

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
Y ACTIVIDAD ANTITOPoisOMERASA I Y/O II SOBRE CEPAS
MUTADAS DE *Saccharomyces cerevisiae* DE PLANTAS DE LA
ECORREGIÓN CAFETERA COLOMBIANA**

**CLARA EUGENIA CORREA SOTO
ANDRÉS GAVIRIA MENDOZA**

**ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
PEREIRA
2010**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
Y ACTIVIDAD ANTI-TOPOISOMERASA I Y/O II SOBRE CEPAS
MUTADAS DE *Saccharomyces cerevisiae* DE PLANTAS DE LA
ECORREGIÓN CAFETERA COLOMBIANA**

TRABAJO DE GRADO
Requisito parcial para optar al título de Tecnólogo en Química

**CLARA EUGENIA CORREA SOTO
ANDRÉS GAVIRIA MENDOZA**

Director
Dr. JAIME NIÑO OSORIO

**ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
PEREIRA
2010**

NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTITOPISOMERASA I Y/O II SOBRE CEPAS MUTADAS DE *Saccharomyces cerevisiae* DE PLANTAS DE LA ECORREGIÓN CAFETERA COLOMBIANA

Presentado por:

**CLARA EUGENIA CORREA SOTO
ANDRÉS GAVIRIA MENDOZA**

El suscrito director y jurado del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de: _____

Con la connotación: _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy _____

Director: _____

Nombre: JAIME NIÑO OSORIO

Jurado: _____

Nombre: LADY ROSSANA PALOMINO

RESUMEN

Los radicales libres contribuyen al desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer. Cuando el aumento del contenido intracelular de dichos radicales sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Entre los fármacos antitumorales actualmente disponibles para el tratamiento del cáncer en los humanos, se encuentran los inhibidores de las topoisomerasas. Muchas de las moléculas que presentan este tipo de actividad frente a las células cancerosas han sido aisladas de plantas, las cuales producen diferentes tipos de metabolitos que han demostrado ser útiles en el tratamiento de múltiples enfermedades, por lo cual extractos de diclorometano y metanol de 29 especies pertenecientes a 7 familias de plantas recolectadas en zonas de reserva de la Ecorregión Cafetera Colombiana (ECC) fueron evaluados para determinar su capacidad antioxidante y actividad antitopoisomerasa.

La actividad antitopoisomerasa fue determinada mediante cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* RJ03, R52Y y RS321 por el método de difusión en agar; mientras que la capacidad antioxidante de captación de radicales libres se realizó por el método del radical libre difenilpicrilhidrazilo (DPPH). Ninguno de los extractos de diclorometano y metanol de las plantas evaluadas presentó actividad antitopoisomerasa, entre tanto que se hallaron 8 extractos de diclorometano y 15 de metanol con actividad antioxidante. Los extractos metanólicos de las especies *Acalypha diversifolia* (UTP-126, Euphorbiaceae), *Alchornea calophylla* (UTP-128, Euphorbiaceae), *Alchornea* sp (UTP-140, Euphorbiaceae) e *Hyeronima* sp (UTP-130, Euphorbiaceae) fueron los que presentaron mayor capacidad antioxidante. Además, se determinó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu a los extractos que mostraron capacidad antioxidante, expresando los resultados como ácido gálico.

ABSTRACT

Free radicals contribute to the development of degenerative diseases such as atherosclerosis, cardiomyopathy, neurological diseases and cancer. When the increase in the intracellular content of these radicals exceeds the antioxidant defenses of cells, oxidative stress is produced, which induces damage to biomolecules such as lipids, proteins and nucleic acids.

Among the currently available antitumoral drugs to treat cancer in humans, are topoisomerases inhibitors. Many of the molecules with this type of activity against cancer cells have been isolated from plants, which produce different types of metabolites that have proven to be useful in treating many diseases, for which dichloromethane and methanol extracts of 29 species belonging to 7 families of plants gathered in reserve zones of the Ecorregión Cafetera Colombiana (ECC) were evaluated to determine their antioxidant capacity and antitopoisomerase activity.

Antitopoisomerase activity was determined by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* RJ03, RS321 and R52Y by agar well diffusion method; whereas the antioxidant capacity of free radical scavenging was tested by diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) free radical method. None of the tested dichloromethane and methanol plant extracts presented anti-topoisomerase activity, while it was found 8 dichloromethane and 15 methanol extracts with antioxidant activity. Methanolic extracts of the species *Acalypha diversifolia* (UTP-126, Euphorbiaceae), *Alchornea calophylla* (UTP-128, Euphorbiaceae), *Alchornea* sp (UTP-140, Euphorbiaceae) and *Hyeronima* sp (UTP-130, Euphorbiaceae) were those who showed the higher antioxidant capacity. In addition, total phenols content were determined by the Folin-Ciocalteu method to extracts that showed antioxidant capacity, expressing the results as gallic acid.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE ANEXOS	IX
AGRADECIMIENTOS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO CONCEPTUAL	3
2.1 ANTIOXIDANTES	3
2.1.1 Radicales libres	4
2.1.2 Métodos de evaluación de actividad antioxidante	6
2.1.2.1 Ensayo con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH.)	7
2.1.2.2 Ensayo de determinación de fenoles totales (reactivo de Folin-Ciocalteu)	9
2.2 COMPORTAMIENTO CELULAR Y EL CÁNCER	9
2.3 TOPOISOMERASAS	11
2.3.1 Evaluación de la actividad antitopoisomerasa: método de difusión de pozo en agar	13
2.4 LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.5 PRODUCTOS NATURALES	16
2.6 ZONAS DE ESTUDIO	17
2.6.1 Reserva Natural Bremen-La Popa	18
2.6.2 Parque Regional Natural Ucumarí	19
2.7 FAMILIAS DE PLANTAS A ESTUDIAR	20
2.7.1 Familia Apocynaceae	20
2.7.2 Familia Asclepiadaceae	21
2.7.3 Familia Asteraceae (Compositae)	22
2.7.4 Familia Euphorbiaceae	22
2.7.5 Familia Rubiaceae	23
2.7.6 Familia Solanaceae	24
2.7.7 Familia Urticaceae	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos	28
	III

4. METODOLOGÍA	29
4.1 MATERIALES	29
4.1.1 Materiales biológicos	29
4.1.2 Equipos e instrumentos	29
4.1.3 Reactivos	30
4.1.4 Material vegetal	30
4.2 MÉTODOS	30
4.2.1 Obtención de los extractos	30
4.2.2 Caracterización fitoquímica de los extractos	32
4.2.3 Ensayos de actividad biológica	32
4.2.3.1 Ensayo de la capacidad antioxidante por captación de radicales libres mediante el método del DPPH	32
4.2.3.1.1 Preparación de la solución de DPPH	32
4.2.3.1.2 Ensayo de porcentaje de actividad antioxidante	32
4.2.3.1.3 Preparación de la curva de calibración con Trolox	34
4.2.3.2 Ensayo de determinación de fenoles totales	34
4.2.3.3 Ensayo de actividad antitopoisomerasa sobre cepas mutadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
4.2.3.3.1 Cepas de levadura	34
4.2.3.3.2 Composición del caldo y el agar YPD	36
4.2.3.3.3 Siembra del microorganismo y evaluación de los extractos	36
4.2.4 Tratamiento de datos y análisis estadístico	39
4.2.4.1 Ensayo de determinación de capacidad antioxidante	39
4.2.4.2 Ensayo de determinación de fenoles totales (reactivo de Folin-Ciocalteu)	39
4.2.4.3 Ensayo de determinación de actividad antitopoisomerasa	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS	41
5.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	45
5.2.1 Ensayos de capacidad antioxidante	45
5.2.1.1 Ensayo con el radical libre DPPH. Determinación del porcentaje de actividad antioxidante	45
5.2.1.2 Cuantificación de la actividad antioxidante mediante la determinación del equivalente Trolox	49
5.2.2 Ensayo de determinación de fenoles totales (reactivo de Folin-Ciocalteu)	53
5.2.3 Ensayos de actividad antitopoisomerasa sobre cepas mutadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57

6. CONCLUSIONES	62
7. RECOMENDACIONES	63
8. BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	75

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Radicales libres comunes	4
Tabla 2. Métodos <i>in vitro</i> más empleados para la determinación de la actividad antioxidante	6
Tabla 3. Descripción de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas	16
Tabla 4. Familias utilizadas en este proyecto y sus principales usos	26
Tabla 5. Especies de plantas estudiadas	31
Tabla 6. Composición del caldo y el agar YPD	36
Tabla 7. Metabolitos secundarios de los extractos metanólicos	41
Tabla 8. Metabolitos secundarios de los extractos de diclorometano	43
Tabla 9. Porcentaje de actividad antioxidante a diferentes concentraciones de Trolox	50
Tabla 10. Relación porcentaje de actividad antioxidante - concentración de Trolox de los extractos metanólicos	51
Tabla 11. Relación porcentaje de actividad antioxidante - concentración de Trolox de los extractos de diclorometano	52
Tabla 12. Absorbancia de la curva de calibración para la determinación de fenoles totales, expresados como ácido gálico	53
Tabla 13. Valor del IC ₁₂ en el bioensayo de actividad antitopoisomerasa para la totalidad de extractos evaluados	58
Tabla 14. Algunas plantas con actividad antitopoisomerasa	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación de los antioxidantes	4
Figura 2. Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	8
Figura 3. Proceso carcinogénico	11
Figura 4. Estructura de la Camptotecina	12
Figura 5. A. Estructura cristalina de la camptotecina unida al complejo topo I-ADN. B. La misma estructura de A; la topo I fue removida excepto por el residuo de tirosina catalítico	13
Figura 6. Colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en caja de Petri	15
Figura 7. Descripción general de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> empleadas en el ensayo de actividad anti-topoisomerasa con sus mutaciones	16
Figura 8. Mapa Reserva Natural Bremen - La Popa	18
Figura 9. El Parque Regional Natural Ucumarí	19
Figura 10. Representante de la familia Apocynaceae, <i>Apocynaceae juss</i>	21
Figura 11. Representante de la familia Asclepiadaceae, <i>Asclepias syriaca</i> L.	21
Figura 12. Representante de la familia Asteraceae, <i>Mikania willd</i>	22
Figura 13. Representante de la familia Euphorbiaceae, <i>Acalypha ostryifolia</i> Riddell	23
Figura 14. Representante de la familia Rubiaceae, <i>Coffea arabica</i> L.	24
Figura 15. Representante de la familia Solanaceae, <i>Solanum melongena</i> L.	24
Figura 16. Representante de la familia Urticaceae, <i>Boehmeria ramiflora</i>	25
Figura 17. Protocolo para determinar la actividad antioxidante mediante captura de radicales libres por DPPH	33
Figura 18. Protocolo para determinar el contenido de fenoles totales	35
Figura 19. Siembra del <i>S. cerevisiae</i> y evaluación de los extractos a diferentes concentraciones	37

Figura 20. Posición de la siembra y concentración (mg/L) de los extractos y controles en el bioensayo de las topoisomerasas empleando las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	38
Figura 21. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las 29 especies de plantas evaluadas	46
Figura 22. Actividad antioxidante de los extractos de diclorometano de las 29 especies de plantas evaluadas	48
Figura 23. Curva de calibración con Trolox	50
Figura 24. Curva de calibración del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales	54
Figura 25. Contenido de fenoles totales para los extractos metanólicos con actividad antioxidante superior al 25%	54
Figura 26. Contenido de fenoles totales para los extractos de diclorometano con actividad antioxidante superior al 25%	56

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Obtención de los extractos crudos de metanol y diclorometano	76
Anexo 2. Reactivación de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que se encuentran almacenadas en papel filtro	77
Anexo 3. Reactivación de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> preservadas en tubos de ensayo en posición de cuña	78
Anexo 4. Crecimiento de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
Anexo 5. Conservación de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en base seca	80
Anexo 6. Conservación de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en posición de cuña	81
Anexo 7. Procedimiento para preparar 500 mL de agar YPD	82
Anexo 8. Procedimiento para preparar 500 mL de caldo YPD	82
Anexo 9. Procedimiento para hallar el IC ₁₂ .Ejemplo con planta UTP 60	83
Anexo 10. Registro del %AA por el método del DPPH de plantas del PRNU y Bremen - La Popa	85
Anexo 11. Relación porcentaje de actividad antioxidante - concentración de Trolox de los extractos evaluados	87
Anexo 12. Contenido de fenoles totales para los extractos vegetales con actividad antioxidante superior al 25%	89
Anexo 13. Correlación entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante para los extractos metanólicos	90
Anexo 14. Correlación entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante para los extractos de diclorometano	90

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que hacen parte del Grupo de Biotecnología - Productos Naturales (GB-PN), quienes nos acogieron como una familia, al punto de convertir el laboratorio en nuestra segunda casa.

A nuestros familiares y seres queridos por el apoyo brindado en el transcurso de la carrera.

