

EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE Y ANTITOPISOMERASA DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE LA ECORREGIÓN CAFETERA COLOMBIANA

Fecha de recepción: 19 de noviembre de 2014 • Fecha de aceptación: 18 de diciembre de 2014

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND ANTI-TOPISOMERASE ACTIVITIES OF PLANTS EXTRACTS FROM THE COLOMBIAN COFFEE ECORREGION

Andrés Gaviria¹ • Clara E. Correa¹ • Oscar M. Mosquera¹ • Jaime Niño¹ • Yaned M. Correa²

RESUMEN

De la parte aérea de 29 especies de plantas recolectadas en la Ecorregión Cafetera Colombiana se obtuvieron por maceración pasiva los extractos de diclorometano y metanol a los cuales se les determinó la actividad antitopisomerasa empleando cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* por el método de difusión en agar; adicionalmente, se les evaluó la capacidad captadora de radicales libres por los métodos de los radicales 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH*) y ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS*⁺). Así mismo, se determinó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu a todos los extractos que presentaron capacidad antioxidante igual o superior al 25% en el ensayo de DPPH*. Se encontraron 8 extractos de diclorometano y 15 de metanol con actividad antioxidante superior al 25% y alto contenido de fenoles totales. Los extractos de metanol de *Hyeronima* sp. y *Acalypha diversifolia* (Euphorbiaceae) presentaron los porcentajes de actividad antioxidante más altos con valores de 41.83% (45.56 $\mu\text{molTrolox/g}$ extracto) y 41.79% (45.51 $\mu\text{molTrolox/g}$ extracto) mediante el método del DPPH*, respectivamente. Ninguno de los extractos evaluados mostró actividad antitopisomerasa a través del método empleado.

Palabras clave: ADN interacción, ABTS*⁺, Bioprospección, DPPH*, Fenoles totales.

- 1 Grupo de Biotecnología-Productos Naturales, Escuela de Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- 2 Departamento de Química, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

ABSTRACT

From the aerial parts of 29 plant species collected in the Colombian Coffee Ecorregion, dichloromethane and methanol extracts were obtained. Their antitopoisomerase activity was determined by the agar well diffusion method using mutated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Moreover antioxidant capacity of the extracts was measured by the 2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH*) free radical method and the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS*+). Furthermore, the total phenol content by the Folin-Ciocalteu method was determined, to those extracts which exhibited activity superior or equal to 25% of in the DPPH* assay. It was found 8 dichloromethane and 15 methanol extracts with antioxidant activity superior to 25% and high content of total phenols. The methanol extracts of *Hyeronima* sp. and *Acalypha diversifolia* (Euphorbiaceae) presented the highest antioxidant activities percentages with values of 41.83% (45.56 $\mu\text{molTrolox/g}$ extract) and 41.79% (45.51 $\mu\text{molTrolox/g}$ extract) through the DPPH assay respectively. None of the extracts showed antitopoisomerase activity with the used method.

Keywords: ABTS*+, bioprospection, DNA interaction, DPPH, total phenols.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013), las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) constituyen la primera causa de muerte en todo el mundo y contribuyen con el 63% de la mortalidad general. Una de las ECNT con mayor índice de mortalidad es el cáncer, con 7.6 millones de muertes anuales y del cual se estima que cada año se presentan más de 11 millones de casos nuevos en el mundo (Ministerio de Salud y Protección Social, 2012). El crecimiento y multiplicación anormal de células carcinógenas se debe en gran parte al daño irreversible al ADN que puede ser originado por radiaciones (siendo la UV la más conocida), hidrólisis espontáneas de moléculas biológicamente importantes, sustancias químicas exógenas (como el venzo[α]pireno del cigarrillo) y productos endógenos derivados del metabolismo tales como productos de peroxidación lipídica, agentes alquilantes, metabolitos de colesterol y estrógenos (Hoeijmakers 2009) y

los radicales libres; estos por su naturaleza altamente oxidante, pueden inducir también daños a lípidos, proteínas y enzimas, además de desencadenar diversas reacciones desfavorables en las células (Rivero et al. 2003, Moon & Shibamoto 2009).

El estrés oxidativo se debe a un desbalance entre factores pro-oxidantes y antioxidantes debido a múltiples componentes que podrían inducir daño celular. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas como producto del metabolismo celular, principalmente a nivel mitocondrial, son determinantes en el estrés oxidativo. Para prevenir o retrasar el daño producido por las ROS, la célula posee enzimas como mecanismo de defensa (Vurusaner et al. 2012).

Diversos estudios llevados a cabo en los últimos años, han puesto de manifiesto el poder antioxidante de algunos compuestos fenólicos presentes en las plantas y particularmente los que abundan en las especies comestibles (Ko et al. 2008). Esta propiedad

antioxidante se asocia con su capacidad para capturar radicales libres, los cuales inducen un efecto positivo y benéfico en la salud (Parekh & Chanda 2007). En este sentido, son numerosos los trabajos que muestran la acción protectora de estos metabolitos secundarios frente a determinadas enfermedades tales como las afecciones cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer (Sabir et al. 2012).

Las plantas son una fuente inmensa de fitocompuestos con gran complejidad estructural, multiplicidad de mecanismos de acción y de actividades sobre los seres vivos. Entre estas se encuentran la prevención de enfermedades que afectan, gran parte de la población humana actual. Por ejemplo, es ampliamente conocido el papel protector de los glucosilanos, presentes en especies de la familia Brassicaceae (Frassinetti et al., 2012) y las xantonas en especies de la Euphorbiaceae (Wu et al., 2013), en la prevención del cáncer.

