de ebullición según el solvente (Éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol), al completar los ciclos correspondientes de este proceso, se pasan los extractos a concentrar en el rotaevaporador a una presión de 200 mbar, temperatura de 60°C y una revolución de 60rpm, donde se recuperó el solvente y se obtuvo el extracto deseado.



Los porcentajes de rendimiento de los extractos por cada solvente se relacionan en la siguiente tabla:

Parte aérea	Extracto	Peso Final (Gramos)	%Rendimiento extracto
Hojas	Éter de petróleo	37.453	5.74
	Diclorometano	29.352	4.50
	Acetato de etilo	36.913	5.66
	Etanol	42.856	6.57

Tabla 5. Cantidad obtenida de extracto por cada Solvente. (Fuente: Autor).

Los extractos se concentraron a presión reducida y se obtuvo su peso seco y para determinar el rendimiento se aplicó la fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento extracto} = \frac{\text{Peso final extracto concentrado}}{\text{Masa Total del material vegetal}} * 100 \quad \text{(Ecuación 3)}$$



Imagen 8. Equipo Soxhlet para la extracción de las hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson (Fuente: Autor).



Imagen 9. Rotaevaporador donde se concentran los diferentes extractos de las hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson (Fuente: Autor).

### 6.2.2 Fraccionamiento de los extractos

De los extractos obtenidos de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y Etanol, se realizó una extracción sólido-líquido para su fraccionamiento, utilizando extracción tipo Soxhlet con cartucho, a una temperatura de ebullición según el solvente durante 3 días, como fase estacionaria se empleó sílica gel 60 (MN Kiesel gel 60 0,063 0.2 mm/70 –230 mest ASTM), que homogenizó con los extractos, este fraccionamiento se realizó con solventes de diferente polaridad (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol), estas fueron concentradas en el rotaevaporador.



Imagen 10. Equipo para la Extracción sólido-Líquido con cartucho para el fraccionamiento de los extractos hojas *Ch.perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).



Imagen 11. Extracto en el cartucho para el fraccionamiento. (Fuente: Autor).

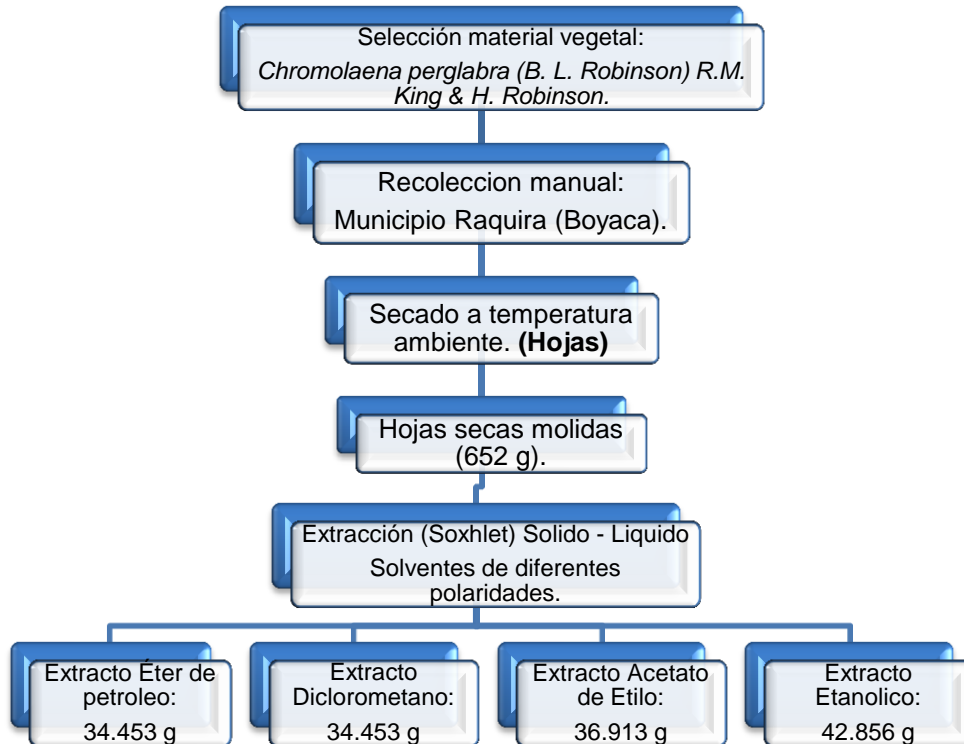


Diagrama 1. Diagrama de trabajo para el estudio fitoquímico de hojas *Ch.perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.

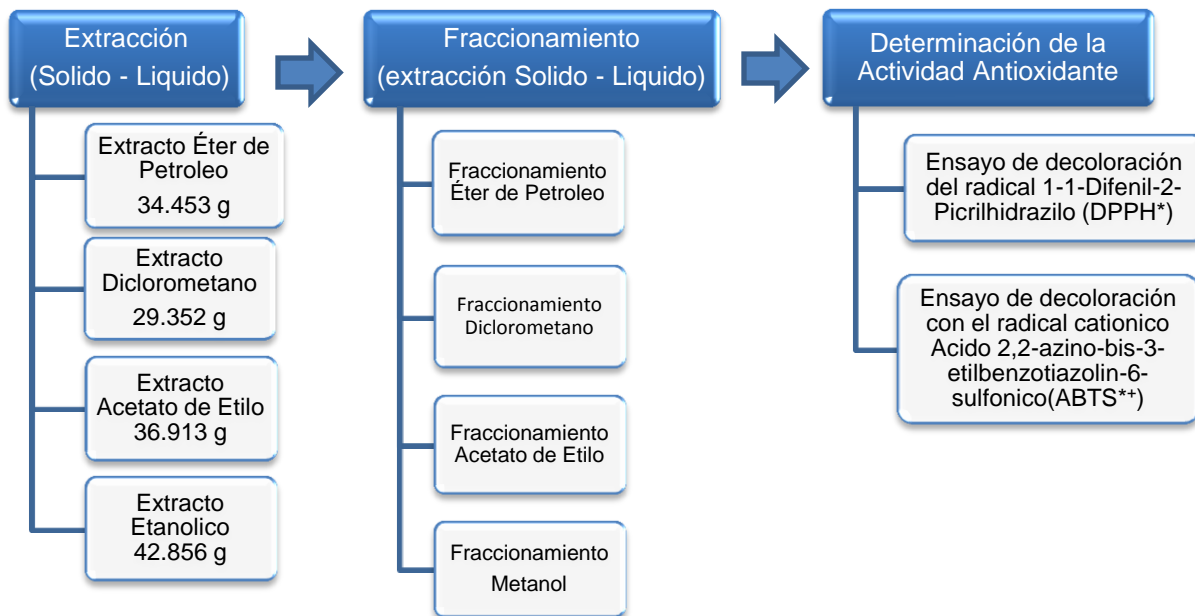


Diagrama 2. Descripción del proceso para obtención de fracciones de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.

### 6.3 Determinación de actividad antioxidante de los diferentes extractos y fracciones obtenidos

Los extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson obtenidos, se determinó su actividad antioxidante por el método de decoloración con el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> (Ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y por el ensayo de decoloración de radicales DPPH<sup>\*</sup> (método del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).

Las pruebas de actividad antioxidante se realizaron según el método propuesto por (RE, R. et al. 1999), empleando la capacidad antioxidante del Trolox sobre el generador de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> y su habilidad de secuestrar radicales de larga vida, el cual se basa en la decoloración del compuesto nitrogenado DPPH<sup>\*</sup>.

#### 6.3.1 Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH<sup>\*</sup>)

##### 6.3.1.1 Preparación de soluciones patrón

Para la preparación del radical DPPH<sup>\*</sup>: Se disolvieron 2 mg de DPPH<sup>\*</sup> Sigma-Aldrich, en 100 mL de metanol grado reactivo, la solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas en la oscuridad. Posteriormente fueron

preparadas soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de  $0.750 \pm 0.050$  para todos los casos, a una longitud de onda de 517 nanómetros.

Para la preparación del ácido ascórbico, se preparó una solución stock de 250 miligramos por litro de Metanol disolviendo 25 mg de ácido ascórbico, en 100mL de metanol, luego se prepararon diluciones de concentraciones de 25, 12.5, 6.25, 0.625 y 0.0625 miligramos por litro de metanol con el fin de realizar la curva de referencia.

Preparación de rutina, Se preparó una solución stock 250 miligramos por litro de metanol disolviendo 25 mg de rutina, en 100 mL de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 25 miligramos/Litro de MeOH y 0.625 miligramos/Litro de MeOH, con el fin de realizar la curva de referencia.

### **6.3.1.2 Preparación de la curva de referencia**

A 600  $\mu$ L del radical DPPH\* se le adicionaron 200  $\mu$ L de cada una de las diluciones de ácido ascórbico y de rutina; la medición se realizó a 517 nm, y el porcentaje de captación se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Captación DPPH} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

El porcentaje de captación representa la pérdida del color purpura a amarillo del radical DPPH\*, cuando le es agregado un compuesto antioxidante, disminuyendo así la absorbancia de la solución, que es medida a 517 nm; la absorbancia inicial se toma en el minuto cero sin adición del antioxidante referencia, la toma de datos de absorbancia se realiza cada 30 segundos durante 10 minutos después de agregar el antioxidante de referencia.

### **6.3.1.3 Medición de la actividad antioxidante de los extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson**

En una celda de plástico de volumen reducido se agregaron 600 $\mu$ L del radical DPPH\*, se midió la absorbancia inicial a 517 nm, luego se adicionaron 200 $\mu$ L de cada uno de los extracto y las fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson y nuevamente, se midió la absorbancia cada 30 segundos durante 10 minutos, midiendo la absorbancia final a la misma longitud de onda a los 10 minutos después.

Para realizar la evaluación de la actividad antioxidante de cada una de las fracciones y extractos de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, se determinó:

Preparar por cada extracto, y por cada una de las fracciones soluciones stock, a una concentración de 250 miligramos por litro de metanol. De cada muestra se realizaron diluciones de 125, 62.5, 25, 12.5 y 6.25 miligramos por litro de metanol para poder determinar las concentraciones necesarias para obtener porcentajes de captación del 10% al 95%.

Se procede a medir la absorbancia del DPPH\* (solo), la cual se conoce como absorbancia inicial, luego se procedió a realizar la mezcla entre el DPPH\* y el extracto o la fracción, sobre la cual se realizó la evaluación de la capacidad antioxidante.

Por último se mide la absorbancia cada 30 segundos por 10 minutos de la mezcla del DPPH\* y de los extractos, del DPPH\* y las fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.

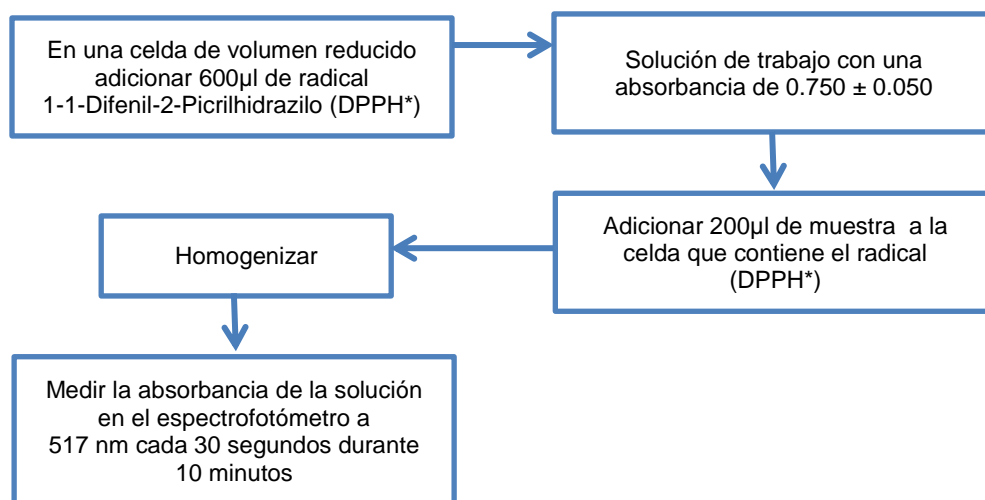


Diagrama 3. Descripción del proceso para la determinación de la actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson por el ensayo de decoloración del radical (DPPH\*).

### 6.3.2 Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>)

#### 6.3.2.1 Preparación de soluciones patrón

En la Preparación del radical ABTS<sup>•+</sup>, Se disolvieron 50 mg de (ABTS) la sal diamónica del 2,2-Azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) de Sigma-Aldrich, en 50 mL de agua desionizada, luego se adicionaron 2,45 mg de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), la solución se dejó reaccionar a una temperatura de 3°C durante 48 horas en la oscuridad (**Imagen 13**). Posteriormente fueron preparadas

soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de  $0.750 \pm 0.050$  para todos los casos, a una longitud de onda de 754 nanómetros.

Para el trolox: Se preparó una solución stock 250 miligramos por litro de metanol disolviendo 25 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97% (trolox) de ACRÕS ORGANIC, en 100 mL de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 0.0625 y 125 miligramos por litro de metanol, con el fin de realizar la curva de referencia.

Preparación de rutina, Se preparó una solución stock 250 miligramos por litro de metanol disolviendo 25 mg de rutina, en 100 mL de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 125 a 0.0625 miligramos por litro de metanol, con el fin de realizar la curva de referencia.

Preparación de ácido ascórbico, se preparó una solución stock 250 miligramos por litro de metanol disolviendo 25 mg de ácido ascórbico (Vitamina C), en 100 mL de metanol, luego se prepararon diluciones de 250, 125, 62.5, 25, 12.5 y 6.25 miligramos por litro de metanol, con el fin de realizar la curva de referencia.

### **6.3.2.2 Preparación de la curva de referencia**

A 600  $\mu$ L del radical ABTS<sup>\*\*</sup> se le adicionaron 200  $\mu$ L de cada una de las diluciones de trolox, ácido ascórbico y rutina; la medición se realizó a 754 nanómetros, y el porcentaje de captación se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de captación de ABTS} = \frac{A \text{ inicial} - A \text{ final}}{A \text{ inicial}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

El porcentaje de captación representa la pérdida del color azul-verde del radical ABTS<sup>\*\*</sup>, cuando le es agregado un compuesto antioxidante, disminuyendo así la absorbancia de la solución, que es medida a 754 nm; la absorbancia inicial se toma en el minuto cero sin adición de trolox, la absorbancia final se toma 10 minutos después de agregar el trolox, el ácido ascórbico o la rutina.

### **6.3.2.3 Medición de la actividad antioxidante de los extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson**

En una celda de plástico con volumen reducido se agregaron 600  $\mu$ L del radical ABTS<sup>\*\*</sup>, se midió la absorbancia a 754 nm, luego se adicionaron 200  $\mu$ L del extracto o de la fracción de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, y nuevamente se midió la absorbancia final a la misma longitud de onda

10 minutos después. Para realizar la evaluación de la actividad antioxidante de cada uno de los extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, se determinó:

Preparar los extractos y las fracciones en una concentración de 250 miligramos por litro de metanol. De cada extracto y fracciones se realizaron diluciones en un rango de 250 a 6,25 miligramos por litro de metanol, para poder determinar las concentraciones necesarias para obtener porcentajes de captación del 10% al 95%.

Se procede a medir la absorbancia del  $ABTS^{*+}$ , la cual se conoce como absorbancia inicial. Después se procedió a realizar la mezcla entre el  $ABTS^{*+}$  y el extracto o fracción, sobre la cual se realizó la evaluación de la capacidad antioxidante. Las absorbancias de la mezcla del  $ABTS^{*+}$  y el extracto de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, se midieron cada 30 segundos durante 10 minutos.



Imagen 12. Fotografía, generación del radical  $ABTS^{*+}$ , en solución sin adición del generador de radicales (Fuente: Autor).



Imagen 13. El radical  $ABTS^{*+}$  generado químicamente con persulfato de potasio después de un periodo de 48 horas en la oscuridad. (Fuente: Autor).

## 7 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS Y FRACCIONES

### 7.1 Ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH\*)

La actividad antioxidante de decoloración del radical DPPH\* se determinó de acuerdo a los parámetros establecidos en el numeral 6.3.1

### 7.1.1 Preparación de la curva de referencia

Para realizar la curva de referencia se prepararon soluciones de ácido ascórbico (Vitamina C) y Rutina en concentraciones de 0.0625, 0.625, 6.25, 12.5 y 25 miligramos por litro de metanol respectivamente, se realizó la medición del porcentaje de captación de DPPH\* empleando la ecuación 2. Los resultados de la medición del porcentaje de captación de DPPH\* se encuentran en la tabla 4 y 5.