A los profesores de la Escuela de Química que tanto nos instruyeron en las diferentes áreas del conocimiento y muy especialmente a los profesores Jaime Niño y Oscar Mosquera por sus enseñanzas, correcciones, paciencia y consejos.

Al Centro de Investigaciones y Estudios en Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIEBREG) por la financiación aportada para realizar este proyecto.

1. INTRODUCCIÓN

Con el paso de los años han aparecido nuevas enfermedades y otras ya existentes han creado resistencia a los métodos convencionales de tratamiento. Una de las enfermedades de mayor índice de mortalidad es el cáncer, se estima que cada año se presentan en el mundo más de 11 millones de casos nuevos y se mueren más de 7 millones de personas por esta enfermedad (Ministerio de la Protección Social, 2009). El cáncer se produce por la división incontrolada de células que dan lugar a un tumor y que tienen la capacidad de invadir y destruir otros órganos (Alberts et al., 2006).

Para que la división celular se complete, es necesaria la intervención de enzimas llamadas topoisomerasas, las cuales son las encargadas de generar alteraciones en la topología del ADN a través del rompimiento transitorio en la doble hélice. Debido a que las células no pueden sobrevivir sin estas enzimas, se llevan a cabo estudios que permitan la creación de drogas anticancerígenas nuevas mediante el control o inhibición de estas importantes enzimas (Deweese y Osheroff, 2009).

El cáncer es producido por diferentes factores, entre los que se encuentran los radicales libres, puesto que estas especies reactivas pueden causar daños a lípidos, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, desencadenando reacciones desfavorables para las células y originando diversas enfermedades como inflamación, aterosclerosis, diabetes, Alzheimer, Parkinson, enfermedades coronarias, cáncer entre otras (Rivero et al., 2003).

Las células para evitar y contener las reacciones adversas producidas por los radicales libres emplean compuestos antioxidantes. Así, los antioxidantes son considerados como moléculas que, cuando están presentes en pequeñas concentraciones comparadas a las de las biomoléculas que se suponen deben proteger, pueden prevenir o reducir la destrucción oxidativa de las biomoléculas (Huang et al., 2005).

En algunos casos los procedimientos para controlar las enfermedades generan efectos secundarios por lo cual se buscan nuevas alternativas en

los productos naturales y entre ellos los metabolitos secundarios producidos por las plantas.

Colombia es un país con una gran riqueza de especies de plantas pertenecientes a muchas familias taxonómicas, lo que lo convierte en una fuente excelente en la búsqueda de productos naturales con actividad benéfica para el hombre, tanto desde la perspectiva biológica como económica.

Por ello, en la búsqueda de moléculas anticancerígenas y/o antioxidantes a partir de extractos vegetales se estudió la inhibición del crecimiento de 3 levaduras mutadas de *Saccharomyces cerevisiae*, para deducir su posible acción como agentes inhibidores de las topoisomerasas I y II y su capacidad antioxidante por captación de radicales libres de 29 extractos de diclorometano y metanol de plantas recolectadas en la Ecorregión Cafetera Colombiana (ECC). De igual forma, se espera incrementar el conocimiento de la flora natural regional y sus potencialidades como agentes con diversas actividades biológicas.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1 ANTIOXIDANTES

En general se pueden definir los antioxidantes como sustancias que se oponen a la oxidación o inhiben las reacciones promovidas por el oxígeno o los peróxidos, muchos de los cuales se usan como preservativos en varios productos como aceites, grasas y alimentos para retardar el desarrollo de la rancidez de los compuestos lipídicos; en la gasolina y otros productos derivados del petróleo se emplean para retardar la formación de gomas y otros cambios no deseados (Huang et al., 2005).

Los antioxidantes en los sistemas biológicos y tejidos vivos son fundamentales para prevenir y/o frenar el daño oxidativo de las biomoléculas. Evidencias experimentales sugieren que los antioxidantes reducen el riesgo de enfermedades crónicas incluyendo el cáncer e infartos. La fuente primaria de antioxidantes naturales son los granos, las frutas y los vegetales (Prakash et al., 2007). Los antioxidantes biológicos se pueden clasificar como enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos fueron desarrollados por los organismos aerobios para defenderse de compuestos como el peróxido de hidrógeno, subproducto de algunas reacciones metabólicas (Gonzalez et al., 2002); mientras que en los no enzimáticos se incluyen moléculas que actúan atrapando agentes reactivos dañinos o inhibiendo su formación, es decir, pueden actuar como preventivos en la generación de una gran cantidad de dolencias (Figura 1).

La principal característica de un antioxidante es su habilidad de atrapar radicales libres (RL). Los radicales libres y las especies de oxígeno altamente reactivas están presentes en sistemas biológicos en una amplia variedad de fuentes. Estos radicales pueden oxidar los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos y pueden dar inicio a enfermedades degenerativas. Los compuestos antioxidantes como ácidos fenólicos, polifenoles y flavonoides captan radicales libres, tales como peróxidos, hidroperóxido o peroxilos lipídicos e inhibiendo los mecanismos oxidativos que llevan a enfermedades graves (Prakash et al., 2007).

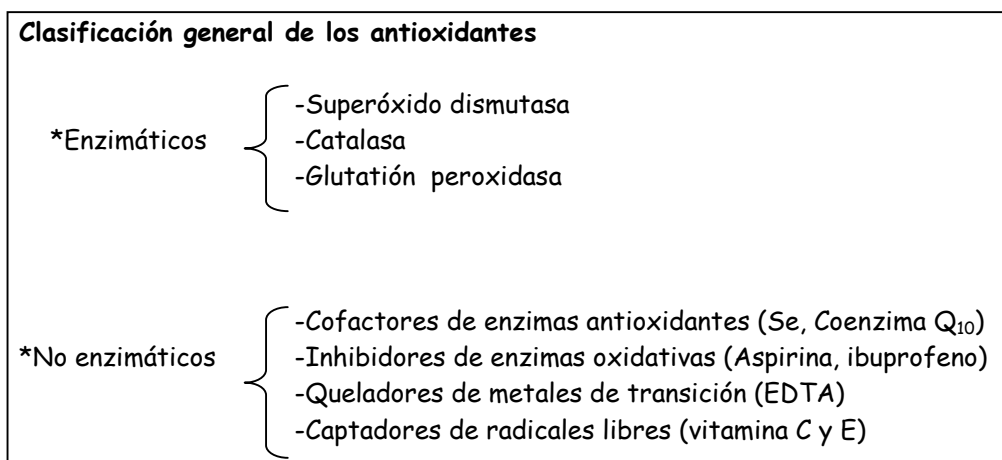


Figura 1. Clasificación de los antioxidantes (Huang et al., 2005)

2.1.1 Radicales libres

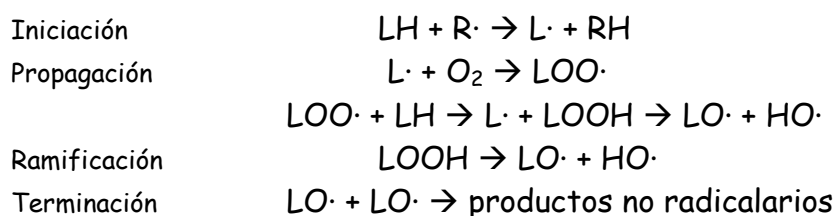
Los radicales libres son moléculas o átomos que poseen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares, los cuales presentan un grado considerable de reactividad. Los radicales libres más comúnmente encontrados en los sistemas biológicos se resumen en la tabla 1, donde se pueden apreciar algunas especies reactivas de oxígeno o ROS (como el radical hidroxilo) y el radical óxido nítrico, perteneciente a las especies reactivas de nitrógeno o RNS (Ramírez y Echeverri, 2007).

Tabla 1. Radicales libres comunes

Fórmula	Nombre del radical
HO·	Hidroxilo
HO ₂ ·	Hidroperoxilo
O ₂ ·	Superóxido
RO·	Alcoxilo
ROO·	Peroxilo
NO·	Óxido nítrico

Los radicales libres son producidos por las células a través de distintos factores, tales como: consumo excesivo de grasas saturadas, alcohol, algunos medicamentos, el humo del cigarrillo, la contaminación ambiental, la exposición solar y el estrés, entre otros (Ramírez y Echeverri, 2007).

Los radicales libres (RL) generados por el metabolismo normal existen en concentraciones muy bajas, no viajan muy lejos de los sitios en donde se forman, puesto que su vida media es de unos cuantos microsegundos. Cuando un RL reacciona con una especie que no sea un radical, pueden formarse otros como sucede en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, en donde un RL iniciador remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de cadena hidrocarbonada. Este hecho genera un electrón desapareado en el átomo de carbono y se forma un radical del ácido graso, el cual después de varios rearrreglos moleculares internos, reacciona con el oxígeno molecular, produce un radical peroxil lipídico este a su vez sustrae un segundo hidrógeno de otras moléculas de ácido graso; así se establece una reacción en cadena auto catalítica, de manera que aunque el radical iniciador produce solo efectos locales y limitados, el radical secundario y los productos de la degradación oxidativa, ocasionan la formación de RL con efectos amplificados a distancia del sitio donde se formó el primer RL (Zentella y Saldaña, 1996). Los pasos esenciales en reacciones oxidativas en cadena mediadas por radicales libres son por tanto iniciación, propagación, ramificación y terminación. La reacción general se muestra a continuación, donde LH representa el sustrato, en este caso un lípido y R representa el radical inicial (Antolovich et al., 2002):



A pesar de todos los daños que pueden causar, los radicales libres también cumplen con una función biológica importante, pues intervienen en procesos tales como el transporte de electrones, los mecanismos de fagocitosis, la regulación de la presión sanguínea; en las plantas participan en procesos fisiológicos relacionados con la maduración, el envejecimiento y la respuesta al daño tisular (Buitrago, 2004).

2.1.2 Métodos de evaluación de actividad antioxidante

Es de gran interés para investigadores de ciencias de la salud y la biotecnología, trabajar en el mejoramiento y descubrimiento de nuevos y mejores antioxidantes con uso potencial en química como preservantes y medicamentos. Una fuente valiosa de antioxidantes son las plantas, de las cuales existen numerosas especies sin evaluar; por tales razones, es necesario contar con un método conveniente para la cuantificación rápida de la actividad antioxidante (Huang et al., 2005).

Existen diferentes maneras de calcular la capacidad antioxidante de un extracto de una planta, un alimento o un compuesto puro (Tabla 2). Cada ensayo se basa en reacciones químicas diferentes y por lo tanto la actividad antioxidante de una misma matriz puede variar dependiendo del método de análisis empleado.

Tabla 2. Métodos *in vitro* más empleados para determinar la actividad antioxidante (Huang et al., 2005).

CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS	TIPO DE ENSAYO PROPUESTO
<p>Ensayos que involucran transferencia de átomos de hidrógeno</p> $ROO\cdot + AH^1 \rightarrow ROOH + A\cdot$	<p>*ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)</p> <p>*TRAP (Total radical trapping antioxidant parameter)</p> <p>*Inhibición de la oxidación de los LDL²</p>
<p>Ensayos por transferencia de electrones</p> $M^3(n) + e^- (\text{del AH}) \rightarrow AH\cdot^+ + M(n - 1)$	<p>*TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)</p> <p>*FRAP (Ferric ion reducing antioxidant parameter)</p> <p>*DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)</p> <p>*FCR (Reactivo de Folin-Ciocalteu)</p>
<p>Otros ensayos</p>	<p>*TOSC (Total oxidant scavenging capacity)</p> <p>*Quimioluminiscencia</p> <p>*Electroquimioluminiscencia</p>

AH¹ = Antioxidante; LDL² = Lipoproteínas de baja densidad; M³ =Oxidante

Posiblemente el mejor método para determinar actividad antioxidante sea aquel que pueda medir *in vivo* el poder antioxidante de un extracto o un compuesto puro. Sin embargo, este tipo de métodos son difíciles de realizar debido a los problemas relacionados con el requerimiento celular de los antioxidantes, su proceso de transporte y la complejidad fisiológica y bioquímica celular. Debido a esto, las determinaciones se realizan con técnicas indirectas e *in vitro*, las cuales pueden alejarse considerablemente de la acción de tales agentes en sistemas biológicos (Antolovich et al., 2002).

De todos estos métodos el que se siguió en este trabajo fue el ensayo de transferencia de electrones evaluado a través del método del DPPH, por las siguientes razones:

- Por su simplicidad y rapidez para realizar el ensayo
- Se puede estudiar o cribar la capacidad antioxidante tanto de compuestos puros como de mezclas complejas como los extractos vegetales (Magalhães et al., 2008).

2.1.2.1 Ensayo con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH·)

El método original del DPPH· fue propuesto por Marsden Blois en 1958, pero la metodología usada actualmente se basa en el método introducido por Brand-Williams y colaboradores (Brand-Williams et al., 1995), el cual ha sido usado como ensayo de referencia por muchos grupos de investigación (Molyneux, 2004).