Dada la diversidad de la flora regional (Romero et al. 2008), se pretende encontrar, agentes que prevengan, modulen o controlen ciertas enfermedades degenerativas que afectan la población. Por ello, a partir de 29 extractos de diclorometano y metanol de plantas recolectadas en la Ecorregión Cafetera Colombiana (ECC), se evaluó la actividad anticancerígena a través de la inhibición del crecimiento de las levaduras mutadas de *Saccharomyces cerevisiae*, con el propósito de deducir su posible acción como agentes inhibidores de las topoisomerasas I y II y también se estudió la actividad antioxidante mediante la captación de radicales libres de estos extractos vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales biológicos y reactivos

Se emplearon las cepas mutadas de la levadura *S. cerevisiae* RJ03, R52Y y RS321 que fueron donadas por el grupo de investigación del Dr. David G.I. Kingston

de Virginia Polytechnic Institute and State University, (USA) con permeabilidad celular aumentada y con mayor susceptibilidad para dañar el ADN por carencia o modificación de los mecanismos de reparación del material genético (Gunatilaka et al., 1994).

Los solventes: *n*-hexano, diclorometano, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol y etanol fueron grado analítico marca Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, USA); agar, peptona y extracto de levadura fueron marca Oxoid Basingstoke (Hampshire, England); Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico), DPPH* (1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo), ABTS** (ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) y el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) fueron de la marca Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) y las cromatoplacas de Silica gel F₂₅₄ 60 mesh y 0.2 mm fueron Merck (Darmstadt, Germany).

Las absorbancias en la actividad antioxidante y el contenido fenólico de los extractos fueron determinadas en el espectrofotómetro UV-VIS light Xs marca Schott (ALÈX Cedex France).

Material vegetal

Este estudio se realizó con 29 especies de plantas, recolectadas teniendo en cuenta el acceso a genéticos No RGE 00019 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Colombia en la zona de reserva de la Ecorregión Cafetera Colombiana (ECC): Reserva Natural Bremen-La Popa (Quindío, Colombia) [4°40'40" N y 75°37'15" W] y en el Parque Regional Natural Ucumarí (Risaralda, Colombia) [4°43'22" N y 75°33'90" W], las cuales fueron clasificadas por el taxónomo F. J. Roldán y un voucher de cada una fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA) (Tabla 1).

Obtención de los extractos

De la parte aérea de cada una de las plantas recolectadas se tomaron 300 g de material vegetal seco y molido, los cuales fueron sometidos a extracción por

maceración pasiva hasta agotamiento con cada solvente, iniciando con *n*-hexano, después con diclorometano y finalmente con metanol. Los extractos correspondientes se concentraron a presión reducida a 45 °C y se almacenaron a -10 °C hasta su utilización (Niño *et al.* 2007). Para la realización de los bioensayos se emplearon los extractos de diclorometano y metanol.

Caracterización fitoquímica preliminar

Los diferentes extractos crudos fueron caracterizados mediante una marcha fitoquímica a través de cromatografía de capa delgada (CCD) de acuerdo a la metodología descrita por Wagner & Bladt (1996). Para la elución de los componentes presentes en los extractos de diclorometano se empleó el sistema *n*-hexano-acetato de etilo (70:30) y para los de metanol se utilizó el de acetato de etilo-metanol-agua (100:13,5:10). Los alcaloides, esteroides, terpenos, saponinas, fenoles y flavonoides fueron detectados mediante las siguientes reacciones de caracterización: Dragendorff, anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina 1% en ácido sulfúrico-etanol, cloruro férrico al 1% y tricloruro de aluminio al 2%, respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES

Método del DPPH*

Esta actividad se determinó por el método espectrofotométrico del radical libre difenilpicrilhidrazilo (DPPH*) siguiendo la metodología propuesta por Brand-Williams *et al.* (1995). Se tomaron 0.25 mL de la solución de los extractos a 1000 mg/L y se hicieron reaccionar con 2.0 mL de solución del DPPH* a una concentración de 20 mg/L. Después de un periodo de incubación de 30 minutos y en la oscuridad se realizaron mediciones de absorbancia a 517 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de actividad antioxidante (%AA) empleando la siguiente

Tabla 1. Especies de plantas utilizadas para determinar actividad antioxidante y antitopoisomerasa.

Familia	Especie	Voucher	
		HUA	UTP ¹
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	FJR 3964	123
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	FJR 3981	139
	<i>Baccharis</i> sp	FJR 3972	131
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	FJR 3966	125
	<i>Critoniella acuminata</i>	FJR 3968	127
Asteraceae	<i>Lepidaploa lehamannii</i>	FJR 3976	135
	<i>Mikania banisteriae</i>	FJR 3965	124
	<i>Mikania lloensis</i>	FJR 3977	136
	<i>Pentacalya urbanii</i>	FJR 3963	122
	<i>Tilesia baccata</i>	FJR 3974	133
Euphorbiaceae	<i>Acalypha diversifolia</i>	FJR 3967	126
	<i>Alchornea calophylla</i>	FJR 3969	128
	<i>Alchornea</i> sp	FJR 3982	140
Rubiaceae	<i>Hyeronima</i> sp	FJR 3971	130
	<i>Faramea</i> sp	FJR 3979	138
	<i>Guettarda crispiflora</i>	FJR 3973	132
	<i>Cestrum</i> sp.	FJR 3978	137
	<i>Depprea aff sachapapa</i>	FJR 4024	170
	<i>Dunalia solanacea</i>	FJR 3992	145
	<i>Lycianthes radiata</i>	FJR 3993	146
Solanaceae	<i>Solandra coriacea</i>	FJR 4013	164
	<i>Solanum acerifolium</i>	FJR 3961	120
	<i>Solanum cf umbellatum</i>	FJR 3962	121
	<i>Solanum lepidotum</i>	FJR 3975	134
	<i>Solanum</i> sp	FJR 3970	129
Urticaceae	<i>Solanum trachycyphum</i>	FJR 4042	188
	<i>Boehmeria bullata</i>	FJR 3989	142
	<i>Phenax uliginosus</i>	FJR 3990	143
	<i>Urera ballotaewfolia</i>	FJR 3998	150

¹ Código interno de clasificación del Grupo de Biotecnología-Productos Naturales

ecuación: $[\%AA = (A_{517 \text{ Blanco}} - A_{517 \text{ Muestra}}) / A_{517 \text{ Blanco}}] \times 100$] y en equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol/g extracto}$), calculados a partir de una curva de calibración (1, 2, 4, 6, 12 y 32 μM) de este compuesto. Como control positivo se empleó hidroquinona a 1000 mg/L. Todas las mediciones se realizaron por triplicado con dos repeticiones. Los extractos vegetales se consideraron activos en este ensayo si el porcentaje de actividad era igual o superior al 25%.