Concentración mg/ L MeOH	Log Concentración	A inicial	A final	% de captación de DPPH*
0,625	- 0,20	0,819	0,628	23,32
6,25	0,8	0,840	0,126	85,00
12,5	1,10	0,846	0,081	90,43

Tabla 6. Porcentaje de Captación del radical DPPH\* empleando Ácido ascórbico. (Fuente: Autor)

Partiendo de los datos obtenidos del porcentaje de captación del radical DPPH\* causado por el ácido ascórbico, se construyó una curva de referencia (**Grafica 1**) que permite verificar la dependencia lineal del porcentaje de captación del radical Vs la concentración del ácido ascórbico obteniéndose un  $R^2$  de 0,977, el cual nos permite calcular el porcentaje de concentración efectiva 50 ( $IC_{50}$ ) por medio de la ecuación de la gráfica 1.

Concentración mg/ L MeOH	Log Concentración	A inicial	A final	% de captación de DPPH**
0,0625	- 1.20	0,793	0,732	7,69
0,625	- 0,20	0,794	0,561	29,34
6,25	0,8	0,796	0,392	50,75
12,5	1,10	0,791	0,330	58,28

Tabla 7. Porcentaje de captación del radical DPPH\* empleando Rutina (Fuente: Autor).

Al igual que con el ácido ascórbico se realizó la curva de referencia con la Rutina, siguiendo los datos de la tabla 7, y se realizó la curva de referencia (**Grafica 2**) que permite verificar la dependencia lineal del porcentaje de captación del radical Vs la concentración de la rutina en miligramos por litro de metanol, obteniéndose un  $R^2$  de 0,9997.

### 7.1.2 Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ )

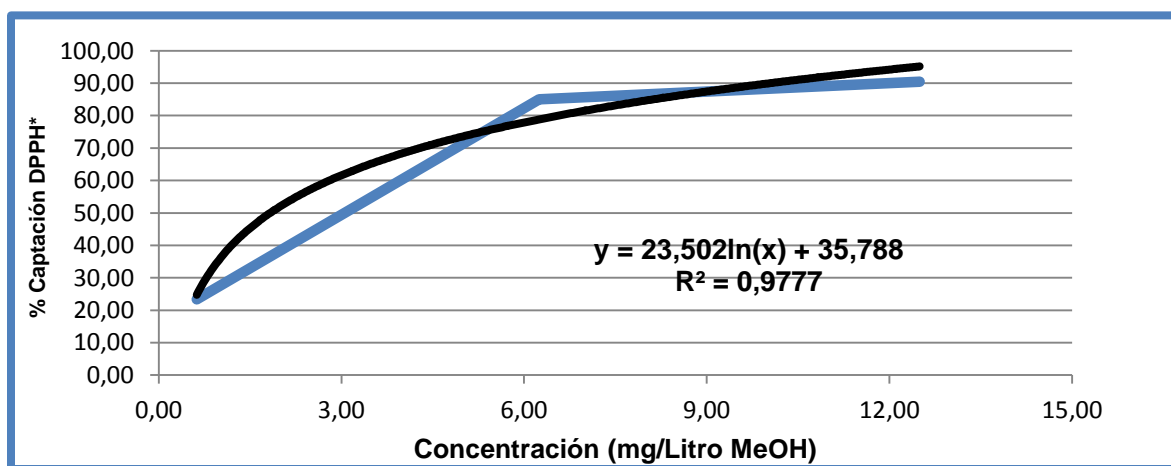
El coeficiente de Inhibición ( $IC_{50}$ ) se calcula con la ecuación de la recta, la cual se obtiene de la curva de referencia de cada patrón analizado (ácido ascórbico y Rutina) para el método de decoloración del radical DPPH\*. Para el método de decoloración del radical ABTS\*\* se utilizaron ácido ascórbico, rutina y trolox. Para



calcular el IC<sub>50</sub> se sustituye (y) por 50, y así calculamos la concentración, o mediante un análisis de regresión del porcentaje de captación de DPPH\* o porcentaje de inhibición del radical ABTS\*\*+, versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical DPPH\*, o ABTS\*\*+ (Brand-Williams et al. 1996).

### 7.1.2.1 IC<sub>50</sub> Ácido ascórbico

Según la gráfica 1 la curva de referencia del ácido ascórbico da una ecuación:  $y = 23,502\ln(x) + 35,788$  y un  $R^2 = 0,9777$ .



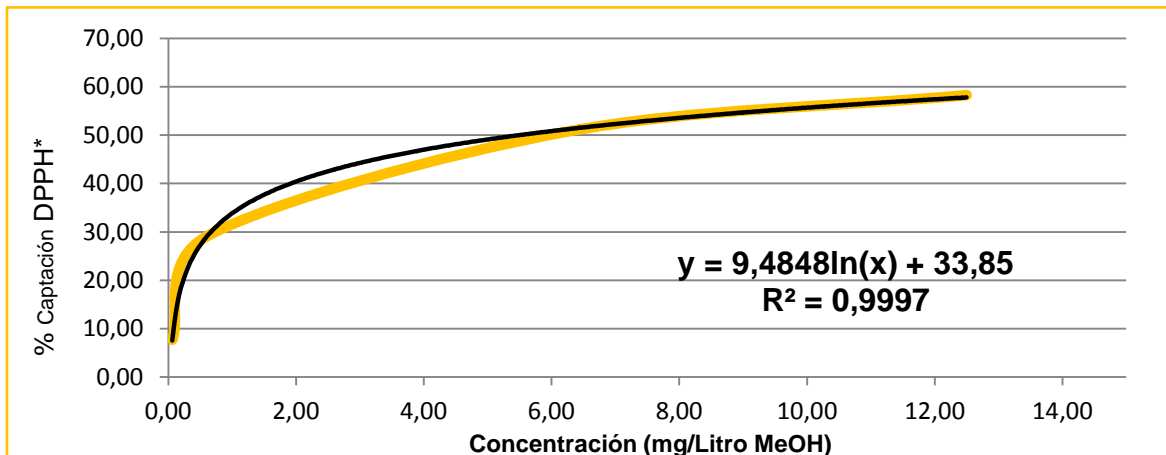
Gráfica 1. Curva de referencia del porcentaje de captación de DPPH\* v/s concentración de ácido ascórbico. (Fuente: Autor).

$e^x = \frac{50-35,788}{25,502}$  Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado obtenido para el ácido ascórbico es de 1.83 miligramos por litro de metanol.

### 7.1.2.2 IC<sub>50</sub> RUTINA

La curva de referencia de la rutina (**Gráfica 2**), da una ecuación:  $y = 9,4848\ln(x) - 33,85$  y un  $R^2 = 0,9289$ .

$e^x = \frac{50-33,85}{9,4848}$  Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado obtenido para obtener la concentración de rutina es: 5,49 miligramos por litro de metanol.



Gráfica 2. Curva de referencia del porcentaje de captación de DPPH\* v/s concentración de Rutina. (Fuente: Autor).

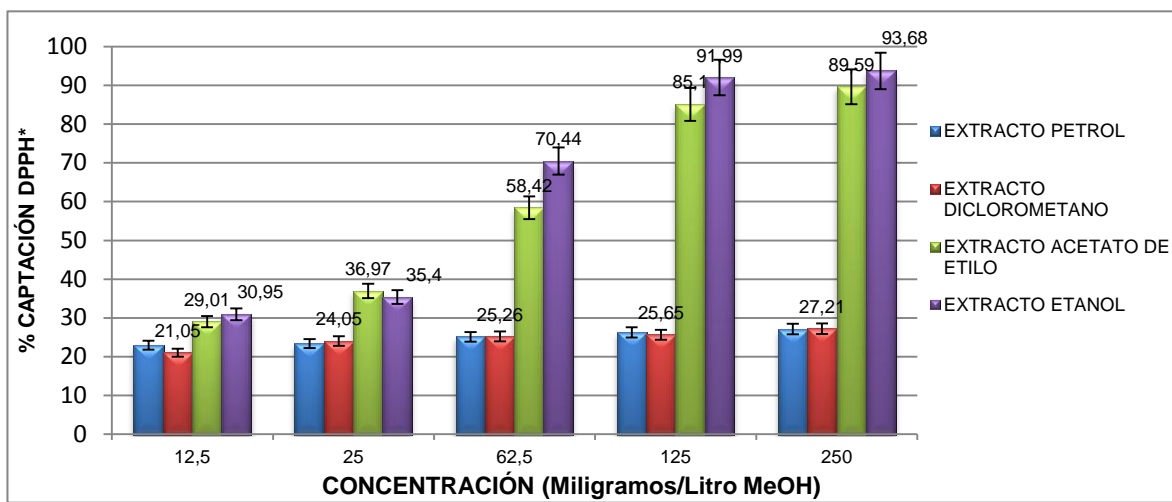
### 7.1.3 Actividad antioxidante de los extractos de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.

La actividad antioxidante fue evaluada para los extractos obtenidos de los solventes de diferentes polaridades (Éter de Petróleo, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol), en diferentes concentraciones (12,5, 25, 62,5, 125 y 250 miligramos por litro MeOH), mediante la aplicación del método decoloración del radical DPPH\*. Para éste método observamos que hay tendencia de mayor actividad antioxidante a medida que aumenta la concentración en las soluciones de trabajo de los extractos.

Concentración mg/ L MeOH	Hojas de <i>Ch. Perglabra</i> . Extracto Petrol		Hojas de <i>Ch. Perglabra</i> . Extracto Diclorometano		Hojas de <i>Ch. Perglabra</i> . Extracto Acetato de Etilo		Hojas de <i>Ch. Perglabra</i> . Extracto Etanol	
	Valor	+/-	Valor	+/-	Valor	+/-	Valor	+/-
12.5	23,01	+/- 0,090	21,05	+/- 0,080	29,01	+/- 0,111	30,95	+/- 0,121
25	23,39	+/- 0,091	24,05	+/- 0,095	36,97	+/- 0,1441	35,40	+/- 0,137
62.5	25,13	+/- 0,096	25,26	+/- 0,097	58,42	+/- 0,226	70,44	+/- 0,274
125	26,29	+/- 0,102	25,65	+/- 0,099	85,10	+/- 0,329	91,99	+/- 0,356
250	27,11	+/- 0,103	27,21	+/- 0,105	89,59	+/- 0,349	93,68	+/- 0,336

Tabla 8. Porcentaje de Captación de DPPH\* en extractos de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).

Los extractos de Acetato de Etilo y Etanol de las hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson (**Grafica 3**), presentaron comportamiento similar a diferencia de los extractos de diclorometano y éter de petróleo, los cuales presentaron menor variación en la absorbancia, lo que se traduce en porcentaje de captación de DPPH\* (**Tabla 8**).



Gráfica 3. Comparación de los extractos de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el método decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).

#### 7.1.4 Actividad antioxidante de las fracciones de los extractos de éter de petróleo , diclorometano, acetato de etilo y etanol de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson

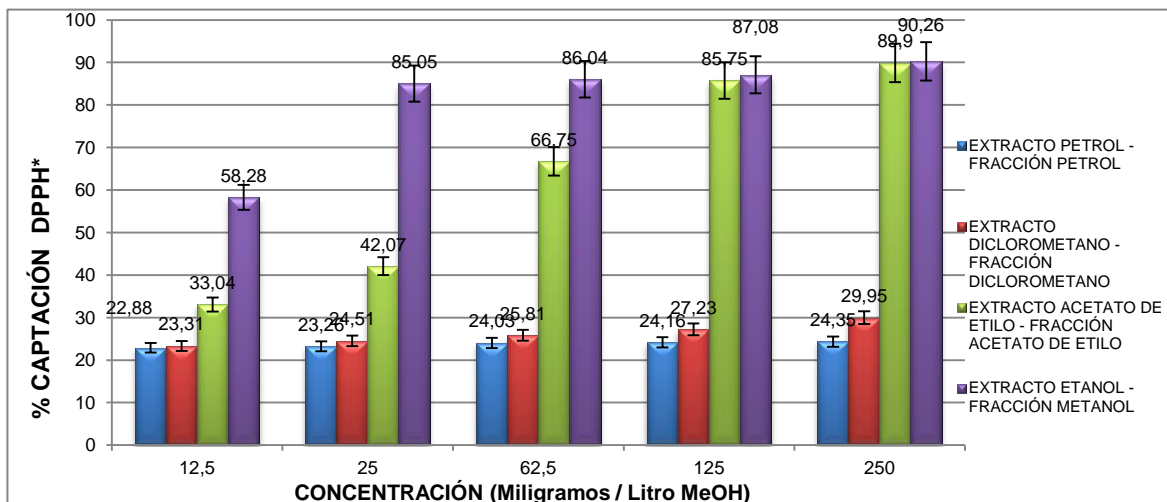
De igual forma como en los extractos de hojas de *Ch. Perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, la fracción de éter de petróleo en el extracto de éter de petróleo, presenta menor porcentaje de captación de radicales en todas las concentraciones evaluadas. La fracción metanólica del extracto etanólico presenta los mayores porcentajes de captación evidenciándose buena actividad antioxidante para esta fracción como se demuestra en la tabla 9.

Concentración mg/ L MeOH	Extracto Petrol Fracción Petrol		Extracto Diclorometano Fracción Diclorometano		Extracto Acetato de Etilo Fracción Acetato de Etilo		Extracto Etanol Fracción Metanol	
	Valor	+/-	Valor	+/-	Valor	+/-	Valor	+/-
12,5	22,88	+/- 0,089	23,31	+/- 0,097	33,04	+/- 0,130	58,28	+/- 0,231
25	23,26	+/- 0,091	24,51	+/- 0,101	42,07	+/- 0,167	85,05	+/- 0,350
62,5	24,03	+/- 0,093	25,81	+/- 0,104	66,75	+/- 0,263	86,04	+/- 0,358
125	24,16	+/- 0,094	27,23	+/- 0,107	85,75	+/- 0,340	87,08	+/- 0,361
250	24,35	+/- 0,094	29,95	+/- 0,141	89,90	+/- 0,352	90,26	+/- 0,385

Tabla 9. Porcentaje de Captación de DPPH\* en Fracciones de los extracto de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).

La actividad antioxidante fue evaluada para las fracciones obtenidas de los extractos de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, a las concentraciones de 12.5, 25, 62.5, 125 y 250 miligramos por litro de metanol, con la aplicación del método decoloración del radical DPPH\*, observando que en los

solventes de menor polaridad a cualquier concentración los porcentajes de captación no superan el 30%.



Gráfica 4. Comparación del porcentaje de captación del radical DPPH\* de las fracciones de los diferentes extractos de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).

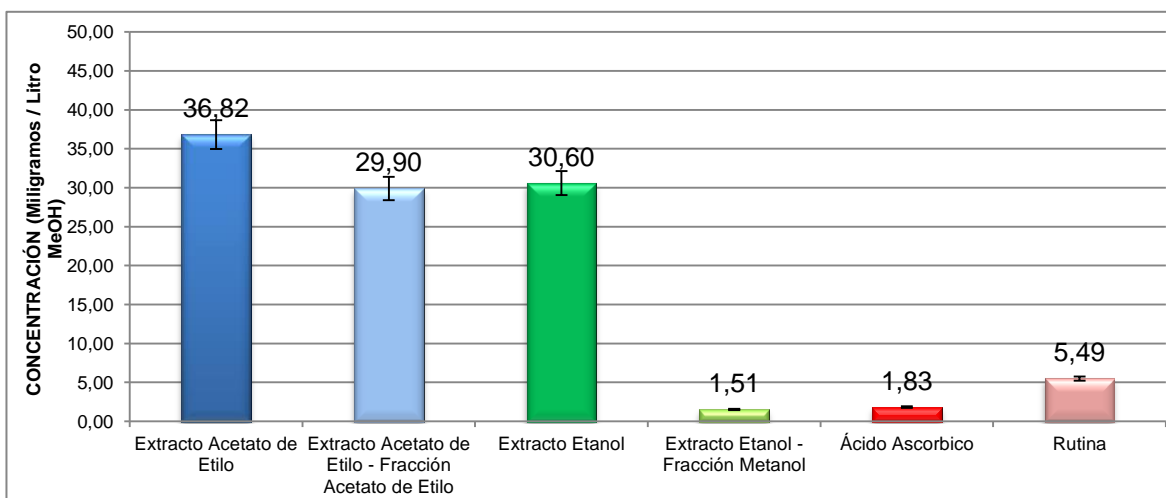
### 7.1.5 Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC<sub>50</sub>) de extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH\*)

Con base en las curvas de concentración vs porcentaje de captación obtenidos de los extracto y las fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, se obtuvieron las ecuaciones de las curvas, las cuales se utilizaron para calcular el IC<sub>50</sub> de cada uno de los mencionados. En la tabla 10 se observa los IC<sub>50</sub> para las fracciones y los extractos evaluados, evidenciándose que los extractos y fracciones con solventes de mayor polaridad mostraron mejor concentración inhibitoria 50 evidenciándose que el la fracción metanolica del extracto etanolico tiene mayor IC<sub>50</sub> para este método.

Extracto o Fracción	IC <sub>50</sub> (mg / L MeOH)
Extracto Acetato de etilo	36,82
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	29,90
Extracto Etanol	30,60
Extracto Etanol – Fracción Metanol	1,51

Tabla 10. IC<sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).