El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Figura 2) es un cromógeno de color púrpura. En este ensayo de capacidad antioxidante o de "atrapamiento" de radicales libres, el DPPH· es reducido por antioxidantes / compuestos reductores a la correspondiente hidracina que es de color amarillo pálido (Magalhães et al., 2008). Este cambio de color hace posible el uso de este compuesto para realizar análisis por espectrofotometría en la región del visible. El radical DPPH· absorbe a 517 nm y la actividad antioxidante puede ser determinada monitoreando el descenso en su absorbancia (Antolovich et al., 2002).

Los resultados obtenidos en las curvas fotométricas hechas para cada muestra a evaluar se pueden comparar con curvas de antioxidantes estándar tales como ácido ascórbico o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico); y expresar los resultados como concentraciones equivalentes a los estándares usados (Magalhães et al., 2008). El Trolox es un análogo hidrosoluble de la vitamina E, conocido por su capacidad de captar radicales peroxilo y de entrar rápidamente a membranas biológicas. Es un potente inhibidor del daño a la membrana que ha mostrado protección celular tanto *in vivo* como *in vitro* (McClain et al., 1995).

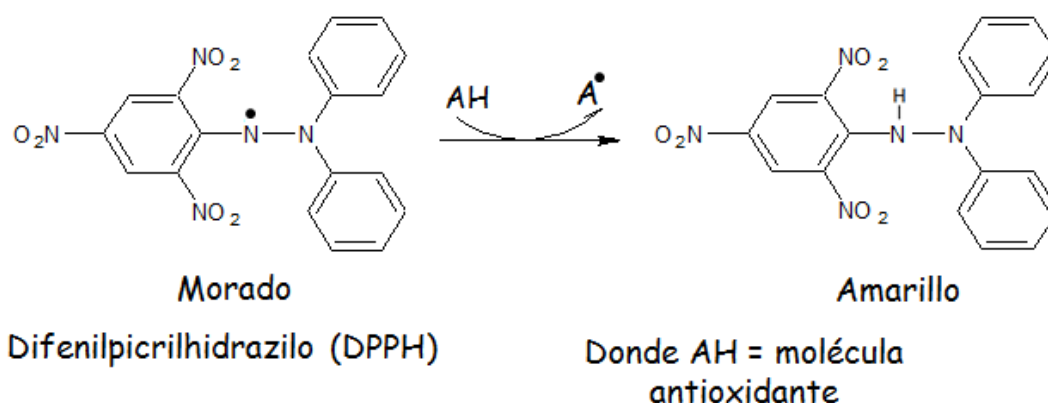


Figura 2. Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Molyneux, 2004)

Generalmente, los resultados de este bioensayo se expresan como el porcentaje de actividad antioxidante y como la concentración eficiente cincuenta (EC_{50}), que es la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en 50% la concentración inicial del DPPH· (Antolovich et al., 2002).

Adicionalmente con la medición de la actividad antioxidante a través del DPPH se determinó el contenido de fenoles totales para determinar la correlación existente entre este tipo de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de los extractos más activos.

Muchos autores consideran que existe una relación directa entre los resultados obtenidos por los métodos de Folin-Ciocalteu y DPPH para medir la capacidad antioxidante. Se han encontrado coeficientes de correlación elevados entre ambos ensayos ($R=0.969$) que indican que la

capacidad captadora de radicales libres puede ser predicha en base del ensayo con Folin-Ciocalteu, probablemente porque ambos métodos dependen de mecanismos de reacción similares (Katsube et al., 2004).

2.1.2.2 Ensayo de determinación de fenoles totales (reactivo de Folin-Ciocalteu)

El ensayo basado en el reactivo de Folin - Ciocalteu es usado también para la determinación de la capacidad reductora total de una muestra. La estructura química exacta del reactivo no se conoce, pero se acepta que está constituido por complejos de ácido fosfomolibdénico / ácido fosfotungsténico. El ensayo se basa en la transferencia de electrones en un medio alcalino desde los compuestos fenólicos (u otros agentes reductores) hacia el molibdeno, formando un complejo azul que puede ser detectado espectrofotométricamente a 750-765 nm (Magalhães et al., 2008).

Cabe resaltar que el método no es totalmente específico para fenoles, puesto que puede ser reducido por otros compuestos como aminas aromáticas, ácido ascórbico o Fe (II) (Magalhães et al., 2008). A pesar de la naturaleza química indefinida del reactivo de Folin - Ciocalteu, el ensayo de los fenoles totales por este método es conveniente, simple y reproducible (Antolovich et al., 2002).

2.2 COMPORTAMIENTO CELULAR Y EL CÁNCER

Las células se reproducen para hacer posible el crecimiento corporal y para reemplazar a las que desaparecen por envejecimiento o por muerte programada; también lo hacen durante ciertas situaciones patológicas, como la reparación de heridas. Para poder reproducirse, la célula duplica primero el contenido del núcleo y del citoplasma y luego se divide en dos. Al cabo de la división celular, las células hijas heredan la misma información genética contenida en la célula progenitora. Como esa información se halla en el ADN, cada una de sus moléculas debe generar previamente dos moléculas de ADN idénticas a la del ADN progenitor para ser repartidas de manera equitativa entre las dos células hijas (Robertis, 2002).

Cada célula humana contiene cerca de 2 m de ADN, compactado en un núcleo de 10 μm de diámetro. El material genético está en los cromosomas y las dos hebras de la doble hélice del ADN se enrolla hasta generar una estructura helicoidal; acceder al genoma es todo un desafío (Deweese y Osheroff, 2009). Una molécula de ADN consiste en una doble cadena de polinucleótidos enrollada en una hélice doble, las cadenas se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno existentes entre parejas complementarias de las bases nitrogenadas (Gartner y Hiatt, 2002).

Para que se puedan formar dos macromoléculas de ADN a partir de una, primero deben separarse las dos cadenas de la doble hélice del ADN preexistente y es necesario desenrollar el ADN con el fin de prevenir excesivas tensiones torsionales en el segmento no replicado de la doble hélice. En este desenrollamiento participan dos enzimas específicas, la topoisomerasa I (Topo I) y la topoisomerasa II (Topo II). Ambas, remueven cada una de las vueltas en exceso mediante un mecanismo que se cumple en tres etapas:

1. Escisión de una (Topo I) o de ambas (Topo II) cadena del ADN.
2. Paso de un segmento del ADN a través de la ruptura
3. Cierre de la ruptura de ADN (Orta et al., 2007).

A parte de las topoisomerasas, existen muchas otras enzimas encargadas de la duplicación del ADN y de mantener la fidelidad de la información que se está duplicando; sin embargo, a pesar de los sistemas de las células para proteger las instrucciones genéticas de la copia de errores y daño accidental, a veces se originan cambios permanentes o mutaciones (Classen et al., 2003).

Cuando una célula sufre una alteración genética (mutación) que le permite sobrevivir y dividirse cuando no debería y producir células hijas que se comportan de la misma manera anómala se pierde el control de una manera insidiosa y potencialmente devastadora. La organización del tejido y en definitiva, la del cuerpo como unidad, puede alterarse debido a la presencia de un clon de células anormales que se expande en forma incontrolable (Figura 3). Esta catástrofe es el suceso que produce el cáncer (Alberts et al., 2006).

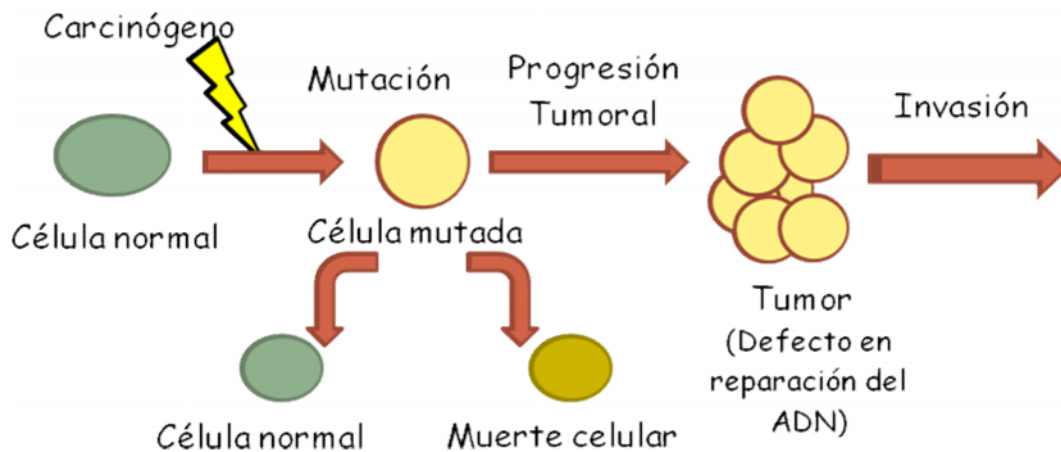


Figura 3. Proceso carcinogénico. (Adaptado de: Álvarez y Orallo, 2003)

Las células cancerosas y su progenie se definen por dos propiedades heredables: 1) proliferan en contra de las limitaciones normales, 2) invaden y colonizan tejidos que en condiciones normales están reservados solo para otras células. Las que sólo tienen la primera propiedad, producen un tumor benigno y por lo general puede extirparse en forma completa por medios quirúrgicos. Las células con las dos propiedades producen tumores malignos (cancerosos) y eventualmente las células pueden separarse del tumor primario y formar tumores secundarios o metástasis en otros sitios del cuerpo (American Cancer Society, 2008).

Las células cancerosas pueden sufrir mutaciones y adquieren una resistencia rápida a los tratamientos utilizados para exterminarlas. Sin embargo, su inestabilidad, las hace más vulnerables a lesiones del ADN que las células normales (Alberts et al., 2006).

2.3 TOPOISOMERASAS

Las topoisomerasas son enzimas que controlan el estado topológico del ADN al introducir rompimientos transitorios unidos por la enzima que permiten el paso de hebras de ADN (Cardenas et al., 1999).

La topoisomerasa I se requiere para el desarrollo en organismos eucarióticos superiores (ejemplo: el hombre); sin embargo el gen de la topoisomerasa I no es esencial en *Saccharomyces cerevisiae*

probablemente porque la topoisomerasa II puede sustituir algunos roles de la topoisomerasa I (Lotito et al., 2008).

Las dos enzimas se diferencian porque, la Topo I presenta en su sitio activo tirosina como un nucleófilo para romper una cadena de la doble hélice del ADN generando un enlace covalente 3'-fosfotirosil; mientras que la Topo II es un homo dímero funcional que usa ATP para llevar a cabo su función (Salceda et al., 2006).

La estructura de la topoisomerasa I humana tiene gran importancia médica porque esta enzima es el único objetivo de la droga antineoplásica camptotecina (Figura 4) y sus derivados: topotecán e irinotecán. El antineoplásico inhibidor de la topoisomerasa II, etopósido, posee actividad antifúngica débil (por ejemplo con especies de *Candida*); sin embargo, el hecho de que la topo II sea esencial en levaduras y hongos la hace un objetivo potencialmente importante en el desarrollo de inhibidores selectivos y posiblemente nuevas drogas antifúngicas (Cardenas et al., 1999).

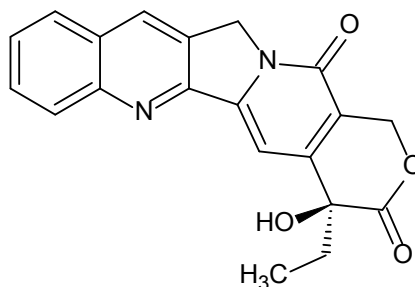


Figura 4. Estructura de la Camptotecina (Pommier et al., 2006)

Los inhibidores de las topoisomerasas estabilizan el complejo de transición enzima-ADN, lo que resulta en la inhibición de la transcripción y replicación que finalmente genera daño en el ADN y eventualmente puede llevar a la muerte celular (Cardenas et al., 1999). En la figura 5 se muestra un modelo de la interacción de la droga anticancerígena camptotecina con el complejo topo I-ADN.