Método del ABTS^{•+}

Se determinó la actividad antioxidante por el método del ABTS^{•+} de acuerdo al protocolo descrito por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. El catión radical del ABTS (ABTS^{•+}) se generó al preparar 5 mL de una solución acuosa 7mM ABTS y 2.45 mM de persulfato de potasio. La mezcla se dejó reaccionar por 16 h a temperatura ambiente y después se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. Se tomaron 30 μL del extracto a 1000 mg/L y se dejaron reaccionar con 1870 mL de la solución del radical ABTS^{•+} en la oscuridad. La disminución de la absorbancia a 734 nm fue medida a los 30 minutos. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad antioxidante empleando la siguiente ecuación: $[\%AA = (A_{734 \text{ Blanco}} - A_{734 \text{ Muestra}}) / A_{734 \text{ Blanco}}] \times 100$] y en equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol/g extracto}$), los cuales fueron calculados a partir de una curva de calibración (1, 2, 4, 6, 12 y 32 μM). Como control positivo se empleó hidroquinona a 1000 mg/L.

Determinación de fenoles totales

Se siguió el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, según lo descrito por Singleton & Rossi (1965) y Cardeño *et al.* (2007). En este procedimiento 50 μL de la solución del respectivo extracto vegetal a 1000 mg/L se hicieron reaccionar con 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua (1:1) después de un minuto se adicionaron 750 μL de Na_2CO_3 al 20% mezcla que fue aforada a 5 mL con agua destilada

y después de 30 minutos en la oscuridad se midieron las absorbancias a 760 nm,. Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (mg/mg extracto) de acuerdo con la curva de calibración obtenida a las siguientes concentraciones 0, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 $\mu\text{g/mL}$. Todas las mediciones se realizaron por triplicado con dos repeticiones.

Actividad antitopoisomerasa con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mutadas

Las cepas de levadura mutada fueron cultivadas en agar y caldo YPD (Extracto de levadura, peptona y dextrosa). El caldo con cada cepa de levadura se diluyó con solución salina isotónica hasta ajustar una dilución del 25% de transmitancia a 600 nm. Un mL de estas soluciones se sembraron por profundidad en cajas de Petri; en el agar solidificado, se perforaron 7 pozos simétricos, a los cuales se les adicionó 20 μL de la dilución de cada extracto a las concentraciones de 4000, 2000, 1000, 500 y 250 mg/L, junto con los controles positivo (nistatina) y negativo (solventes usados para disolver los respectivos extractos) (Ríos *et al.* 1988). Las cajas Petri así preparadas, se incubaron a 30 °C y a las 24 horas se midieron los respectivos halos de inhibición, con el fin de calcular el IC_{12} (Gunatilaka *et al.* 1994). Mediante un análisis de regresión lineal de la concentración y los halos de inhibición se calcula el IC_{12} (Concentración de extracto que produzca un halo de inhibición de 12 mm de diámetro) (Gunatilaka *et al.*, 1994; Zhout *et al.*, 2000 y Hosein *et al.*, 2002). Todos los análisis se realizaron por triplicado y con dos repeticiones.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos para los experimentos realizados representan la media de tres repeticiones y fueron comparados por análisis de variancia (ANOVA) y análisis de regresión mediante los programas Infostat versión libre y Microsoft Excel 2010. Diferencias de $p=0.05$ fueron consideradas significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A través de la caracterización fitoquímica preliminar se evidenció que los extractos de metanol de la familia Solanaceae presentaron alcaloides; adicionalmente, los extractos de diclorometano de la misma familia mostraron esteroides en gran proporción (de acuerdo a la intensidad y cantidad de las manchas detectadas en las cromatoplasmas) presentadas con respecto a las demás especies estudiadas pertenecientes a otras familias. Por otro lado, en las especies evaluadas de la familia Euphorbiaceae se detectaron esteroides, saponinas, fenoles, flavonoides y taninos destacándose como una de las familias que posee un número importante de especies con abundancia de metabolitos secundarios (MS); situación contraria a la observada para las especies estudiadas de las familias Apocynaceae, Asclepiadaceae y Rubiaceae, las cuales mostraron menos de estos MS (Tabla 2).

Los porcentajes de actividad antioxidante por el método del DPPH* de los extractos de metanol y diclorometano se presentan en las figuras 1 y 2, respectivamente. El 51.7% de los extractos de metanol evaluados presentaron un porcentaje de actividad antioxidante (%AA) superior al 25%, los cuales se consideraron activos. Por otro lado, el porcentaje de extractos activos de diclorometano solo fue del 29.6%. Éstos resultados son coherentes con los obtenidos por Hussein et al. (2013) quienes reportaron que la actividad antioxidante por los métodos de DPPH* y ABTS*+ fue mayor en los extractos polares que en los de mediana o baja polaridad.

Las familias Euphorbiaceae y Asteraceae mostraron la mayor capacidad antioxidante del conjunto de los extractos metanólicos evaluados. Todos los extractos estudiados de la familia Euphorbiaceae resultaron activos y fueron los que presentaron los porcentajes de actividad antioxidante más altos. Las especies pertenecientes a la familia

Euphorbiaceae, *Acalypha diversifolia* (UTP-126), *Alchornea calophylla* (UTP-128), *Alchornea grandis* (UTP-140) e *Hyeronima* sp (UTP-130) tuvieron los valores más destacados en los bioensayos por los métodos de la actividad antioxidante de DPPH* y ABTS*+. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Peng et al. (2006) quienes reportaron que los extractos polares de plantas de la familia Euphorbiaceae tuvieron una capacidad antioxidante prominente a través del ensayo del DPPH*. Asimismo, los extractos de baja y alta polaridad de *Alchornea laxiflora* (Euphorbiaceae) presentaron fuerte actividad antioxidante, la cual puede ser atribuida a terpenoides y compuestos fenólicos presentes en ellos (Farombi et al. 2003). De igual manera, los taninos, flavonoles y terpenoides constituyentes de los extractos de etanol y acetona de *Acalypha indica* se consideraron los responsables de la actividad antioxidante de esta especie (Ramya et al. 2010).