Se comparó los resultados obtenidos con el IC<sub>50</sub> del ácido ascórbico (1.83 miligramos por litro de MeOH) y la Rutina (5.49.miligramos por litro de MeOH), observándose que la fracción metanol del extracto etanolico de hojas *Ch. perglabra* (*B. L. Robinson*) *R.M. King & H. Robinson*, mostro mejor concentración inhibitoria IC<sub>50</sub> para este método en 1.51 miligramos por litro de MeOH.



Gráfica 5. Comparación IC<sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (*B. L. Robinson*) *R.M. King & H. Robinson*, calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).

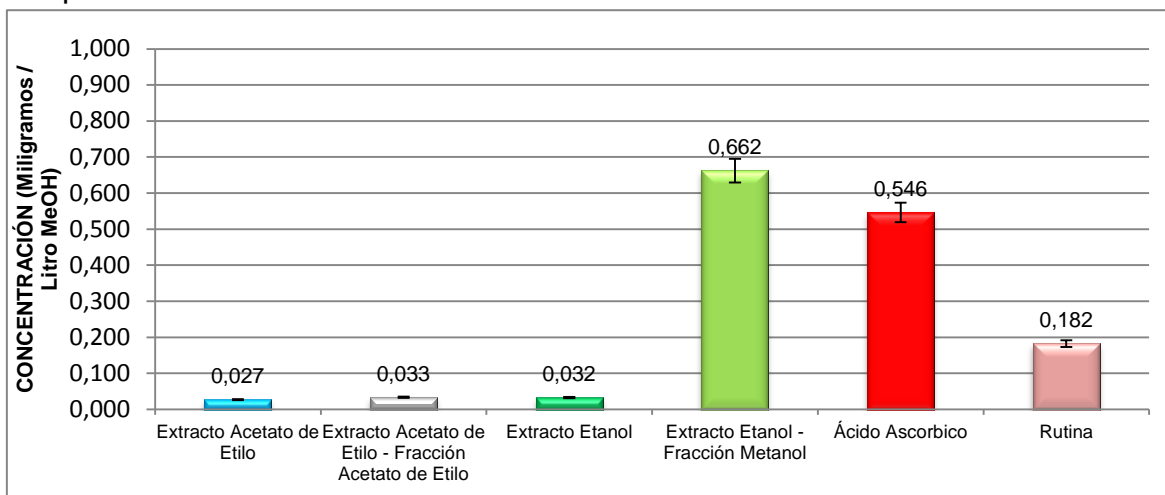
### 71.6 Capacidad antioxidante de extractos fracciones de hojas *Ch. perglabra* (*B. L. Robinson*) *R.M. King & H. Robinson*, por el ensayo de DPPH\*

La capacidad antioxidante significa la captación que tiene un miligramo por litro de metanol para atrapar radicales libres, para este ensayo se evidencia que la mayor capacidad antioxidante la presenta la fracción metanolica del extracto etanolico con 0.66 miligramos por litro de metanol, es mayor que la del ácido ascórbico que es 0.54 miligramos por litro de metanol.

Extracto o Fracción	Capacidad antioxidante (mg / L MeOH)
Extracto Acetato de etilo	0,027
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	0,033
Extracto Etanol	0,033
Extracto Etanol – Fracción Metanol	0,662

Tabla 11. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (*B. L. Robinson*) *R.M. King & H. Robinson*, calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).

En la gráfica 6 observamos que los extractos acetato de etilo y etanolico la capacidad antioxidante no varía mucho, evidenciándose que la fracción metanólica del extracto de etanol tiene una excelente capacidad antioxidante respecto a los dos patrones.



Gráfica 6. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).

### 7.1.7 Actividad antioxidante relativa (AAR)

La actividad antioxidante relativa (AAR), de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, para el método de decoloración del radical DPPH\*, se calculó con la ecuación 4.

$$AAR = \frac{IC_{50} \text{ Muestra Analizada}}{IC_{50} \text{ Muestra Patron}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.}$$

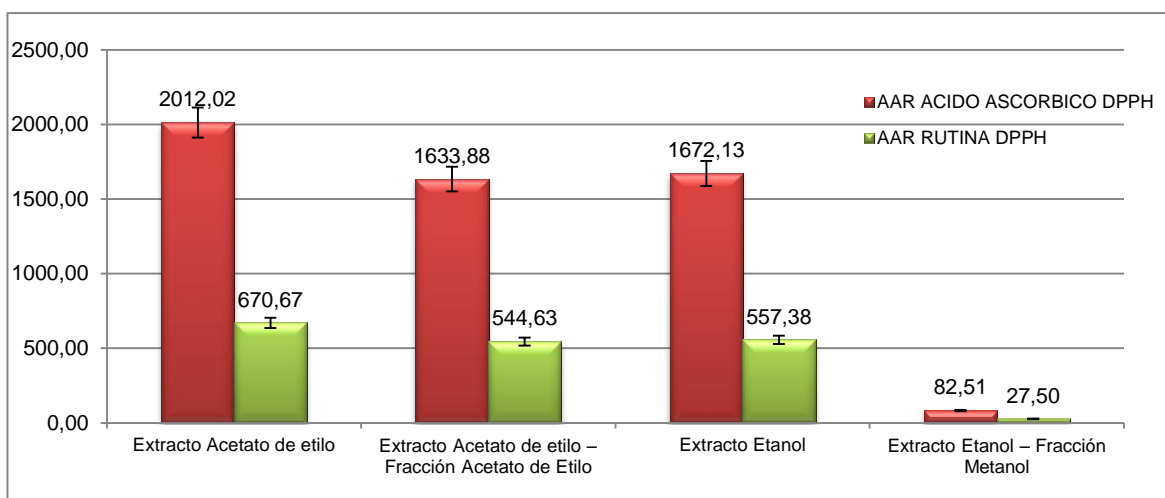
El AAR, muestra el comportamiento de las fracciones y extractos analizados comparados con los patrones usados, los resultados son obtenidos en actividad antioxidante relativa. Estos resultados aunque diferentes para cada uno de los patrones, muestran el mismo orden de resultados (**Tabla 12**). La fracción metanólica del extracto etanolico presentó un 27,50 AAR comparado con la rutina y 82,51 de AAR con el ácido ascórbico, siendo la fracción analizada con mejor actividad relativa, seguido por la fracción acetato de etilo del extracto acetato de etilo con 1633,88 de AAR para el ácido ascórbico y 544,63 AAR para la rutina.

La actividad antioxidante relativa entre mayor sea el valor menor es la capacidad antioxidante en concentración de miligramos por litro de metanol

Extracto o Fracción	AAR Ácido Ascórbico	AAR Rutina
Extracto Acetato de etilo	2012,02	670,67
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	1633,88	544,63
Extracto Etanol	1672,13	557,38
Extracto Etanol – Fracción Metanol	82,51	27,50

Tabla 12. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).

En la gráfica 7 se observa que por el ensayo de decoloración DPPH\*, hay mayor capacidad antioxidante relativa con respecto a la rutina verificando que a mayor valor menor capacidad de atrapar radicales libres.



Gráfica 7. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el ensayo de DPPH\*. (Fuente: Autor).

## 7.2 Ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>)

La metodología desarrollada para el método de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>, se determinó de acuerdo a los parámetros establecidos en el numeral 6.3.2 de este documento.

### 7.2.1 Preparación de la curva de referencia

Para realizar las curvas de referencia se prepararon soluciones de Trolox, ácido ascórbico y rutina, en concentraciones de 0,625 a 12,5 miligramos por litro de

metanol y se realizó la medición del porcentaje de captación empleando la ecuación 2.

Concentración mg/ L MeOH	Log Concentración	A inicial	A final	% de captación de ABTS <sup>•+</sup>
0.625	- 0.20	0.788	0.577	26.78
6.25	0,8	0,788	0,347	55.96
12.5	1,10	0,784	0,110	85.97

Tabla 13. Porcentaje de captación del radical ABTS<sup>•+</sup> empleando trolox. (Fuente: Autor).

Partiendo de los datos obtenidos del porcentaje de captación del radical catiónico Acido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>), se construyó una curva de referencia (**Grafica 8**) que permite verificar la dependencia lineal del % de captación del radical ABTS<sup>•+</sup> Vs la concentración del trolox, obteniéndose un R<sup>2</sup> de 0,9077, el cual nos permite calcular el porcentaje de concentración efectiva 50 (IC<sub>50</sub>) por medio de la ecuación de la gráfica 8.

Concentración mg/ L MeOH	Log Concentración	A inicial	A final	% de captación de ABTS <sup>•+</sup>
0,625	- 0,20	0,766	0,543	29,11
6.25	0,80	0,762	0,140	81,63
12,5	1,10	0,768	0,012	98,44
25	1,40	0,768	0,010	98,69

Tabla 14. Porcentaje de captación del radical ABTS<sup>•+</sup> empleando ácido ascórbico. (Fuente: Autor).

Debido a que se va a evaluar la capacidad antioxidante de extractos vegetales, se realiza la curva de referencia con ácido ascórbico, como antioxidante de referencia con concentraciones de 0.625, 6.25, 12.5 y 25 miligramos por litro de MeOH (**Tabla 14**).

Concentración mg/ L MeOH	Log Concentración	A inicial	A final	% de captación de ABTS <sup>•+</sup>
0,625	- 0,20	0,788	0,567	28,05
6.25	0,80	0,784	0,366	53,32
12,5	1,10	0,794	0,148	81,36
25	1,40	0,798	0,016	97,99

Tabla 15. Porcentaje de captación del radical ABTS<sup>•+</sup> empleando rutina. (Fuente: Autor).

Al igual que con el trolox y ácido ascórbico se realizó la curva de referencia con la rutina, partiendo de los datos de la tabla 15, y se realizó la curva de referencia (**Grafica 9**) que permite verificar el porcentaje de captación del radical ABTS<sup>•+</sup> Vs la concentración de la Rutina obteniéndose un R<sup>2</sup> de 0,9199.

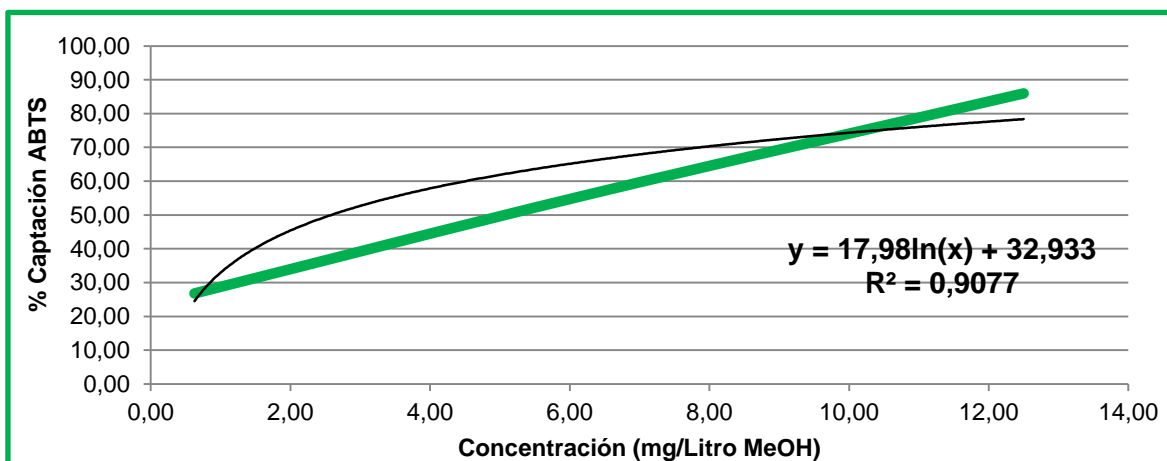


## 7.2.2 Coeficiente de inhibición IC<sub>50</sub>

Como se calculó anteriormente para el método del DPPH\*, el IC<sub>50</sub> se calcula con la fórmula de la ecuación de la recta.

### 7.2.2.1 IC<sub>50</sub> Trolox

Partiendo de los datos obtenidos de la captación del radical ABTS<sup>•+</sup> causado por el trolox, se construyó la curva de referencia (**Gráfica 8**) que permite verificar la dependencia lineal del porcentaje (%) de captación contra concentración de trolox obteniéndose un R<sup>2</sup> de 0,9077. La curva de referencia de trolox da una ecuación de recta  $y = 17,98 \ln x + 32,933$ .



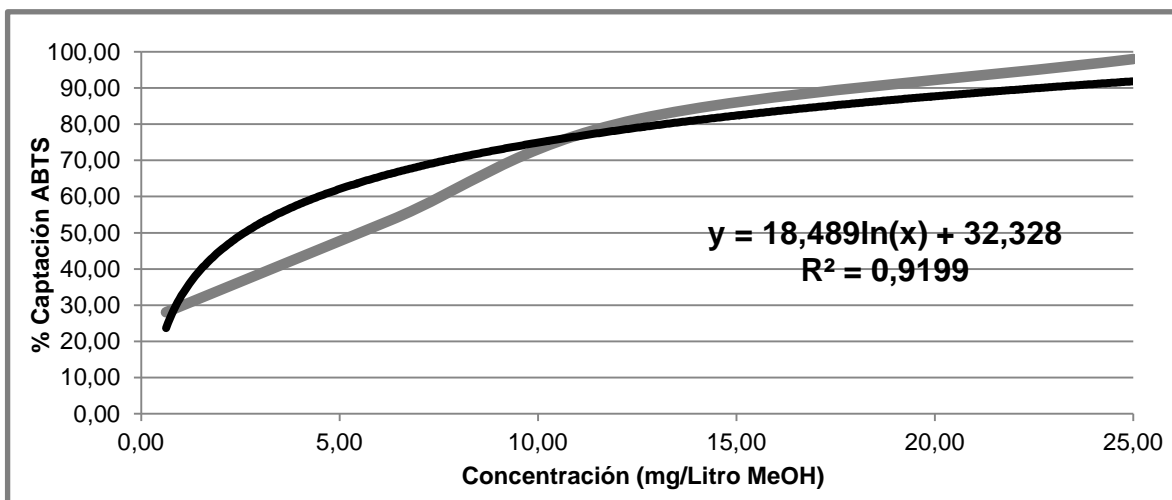
Gráfica 8. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS<sup>•+</sup> v/s concentración de Trolox. (Fuente: Autor).

$\frac{50 - 32,933}{17,98} = e^x$  Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado para el IC<sub>50</sub> del trolox es de 2.58 miligramos por litro de metanol.

### 7.2.2.2 IC<sub>50</sub> Rutina.

Según la gráfica 9, la curva de referencia de la rutina da la ecuación de la recta:  $y = 18,489 \ln x + 32,328$ , y un R<sup>2</sup> de 0,9199.

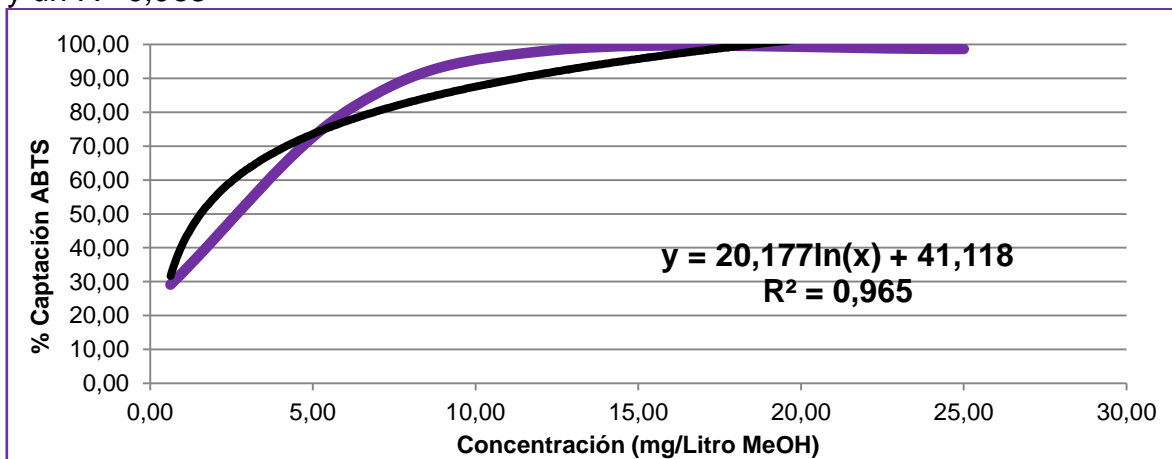
$\frac{50 - 32,328}{18,489} = e^x$  Obteniendo un IC<sub>50</sub> de 2.60 miligramos de rutina por litro de metanol.



Gráfica 9. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS\*+ v/s concentración de rutina. (Fuente: Autor).