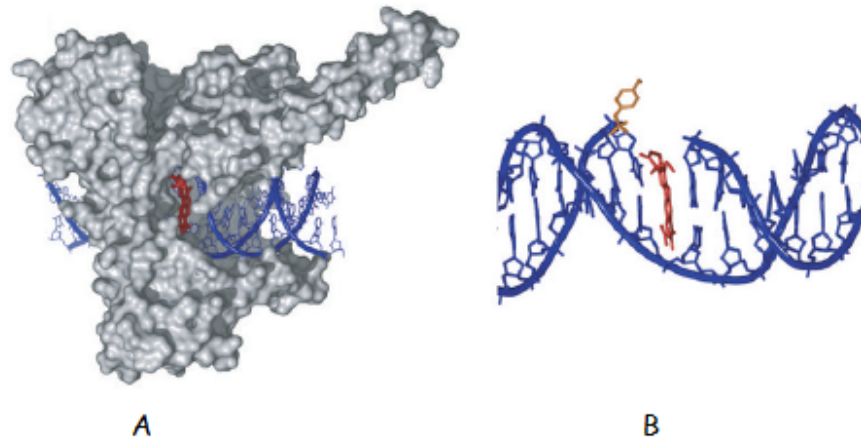


Figura 5. **A.** Estructura cristalina de la camptotecina unida al complejo topo I-ADN. La topoisomerasa aparece en gris, la doble cadena de ADN en azul y el inhibidor (camptotecina) en rojo. **B.** La misma estructura de **A**; la topo I fue removida excepto por el residuo de tirosina catalítico (Tomado de: Pommier et al., 2006).

Gran cantidad de agentes que inhiben o bloquean la acción enzimática de las Topo I y II, han sido descubiertas en el reino vegetal, entre estos compuestos con actividad contra las topoisomerasas y que por consiguientes se utilizan como medicamento en la lucha contra el cáncer se tienen las camptotecinas, epipodofilotoxinas y la genesteina (Roca, 1998).

2.3.1. Evaluación de la actividad antitopoisomerasa: método de difusión de pozo en agar.

Actualmente existen diversas técnicas para la evaluación de extractos usando microorganismos, el método a utilizar se elige de acuerdo con el tipo de extracto a evaluar, el tipo de ensayo a realizar y la disponibilidad de recursos (Alves et al., 2008). Los métodos de la actividad antimicrobiana pueden clasificarse en tres grupos: difusión, dilución y métodos de antibiograma. Un gran número de factores pueden alterar los resultados: Los métodos de extracción, el volumen inoculado, la composición del medio, el pH y la temperatura de incubación (Ríos et al., 1988).

Los métodos de difusión (discos, pozos y cilindros), son con frecuencia más usados en la investigación. Las ventajas de estos métodos son la cantidad pequeña de muestra requerida en la evaluación y la posibilidad de probar cinco o seis compuestos contra un mismo microorganismo. Sin embargo, estos métodos no deben ser utilizados para determinar el MIC (mínima concentración inhibitoria) de una muestra. Las técnicas de difusión permiten las evaluaciones preliminares de sustancias puras (alcaloides, flavonoides y terpenoides, etc) (Recio et al., 1989).

2.4 LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

El uso de los microorganismos en el control y la solución de los grandes problemas actuales de la humanidad, como son los relacionados con la salud humana y animal, la agricultura y la alimentación, la obtención de formas no convencionales de energía, el saneamiento y conservación del ambiente, entre otros, ha alcanzado un incremento considerable en el mundo entero, principalmente en los países desarrollados (Andreu et al., 2005)

Saccharomyces cerevisiae (Figura 6) es un hongo unicelular, tiene la facultad de crecer en forma anaerobia, es un tipo de levadura muy utilizado industrialmente en la fabricación de cerveza, vino, hidromiel, pan, producción de antibióticos, etc. *S. cerevisiae* es uno de los modelos más adecuados para el estudio de problemas biológicos al presentar ventajas como su facilidad de cultivo y velocidad de división celular. Por ello, ha estado siempre a la vanguardia de los avances técnicos. Es un sistema eucariota, con una complejidad sólo ligeramente superior a la de las bacterias pero compartiendo con ella muchas de sus ventajas técnicas (Gonzalez y Valenzuela, 2008).

El genoma de esta levadura eucariótica fue el primero en ser secuenciado completamente, el cual fue completado 1996 y comprende 600 genes, de los cuales más del 60% tiene una función asignada. El 30% de los genes humanos con participación en enfermedades humanas son similares a los de la levadura. Debido a esta homología genética notable y la alta conservación de las vías bioquímicas elementales, los estudios en la levadura han sido esenciales para entender procesos celulares

fundamentales como la traducción del mRNA y su degradación, el mecanismo de reparación del ADN y el ciclo celular (Galao et al., 2007).

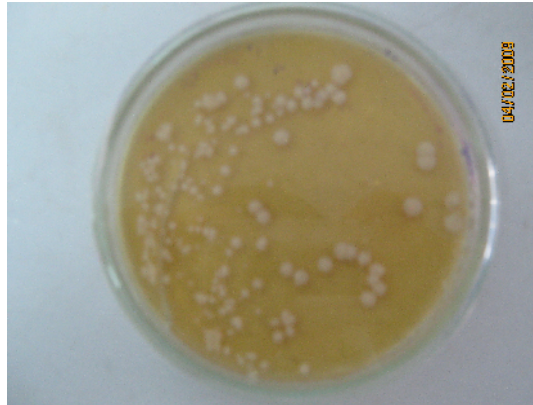


Figura 6. Colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en caja de Petri.

La replicación del ADN puede proceder en las levaduras cuando se presenta por lo menos una de las dos topoisomerasas activas. En adición, la inactivación de alguna de las topoisomerasas, no afecta significativamente la transcripción del ADN, mientras que la inactivación de ambas enzimas reduce marcadamente la síntesis del rARN y en menor grado la síntesis del mRNA (Salceda et al., 2006).

Las tres mayores vías o mecanismos reparadores del ADN definidos en la levadura son conocidos como: *rad3*, *rad6* y *rad52*. El *rad3* está asociado con la reparación de la escisión, el *rad6* con la reparación postreplicacional y el *rad52* es el camino de recombinación asociado con la reparación del rompimiento de la doble cadena y la recombinación meiótica. Las levaduras deficientes en algunos de estos mecanismos de reparación y que tengan también permeabilidad celular aumentada, han sido usadas en la búsqueda de agentes anticancerígenos potenciales (Gunatilaka et al., 1994).

En este bioensayo se usaron cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* denominadas como RS321, R52Y y RJ03, las cuales pueden emplearse para estudios del mecanismo de acción de agentes antitumorales y anticancerígenos (daño en la reparación del ADN) tomando como blanco a las topoisomerasas (Nittiss y Wang, 1988). El mecanismo implicado en su mutación es el *rad52* y cada cepa tiene mutaciones puntuales las cuales se explican en la Figura 7 y la Tabla 3.



Figura 7. Descripción general de las cepas de *S. cerevisiae* empleadas en el ensayo de actividad anti-topoisomerasa con sus mutaciones. (Adaptado de Gunatilaka et al., 1994).

Tabla 3. Descripción de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas

CEPA	MUTACIÓN	Actividad biológica que representa
RS321	Permeabilidad de la membrana, carencia de <i>rad52</i> y de la topoisomerasa I	Agentes que causan daño al ADN al inhibir la topoisomerasa II
R52Y	Permeabilidad de la membrana, carencia de <i>rad52</i>	Agentes que causan daño al ADN inhibiendo la topoisomerasa I
RJ03	Permeabilidad de la membrana	Agentes que inhiben la levadura

2.5 PRODUCTOS NATURALES

Las plantas producen una gama amplia y diversa de compuestos orgánicos que aún no se les conoce una función directa en su crecimiento y desarrollo las cuales se han denominado metabolitos secundarios (MS) (Taiz y Zeiger, 2002). Gran cantidad de estos metabolitos tienen propiedades benéficas para la salud de las personas.

Los metabolitos secundarios también difieren de los metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, lípidos) al tener una distribución restringida en el reino vegetal. Los metabolitos secundarios particulares se encuentran generalmente en solo una especie de planta o en grupos relacionados de especies, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2002).

Mucho antes que se descubriera la existencia de los microorganismos, ya se tenía la idea que ciertas plantas eran potencialmente medicinales. Desde la antigüedad el hombre ha usado plantas para tratamientos de enfermedades infecciosas y algunas de estas medicinas tradicionales son todavía incluidas como parte de los tratamientos habituales de varias enfermedades (Ríos y Recio, 2005).

Aunque los extractos crudos de las plantas son utilizados en el cuidado de la salud por un porcentaje alto de la población mundial, estos han sido como los agentes de primera línea ampliamente remplazados por ingredientes sintéticos con actividad farmacéutica en el mundo occidental. Además, la confianza sobre los productos naturales no es obligatoriamente más amplia y muchas drogas son moléculas de bajo peso molecular puramente sintéticas ó elaboradas biológicamente cómo una vacuna, antibióticos y proteínas recombinantes (Ganesan, 2008).

El mercado de los productos naturales es un campo de rápido crecimiento. Entre el periodo de 1981 y 2006, la lista fue de 1184 nuevas entidades químicas aprobadas como medicamentos y 52% de estas están relacionadas con productos naturales, 18% son biológicos y 30% puramente sintéticos (Ganesan, 2008).

2.6 ZONAS DE ESTUDIO

Las plantas estudiadas en este proyecto fueron recolectadas en áreas naturales protegidas de la Ecorregión Cafetera Colombiana, que se entiende como un conjunto de ecosistemas en el cual coexisten complejos ecológicos y humanos que muestran una indivisibilidad compuesta por la unidad de cuencas con sus vertientes y planicies; la de los nevados; la colindante con el Chocó biogeográfico; el ecosistema cafetero y la zona urbana. El trópico andino, contexto geográfico inmediato de esta

Ecorregión, ha sido reconocido internacionalmente como de importancia global dada su alta biodiversidad, gran número de endemismos y el considerable grado de amenaza a sus ecosistemas (CARDER, 2002). Las zonas de estudio donde se tomaron las muestras corresponden a la Reserva Natural Bremen-La Popa y Parque Regional Natural Ucumarí.

2.6.1 Reserva Natural Bremen-La Popa

La Reserva Natural Bremen-La Popa (Figura 8) está localizada en jurisdicción de los municipios de Filandia y Circasia, a 22 kilómetros de Armenia (Rango altitudinal: 1750 - 2000 m.s.n.m.). Es un área forestal que ocupa la parte alta de la Cuenca del Río Roble que tiene una extensión de 731 hectáreas, de las cuales 368 están sembradas en coníferas y cipreses; las otras 368 corresponden a bosque nativo con especies como roble, yarumo, palma de cera, helechos, platanillas y musgos, entre otras. Su temperatura promedio es de 16°C (CRQ, 2008).

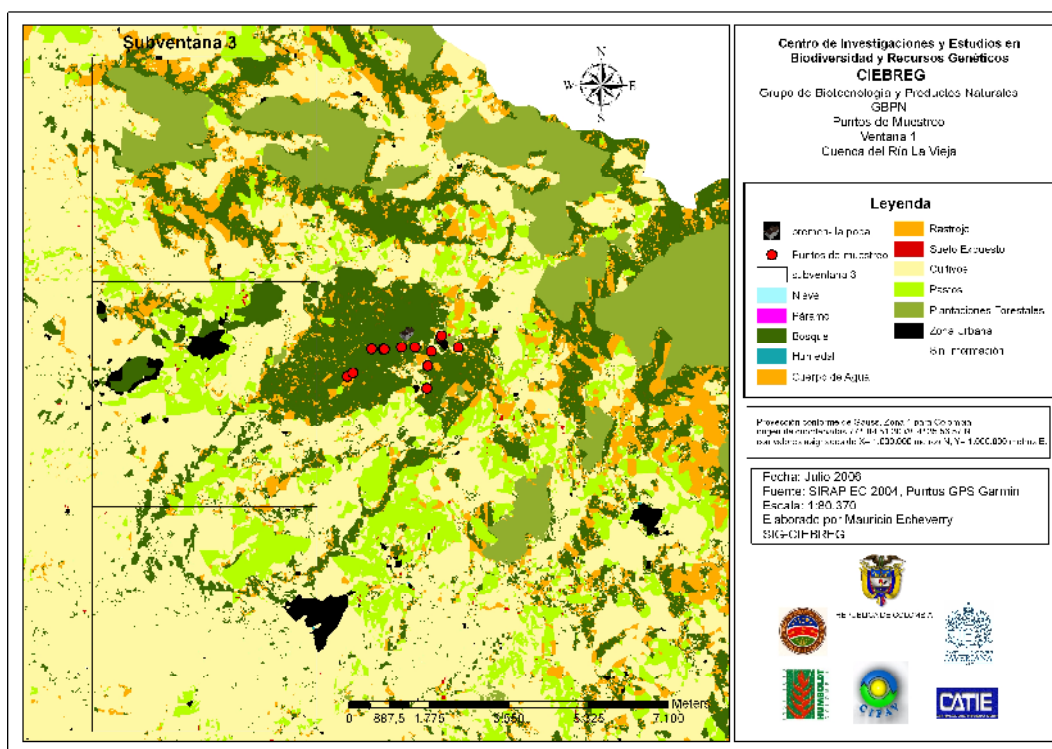


Figura 8. Mapa Reserva Natural Bremen - La Popa. Se observan los puntos de recolección de las plantas de muestras en rojo (CIEBREG, 2006).