Relacionando los resultados de la caracterización fitoquímica con los de la actividad antioxidante, se evidenció que los extractos metanólicos de las plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae evaluados mostraron presencia de fenoles, flavonoides y taninos (Tabla 2) a los cuales de manera general se les puede atribuir la importante capacidad captadora de radicales libres (Cakir et al. 2003).

También, es de destacar que en la familia Asteraceae se detectaron especies con marcada actividad antioxidante tales como *Clibadium pentaneuron* (UTP-125) y *Pentacalya urbanii* (UTP-122); estos resultados correlacionan con lo reportado para cinco variedades de lechuga (Asteraceae) en los que se encontró que los principales responsables de sus actividades biológicas eran compuestos polifenólicos derivados del ácido caféico (Llorach et al. 2008); de igual manera, para especies del género *Helichrysum* (Asteraceae) la actividad antioxidante se atribuyó al ácido clorogénico y al 7-glucosido de apigenina (Albayrak et al. 2010).

Tabla 2. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de metanol y diclorometano.

Familia	Nombre Científico	N° UTP	METABOLITOS SECUNDARIOS													
			Alcaloides		Esteroles y triterpenos		Saponinas		Fenoles		Flavonoides		Taninos			
			M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D		
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	139	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Baccharis</i> sp	131	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	125	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Critoniella acuminata</i>	127	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Lepidaploa lehamannii</i>	135	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Asteraceae	<i>Mikania banisteriae</i>	124	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	<i>Mikania lloensis</i>	136	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pentacalya urbanii</i>	122	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Tilesia baccata</i>	133	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Acalypha diversifolia</i>	126	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Euphorbiaceae	<i>Alchornea calophylla</i>	128	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Alchornea</i> sp	140	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>Hyeronima</i> sp	130	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Rubiaceae	<i>Faramea</i> sp	138	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	<i>Guettarda cri</i>	132	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Esto permite destacar a las familias Euphorbiaceae y Asteraceae como una fuente promisoría de moléculas para la captación de radicales libres y su

uso potencial como agentes antioxidantes. La actividad antioxidante fue significativamente mayor tanto para los extractos metanólicos y de diclorometano

Solanaceae	<i>Cestrum</i> sp	137	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	<i>Depprea aff sachapapa</i>	170	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	<i>Dunalia solanacea</i>	145	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
	<i>Lycianthes radiata</i>	146	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	<i>Solandra coriacea</i>	164	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
	<i>Solanum acerifolium</i>	120	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
	<i>Solanum cf umbellatum</i>	121	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
	<i>Solanum lepidotum</i>	134	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Solanum</i> sp	129	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Solanum trachycyphum</i>	188	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
Urticaceae	<i>Boehmeria bullata</i>	142	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
	<i>Phenax uliginosus</i>	143	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
	<i>Urera ballotaewfolia</i>	150	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
Controles positivos														
			Papaverina	Hecogenina y Estigmasterol	Prostosaponina de Dioscina A	Resorcinol	Kaempferol	Ácido tánico						

* (+) Presencia; (-) Ausencia; M:MeOH; D: DCM

por el método de ABTS^{•+} que por el de DPPH[•] (Tabla 3), esto correlaciona con resultados similares reportados por Floegel *et al.* (2011) quienes consideraron que el método de ABTS^{•+} mostró mayor sensibilidad al ser aplicado en extractos de alimentos de origen vegetal que contenían compuestos antioxidantes hidrófilos, lipófilos y altamente pigmentados en comparación con método de DPPH[•].

Determinación de los fenoles totales

En las figuras 3 y 4 se muestran los contenidos de los fenoles totales para los extractos metanólicos y de diclorometano, respectivamente de las especies que presentaron actividad oxidante superior al 25% a través del método de DPPH[•].

Para los extractos metanólicos se observó que las especies con mayores porcentajes de actividad