### 7.2.2.3 IC<sub>50</sub> Ácido Ascórbico

Cómo se ha venido calculando el IC<sub>50</sub> para los patrones, el del ácido ascórbico se obtuvo en base a la ecuación de la recta, de la gráfica 10.  $y = 20,177 \ln x + 41,118$  y un  $R^2: 0,965$



Gráfica 10. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS\*+ v/s concentración de ácido ascórbico. (Fuente: Autor).

En la grafica anterior se observa el comportamiento del ácido ascórbico,  $\frac{50 - 41,118}{20,177} = e^x$  Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado obtenido de la concentración de ácido ascórbico es de 1,55 miligramos por litro de metanol.

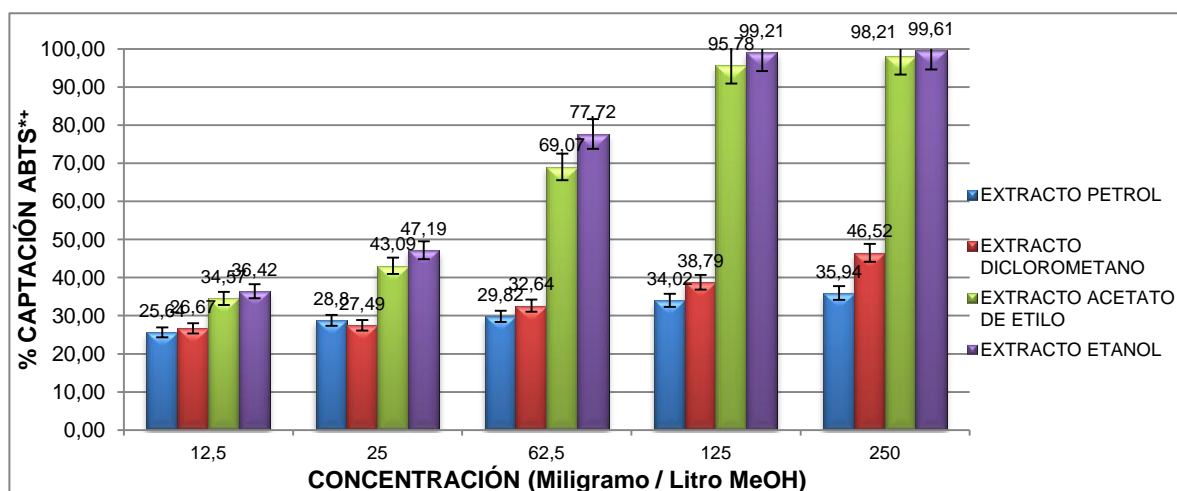
### 7.2.3 Actividad antioxidante de los extractos de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson

Como se aplicó para el método de decoloración del radical DPPH\*, para el método de decoloración del ABTS\*\*+, se utilizaron las mismas concentraciones (12,5, 25, 62,5, 125 y 250 miligramos por litros de MeOH). Para éste método también observamos que hay tendencia de mayor actividad antioxidante a medida que aumenta la concentración en las soluciones de los extractos.

Concentración mg/ L MeOH	Hojas de <i>Ch. perglabra</i> . Extracto Petrol		Hojas de <i>Ch. perglabra</i> . Extracto Diclorometano		Hojas de <i>Ch. perglabra</i> . Extracto Acetato de Etilo		Hojas de <i>Ch. perglabra</i> . Extracto Etanol	
	Valor	+/-	Valor	+/-	Valor	+/-	Valor	+/-
12,5	25,64	0,101	26,67	0,104	34,57	0,136	36,42	0,139
25	28,80	0,110	27,49	0,108	43,09	0,169	47,19	0,185
62,5	29,82	0,115	32,64	0,126	69,07	0,274	77,72	0,300
125	34,02	0,132	38,79	0,154	95,78	0,375	99,21	0,377
250	35,94	0,138	46,52	0,181	98,21	0,384	99,61	0,379

Tabla 16. Porcentaje de captación de ABTS\*\*+ en extractos de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).

El extracto éter de petróleo y de Diclorometano presentaron menor porcentaje de captación con respecto a los extractos de acetato de etilo y etanol, ya que estos extractos sobrepasaron el 90% de captación del radical ABTS\*\*+ en las concentraciones de 125 y 250 miligramos por litro de metanol (**Tabla 16**).



Gráfica 11. Comparación extractos de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el método decoloración del radical ABTS\*\*+. (Fuente: Autor).

El extracto de Éter de petróleo mostro un comportamiento más conservador, presentando una menor disminución de la absorbancia, que se ve reflejada en el

porcentaje de captación (**Grafica 11**), su mayor porcentaje de captación se presentó a 250 miligramos de extracto por litro de Metanol con un porcentaje de 35,94% de captación.

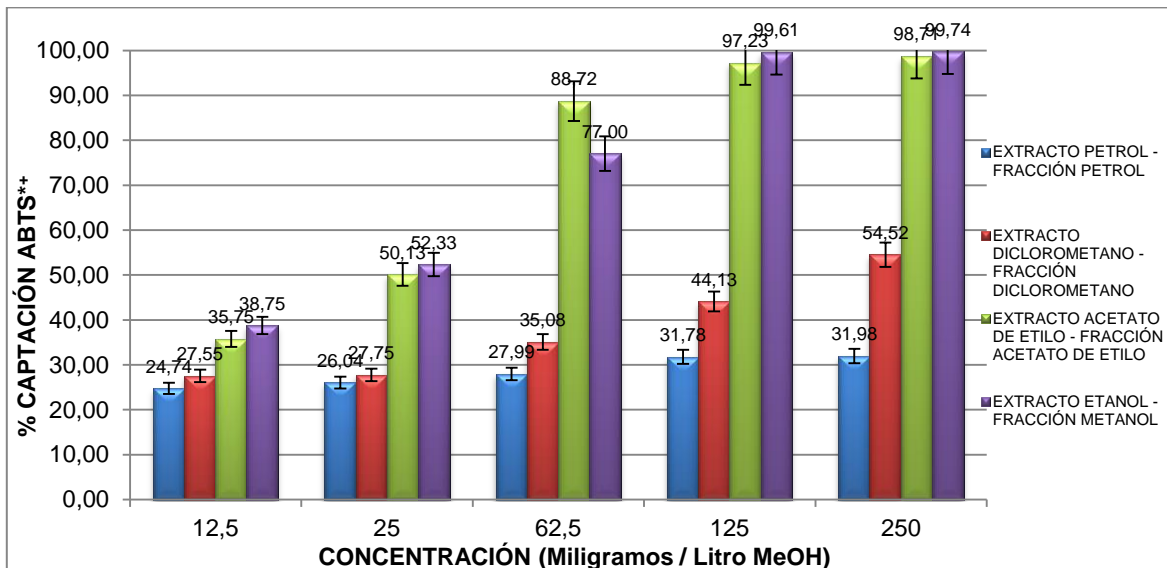
En la gráfica 11 también se evidencia los porcentajes de captación del extracto Etanólico, este presenta mayor porcentaje de inhibición en las concentraciones de 62,5 y 125 miligramos de extracto por litro de metanol, con unos porcentajes de 77.72% y 99.21% de captación de ABTS<sup>•+</sup> respectivamente, pero el mayor porcentaje de captación de este extracto corresponde a la concentración de 250 miligramos por litro de metanol con 99.61%.

#### 7.2.4 Actividad antioxidante de las fracciones de los extractos de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson

Concentración mg/ L MeOH	Extracto Petrol Fracción Petrol		Extracto Diclorometano Fracción Diclorometano		Extracto Acetato de Etilo Fracción Acetato de Etilo		Extracto Etanol Fracción Metanol	
	12,5	24,74	+/- 0,095	27,55	+/- 0,106	35,75	+/- 0,138	38,75
25	26,04	+/- 0,101	27,75	+/- 0,106	50,13	+/- 0,192	52,33	+/- 0,203
62,5	27,99	+/- 0,108	35,08	+/- 0,134	88,72	+/- 0,346	77,00	+/- 0,298
125	31,78	+/- 0,123	44,13	+/- 0,169	97,23	+/- 0,386	99,61	+/- 0,381
250	31,98	+/- 0,123	54,52	+/- 0,211	98,71	+/- 0,382	99,74	+/- 0,386

Tabla 17. Porcentaje de Captación de ABTS<sup>•+</sup> en Fracciones de los extractos de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. (Fuente: Autor).

La fracción de éter de petróleo de extracto petrol presento menor actividad con respecto a la fracción de metanol del extracto etanólico de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, esta fracción de petrol solo sobrepasan del 30% de captación del radical ABTS<sup>•+</sup>, en concentración de 250 miligramos por litro de metanol. (**Tabla 17**).



Gráfica 12. Comparación de las fracciones de los extractos de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el método decoloración del radical ABTS\*\*. (Fuente: Autor).

En la anterior grafica se evidencia que a la concentración de 250 miligramos por litro de MeOH la fracción metanolica del extracto etanolico presentan un porcentaje de captación de ABTS\*\* mayor al 90%. También se observa los porcentajes de captación de la fracción del extracto de acetato de etilo de hojas de, este presenta mayor porcentaje de inhibición que las otras fracciones en las concentración de 62.5 miligramos por litro de MeOH, con un porcentaje de 88.72%, de captación de ABTS\*\*. En la fracción petrol del extracto petrol a una concentración de 250ppm, solo alcanza a superar el 30% de captación, lo que sugiere actividad antioxidante baja a esta concentración.

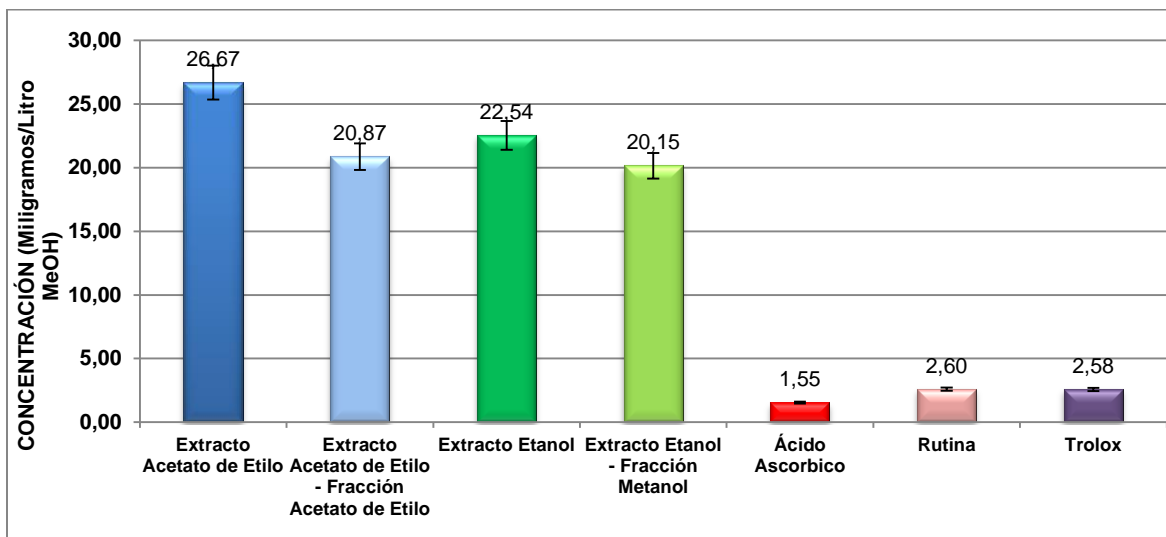
### 7.2.5 Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC<sub>50</sub>) de extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS\*\*)

Los resultados de la tabla 18 se compararon con los patrones usados para el método de decoloración del radical ABTS\*\*, el ácido ascórbico (1.55 miligramos por litro MeOH), rutina (2.60 miligramos por litro MeOH) y trolox (2.58 miligramos por litro MeOH), obteniéndose resultados que tienen mayor IC<sub>50</sub> que el los patrones, concluyendo que la actividad antioxidante es baja en relación al ácido ascórbico, rutina y trolox.

Extracto o Fracción	IC <sub>50</sub> (mg / L MeOH)
Extracto Acetato de etilo	26.67
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	20.87
Extracto Etanol	22.54
Extracto Etanol – Fracción Metanol	20.15

Tabla 18. IC<sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor).

Se comparó los resultados obtenidos con el IC<sub>50</sub> del ácido ascórbico, la rutina y el trolox, observándose que la fracción metanol del extracto etanolico y la fracción acetato de etilo del extracto acetato de etilo presentan similar IC<sub>50</sub> para este método.



Gráfica 13. Comparación IC<sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor).

En la anterior grafica se observa que por este ensayo los los extracto y fracciones edvaluados presentan una capacidad antioxidante baja respecto a los tres patrones, ya que lo IC<sub>50</sub> se encuentran entre los 20 y 30 miligramos por litro de metanol.

### 7.2.6 Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas *Ch perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, por el ensayo ABTS<sup>•+</sup>.

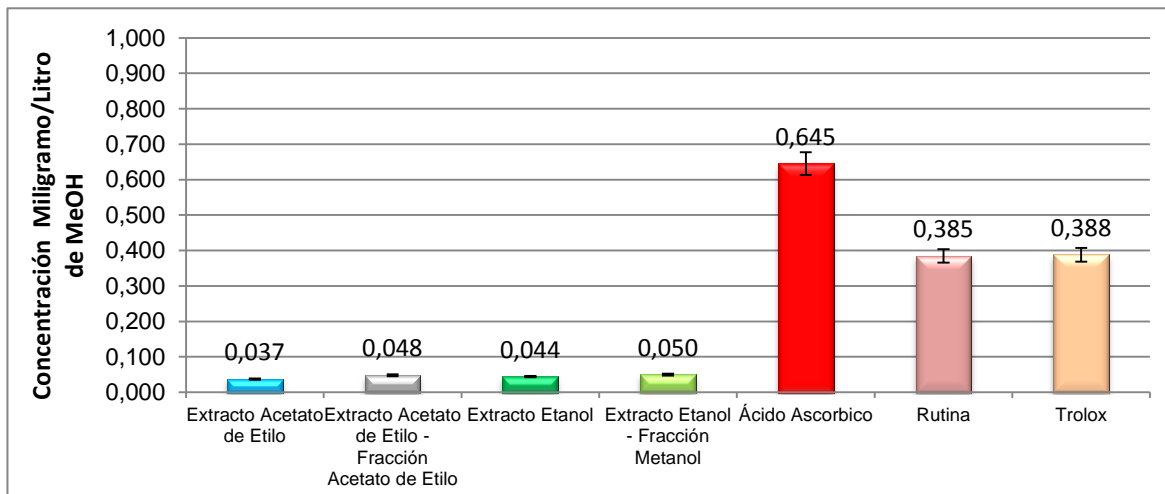
La capacidad antioxidante para este ensayo es baja comparada con los patrones para todas las muestras evaluadas, en la fracción metanolica del extracto etanolico solo alcanza el 0.05 mg/L, comparada con el ácido ascórbico que

alcanza un 0.65 mg/L de capacidad antioxidante por un gramo en un litro de metanol.

Extracto o Fracción	Capacidad antioxidante (mg / L MeOH)
Extracto Acetato de etilo	0.037
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	0.048
Extracto Etanol	0.044
Extracto Etanol – Fracción Metanol	0.050

Tabla 19. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor).

En la siguiente grafica se observa la comparación de la capacidad antioxidante de los extractos y fracciones activos por este metodo, se evidencia que los patrones captan mas radicales libres en un gramos de muestra. Las fracciones y extractos solo alcanza a captar 0.05 miligramo por litro de metanol de radicales libres.



Gráfica 14. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical ABTS. (Fuente: Autor).

### 7.2.7 Actividad antioxidante relativa (AAR).

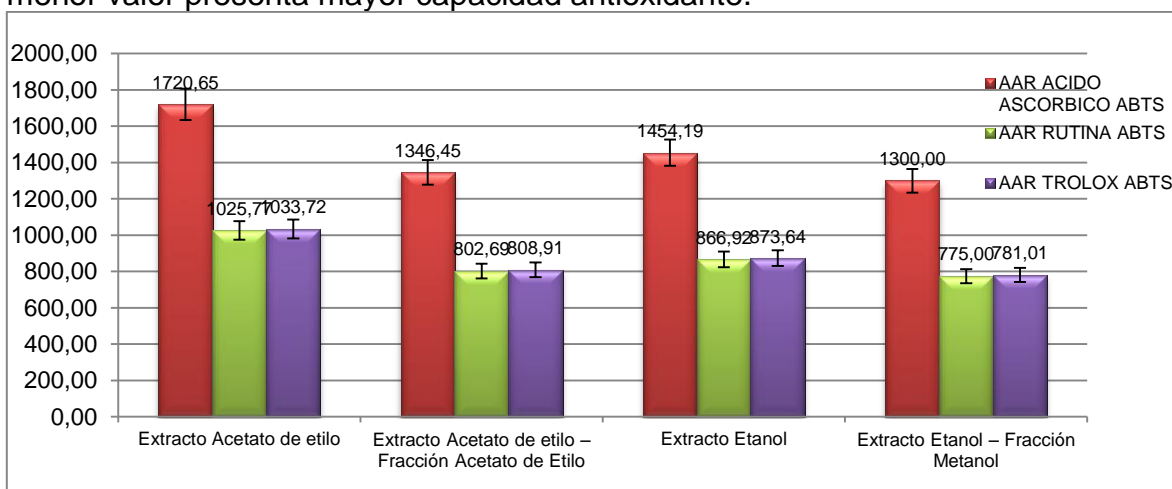
La actividad antioxidante relativa de los extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, para el método de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>, se calculó con la ecuación 3. La fracción que presento menor porcentaje de AAR de las muestras evaluadas fue la metanolica del extracto etanolico con 781,01 de AAR con trolox, 775,00 AAr con rutina, y 1300,0 AAR con ácido ascórbico, esto indica que para este ensayo de ABTS<sup>•+</sup> las

muestras evaluadas presentan una capacidad antioxidante baja, ya que los valores comparados con las muestras control son mas altos.