2.6.2 Parque Regional Natural Ucumarí

El Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU) (Figura 9) fue creado en 1984 por el Concejo Municipal de Pereira y está a cargo de la Corporación Autónoma Regional del Risaralda (CARDER); consta de 4240 hectáreas, localizadas en la vertiente occidental de la Cordillera Central del Departamento de Risaralda (Galeano y Bernal, 1993).

Ucumarí limita por el norte y el oriente con el Parque Nacional Natural Los Nevados, y posee un rango altitudinal entre los 1850 y los 2650 m. Está ubicado en la zona de vida de Bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB).

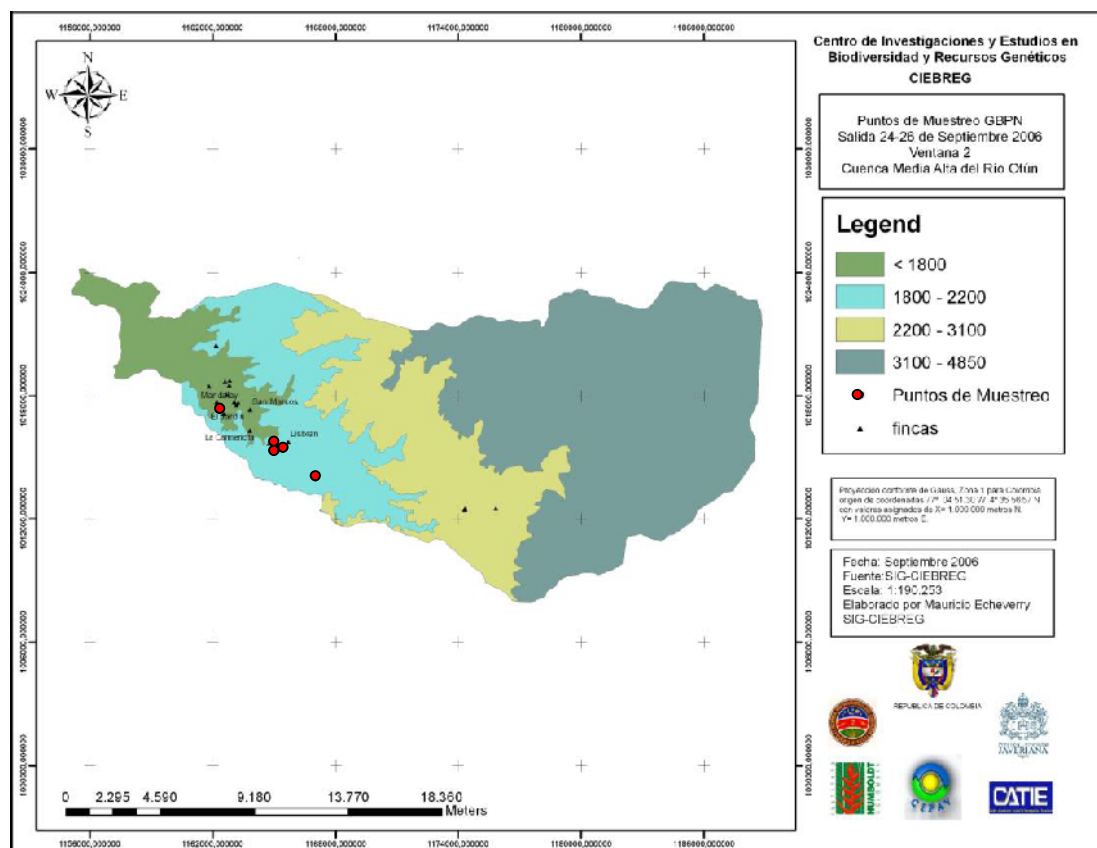


Figura 9. El Parque Regional Natural Ucumarí. Los puntos de muestreo se ven en rojo (CIEBREG, 2006).

La flora del Ucumarí es relativamente rica, a pesar de que el área del Parque no es muy grande. Hasta el momento se han encontrado 598 especies, pertenecientes a 113 familias de plantas superiores, es decir, plantas que se reproducen por medio de semillas. Se estima que este número corresponde aproximadamente a un 80% de todas las especies existentes en el Ucumarí. De las familias que presentan el mayor número de especies se destacan la Solanaceae con 39 especies, las Orquidaceae con 35, la Asteraceae con 33 y la Melastomataceae con 31 especies. En total estas cuatro familias abarcan alrededor del 20% de todas las plantas superiores del Parque Regional Natural Ucumarí (Galeano y Bernal, 1993).

2.7 FAMILIAS DE PLANTAS A ESTUDIAR

Este estudio se realizó con 29 especies de plantas, recolectadas en la Reserva Natural Bremen-La Popa y en el Parque Regional Natural Ucumarí. Las familias a las que pertenecen las plantas colectadas fueron: Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Urticaceae; estas han sido muy utilizadas en medicina natural como antimicrobianos, antimaláricos o como sedantes (Mahabir, 1995). A continuación se hace una descripción general de las familias estudiadas en este proyecto.

2.7.1 Familia Apocynaceae

Son plantas herbáceas (hay muchas especies volubles o trepadoras), leñosas de hojas enteras y opuestas. Las estípulas son muy raras. Fruto bacciforme o capsular o formado por dos mericarpos distintos que constituyen sendos folículos o frutos abayados. Semillas por lo común comprimidas (García, 1992).

Las especies de esta familia siempre poseen tubos laticíferos simples y floema intraleñoso. El látex frecuentemente es blanco pero también pueden ser de color amarillento a marfil (García, 1992).



Figura 10. Representante de la familia Apocynaceae, *Apocynaceae juss* (Tomado de: www.tropicos.org).

Esta familia comprende 200 géneros, 2000 especies. Los Géneros más numerosos: *Tabernaemontana* (140), *Mandevilla* (115), *Rauvolfia* (100), *Parsonia* (100) y *Aspidosperma* (80). Se encuentra distribuida en regiones tropicales y subtropicales, con algunas pocas especies en regiones templadas.

2.7.2 Familia Asclepiadaceae

La familia Asclepiadaceae agrupa a unas 1700 especies (Furnari et al., 2002). Se trata de plantas herbáceas, o más comúnmente arbustivas a menudo crasa, hojas sencillas, enteras, opuestas y sin estípulas; flores actinomorfas.

La familia Asclepiadaceae está incluida en la Apocynaceae al demostrarse por análisis filogenéticos que el grupo Asclepiadaceae se originó a partir del Apocynaceae (Shumway et al., 2009).

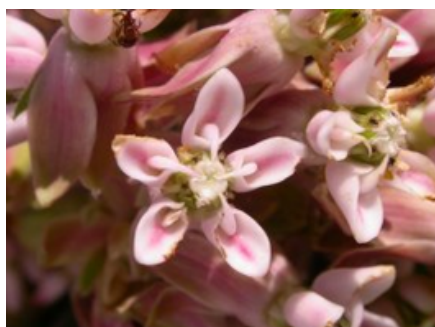


Figura 11. Representante de la familia Asclepiadaceae, *Asclepias syriaca* L. (Tomado de: www.tropicos.org).

2.7.3 Familia Asteraceae (Compositae)

Son hierbas (rastreras o trepadoras), plantas leñosas (arbustos, árboles, bejucos). Poseen hojas alternas y opuestas, simples o compuestas; flores dispuestas siempre en capítulos, hermafroditas o unisexuales. Fruto en aquenino sésil, algunas veces con un apéndice y frecuentemente con el vilano adherido a la testa; semillas sin endospermo en íntimo contacto con el pericarpio.



Figura 12. Representante de la familia Asteraceae, *Mikania willd* (tomado de: www.tropicos.org).

Para la flora colombiana esta familia comprende numerosísimas especies que crecen desde 0 metros sobre el nivel del mar hasta el páramo a 4.000 m. Sin embargo, la mayor distribución de las especies de esta familia está en los páramos y subpáramos de las 3 cordilleras (García, 1992).

Esta familia comprende más de 1700 géneros y unas 30.000 especies distribuidas por todo el mundo (Katinas et al., 2007). Los géneros más numerosos en especies son: *Senecio* con 127 especies, *Eupatorium* con 68 especies, *Espeletia* (58), *Diplostegium* (49), *Verononia* (34), *Tagetes* (12), *Gnaphalium* (15). Los demás géneros no son tan numerosos en especies (García, 1992).

2.7.4 Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae consta de unos 317 géneros y 8000 especies de distribución principalmente tropical. Es una familia muy variable morfológicamente, comprende árboles, arbustos, lianas y hierbas (Murillo, 2004). La mayoría o casi la totalidad de las especies de esta familia en

todos sus órganos tienen tubos laticíferos por donde recorre abundante látex blanco o amarillento. Las semillas están provistas de tejido nutritivo y generalmente contienen grandes cantidades de aceite y granos de aleurona; las hojas son sencillas; con flores unisexuales, monoicas o dioicas; en la mayoría de especies el perianto se reduce a una sola cubierta floral aunque puede faltar por completo o por el contrario, puede estar integrado al cáliz y la corola; el fruto es casi siempre esquizocárpico, se descompone en tres cocos o partes; raras veces bacciforme o drupáceo (García, 1992).



Figura 13. Representante de la familia Euphorbiaceae, *Acalypha ostryifolia* Riddell (tomada de: www.tropicos.org).

2.7.5 Familia Rubiaceae

Está constituida por árboles, arbustos o yerbas con hojas opuestas o verticiladas decusadas, generalmente enteras; estípulas frecuentemente interpeciolares, libres o unidas, algunas semejantes a hojas. Flores por lo regular actinomorfas, tetrámeras o pentámeras, cordada más o menos tubulosa; estambres en general en número igual al de los pétalos. Fruto en cápsula o compuesto de núculas monospermas que se sueltan en la madurez (García, 1992).

La familia Rubiaceae es una de las más grandes de las plantas con flores, consta de unos 600 géneros y tal vez 10.000 especies. Su distribución es cosmopolita pero está mejor representada en las zonas tropicales (Andersson, 1992).



Figura 14. Representante de la familia Rubiaceae, *Coffea arabica* L.
(tomada de: www.tropicos.org)

2.7.6 Familia Solanaceae

Son plantas herbáceas o leñosas, arbustos o árboles; hojas generalmente sencillas, esparcidas o acopladas; el androceo consta generalmente de 5 estambres bien desarrollados. Fruto en baya o cápsula, semilla con tejido nutritivo o sin él (García, 1992).



Figura 15. Representante de la familia Solanaceae, *Solanum melongena* L.
(tomada de: <http://susveg-asia.nri.org/>).

En esta familia es muy frecuente la concrecencia de las hojas florales o de las brácteas con el eje florífero o la del eje de la inflorescencia con el tallo o la rama principal en que se insertan; esto motiva la disposición curiosa por parejas de las hojas y la posición extraaxilar a un mismo nivel del tallo y con una divergencia de 90°. Esta familia está compuesta de más de 1500 especies, difundidas por la mayor parte de la tierra, pero

particularmente en América del sur. En nuestro país son numerosísimas las especies de esta familia, pues crecen desde el nivel del mar hasta los 3.000 m. de altura (García, 1992).

2.7.7 Familia Urticaceae

Las urticáceas son en su mayoría hierbas o pequeños arbustos con hojas opuestas o alternas, muchas veces con varias venas que se extienden arqueadas desde la base hasta el ápice de la hoja y con flores pequeñas y poco vistosas, de color blanquecino o verdoso, dispuestas en inflorescencias. Al contrario de lo que puede sugerir el nombre de la familia, la mayoría de las urticáceas no son irritantes (Galeano y Bernal, 1993).

Hay unas 1000 especies de urticáceas, distribuidas en las zonas tropicales y templadas de todo el mundo. En Colombia hay alrededor de 100 especies, 60 de ellas en el género *Pilea*; una especie de este género, *Pilea goudotiana*, es muy común en las paredes húmedas de las cascadas en el Ucumarí; en el parque hay quince especies de urticáceas (Galeano y Bernal, 1993).