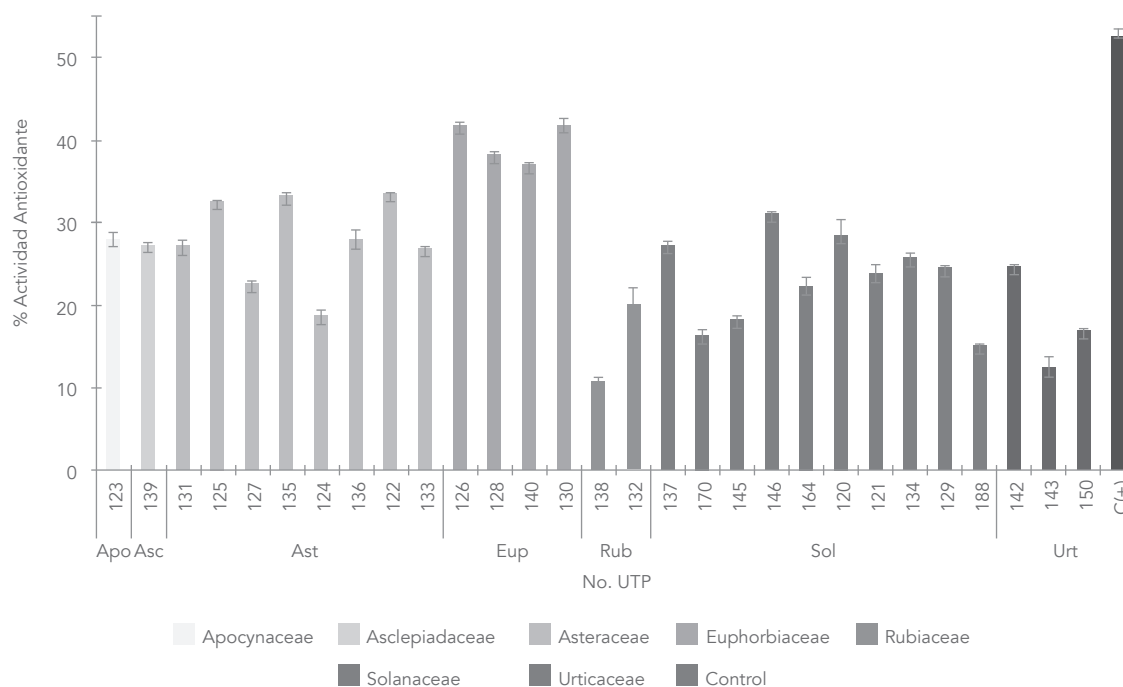


Figura 1. Porcentaje de la actividad antioxidante a través del método de DPPH• de los extractos metanólicos de las 29 especies de plantas estudiadas.

antioxidante también fueron las que presentaron los contenidos de fenoles más altos basados en los equivalentes de ácido gálico (figuras 3 y 4), lo cual demuestra que la marcada actividad antioxidante presentada por los extractos de metanol de estas especies se debe principalmente a este tipo de metabolitos.

Al correlacionar los resultados de capacidad antioxidante expresados como $\mu\text{molTrolox/g}$ extracto con el contenido de fenoles totales de las muestras, se encontró un coeficiente de correlación de 0.707 para los extractos metanólicos (Figura 5) por el método del DPPH•; mientras que para los evaluados por el método del ABTS•+ dicho coeficiente fue de 0.75 (Figura 6); esto permite inferir que el contenido de fenoles de las especies evaluadas correlaciona de manera directa con la actividad antioxidante que presentaron estos mismos extractos.

Este estudio mostró una relación significativamente mayor entre el contenido de fenoles totales y el ensayo de ABTS•+ que con el de DPPH•, lo cual correlaciona con lo encontrado en otros estudios (Dudonné *et al.* 2009, Samaniego *et al.* 2007). La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, las cuales juegan un papel importante neutralizando los radicales libres a nivel celular (Javanmardi *et al.* 2003).

Con este estudio se evidenció que la mayor capacidad antioxidante la presentaron los MS constituyentes de los extractos de mayor polaridad de las plantas estudiadas.

Actividad antitopoisomerasa

Ninguno de los extractos de metanol ni de diclorometano de las 29 especies de plantas evaluadas

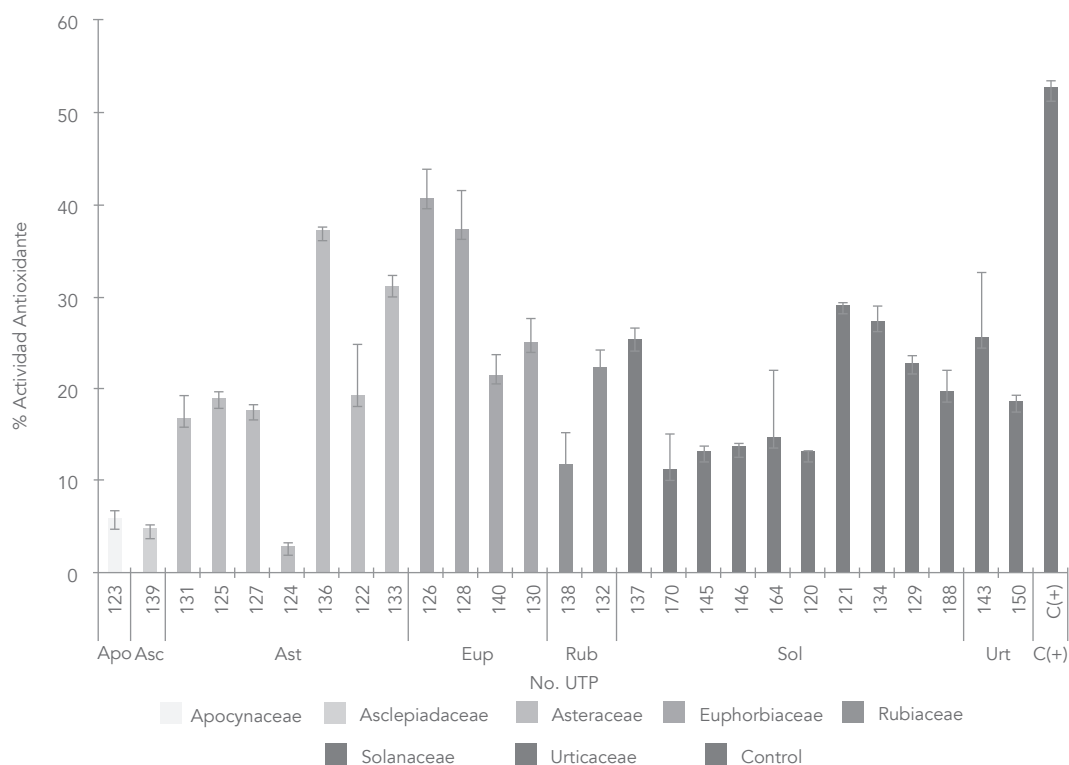


Figura 2. Porcentaje de la actividad antioxidante a través del método de DPPH• de los extractos de diclorometano de las 29 especies de plantas estudiadas.

presentó actividad antitopoisomerasa significativa sobre las cepas mutadas de *S. cerevisiae* empleadas. En varias investigaciones en las cuales se han analizado un número considerable de plantas o compuestos puros el número de los que han presentado esta actividad biológica no ha sido significativo. Por ejemplo, en la investigación realizada por Correa et al. (2007), de 51 extractos de diclorometano de diferentes especies de plantas analizadas sobre la inhibición de ADN, solo el 7.8% mostraron actividad apreciable. En otros estudios realizados por Yuan et al. (2007) sobre *Cnidocolus texanus* (Euphorbiaceae) se lograron aislar 26 compuestos, entre los cuales se hallaban 15 flavonoides de los cuales todos fueron inactivos frente a la topoisomerasa I.