Extracto o Fracción	AAR ácido ascórbico	AAR rutina	AAR trolox
Extracto Acetato de etilo	1720,65	1025,77	1033,72
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	1346,45	802,69	808,91
Extracto Etanol	1454,19	866,92	873,64
Extracto Etanol – Fracción Metanol	1300,00	775,00	781,01

Tabla 20. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el método de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor).

En la gráfica 15 observamos que la actividad antioxidante relativa para los extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson por el ensayo de ABTS<sup>•+</sup> los resultados comparados con la rutina son más bajos con respecto a los otros dos patrones. El AAR de una sustancia a menor valor presenta mayor capacidad antioxidante.



Gráfica 15. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por el ensayo de ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor).

### 7.3 Comparación del IC<sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los métodos de DPPH\* y ABTS<sup>•+</sup>

Se determinó la concentración media inhibitoria 50 IC<sub>50</sub> de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH\* y ABTS<sup>•+</sup> (Tabla 21) de los extractos y fracciones de hojas *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, para la fracción metanólica del extracto etanolico se encontró el mayor valor de IC<sub>50</sub> por ambos

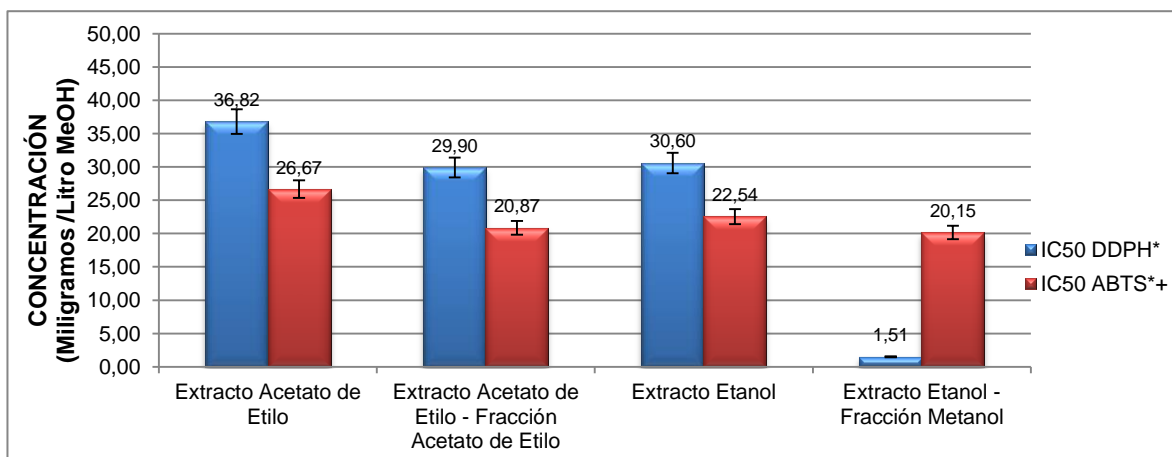


métodos, en DPPH\* en 1.51 miligramo/Litro MeOH, y ABTS\*\* 20.15 miligramo /Litro MeOH, seguida por la fracción acetato de etilo del extracto acetato de etilo, por el método ABTS\*\* en 20.87 mg/L MeOH y DPPH\* 29.90 mg/L MeOH.

Extracto o Fracción	IC <sub>50</sub> (mg / L MeOH) DPPH*	IC <sub>50</sub> (mg / L MeOH) ABTS**
Extracto Acetato de etilo	36,82	26,67
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	29,90	20,87
Extracto Etanol	30,60	22,54
Extracto Etanol – Fracción Metanol	1,51	20,15

Tabla 21. Comparación IC<sub>50</sub> en extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los métodos de decoloración del radical DPPH\* y decoloración del radical ABTS\*\*. (Fuente: Autor).

En la gráfica 16 se observa que en mayor parte los IC<sub>50</sub> calculados por el método de decoloración del radical DPPH\* las concentraciones son mayores que los calculados por el método de decoloración del radical ABTS\*\*. Siendo el ensayo ABTS\*\* más sensible. Evidenciándose que la fracción metanol del extracto de etanol por el ensayo DPPH\* tiene el IC<sub>50</sub> más bajo, concluyendo que muestra evaluada presenta mejor actividad antioxidante por ambos métodos.



Gráfica 16. Comparación IC<sub>50</sub> de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los métodos DPPH\* y ABTS\*\*. (Fuente: Autor).

#### 7.4 Comparación de la actividad antioxidante relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\* comparadas con el ácido ascórbico

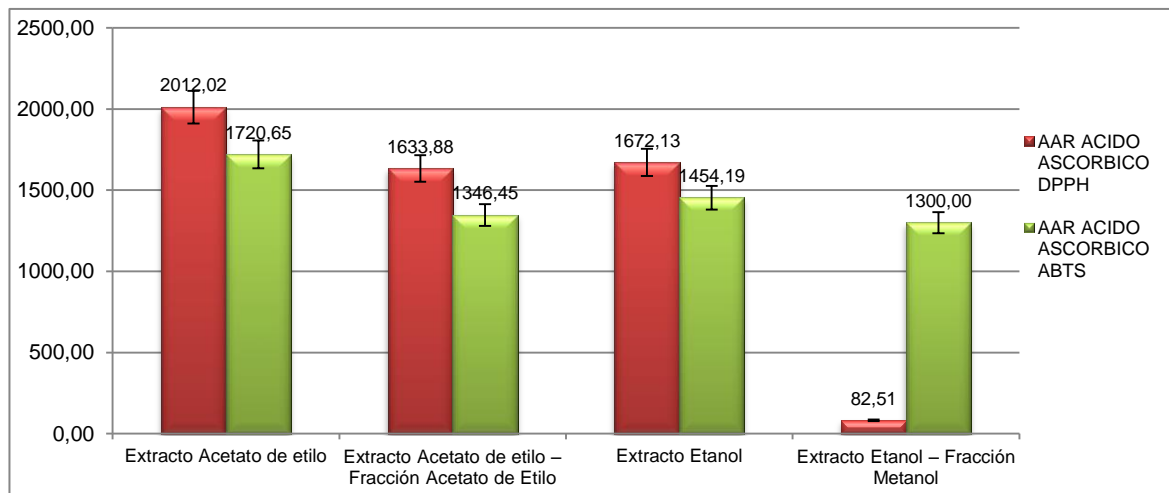
Los porcentajes de actividad antioxidante relativa (AAR) con respecto al ácido ascórbico se relacionan en la tabla 22. Se evidencia que para la fracción metanol

del extracto etanolico determinado por ambos métodos es el más alta la capacidad antioxidante.

Extracto o Fracción	AAR acido ascorbico DPPH*	AAR acido ascorbico ABTS**
Extracto Acetato de etilo	2012,02	1720,65
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	1633,88	1346,45
Extracto Etanol	1672,13	1454,19
Extracto Etanol – Fracción Metanol	82,51	1300,00

Tabla 22. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\* con respecto al ácido ascórbico. (Fuente: Autor).

Por el método de ABTS\*\* en casi todas las muestras se obtuvieron porcentajes de actividad antioxidante relativa más bajos con respecto al método DPPH\*, evidenciándose más sensibilidad de este método para evaluar la capacidad antioxidante.



Gráfica 17. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\* con respecto al ácido ascórbico. (Fuente: Autor).

En la gráfica 17 se evidencia que para el ensayo de DPPH\* la fracción metanolica del extracto etanolico presenta el mejor comportamiento con respecto a las otras muestras, traduciendo en una actividad antioxidante excelente, las otras muestras evaluadas, presentan una actividad antioxidante baja, ya que se necesita mayor cantidad de antioxidante para atrapar radicales libres.

## 7.5 Comparación de la actividad antioxidante relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H.

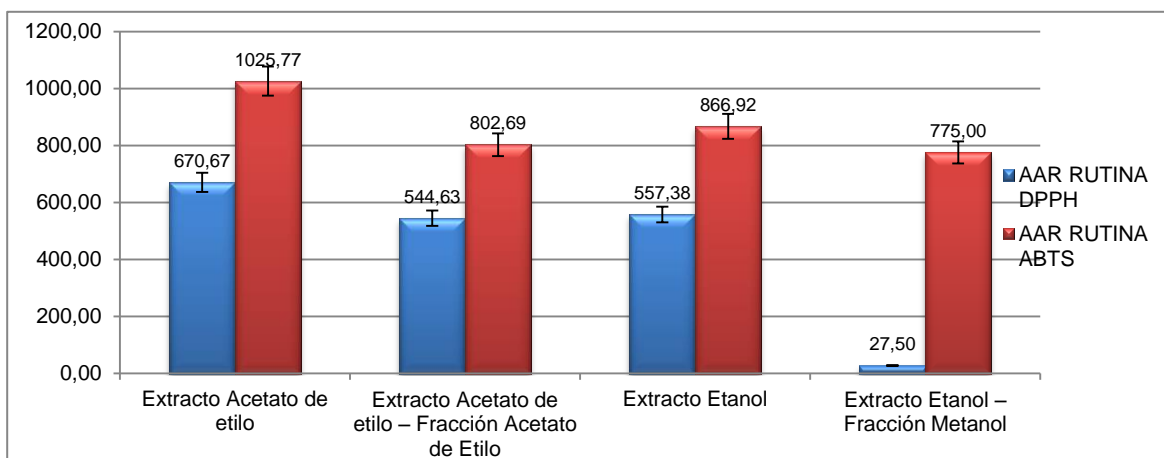
**Robinson, calculados por los ensayos de radical DPPH\* y de ABTS\*\* comparadas con la rutina**

En la tabla 23 se están consiguiendo los datos de la actividad antioxidante relativa (AAR) evaluadas con respecto a la rutina por ambos métodos, en ella podemos determinar que la fracción metanólica en el extracto etanólico presentan menor actividad antioxidante relativa, ya que el valor por el ensayo DPPH\* es 27,50 mayor que el patrón y en el ABTS\*\* es 775,00, determinado que esta fracción posee una capacidad antioxidante mayor que las otras muestras evaluadas.

Extracto o Fracción	AAR rutina DPPH*	AAR rutina ABTS**
Extracto Acetato de etilo	670,67	1025,77
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	544,63	802,69
Extracto Etanol	557,38	866,92
Extracto Etanol – Fracción Metanol	27,50	775,00

Tabla 23. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\*

En la siguiente gráfica (**Gráfica 18**) observamos que las fracciones y los extractos con los solventes de mayor polaridad (Etanol, metanol y acetato de etilo) presentan similar comportamiento, con esto se puede concluir que estas dos fracciones y extractos tienen actividad antioxidante similar con respecto a la rutina. Se evidencia que la fracción metanólica del extracto de etanol presenta el mejor comportamiento con un porcentaje de AAR de 27,50 por el ensayo de DPPH\* traduciéndose como la fracción con mayor capacidad antioxidante. Para la rutina es más sensible el método de ABTS.



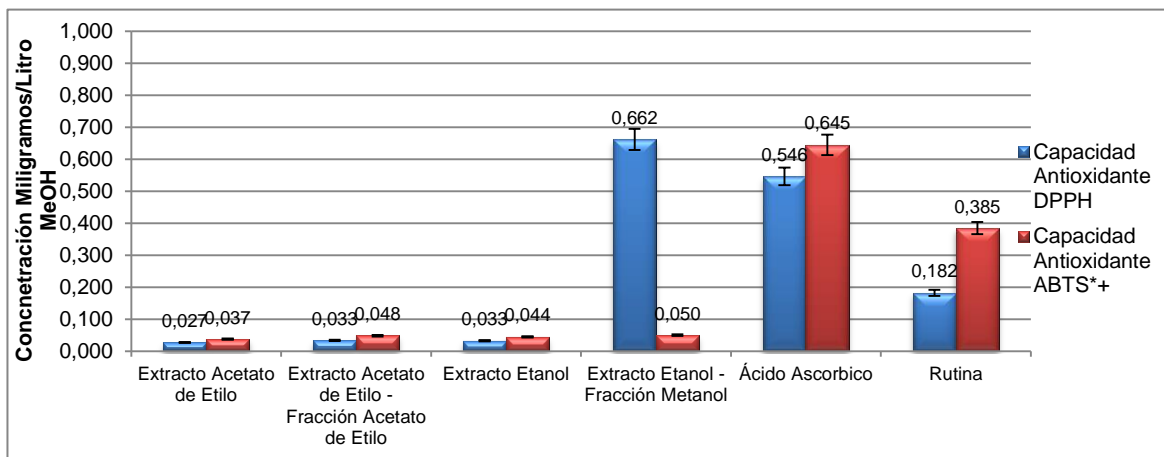
Gráfica 18. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\* con respecto a la Rutina. (Fuente: Autor).

## 7.6 Comparación de la capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos de decoloración del radical DPPH\* y del radical catiónico ABTS\*\* comparadas con la rutina

Extracto o Fracción	Capacidad antioxidante DPPH*	Capacidad antioxidante ABTS**
Extracto Acetato de etilo	0.027	0.037
Extracto Acetato de etilo – Fracción Acetato de Etilo	0.033	0.048
Extracto Etanol	0.033	0.044
Extracto Etanol – Fracción Metanol	0.662	0.051

Tabla 24. Comparación de la capacidad Actividad Antioxidante Relativa de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\*

La comparación de la capacidad antioxidante evaluada por ambos métodos concluye que la fracción metanólica del extracto etanólico por el método de DPPH\* presenta la mayor captación de radicales libres por miligramo de sustancia en un litro de metanol con un 0,662, esta capacidad es mayor evaluada frente a los dos patrones, esta fracción en la investigación es la mejor evaluada con capacidad antioxidante.



Gráfica 19. Comparación de la capacidad Actividad Antioxidante Relativa de extractos y fracciones de hojas de *Ch. perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\*. (Fuente: Autor).

Los métodos de captación de radicales libres usados sobre las hojas *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, muestran que la fracción metanólica del extracto etanólico superó el 50% de captación de DPPH\* a las concentraciones de 12,5, 25, 62,5, 125 y 250 miligramos de sustancia por litro de metanol siendo la fracción con mayor capacidad antioxidante en la investigación, esta se puede considerar como una fuente natural de antioxidantes.

## CONCLUSIONES

Los extractos polares de las hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson., tienen actividad antioxidante, la fracción metanólica es la más activa con IC<sub>50</sub> 1,51 mg/L, la fracción AcOEt tiene IC<sub>50</sub> 29,9 mg/L y la fracción Etanólica con IC<sub>50</sub> 30,60 mg/L, extracto en AcOEt 36,82 mg/L, esto evaluado por la técnica de DPPH\*.

La capacidad antioxidante, inverso del IC<sub>50</sub>, para las fracciones AcOEt, Etanólica, extracto en AcOEt de las hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson., son 0,033; 0,032; 0,027 respectivamente, que son relativamente bajas en comparación con el mismo dato de los controles ácido ascórbico, 0,546 y rutina 0,182 a excepción de la fracción metanólica que es 0,662. Este parámetro corresponde a la actividad antioxidante por mg/L. esto evaluado por la técnica de DPPH\*.

El extracto polar en metanol de las hojas de *Chromolaena perglabra* tiene actividad antioxidante mayor que el ácido ascórbico y la rutina comprobado por la capacidad antioxidante, 0,662, 0,546 y 0,182 respectivamente.

Los extractos polares de las hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson., tienen actividad antioxidante, la fracción metanólica con IC<sub>50</sub> 20,15 mg/L, la fracción AcOEt tiene IC<sub>50</sub> 20,87 mg/L y la fracción Etanólica con IC<sub>50</sub> 22,54 mg/L, extracto en AcOEt 26,67 mg/L, esto evaluado por la técnica de ABTS\*\*.

La capacidad antioxidante, se determinó con el inverso del IC<sub>50</sub>, para las fracciones acetato de etilo, etanólica, metanólica y el extracto en Acetato de etilo de las hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson., son 0,048; 0,044; 0,051 y 0,037 respectivamente, que son bajas en comparación con el mismo dato de los patrones evaluados ácido ascórbico, 0,645, rutina 0,385 y trolox 0,388. Este parámetro corresponde a la actividad antioxidante por mg/L. esto evaluado por la técnica de ABTS\*\*.