Figura 16. Representante de la familia Urticaceae, *Boehmeria ramiflora* (tomada de: <http://herbaria.plants.ox.ac.uk>)

En la tabla 4 se muestran algunos usos etnobotánicos y farmacológicos atribuidos a las plantas de las diferentes familias estudiadas:

Tabla 4. Familias utilizadas en este proyecto y sus principales usos.
 (Adaptado de García, 1992)

FAMILIA	USOS
Apocynaceae	Han sido utilizadas como plantas medicinales (<i>Rauwolfia serpentina</i>) y otras como ornamentales. Usos comunes: como purgantes, contraveneno de serpientes, expectorantes, hipotensores y en tratamiento de resfriados, dolores de cabeza, pulmonía y asma. Algunas especies muestran alta toxicidad, siendo empleadas como insecticidas. De la familia Apocynaceae se han aislado los alcaloides vinblastina y vincristina los cuales presentan actividad anticancerígena (Pung, 2002).
Asclepiadaceae	El látex de muchas especies de esta familia es venenoso, se usan como hemostático, antihelmínticos, contra la gonorrea y neuralgias faciales, para quitar verrugas, bajar presión arterial, incluso como analgésicos gástricos.
Asteraceae	Se pueden emplear como oleaginosas (girasol: <i>Helianthus annuus</i>); hortícolas (lechuga: <i>Lactuca sativa</i>); insecticidas (<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>); ornamentales; aromáticas (abrotano: <i>Artemisia abrotanum</i>); para la elaboración de licores y medicinales (manzanilla: <i>Chamaemelum nobile</i>). Se atribuyen usos contra el cáncer y úlceras malignas, se emplean como hemostáticos, estimulantes y antihemorroidales, contra el acné y daños en la piel.
Euphorbiaceae	Como ornamental es muy conocida la flor de pascua (<i>Euphorbia pulcherrima</i>). También incluye plantas medicinales como el ricino (<i>Ricinus officinalis</i>) y presenta un gran interés económico por sus potencialidades en oleoquímica. Otros usos son como almendras comestibles de gran valor alimenticio, en afecciones de la piel, como laxantes suaves y para tratar amebiasis.
Rubiaceae	Tiene gran interés económico el cafeto (<i>Coffea arabica</i>) de cuya semilla se obtiene el café. Como ornamentales destacan las gardenias (<i>Gardenia sp. pl.</i>). Presenta interés terapéutico <i>Cinchona officinalis</i> de la que se obtiene la quina (se usa como antiséptico) y <i>Rubia tinctoria</i> fue cultivada por sus propiedades tintóreas.

FAMILIA	USOS
Solanaceae	<p>Por su interés económico destacan la papa y el tabaco. Como alimentos o condimentarias se emplean el pimiento (<i>Capsicum annuum</i>), berenjena (<i>S. melongena</i>) y tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>). Entre las utilizadas en jardinería son muy comunes las petunias. Los alcaloides (atropina, escopolamina, hiosciamina) que contienen algunas especies se emplean en medicina: belladona (<i>Atropa belladonna</i>) usada como antiespasmódico, estramonio (<i>Datura stramonium</i>) por su efecto analgésico, beleño (<i>Hyoscyamus niger</i>) que se usa en casos de hipocondría.</p>
Urticaceae	<p>Especies de esta familia han reportado actividad benéfica en el tratamiento de enfermedades de los riñones y como hemostático. Algunas se usan como contraveneno de serpientes, como diurético y en enfermedades de la piel (alergias).</p>

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante e inhibitoria de las topoisomerasas I y/o II de 29 plantas de la Ecorregión Cafetera Colombiana (ECC).

3.2 Objetivos específicos

- Obtener los extractos de diclorometano y metanol de 29 plantas de las familias: Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Urticaceae.
- Caracterizar los metabolitos secundarios más abundantes en los extractos de diclorometano y metanol mediante una marcha fitoquímica por cromatografía de capa delgada.
- Valorar la capacidad antioxidante de los extractos de diclorometano y metanol por el método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).
- Determinar el contenido de fenoles totales por el método de Folin - Ciocalteu para los extractos con capacidad antioxidante mayor al 25%.
- Determinar la capacidad inhibitoria de las topoisomerasas I y II de los extractos de diclorometano y metanol sobre las cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* RS321, RJ03 y R52Y.

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIALES

4.1.1 Materiales biológicos

En este bioensayo se utilizaron las cepas mutadas de *S. cerevisiae* RJ03, R52Y y RS321. Dicho material fue donado al laboratorio del Grupo de Biotecnología - Productos Naturales por el profesor David G.I. Kingston, de la Universidad Virginia Polytechnic Institute and State University, USA.

4.1.2 Equipos e instrumentos

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron erlenmeyers de varios volúmenes marca Schott Duran. Para la realización de los ensayos de actividad antitopoisomerasa sobre *S. cerevisiae* se usaron cajas de Petri de 100 por 30 mm.

Durante las distintas etapas de los bioensayos se emplearon pipetas de vidrio de volumen constante marca Brand y micropipetas de 1000 μL y de 100 μL marca Eppendorf. Para la preparación de las soluciones de trabajo se emplearon matraces volumétricos marca Schott Duran clase A. De igual forma se usó material de vidrio común en un laboratorio.

Los instrumentos empleados para el desarrollo de este trabajo fueron: balanza analítica Adventurer marca Ohaus, Rotaevaporador Laborota 4000 Heidolph, Minishaker S1 IKA Works, Shaker SG2 Schott, Ultrasonido LC30H Elma, Centrifuga Sero - Fuge II Adams, Incubadora WTB Binder, Espectrofotómetro UVI light Xs marca Schott, Espectrofotómetro Genesys 20 marca Thermo, Cronómetro Fisher Scientific, Cabina de flujo laminar (CFL) y Autoclave 25 x All American.

4.1.3 Reactivos

Para los ensayos de actividad antitopoisomerasa sobre *S. cerevisiae* se utilizaron agar y peptona Oxoid, extracto de levadura Becton Dickinson, glucosa Carlo Erba, cloruro de sodio Merck, nistatina Sigma-Aldrich y sulfato de gentamicina comercial.

En la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó el radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) Sigma-Aldrich con pureza del 99.9%; como controles positivos se emplearon: Hidroquinona Merck y Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) Sigma- Aldrich.

La determinación de fenoles totales se realizó por el método de Folin - Ciocalteu empleando reactivo marca Merck, ácido gálico marca Sigma y carbonato de sodio Merck.

Todos los solventes orgánicos empleados fueron de grado analítico. Metanol, etanol, diclorometano fueron marca Mallinckrodt; excepto los usados para obtener los extractos crudos que fueron de tipo comercial.

4.1.4 Material vegetal

En la tabla 5 se presentan las plantas recolectadas en las zonas de estudio (Reserva Natural Bremen-La Popa y el Parque Regional Natural Ucumarí) y empleadas en este trabajo con su voucher de identificación (código de herbario de la Universidad de Antioquia).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtención de los extractos

La extracción del material vegetal se realizó mediante maceración con los solventes hexano, diclorometano y metanol; siguiendo el procedimiento descrito por Niño et al., (2007a) que se muestra en el anexo 1.

Tabla 5. Especies de plantas estudiadas

Familia	Especie	Voucher	No. UTP
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	FJR 3964	123
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	FJR 3981	139
Asteraceae	<i>Baccharis</i> sp	FJR 3972	131
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	FJR 3966	125
	<i>Critoniella acuminata</i>	FJR 3968	127
	<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
	<i>Hyeronima</i> sp	FJR 3971	130
Rubiaceae	<i>Faramea</i> sp	FJR 3979	138
	<i>Rubiaceae</i> sp	FJR 3973	132
Solanaceae	<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
	<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
	<i>Solanum trachycyphum</i>	FJR 4042	188
Urticaceae	<i>Boehmeria bullata</i>	FJR 3989	142
	<i>Phenax uliginosus</i>	FJR 3990	143
	<i>Urera ballotaewfolia</i>	FJR 3998	150

4.2.2 Caracterización fitoquímica de los extractos

A cada extracto se le realizó una caracterización fitoquímica para detectar la presencia de metabolitos secundarios mediante cromatografía de capa delgada (CCD). Para los extractos metanólicos las cromatoplasas se eluyeron con acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10) y para los de diclorometano se empleó el sistema hexano-acetato de etilo (6:4). La detección de los núcleos fitoquímicos se llevó a cabo aplicando los siguientes agentes cromogénicos a las placas eluidas: el reactivo de Dragendorff para alcaloides, el anisaldehído-ácido sulfúrico para esteroides, vainillina al 1% en ácido sulfúrico-etanol absoluto para saponinas, el cloruro de aluminio al 2% en etanol para flavonoides y el cloruro férrico al 1% para taninos (Niño et al., 2007b).

4.2.3 Ensayos de actividad biológica

4.2.3.1 Ensayo de la capacidad antioxidante por captación de radicales libres mediante el método del DPPH

La capacidad antioxidante se determinó por medio del método del DPPH porque es un método *in vitro* confiable, efectivo y reproducible al evaluar extractos de plantas así como de compuestos puros (Surveswaran et al., 2007).

4.2.3.1.1 Preparación de la solución de DPPH

La solución de DPPH se preparó para cada ensayo, dependiendo del número de muestras a evaluar. Aunque éste es un radical libre estable, se degrada fácilmente por efectos de luz y de almacenamiento cuando está disuelto. La solución se preparó a 20 mg/L en un matraz aforado envuelto en papel aluminio, empleando metanol como solvente. Posteriormente la solución se transfirió a un frasco color ámbar también envuelto en papel aluminio.

4.2.3.1.2 Ensayo de porcentaje de actividad antioxidante

En la figura 17 se muestra el procedimiento seguido para medir el porcentaje de actividad antioxidante de los extractos vegetales, basado en el método descrito por Brand-Williams et al., (1995). Las muestras se

incubaron por 30 minutos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con una repetición en días diferentes.

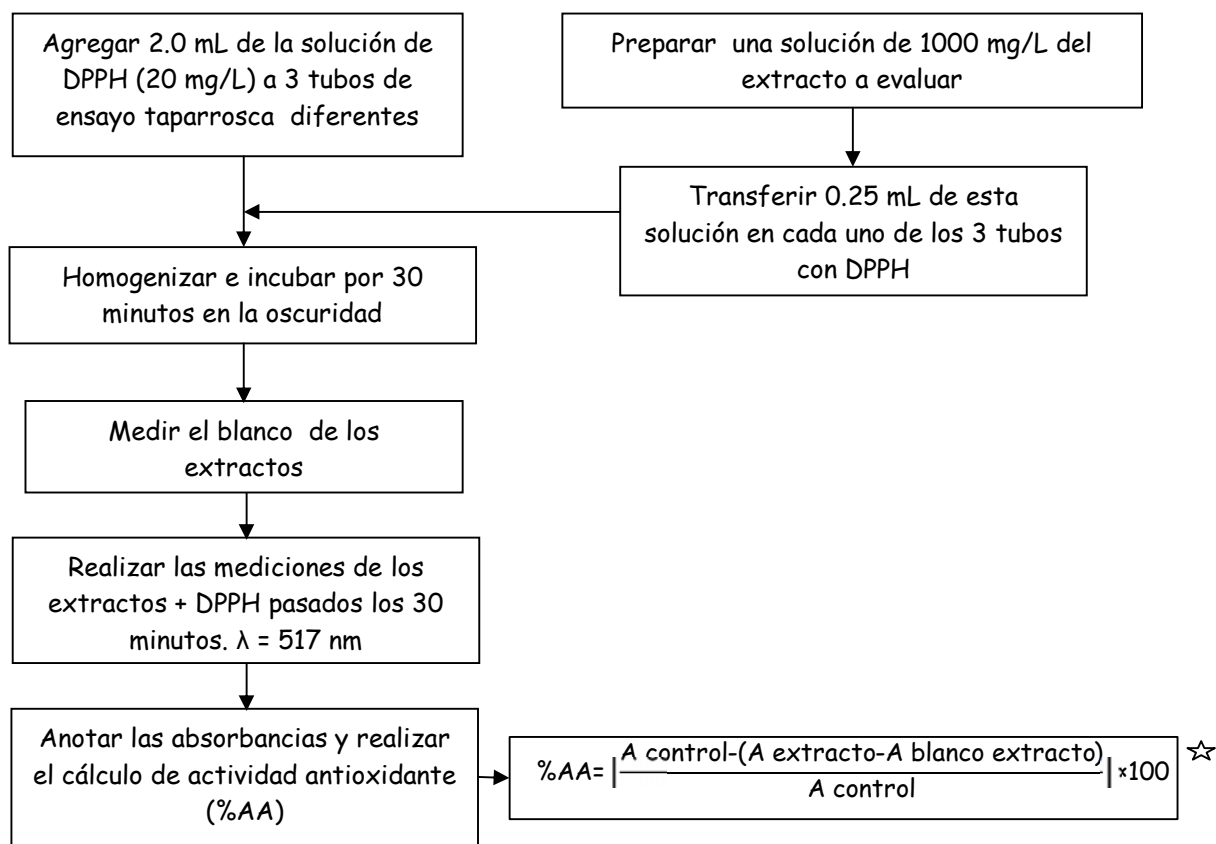


Figura 17. Protocolo para determinar la actividad antioxidante mediante captura de radicales libres por DPPH. ☆: Ver numeral 4.2.4.1

Las soluciones de los extractos se prepararon a 1000 mg/L, al igual que la hidroquinona el control positivo (evaluado de la misma manera que los extractos, figura 17). Los extractos metanólicos se solubilizaron en la mezcla metanol-agua (9:1) y los de diclorometano en la mezcla butanol-etanol-agua (2:6:2). El control negativo se preparó al mezclar 0.25 mL del sistema empleado para disolver los extractos con 2.0 mL de DPPH (20 mg/L) y se utilizó un blanco de extractos, preparado con 0.25 mL de la solución de extracto y la adición de 2 mL de metanol (solvente de DPPH).