CONCLUSIONES

En total se encontraron 8 extractos de diclorometano y 15 de metanol con actividad antioxidante. Los extractos metanólicos de las plantas *Hyeronima* sp y *Acalypha diversifolia* (Euphorbiaceae) tuvieron los porcentajes de actividad antioxidante más altos del conjunto de los extractos de las plantas evaluadas: 41.83% (45.56 $\mu\text{molTrolox/g}$ extracto) y 41.79% (45.51 $\mu\text{molTrolox/g}$ extracto), respectivamente.

El presente trabajo es un aporte a la bioprospección de la flora de la Ecorregión Cafetera Colombiana y un avance en la búsqueda de moléculas con actividad antioxidante que podrían ser empleadas para prevenir o para desarrollar nuevos agentes anticancerígenos.

Tabla 3. Actividad Antioxidante de los extractos de diclorometano y metanol más activos por los métodos de ABTS^{•+} y DPPH[•].

Familia	Nombre Científico	No. UTP	ABTS ^{•+} (μmol/g extracto)		DPPH [•] (μmol/g extracto)		Fenoles Totales (mg ácido gálico/mg de extracto)	
			DCM	MeOH	DCM	MeOH	DCM	MeOH
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	123	----	184,39	----	30,98	----	0,046
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	139	----	253,61	----	30,08	----	0,081
	<i>Baccharis</i> sp	131	----	295,94	----	29,80	----	0,049
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	125	----	498,55	----	35,77	----	0,150
Asteraceae	<i>Lepidaploa lehamanii</i>	135	----	411,03	----	36,20	----	0,065
	<i>Mikania lloensis</i>	136	59,09	267,78	40,50	30,65	-0,003	0,030
	<i>Penta calyaurbanii</i>	122	----	508,67	----	36,63	----	0,188
	<i>Tilesia baccata</i>	133	63,31	252,43	34,00	29,66	0,018	0,060
	<i>Acalypha diversifolia</i>	126	142,57	835,99	44,24	45,51	0,031	0,424
Euphorbiaceae	<i>Alchornea calophylla</i>	128	149,06	837,42	40,61	41,65	0,027	0,314
	<i>Alchornea grandis</i>	140	----	827,31	----	40,40	----	0,158
	<i>Hyeronima</i> sp	130	----	467,95	----	45,56	----	0,187
	<i>Cestrum</i> sp	137	131,18	----	27,69	----	0,011	----
	<i>Lycianthes radiata</i>	146	----	295,69	----	34,06	----	0,065
Solanaceae	<i>Solanum acerifolium</i>	120	----	255,05	----	31,21	----	0,060
	<i>Solanum cf umbellatum</i>	121	254,54	----	31,92	----	0,03	----
	<i>Solanum lepidotum</i>	134	152,01	----	29,98	----	0,010	----
Urticaceae	<i>Phenax uliginosus</i>	143	261,03	----	28,01	----	0,037	----
Control positivo (Hidroquinona)			833,29		57,14		-----	

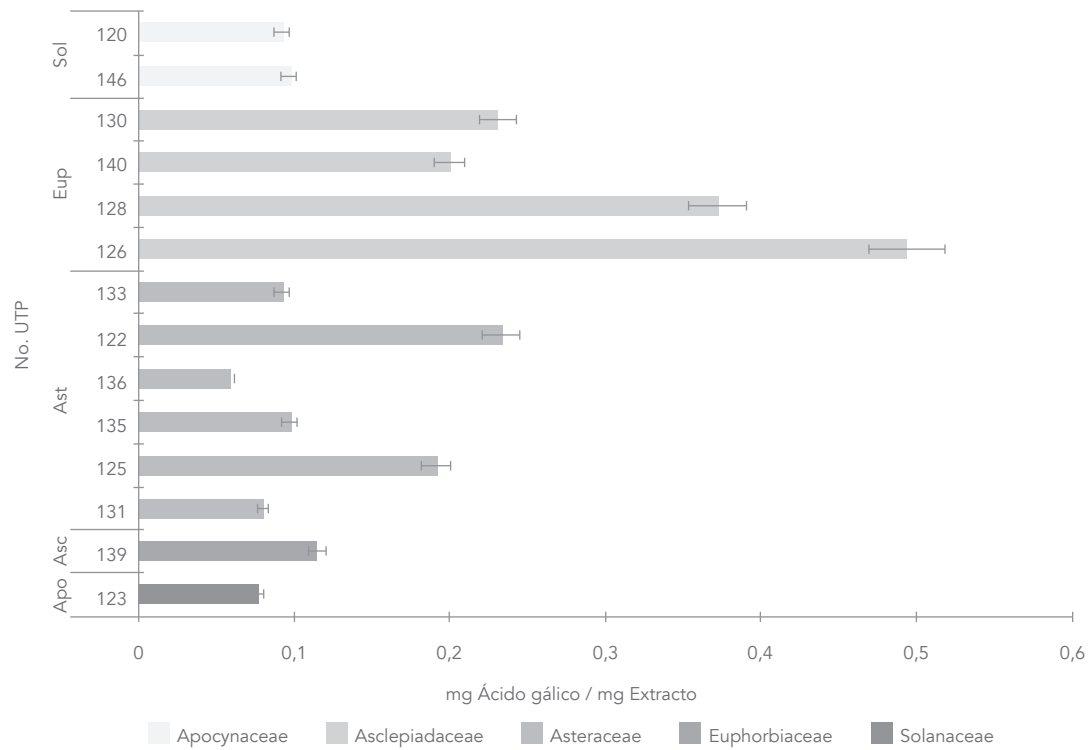


Figura 3. Contenido de fenoles totales para los extractos metanólicos con actividad antioxidante superior al 25%.