Los extractos baja polaridad (Éter de petróleo y diclorometano) de hojas *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, no son antioxidantes al evaluarse por las técnicas de DPPH\* y ABTS\*\*.

## RECOMENDACIONES

Determinar la composición química de cada una de las fracciones activas de hojas *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson, y realizarle pruebas de actividad antioxidante a estos metabolitos purificados para así determinar los responsables de esta actividad.

La planta *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson por los resultados que se han obtenido, nos indica que es una especie promisoría a nivel medicinal, se sugiere realizarle otros estudios biológicos diferentes a los realizados a la planta.

Estudiar otras formas de determinación de la actividad antioxidante para analizar más a fondo el comportamiento de los extractos y las fracciones activas de la planta estudiada.

## BIBLIOGRAFÍA

Akinmoladun, Afolabi C., Ibukun E, Dan Ologe. 2007. Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*. University of Agriculture, Abeokuta, Nigeria. Scientific Research and Essay Vol. 2; p. 191-194.

Alam Md. N., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md. 2012. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal; 21: 143 - 152.

Anaya L, Ana. Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. México: Plaza y Valdez S.A., 2004. p. 181-185.

Arango Amparo, Urueña Claudia, Rodríguez Oscar E., Torrenegra Rubén D., Fiorentino Susana, 2007, Un flavonoide de *Chromolaena perglabra* induce muerte celular en células tumorales y proliferación en células normales Scientia et Technica, ISSN 0122-1701, AÑO XIII; No 33; pág. 315

Armstrong Donald., Browne Richard. 1998. Methods in molecular biology. Free radical and antioxidant protocols. Vol 108. Humana press Inc. Totowa. New Jersey. p 270:296

Arnér Elias S.J. 2009. Focus on mammalian thioredoxin reductases important selenoproteins with versatile functions. Biochimica et Biophysical Acta; 1790: 495 - 526.

Badillo, V.M. 1995. Dos nuevas Compuestas (Asteraceae) de los géneros *Ayapana* y *Chromolaena* de los Andes Venezolanos. Ernstia 5 (2): 81-87.

Baxendale J. H. 1992. Hydrogen peroxide use to increase oxidant capacity for in situ bioremediation of contaminated soils and aquifers: A review. Journal of Contaminant Hydrology. Volume 9, Pages 221-242

Bilbao M. R., 1997. Análisis fitoquímico preliminar: química de los productos naturales. Universidad del Quindío. Armenia.

Bohlmann R., Sing P., Jakupovic J., King R., Robinson H., 1982. Three cadinene derivatives and a prostaglandin like fatty acid from *Chromolaena* species. Phytochemistry. Vol 21. No 2. p. 371 – 374.

Brand-Williams W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol. p. 25-30

Bremer, K. 1994. Asteraceae: Cladistics and classification. Timber Press, Portland, Oregon.

Cabrera, A. L. 1978. Compositae. Págs. 1-726. En: A.L. Cabrera (ed.), Fl. Prov. Jujuy, Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu. 13 (10).

Cadenas Enrique, Packer Lester. 2002. Handbook of antioxidants second edition revised and expanded. Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo. Measurement of Total Antioxidant Capacity in Nutritional and Clinical Studies; University of Southern California School of Pharmacy. California. Marcel Dekker INC. p. 18-50, 63-70.

Calderon E., 1963. Guía para el análisis de plantas y notas prácticas sobre fitoquímica. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Cannell J. Richard. 1998. How to Approach the Isolation of a Natural Product. Methods in Biotechnology. Totowa. New Jersey. Volume 4. Pp 1-51.

Cemeli E., Baumgartner A., Anderson D. 2009. Antioxidants and the Comet assay. Mutation Research/Reviews in Mutation Research; 681: 51–67.

Chandian Sen, Parcker Lester. Osmo Hanninen. 2000. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Elsevier science B.V. Amsterdam.

Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., Park S.H., Kim S.K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Science; 163: 1161 - 1168.

Clarkson P. M. 1995. Antioxidants and physical performance. Crit Review Food Science. 35, 131-41

Díaz P, Santiago, & Rodríguez C, Betsy. 2013. Novedades en Asteráceas colombianas III. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

Deng J., Cheng W., Yang G. 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH\* assay. Food Chemistry; 125: 1430–1435.

Dominguez X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México D.F.



Doria E., Buonocore D., Focarelli A., Marzatico F. 2012. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2012: pag 13.

Dorman H.J.D, Hiltunen R. 2004. Fe (III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja Hortensis* L.) extract and subfractions. *Food chemistry*; 88:193-199.

Farnsworth, N. R., Akerele O., Bingel A. S., D. Soejarto D. and Guo Z., 1992, Las plantas medicinales en la terapéutica. In: *Plantas Medicinales de México, introducción a su estudio*. 4ª edición. Estrada L., E. (ed.). Universidad Autónoma Chapingo. México. 295–312 p

Funk, V.A., A. Susanna, T.F. Stuessy & R.J. Bayer (eds.). 2009. Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy. Institute of Botany. University of Vienna. Vienna.

García-Sánchez, L.C., J.A. Corredor-Barinas, J. Guerrero & D.A. Navas. 2008. Extracción e identificación de metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana en *Chromolaena bullata* (Klatt) King & Robinson. *Revista Científica* 10:101-108.

Garzón Andrés, 2008, FITOQUIMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE CHROMOLAENA SCABRA (L.F.) R.H. King & H. Rob. Pontificia Universidad Javeriana Tesis maestría

Guzman A. Antonio. 2007. Análisis fitoquímico de la especie colombiana *Chromolaena subscandens* (Hieron.) R.M. King & H. Rob. y determinación de su actividad biológica. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá.

Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 1841–1856.

Hernández, J. A. 2011. Caracterización Fitoquímica, Actividad Antibacteriana y Antioxidante de Extractos de Plantas Medicinales.

Horan, I.; Clotworthy, M.; Fokunang, C.N. and Tomkings, P.T. 2003. The Development of an In Vitro Screening Strategy for Topically Applied Products. *J. Ethnopharmacology*, 89, 81-90.

Hostettmann, K. 1998. Strategy for the Biological and Chemical Evaluation of Plants. *Pure Appl. Chem.* 70, 1-9.

Irobi On., 1992. Activities of *Chromolaena odorata* (Compositae) leaf extract against *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus faecalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 37:81-83

Jaitak V., Sharma K., Kalia K., Kumar N., Singh H.P., Kaul V.K., Singh B. 2010. Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western Himalaya. *Journal of Food Composition and Analysis*; 23: 142–147.

Jimenez, P. Girbes, T. 2013. Metodo del radical DPPH\*. 2,2-DIFENIL -1-Picrylhydrazyl. Determinación de la capacidad antioxidante en extractos de manzana, brocoli y alcachofa. *Nutrición y Bromatología*, facultad de biología. Universidad de Valladolid.

Katalinic V., Modun D., Music I., Boban M. 2005. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3- thylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & pharmacology*; 140: 47-52.

King, R.M. and Robinson, H. 1970a. Studies in the Eupatorieae (compositae) XXIX the genus *Chromolaena*. *Phytologia*, 20 , 196 – 209.

King, R.M. and Robinson, H. 1970b. Studies in the Eupatorieae (Compositae). XXV. A new genus *Eupatoriadelphus*. *Phytologia* 19, 431– 432.

Kim B.Y., Lee K.S., Choo Y.M., Kim I., Je Y.H., Woo S.D., Lee S.M., Park H.C., Sohn H.D., Jin B.R. 2008. Insect transferrin functions as an antioxidant protein in a beetle larva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*; 150: 161–169.

Mackenzie E.L., Ray P.D., Tsuji Y. 2008. Role and regulation of ferritin H in rotenone-mediated mitochondrial oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*; 44: 1762–1771.

Marnett L.J., 1999. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*; 424 : 83–95.

Martínez Flórez. González Gallego. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Departamento de Fisiología, Universidad de León y Hospital de León. España. *Nutrición Hospitalaria*. XVII; p. 271-278.

Marwah R.G., Fatope M.O., Mahrooqi R.A., Varma G.B, Abadi H.A., Khamis S., Burtamani-Al. 2007 Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*; 101:465-470.

Mulder A.M., Connellan P.A., Oliver C.J., Morris C.A. 2008. Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males. *Nutrition Research*; 28: 583–589.

Muñoz Juarez, M. A., Gutierrez D. M. 2012. Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca*. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

Ocampo C. Rogelio.; Rios V. L. Amalia.; Betancur L. Adriana y Ocampo S. Diana.. 2008. Curso Práctico de Química Orgánica: enfocado a Biología y Alimentos. Manizales: Universidad de Caldas. p. 61-62.

Page H., Salmon A., Leiser S., Robb E., Brown M., Milter R., Stuart J. 2009. Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroblast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*; 46: 1109-1118.

Parcker Lester, Cardenas Enrique. 2002. Handbook of antioxidants. University of southern California. School of pharmacy. California. Second edition.

Phan T. Thang, Allen J, Hughes MA, Cherry G, Wojnarowska F. 2000. Up regulation of adhesion complex proteins and fibronectin by human keratinocytes treated with an aqueous extract from the leaves of *Chromolaena odorata* (Eupolin). *European Journal of Dermatology*, 10:522

Phan Toan-Thang, Wang Lingzhi, See Patrick, Grayer Renee J., Chan Sui-Yung, Lee Seng Teik. 2001. Phenolic Compounds of *Chromolaena odorata* Protect Cultured Skin Cells from Oxidative Damage: Implication for Cutaneous Wound Healing. *Biol. Pharm. Bull.* vol. 24. National University of Singapore, Republic of Singapore.

Podsędek A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*; 40: 1–11.

Prusky, J.F. 1997. Asteraceae. 20. Chromolaena. Págs. 247-251. En: P.E. Berry, K.H. Bruce & D. Yatskievych (eds.), *Flora of the Venezuelan Guayana*. Araliaceae-Cactaceae. Vol. 3. Missouri Botanical Garden. St. Louis.

Re Roberta, Pellegrini Nicoletta, Rroteggente Anna, Rannala Ananth, Min Yang, Rice-Livans Catherine. 1998. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. International Antioxidant Research Centre, Guy's, King's and St Thomas' School of Biomedical Sciences, Kings College-Guy's Campus, London SE1 9RT, UK. p. 7.

Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E. 2008. The antioxidant properties of serum albumin. FEBS letters; 582: 1783–1787.

Rodriguez A. Oscar E., Torrenegra G. Ruben D., 2007, Química y actividad Biológica de *Chromolaena perglabra*, Scientia et Tehcnica, UTP, año XIII, No 33, 267-270 p.

Rodriguez A. Oscar, 2008. Química de *Chromolaenas* Colombianas (*C. perglabra* y *C. tacotana*) y actividad biológica de algunos de sus compuestos. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Rodríguez A. Oscar, Torrenegra G. Rubén, 2005. Flavonoides de *Chromolaena tacotana* (Klatt) R.M. King y H. Rob. Actualidades Biológicas. Vol 27. P. 113 – 115.

Rodriguez, C. Betsy., 2013. El género *Chromolaena* DC. (*Eupatorieae: Asteraceae*) en Colombia: revisión taxonómica y evaluación de su estatus genérico. Tesis de maestria. Facultad de ciencias. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Roginsky V, Lissi EA. 2005. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. Food Chem. p 235-254

Sanabria-Galindo, A. & M. Carrero. 1995. Un flavonol con actividad antimicrobiana de *Chromolaena tacotana*. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 24: 24-28.

Sanabria-Galindo, A., A.M. García, A.M. Torres & J.R. Mantilla. 1989. Actividad antimicrobiana de *Chromolaena tequendamensis* (Hieron) R. King & H. Robinson. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 17: 39-43.

Sanabria a., 1982. Análisis fitoquímico preliminar metodología y aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia compositae. Departamento de química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogota.

Siddhuraju P., Becker, K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. Food Chemistry; 101: 10–19.

Santander G. Sandra P., Urueña Claudia., Rodriguez Oscar E., Torrenegra Ruben D., Fiorentino G. Susana. 2007 El flavonoide cb2 obtenido de *chromolaena bullata* induce activación de células dendríticas humanas. Scientia et Technica Año XIII, Vol 33; p. 313.

Sogorbs Miguel Á y Vilanova G, Eugenio. 2004. Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. España, Ediciones Díaz de Santos S.A. p. 20-21

Srinivasa Rao, Chaudhury P, Pradhan A. 2010. Evaluación de las actividades antioxidante y contenido fenólico total de *Chromolaena odorata*. Roland Institute of Pharmaceutical Sciences, Berhampur, India. p. 729.

Suksamrarn A, Chotipong A, Suavansri T, Boongird S, Timsuksai P, Vimuttipong S, Chuaynugul A. 2004. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. Archives of Pharmacal Research; 27. 507-511.

Taleb-contini Silvi, Schorr Karin, Batista D'Costa Fernando, Rodrigues de Oliveira Dionéia. 2007. Detección de flavonoides en tricomas glandulares de *Chromolaena* especies (Eupatorieae, Asteraceae) de fase inversa de alto rendimiento cromatografía líquida. Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas. Vol.43 No. 2. São Paulo.

Timofeevich Evgeny, Denisov Igor. 2005. Oxidation and antioxidant in organic chemistry and biology. Boca Raton. Taylos & Francis group.

Tovar del Rio, J. 2013. Determinación de la actividad antioxidante por dpph\* y abts de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera. Facultad de Tecnología, Escuela de Tecnología Química. Universidad tecnológica de Pereira.

Turner, B. 1991a. Recension of the Asplundianthus group of Eupatorium s.l. Phytologia 70: 126-134.

Turner, B. 1991b. Recension of the Cronquistianthus group of Eupatorium s.l. Phytologia 70: 158-177

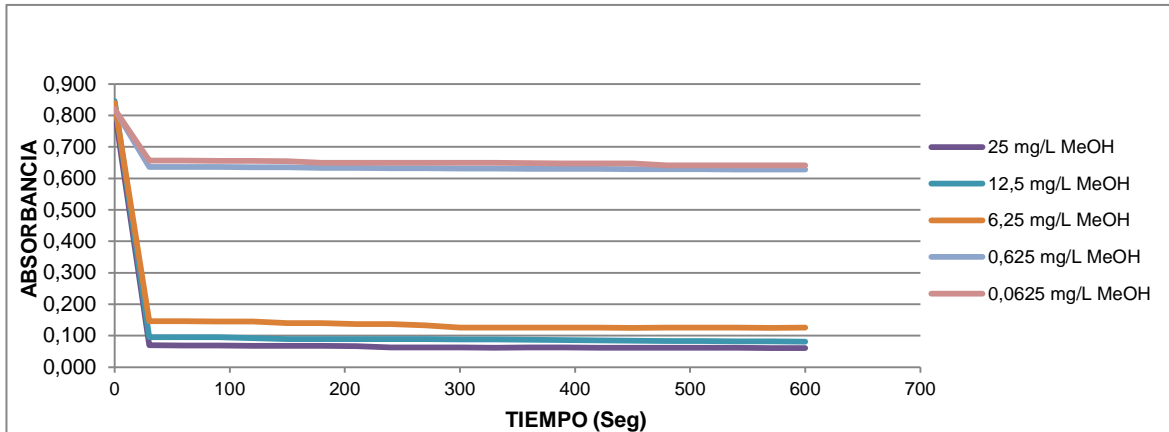
Yen C. Gow., Duh D. Pin. 1994. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. Department of Food Science, Natural Chung Hsing University. Taiwan, Republic of China. 42. Pp 629-632

Yu Liangly. 2008. Wheat antioxidants by Liangly Yu. The University of Maryland. Department of nutrition and food science. Wiley – Interscience. New Jersey.