4.2.3.1.3 Preparación de la curva de calibración con Trolox

Se prepararon soluciones patrón de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) a 1, 2, 4, 6, 12 y 32 μM usando etanol absoluto como solvente. Estas soluciones fueron evaluadas para determinar el porcentaje de actividad antioxidante por medio del mismo protocolo empleado para la evaluación de los extractos (Figura 17). Con los resultados obtenidos se obtuvo una curva de calibración con el fin de expresar la capacidad antioxidante de los extractos en equivalentes de Trolox (Wetwitayaklung et al., 2006).

4.2.3.2 Ensayo de determinación de fenoles totales

Para esta determinación se siguió el método espectrofotométrico de Folin - Ciocalteu, según lo descrito por Singleton y Rossi (1965) y Cardeño et al., (2007). El compuesto tomado como control positivo fue el ácido gálico. El protocolo seguido se muestra en la figura 18.

Se realizó una curva de calibración con ácido gálico a las siguientes concentraciones: 0, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 $\mu\text{g/mL}$ y se procedió de acuerdo con el protocolo de la figura 17, el mismo empleado para realizar las mediciones de las muestras de extractos.

4.2.3.3 Ensayo de actividad antitopoisomerasa sobre cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.3.3.1 Cepas de levadura

Como se dijo anteriormente las cepas empleadas para la determinación de la actividad antitopoisomerasa de los extractos vegetales fueron *S. cerevisiae* RJ03, R52Y y RS321. Las cepas R52Y y RS321 están disponibles en el laboratorio de Biotecnología-Productos Naturales de la Escuela de Tecnología Química preservadas en papel filtro y almacenadas a 4°C; además, las 3 cepas (RJ03, R52Y y RS321) se encuentran preservadas en posición de cuña y congeladas.

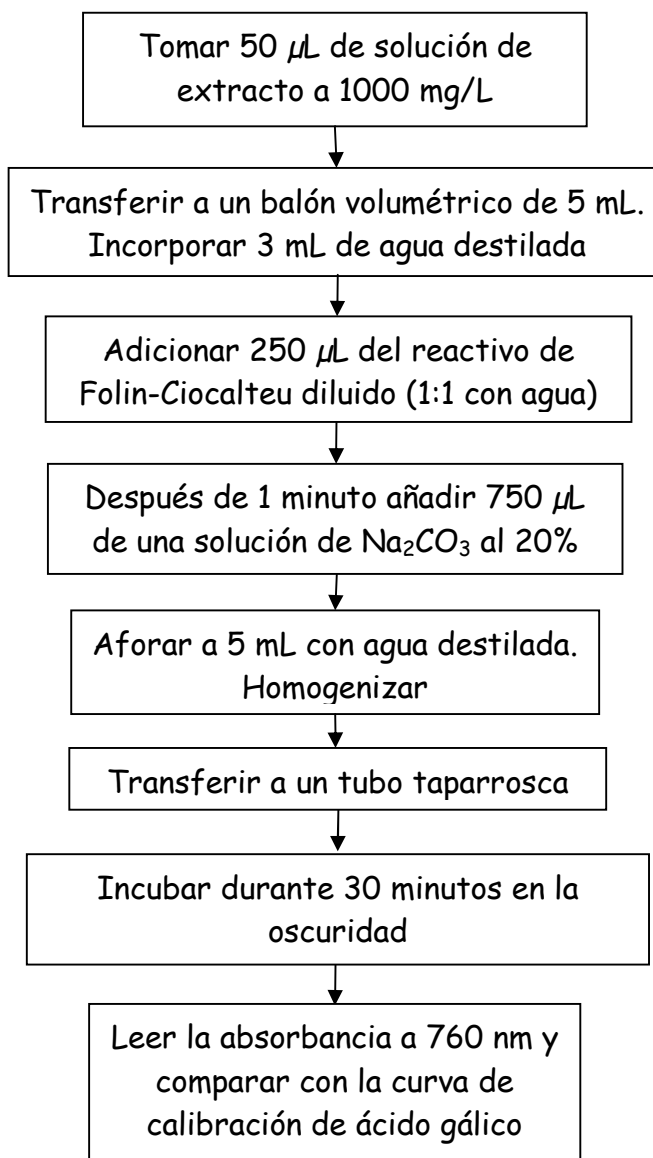


Figura 18. Protocolo para determinar el contenido de fenoles totales en las muestras de los extractos vegetales.

Estas cepas requieren de un protocolo de reactivación (anexo 2 y 3), crecimiento (anexo 4) y conservación (anexo 5 y 6). Todas las operaciones para la activación, siembra, transferencia y preservación de las cepas de *S. cerevisiae*, se realizaron bajo condiciones asépticas y trabajando en el interior de cabina de flujo laminar (CFL) (Ríos et al., 1988).

4.2.3.3.2 Composición del caldo y el agar YPD

El medio de cultivo utilizado fue YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa). Para preparar 500 mL de agar YPD, se realizó el procedimiento indicado en el anexo 7 y para la preparación de 500 mL de caldo de cultivo YPD se siguieron las etapas descritas en el anexo 8. La composición para el caldo y el agar se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Composición del caldo y el agar YPD.

Reactivo	Composición (%)
Extracto de levadura	1
Peptona	2
Dextrosa	2
Agar*	1.5

* Este no se incorpora en la preparación del caldo.

4.2.3.3.3 Siembra del microorganismo y evaluación de los extractos

Se permitió que las levaduras crecieran 24 horas en el caldo YPD, luego una porción de ellas se suspendieron y diluyeron con solución salina al 0.85%, hasta obtener una dilución cuya transmitancia fuese del 25% a 600 nm. Con el caldo diluido de cada cepa, a la transmitancia deseada se realizaron los ensayos de actividad antitopoisomerasa, usando el método de difusión del pozo en agar (Figura 19).

Como control positivo se utilizó el antimicótico nistatina que inhibe el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae*. Como control negativo se usaron los solventes empleados para disolver los respectivos extractos (Zhou et al., 2000b).

A cada caldo empleado en los ensayos se adicionó una solución de sulfato de gentamicina para que su concentración fuese de 50 mg/L, la cual inhibe otros microorganismos distintos a *S. cerevisiae*, evitando así interferencias en los análisis.

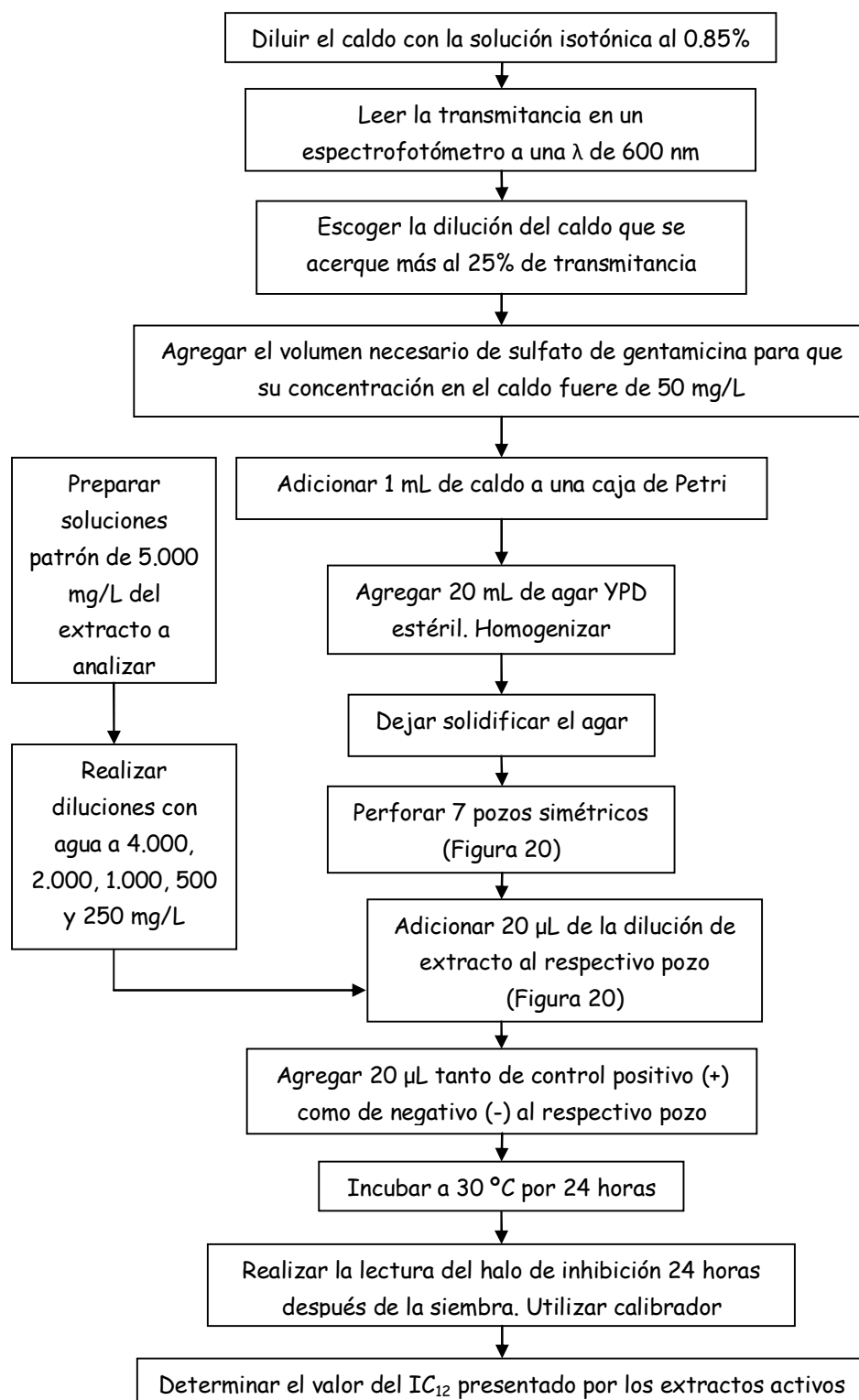


Figura 19. Siembra de *S. cerevisiae* y evaluación de los extractos a diferentes concentraciones.

Los extractos metanólicos se solubilizaron en la mezcla etanol-agua (1:4) y los de diclorometano en la mezcla butanol-etanol-agua (2:6:2). Se prepararon soluciones stock de 5.000 mg/L y con esta se realizaron diluciones a 4.000, 2.000, 1.000, 500 y 250 mg/L.

Las soluciones de cada uno de los extractos se sembraron como se muestra en la figura 20.

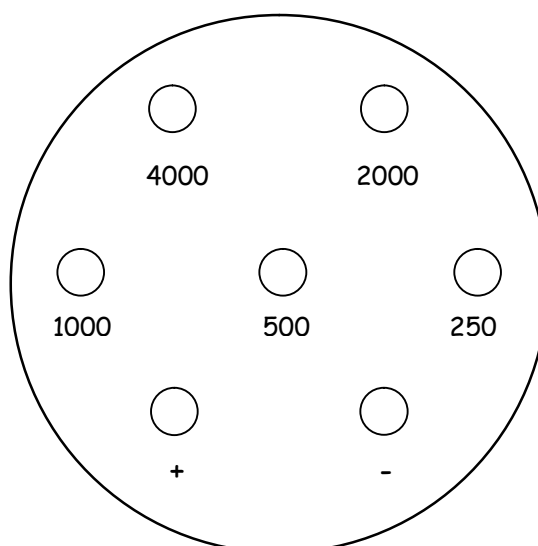


Figura 20. Posición de la siembra y concentración (mg/L) de los extractos y controles en el bioensayo de las topoisomerasas empleando las cepas de *S. cerevisiae*.

Se realizó la lectura del halo de inhibición a las 24 horas para determinar cuáles de los extractos evaluados tendrían la capacidad de inhibir el crecimiento de la levadura. Se determinó la concentración inhibitoria doce (IC₁₂), la cual es la concentración del extracto (o de cualquier sustancia evaluada) mínima necesaria para lograr un halo de inhibición de 12 mm alrededor del pozo que contiene el extracto o del compuesto evaluado (Gunatilaka et al., 1994). Todos los análisis se realizaron por triplicado y con repetición en un día diferente.

Un extracto activo será aquel que muestre actividad selectiva contra una o más de las cepas deficientes en el mecanismo de reparación rad52, con IC₁₂ inferior a un tercio del de la especie silvestre (RJ03) y que sea menor a 2000 µg/mL (Hosein et al., 2002).

Para determinar la concentración del control positivo (nistatina), esta se evaluó a diferentes concentraciones frente a cada una de las cepas y se hizo la determinación de su IC_{12} . La concentración de Nistatina usada como control positivo fue: $65 \mu\text{g/mL}$, $40 \mu\text{g/mL}$ y $40 \mu\text{g/mL}$ para las cepas RS321, R52Y y RJ03, respectivamente.