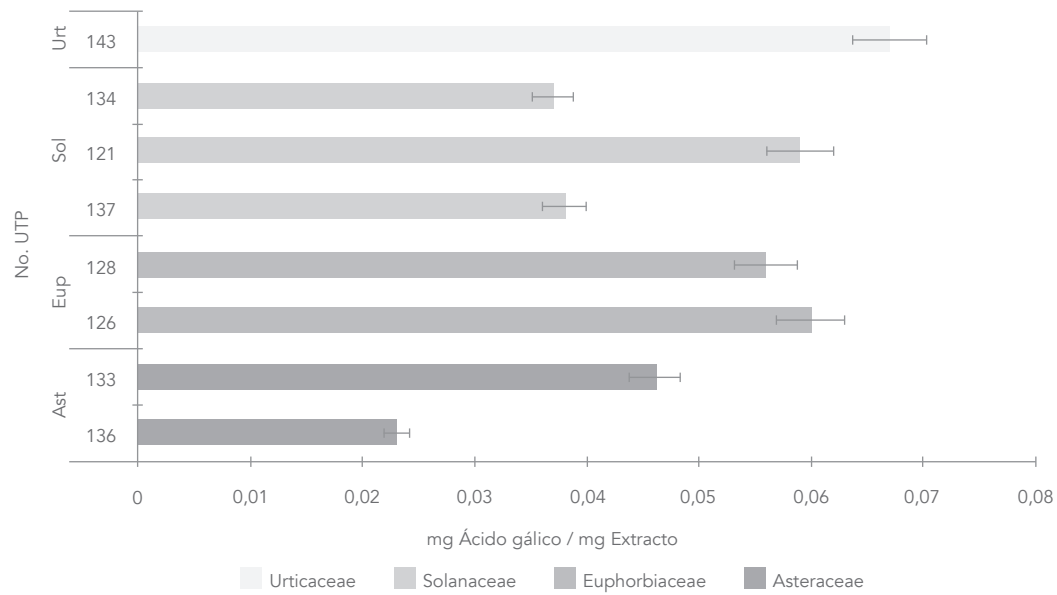


Figura 4. Contenido de fenoles totales para los extractos de diclorometano con actividad antioxidante superior al 25%.

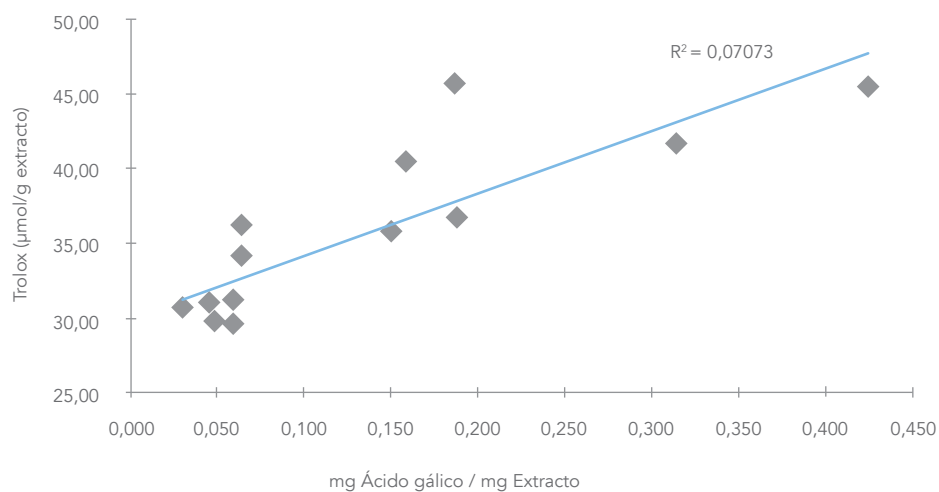


Figura 5. Correlación entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante para los extractos metanólicos por el método del DPPH*.

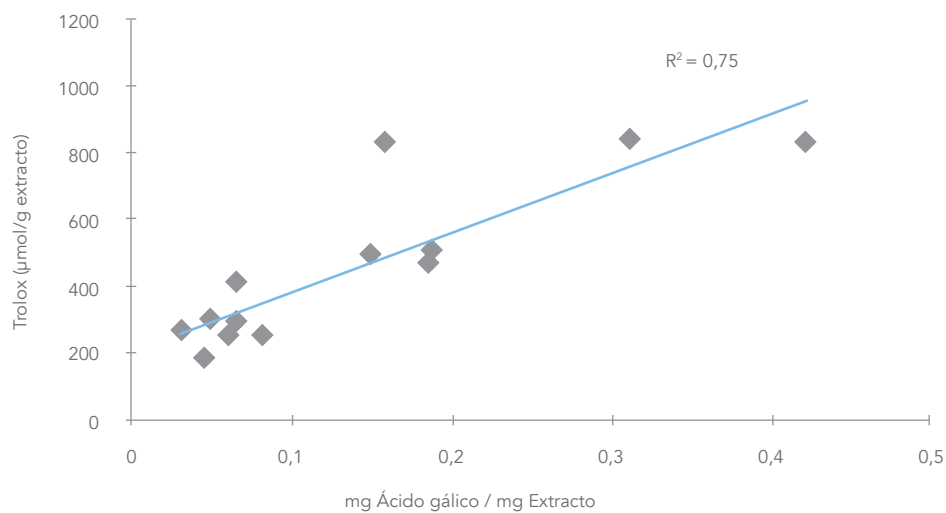


Figura 6. Correlación entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante para los extractos metanólicos por el método del ABTS**.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) y al Centro de Excelencia CIEBREG por el apoyo financiero RGE 00019 Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Colombia; así mismo, a las Corporaciones Autónomas Regionales de Risaralda (CARDER) y

del Quindío (CRQ), por conceder los permisos para coleccionar el material vegetal. Al igual que a Kingston D (Virginia Polytechnic Institute and State University, VA, USA) por obsequiar las cepas mutadas de *S. cerevisiae* RJ03, R52Y y RS321 utilizadas en este trabajo.