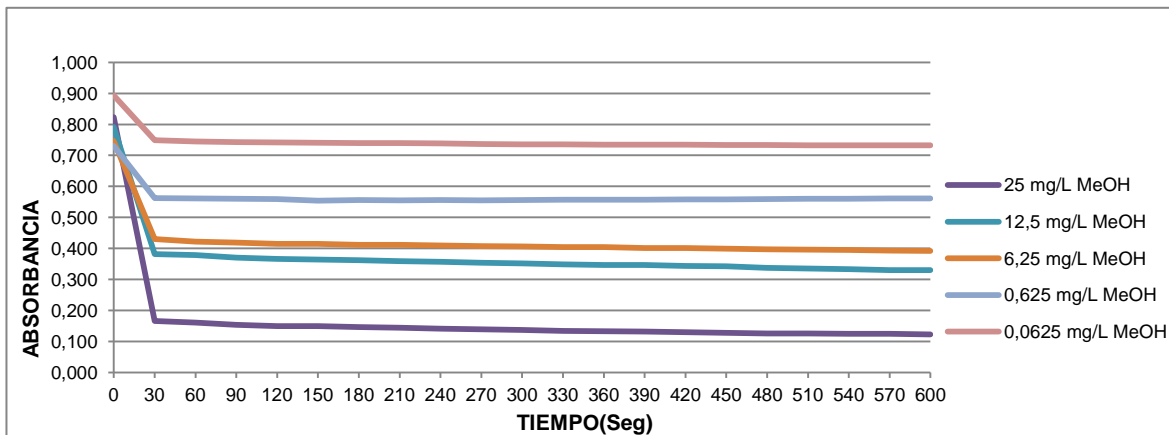
Zuleta A., Esteve M., Frigola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chemistry; 114: 310-316

## ANEXOS

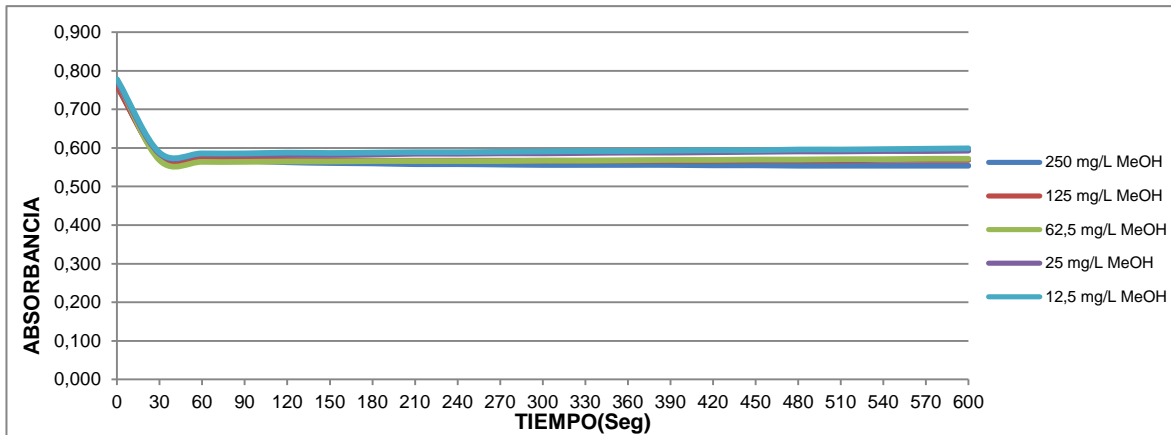
Cinéticas comparativas entre ambos métodos de decoloración de los radicales ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>, realizados para extractos y fracciones de hojas *Chromolaena Perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.



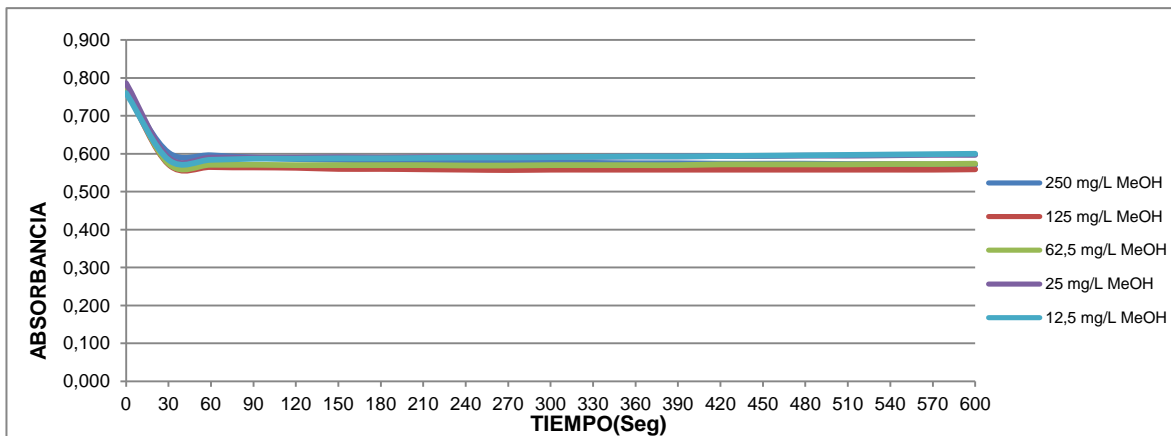
**Anexo 1. Cinética del Ácido Ascórbico, tiempo vs absorbancia ensayo**



**DPPH\*. (Fuente: Autor)**  
**Anexo 2. Cinética de la Rutina, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*.**  
**(Fuente: Autor)**



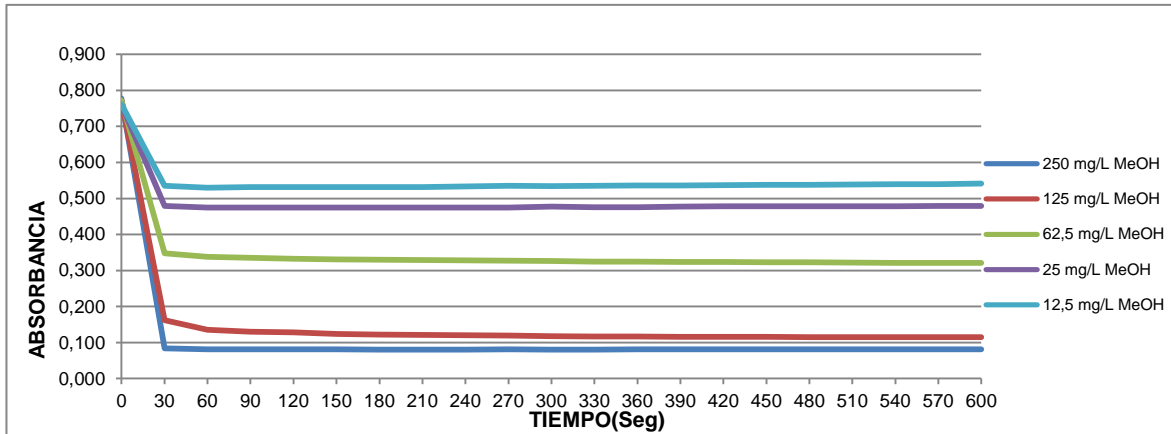
**Anexo 3. Cinética del extracto éter de petróleo, tiempo vs absorbancia**



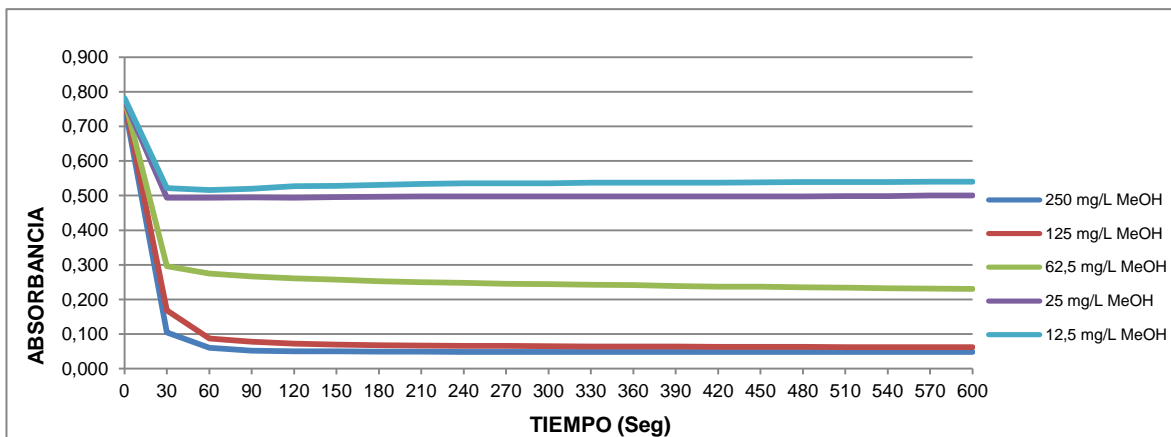
**ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**

**Anexo 4. Cinética del extracto diclorometano, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**

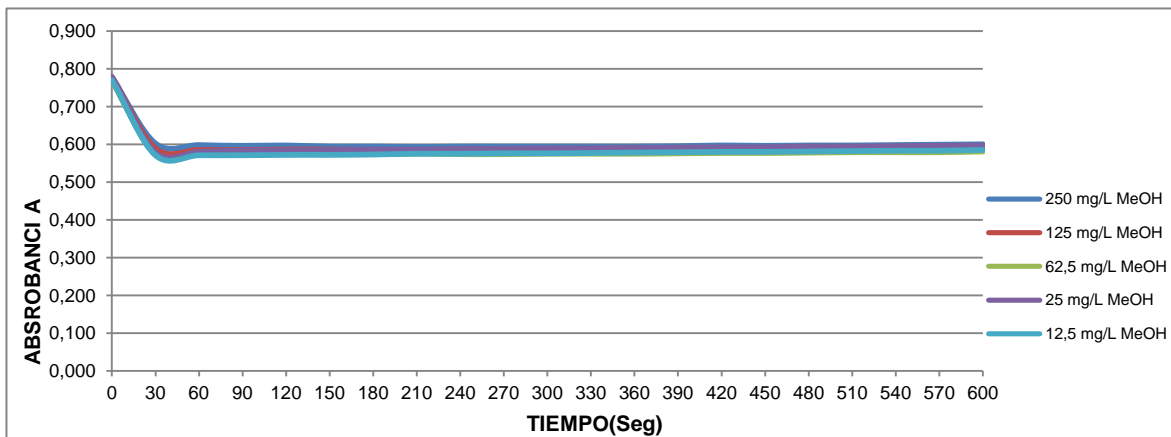




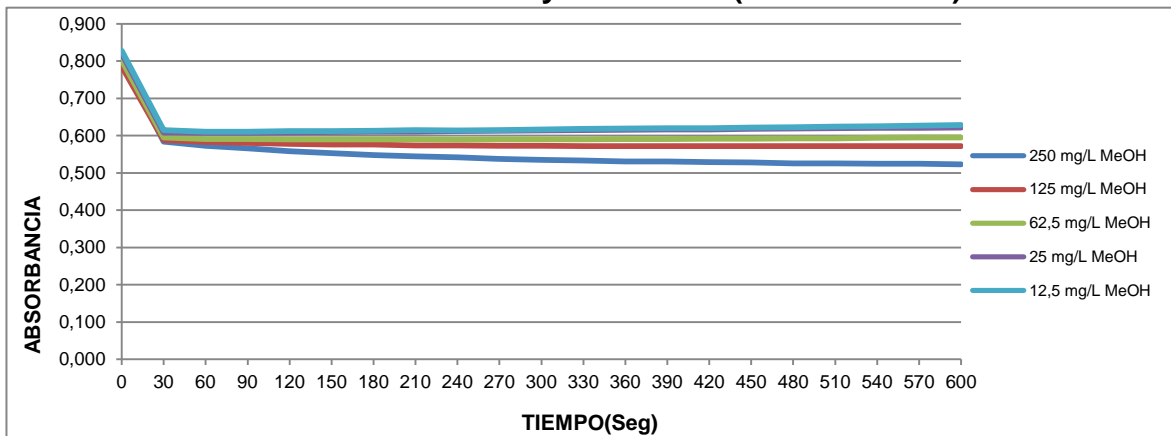
**Anexo 5. Cinética del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**



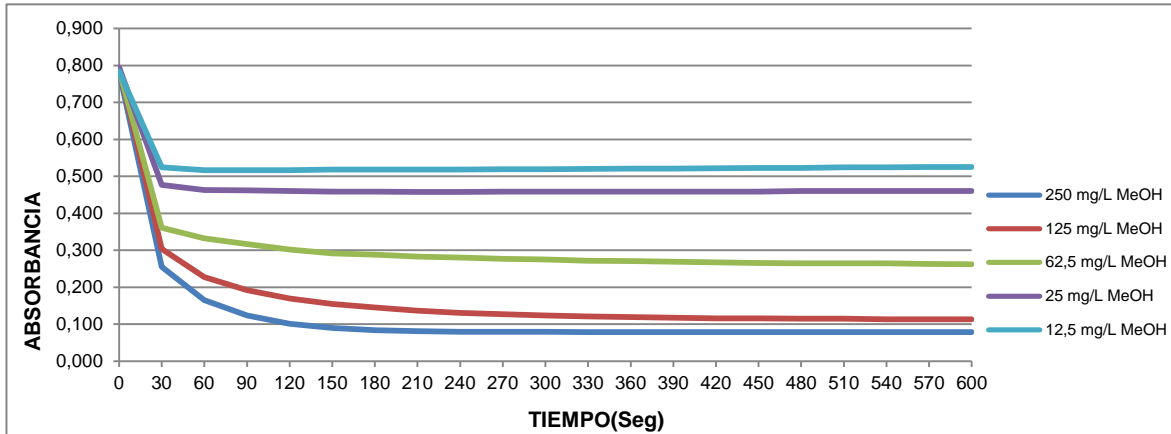
**Anexo 6. Cinética del extracto etanólico, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**



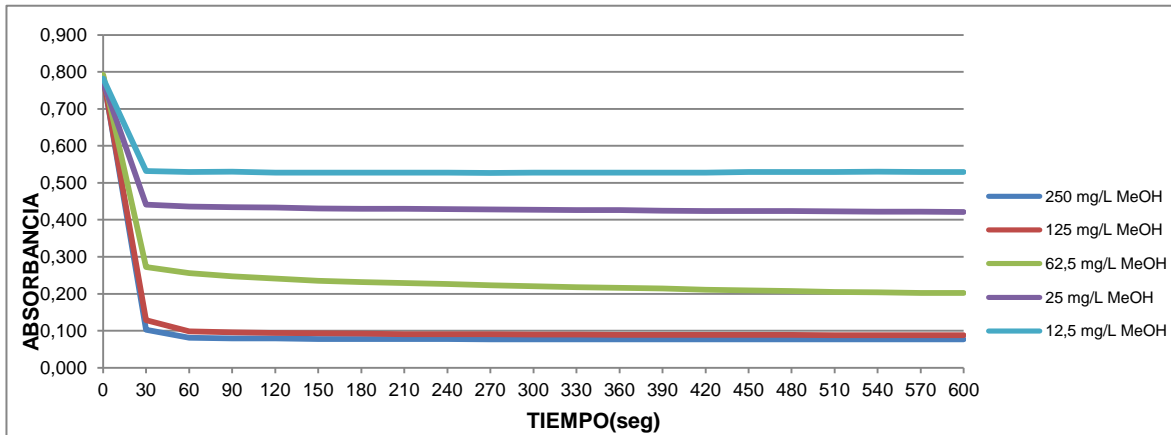
**Anexo 7. Cinética de la fracción éter de petróleo del extracto petrol, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*\*+. (Fuente: Autor)**



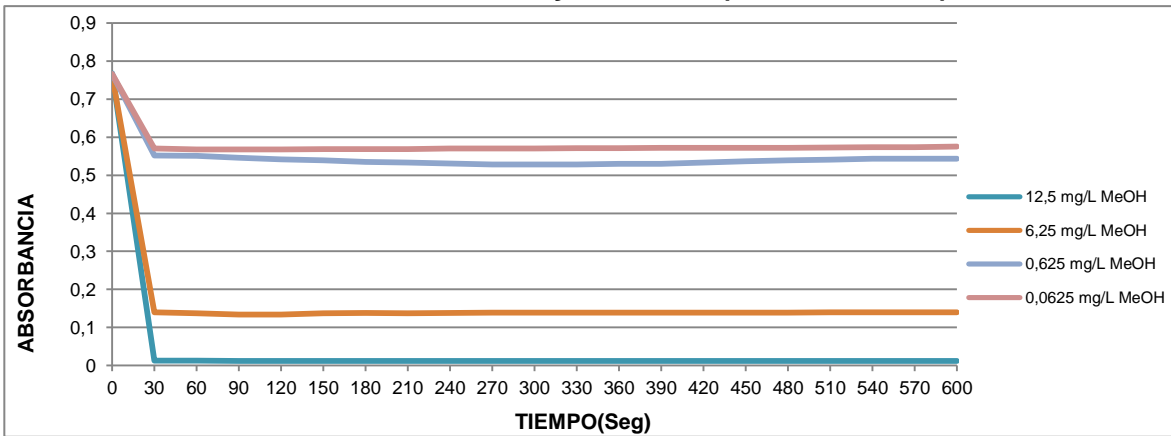
**Anexo 8. Cinética de la fracción diclorometano del extracto diclorometano, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**