REFERENCIAS

1. Albayrak S., Aksoy A., Sagdic O & Hamzaoglu E. 2010. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*. 119: 114–122.
2. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K & Waler. 2006. *Introducción a la biología celular* 2 ed, p. 170-177. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
3. Brand - Williams W., Cuvelier M & Berset C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 28: 25-30.
4. Cakir A., Mavi A., Yildirim A., Duru ME., Harmandar M & Kazaz C. 2003. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hypopifolium* L. by activity-guided fractionation. *J Ethnopharmacol*. 87: 73–83.
5. Cardeño A., Molina M., Miranda I., Tafurt G., Martínez J & Stashenko E. 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica*. 33: 205-207.
6. Correa Y., Niño J & Mosquera O. 2007. Inhibición del ADN por extractos vegetales de plantas de la Ecorregion Cafetera. *Scientia et Technica*. 33: 423-424.
7. Deweese J & Osheroff N. 2009. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Research*. 37: 738-748.
8. Dudonne S., Vitrac X., Coutiere P, Woillez M & Merillon JM. 2009. Comparative study of antioxidation properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1768-1774.
9. Farombi EO., Ogundipe OO., Uhuwqngho ES., Adeyanju MA & Moody JO. 2003. Antioxidant properties of extracts from *Alchornealaxiflora* (Benth) Pax and Hoffman. *Phytoterapy Research* 17: 713-716.
10. Floegel A., Kim D-O., Chung S-J., Koo S I & Chun O K. 2011. Comparison of ABTS/ DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:1043–1048.
11. Frassinetti S., Della Croce C M., Caltavuturo L. & Longo V. 2012. Antimutagenic and antioxidant activity of *Lisosan G* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*. 135: 2029-2034.
12. Gunatilaka L., Kingston D & Johnaon R. 1994. Mechanism-based isolation and structures of some anticancer active natural products. *Pure & Applied Chemistry*. 66: 2219-2222.

13. Hoeijmakers J. 2009. DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*. 361:1475-1485.
14. Hosein G, Reza M, Reza A, Rokhbakhsh-Zamin. (2002). Cytotoxic activity of medicinal plants used in Iranian traditional medicine on two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *DARU*. 10: 162-164.
15. Hussein Hamdy Roby M., Atef. Sarhana M., Abdel-Hamed Selima K & Ibrahim Khalel K. 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 43: 827– 831.
16. Javanmardi J., Stushnoff C., Locke E & Vivanco JM. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*. 83: 547–550.
17. Ko S-H., Choi S-W., Ye S-K., Yoo S., Kim H-S & Chung M-H. 2008. Comparison of anti-oxidant activities of seventy herbs that have been used in Korean traditional medicine. *Nutrition Research and Practice*. 2: 143-151.
18. Llorach R., Martínez-Sánchez A., Tomás-Barberán FA., Gil MG & Ferrere F. 2008. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole *Food Chemistry*. 108: 1028–1038.
19. Ministerio de Salud y Protección Social. 2012. Plan nacional para el control de cáncer en Colombia 2012-2020. Bogotá, Colombia. (Consultado 05 noviembre 2012, www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20nacional%20para%20el%20control%20del%20c%C3%A1ncer%20en%20Colombia.pdf).
20. Moon J-K & Shibamoto T. 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 57: 1655–1666.
21. *Natural Products*. 63: 217-221.
22. Niño J., Morales P., Batero J., Correa Y & Mosquera O. 2007. Extractos vegetales con actividad sobre cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* con deficiencia en el mecanismo de reparación del ADN. *Scientia et Technica*. 33: 431-434.
23. Organización Mundial de la Salud-OMS. 2013. Enfermedades no transmisibles. (consultado 14 abril de 2013, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>)
24. Parekh J & Chanda SV. 2007. In vitro Activity and Phytochemical Analysis of some Indian Medicinal Plants. *Turk J Biol*. 31: 53-58.
25. Peng S., Peng L & Hoe J. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. 99: 755-783.
26. Ramya Durga K., Karthikumar S & Jegatheesan K. 2010. Isolation of potential antibacterial and antioxidant compounds from *Acalypha*

- indica* and *Ocimum basilicum*. African Journal of Plant Science. 4: 163-166.
27. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M & Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. 26: 1231-1237.
 28. Ríos J.L., Recio M.C. & Villar A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. J of Ethnopharmacology. 23: 127-149.
 29. Rivero F., Fallarero A., Castañeda O., Dajas F., Manta E., Areces F., Mancini F & Vidal A. 2003. Antioxidant activity *in vivo* and *in vitro* of *Halimeda incrassata* aqueous extracts. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 23: 256-263.
 30. Romero M., Cabrera E & Ortiz N. 2008. Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D.C, Colombia.
 31. Sabir SM., Ahmad SD., Hamid A., Khan MQ., Athayde ML., Santos DB., Boligon AA & Rocha JBT. 2012. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. Food Chemistry 131: 741-747.
 32. Samaniego C., Troncoso AM., García MC., Quesada JJ., Lopez H & Lopez MC. 2007. Different radical scavenging test in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. Analytica Chimica Acta. 593: 103-107.
 33. Singleton V & Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16: 144-58.
 34. Vurusaner B., Poli G & Basaga H. 2012. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. Free Radical Biology & Medicine. 52: 7-18.
 35. Wagner H & Bladt S. 1996. Plant drug analysis: thin layer chromatography. Springer. Berlin, Germany.
 36. Wu Y-P., Meng X-Sh., Bao Y-R. & Wang. Sh. 2013. Pharmacokinetic study of our flavones of *Glycyrrhiza* in rat plasma using HPLC-MS. Journal of Ethnopharmacology. 148: 266-270.
 37. Yuan W., Li S., Ownby S., Zhang Z., Wang P., Zhang W & Beasley RS. 2007. Flavonoids, coumarins and triterpenes from the aerial parts of *Cnidioscolus texanus*. Planta Medica. 73:1304-1308.
 38. Zhou B, Johnson R, Mattern M, Wang W, Hecht S, Beck H, Ortiz A, Kingston D.(2000). Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxylon*. Journal of