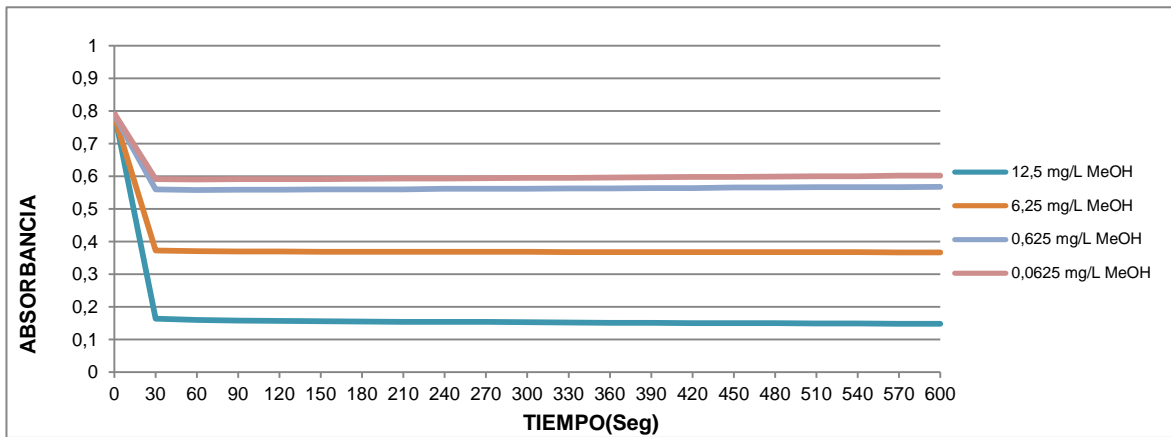
**Anexo 9. Cinética de la fracción acetato de etilo del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**



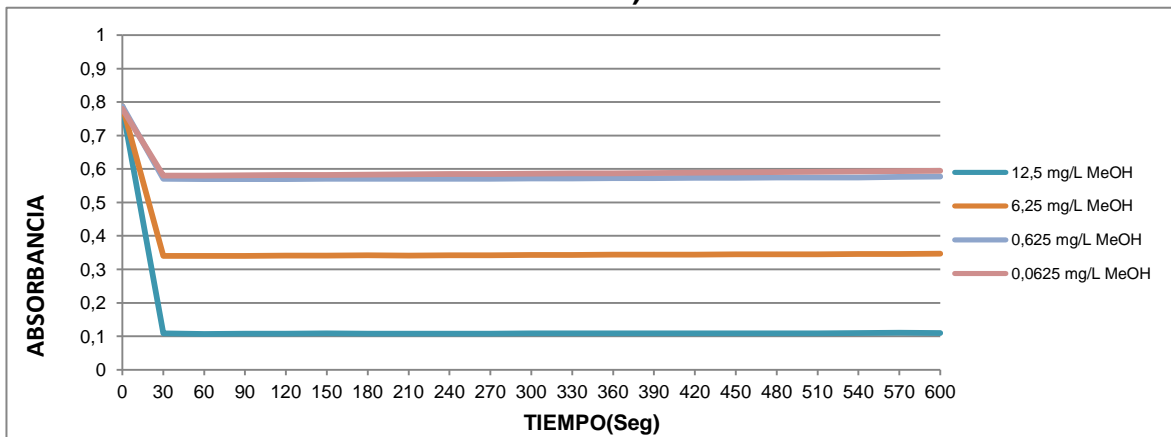
**Anexo 10. Cinética de la fracción metanólica del extracto etanólico, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**



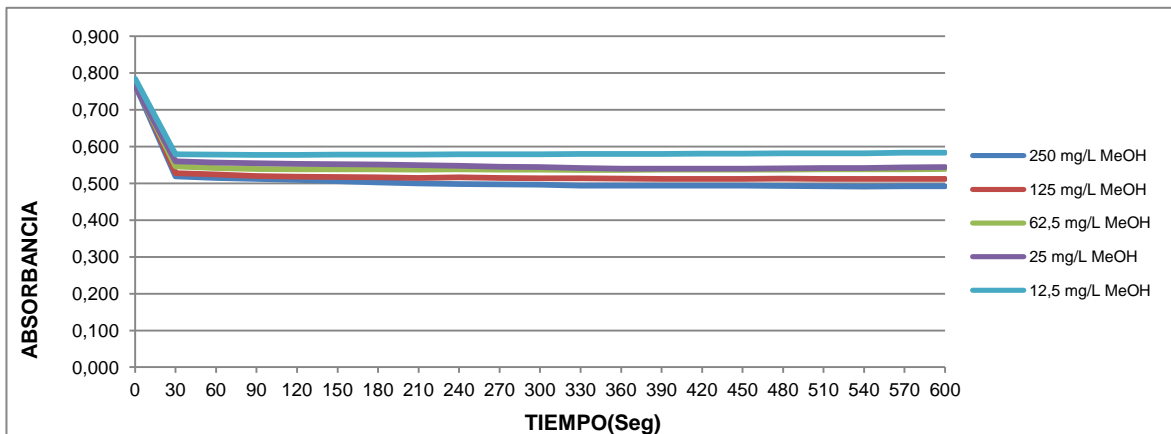
**Anexo 11. Cinética Ácido Ascórbico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS\*\*. (Fuente: Autor)**



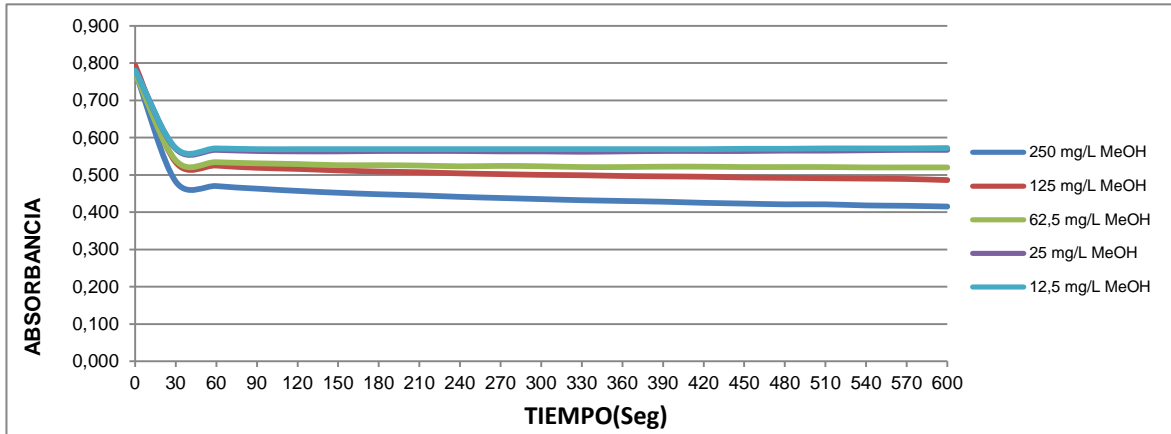
**Anexo 12. Cinética Rutina, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**



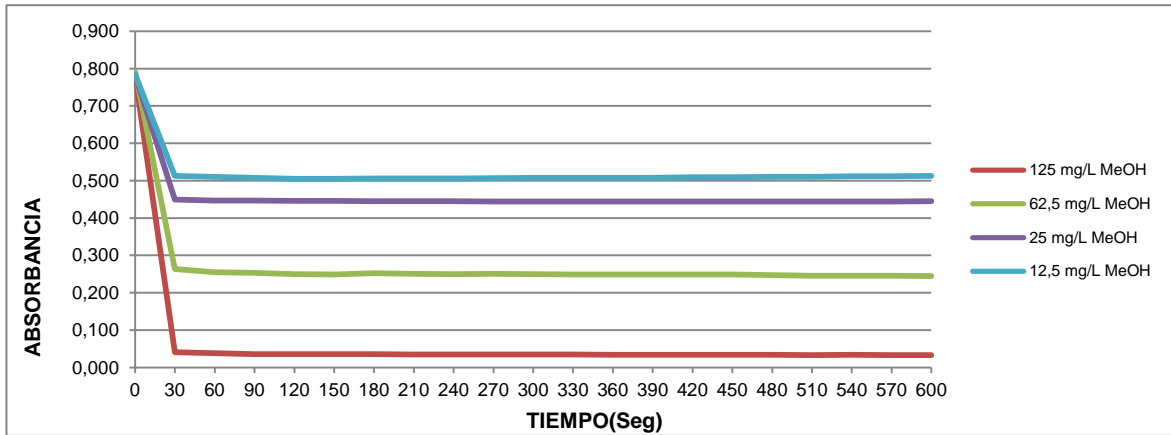
**Anexo 13. Cinética trolox, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**



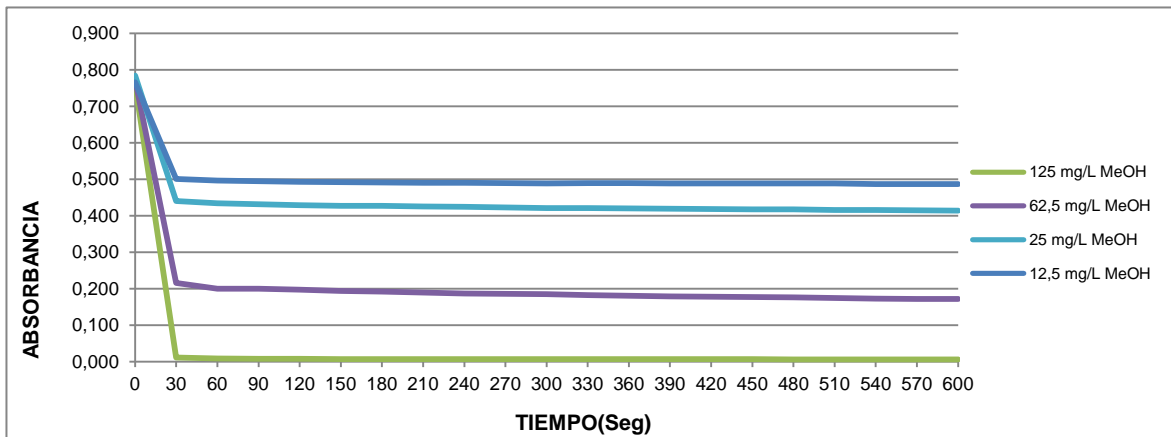
**Anexo 14. Cinética del extracto éter de petróleo, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**



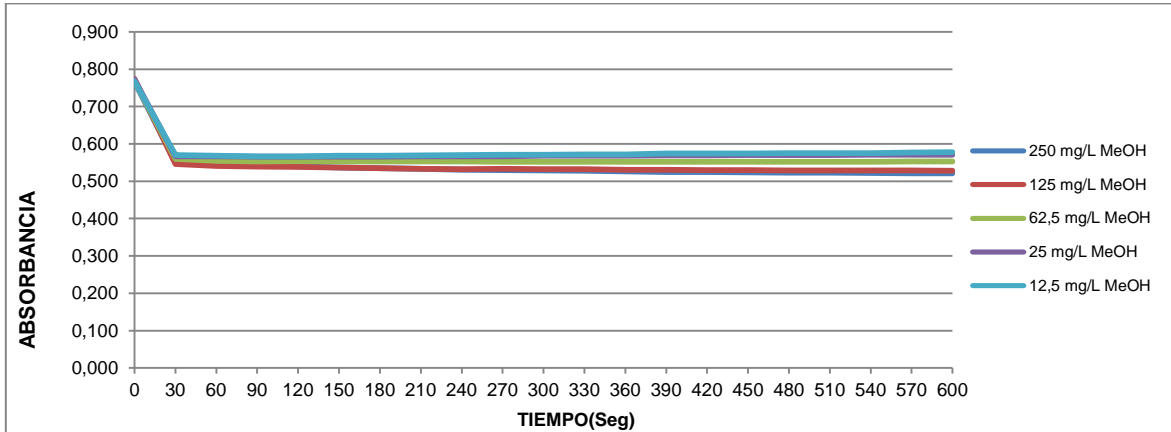
**Anexo 15. Cinética del extracto diclorometano, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**



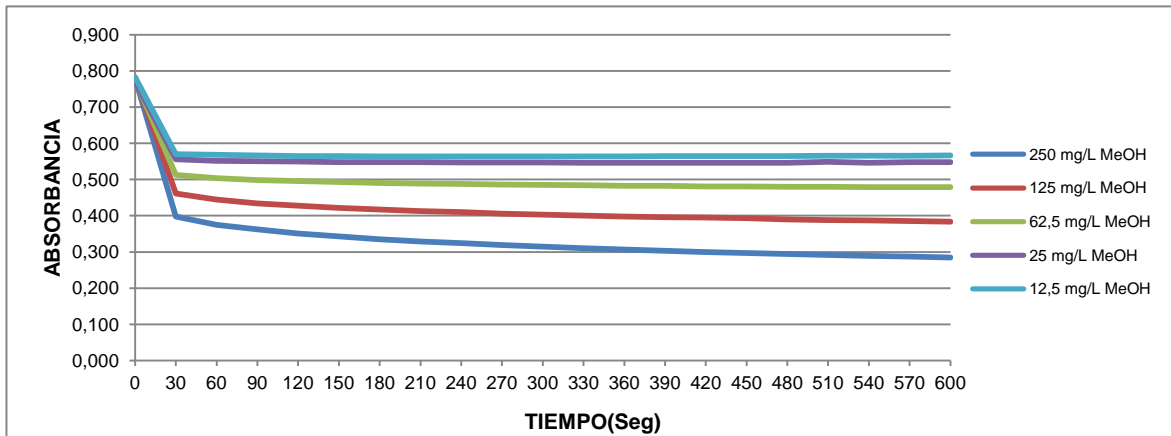
**Anexo 16. Cinética del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**



**Anexo 17. Cinética del extracto etanólico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**

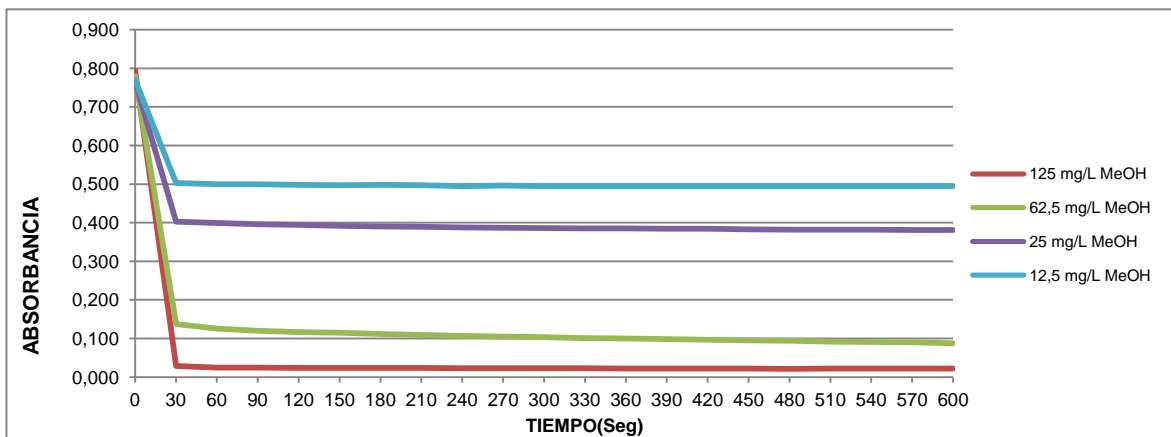


**Anexo 18. Cinética de la fracción éter de petróleo del extracto petrol, tiempo**



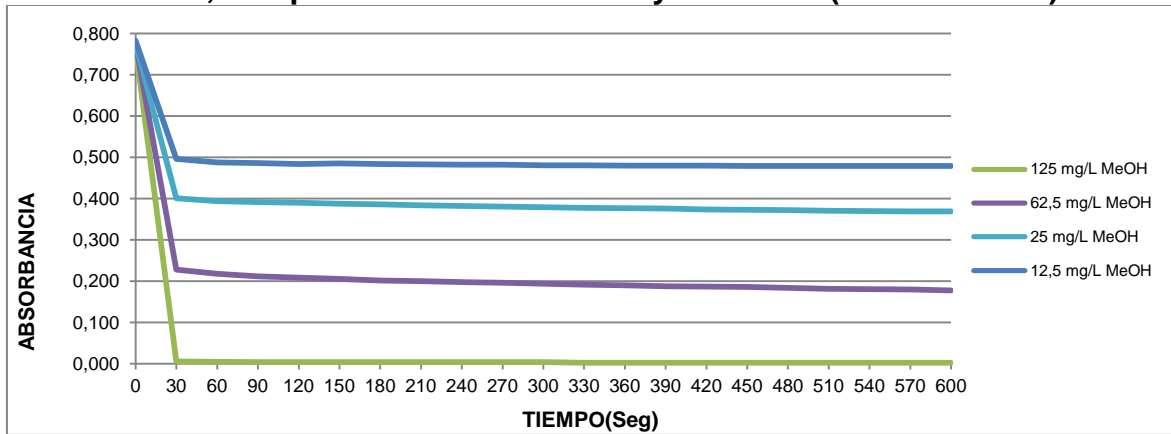
**vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**

**Anexo 19. Cinética de la fracción diclorometano del extracto diclorometano,**



**tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**

**Anexo 20. Cinética de la fracción acetato de etilo del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**



**Anexo 21. Cinética de la fracción metanólica del extracto etanólico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**