4.2.4 Tratamiento de datos y análisis estadístico

Se utilizó el programa Microsoft Office EXCEL 2007 para realizar todo el tratamiento y el análisis estadístico de los datos obtenidos para cada ensayo de actividad biológica estudiado.

4.2.4.1 Ensayo de determinación de capacidad antioxidante

Con los datos obtenidos para la capacidad antioxidante se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (captación de radicales libres) de cada extracto por medio de la siguiente ecuación:

$$\%AA = \left| \frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{extracto}} - A_{\text{blanco extracto}})}{A_{\text{control}}} \right| \times 100$$

Donde A_{control} es la absorbancia del DPPH sin extracto y A_{extracto} la absorbancia del DPPH con la muestra luego de los 30 minutos de incubación.

Los resultados del porcentaje de actividad antioxidante se interpolaron en la curva de calibración con Trolox y los resultados se expresaron como equivalentes Trolox ($\mu\text{mol Trolox} / \text{g Extracto}$).

Los extractos se consideraron activos si presentaban una actividad antioxidante superior o igual a 25%, la mitad del valor presentado por el control positivo, hidroquinona. A los datos también se les calculó su desviación estándar y los límites de confiabilidad.

4.2.4.2 Ensayo de determinación de fenoles totales (reactivo de Folin-Ciocalteu)

Por medio de la curva de calibración con ácido gálico se logró calcular la concentración de fenoles totales en la muestra de extractos evaluados,

expresándolos como mg de ácido gálico / mg de extracto. Esto se hizo con el fin de relacionar los resultados de capacidad antioxidante con la cantidad de fenoles, identificando extractos cuyo contenido de compuestos fenólicos fuera el responsable de la actividad antioxidante.

También se realizó una gráfica de correlación entre los resultados obtenidos de actividad antioxidante y la cantidad de fenoles en la totalidad de las muestras analizadas, lo que permitió determinar la influencia del contenido de fenoles en los extractos con la capacidad antioxidante del conjunto de plantas.

4.2.4.3 Ensayo de determinación de actividad antitopoisomerasa

Con los datos de los halos de inhibición obtenidos en el ensayo de determinación de actividad antitopoisomerasa sobre las cepas mutadas de *S. cerevisiae* fueron analizados por medio de una regresión lineal, de la cual se calculó la ecuación de la gráfica del logaritmo en base 10 de la concentración (y) vs el promedio del halo de inhibición (x), donde finalmente se obtiene el IC₁₂ (concentración de extracto o sustancia que produzca un halo de inhibición de 12 mm de diámetro) (anexo 9).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS

Los resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de metanol y diclorometano de 29 plantas recolectadas en zonas de reserva natural de la Ecorregión Cafetera Colombiana (ECC) y evaluadas en este trabajo se presentan en las tablas 7 y 8 respectivamente.

En la tabla 7 se muestran los núcleos fitoquímicos detectados para los extractos metanólicos evaluados, de la cual se puede destacar lo siguiente:

Tabla 7. Metabolitos secundarios detectados en los extractos metanólicos

Familia	Especie	Número UTP	Metabolitos Secundarios *					
			Alcaloides	Esteroles y Triterpenos	Saponinas	Fenoles	Flavonoides	Taninos
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	123	-	-	-	-	+	-
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	139	+	+	+	-	+	-
Asteraceae	<i>Baccharis</i> sp	131	-	-	-	+	-	+
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	125	-	+	-	-	-	-
	<i>Critoniella acuminata</i>	127	+	-	+	-	-	-
	<i>Lepidaploa lehamanii</i>	135	-	+	+	+	-	+
	<i>Mikania banisteriae</i>	124	-	+	+	+	+	+
	<i>Mikania lloensis</i>	136	-	-	+	-	-	-
	<i>Pentacalya urbanii</i>	122	-	+	+	+	+	+
	<i>Tilesia baccata</i>	133	-	+	+	-	-	-
Euphorbiaceae	<i>Acalypha diversifolia</i>	126	-	-	-	+	-	+
	<i>Alchornea calophylla</i>	128	-	+	+	+	+	+
	<i>Alchornea</i> sp	140	-	+	+	+	-	+
	<i>Hyeronima</i> sp	130	-	+	+	+	+	+
Rubiaceae	<i>Faramea</i> sp	138	-	-	-	+	-	+
	<i>Rubiacea</i> sp	132	-	-	-	-	-	-
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	+	+	+	-	+	-
Urticaceae	<i>Solanum trachycyphum</i>	188	+	+	+	-	-	-
	<i>Boehmeria bullata</i>	142	-	-	-	-	-	-
	<i>Phenax uliginosus</i>	143	-	-	-	-	-	-
	<i>Urera ballotaewfolia</i>	150	-	+	+	-	-	-
Controles positivos			Papaverina	Hecogenina y Estigmasterol	Protosaponina de Dioscina A	Resorcinol	Kaempferol	Acido Tánico

* (+) Presencia; (-) Ausencia

= Plantas activas con capacidad antioxidante

- Las plantas pertenecientes a la familia Asteraceae se caracterizaron por la ausencia de alcaloides y de las 8 especies evaluadas solo *Critoniella acuminata* dio positiva para este tipo de metabolitos. Esta familia presentó saponinas en varias de las especies analizadas, contrario a lo que sucedió con la Solanaceae. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Buitrago, (2004) y Salama et al., (1987). La familia Asteraceae presentó pocas especies con fenoles, flavonoides y taninos; aunque *Mikania banisteriae* dio prueba positiva para estos tres tipos de metabolitos secundarios.
- Las especies de la familia Euphorbiaceae presentaron fenoles, taninos y flavonoides, aunque no mostraron alcaloides. En las especies del género *Alchornea*, se han encontrado alcaloides hexaidroimidazo - pirimidínicos y guanidínicos como constituyentes principales, los cuales reportan actividad significativa frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (de Souza et al., 2003).
- Los extractos metanólicos de las plantas de la familia Solanaceae evaluados se caracterizaron por la presencia de compuestos del tipo alcaloidal, pero mostraron ausencia marcada de saponinas. En cuanto al contenido de los demás metabolitos, las especies no presentaron una tendencia característica entre ellas. *Depprea aff sachapapa* y *Solanum cf umbellatum* solo mostraron la presencia de alcaloides. Estos resultados concuerdan con los hallados por Maiti et al. (2002) y Hernández et al. (2010) quienes destacaron la presencia constante de alcaloides en esta familia, algunos con propiedades medicinales.
- La familia Urticaceae se caracterizó por la poca presencia de metabolitos. El contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos fue nulo; y en cuanto a los esteroides, triterpenos y saponinas, la única especie que los presentó fue *Urera ballotaewfolia*.
- *Cynanchum* sp (Apocynaceae) únicamente reportó la presencia de flavonoides en la marcha fitoquímica (metanol). Por otro lado, como

se mencionó en la tabla 4, de la familia Apocynaceae se han aislado alcaloides que presentan actividad anticancerígena (Pung, 2002).

- El extracto de la especie *Oxypetalum cordifolium* (Asclepiadaceae), carece de compuestos fenólicos y taninos, aunque dio positiva para todos los demás metabolitos analizados. Quizá a este tipo de metabolitos se deban las propiedades medicinales presentadas por plantas de esta familia (tabla 4).

Los núcleos fitoquímicos detectados en los extractos de diclorometano se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Metabolitos secundarios detectados en los extractos de diclorometano.

Familia	Especie	Número UTP	Metabolitos Secundarios *					
			Alcaloides	Esteroles y Triterpenos	Saponinas	Fenoles	Flavonoides	Taninos
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	123	-	-	-	-	-	-
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	139	-	-	-	-	-	-
Asteraceae	<i>Baccharis</i> sp	131	-	+	-	-	-	-
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	125	-	-	-	-	-	-
	<i>Critoniella acuminata</i>	127	-	+	-	+	-	+
	<i>Lepidaploa lehamanii</i>	135	-	+	+	+	-	+
	<i>Mikania banisteriae</i>	124	-	+	-	-	-	-
	<i>Mikania lloensis</i>	136	-	-	-	-	-	-
	<i>Pentacalya urbanii</i>	122	+	+	-	+	+	+
	<i>Tilesia baccata</i>	133	-	-	-	-	+	-
Euphorbiaceae	<i>Acalypha diversifolia</i>	126	-	+	-	+	+	+
	<i>Alchornea calophylla</i>	128	-	-	+	+	+	+
	<i>Alchornea</i> sp	140	-	-	+	-	+	-
	<i>Hyeronima</i> sp	130	-	+	-	+	+	+
Rubiaceae	<i>Faramea</i> sp	138	-	-	-	-	+	-
	<i>Rubiacea</i> sp	132	-	+	-	-	-	-
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	Protosaponina de Dioscina A	Resorcinol	Kaempferol	Acido Tánico

* (+) Presencia; (-) Ausencia

= Plantas activas con capacidad antioxidante

Con relación a los resultados mostrados en la tabla 8 se pueden resaltar los siguientes aspectos:

- Los extractos de diclorometano de las plantas de la familia Asteraceae tampoco mostraron presencia relevante de alcaloides ni de saponinas. De esta familia hay dos especies que no mostraron ninguno de los metabolitos evaluados: *Clibadium pentaneuron* y *Mikania lloensis*.
- Las plantas de la familia Euphorbiaceae no evidenciaron la presencia de alcaloides en los extractos de diclorometano, aunque presentaron compuestos como fenoles, flavonoides y taninos, que se esperarían con mayor abundancia en las fracciones metanólicas. Esto se puede deber a que dichos compuestos presentan estructuras aromáticas predominantes o cadenas hidrocarbonadas largas.
- Según la marcha fitoquímica de los extractos de diclorometano de las especies de la familia Solanaceae se caracterizaron por la ausencia de alcaloides y por la presencia de esteroides, triterpenos, saponinas, fenoles y taninos. Esto contrasta a los resultados obtenidos para esta misma familia en los extractos de metanol, que presentaron alcaloides.
- Al contrario de los extractos metanólicos, los extractos de diclorometano de las especies de la familia Urticaceae presentaron muchos de los metabolitos analizados. Las tres especies analizadas contenían esteroides, triterpenos, saponinas y fenoles. De estas, *Phenax uliginosus*, contiene además alcaloides.
- La especie *Oxypetalum cordifolium* (Asclepiadaceae) y *Cynanchum* sp (Apocynaceae), no presentaron resultados positivos para ninguno de los núcleos fitoquímicos analizados. Es de destacar que plantas pertenecientes al género *Cynanchum* han mostrado actividad inhibitoria contra levaduras y mohos (Sanabria y Mantilla, 1986).

5.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.2.1 Ensayos de capacidad antioxidante

5.2.1.1 Ensayo con el radical libre DPPH. Determinación del porcentaje de actividad antioxidante

Como se expresó anteriormente, los extractos vegetales se consideraron activos para el ensayo de determinación de porcentaje de actividad antioxidante (%AA), a través de la técnica de secuestro de radicales libres (método del DPPH), si dicha actividad era superior a 25%, tomando como control positivo la hidroquinona. Cabe mencionar que los extractos de diclorometano de *Lepidaploa lehamanii* (UTP-135, Asteraceae) y *Boehmeria bullata* (UTP-142, Urticaceae) no se evaluaron debido a la poca cantidad de muestra disponible. Los resultados experimentales se reportan en el anexo 10.

En la figura 21 se muestran los porcentajes de actividad antioxidante para todos los extractos de metanol evaluados. Se puede considerar que el 51.7% (15 de los 29 extractos evaluados) de estos extractos presentaron un %AA superior al 25%, resultando activos. Esto contrasta con lo encontrado para los extractos de diclorometano (figura 22), cuyo porcentaje de extractos activos fue del 29.6% (8 de los 27 extractos evaluados).

Estos resultados correlacionan con los hallados por Echevarría et al., (2009) quienes encontraron que los extractos más polares fueron los que presentaron la mayor capacidad antioxidante debido posiblemente a que el metanol puede extraer compuestos más polares de la planta, de los cuales se sabe que los de tipo fenólico poseen actividad antioxidante considerable (Javanmardi et al., 2003).

Las familias que mostraron mayor capacidad antioxidante del conjunto de extractos metanólicos fueron la Euphorbiaceae y Asteraceae. Todas las plantas estudiadas de la familia Euphorbiaceae resultaron activas y precisamente fueron las que presentaron un porcentaje de actividad antioxidante más alto. Especies de esta familia además de presentar capacidad antioxidante reconocida, también son distinguidas por su

actividad antiviral, antitumoral y antidiurética (Abdulladzhanova et al., 2003). En contraste, los valores más bajos los presentaron las especies de las familias Rubiaceae y Urticaceae.

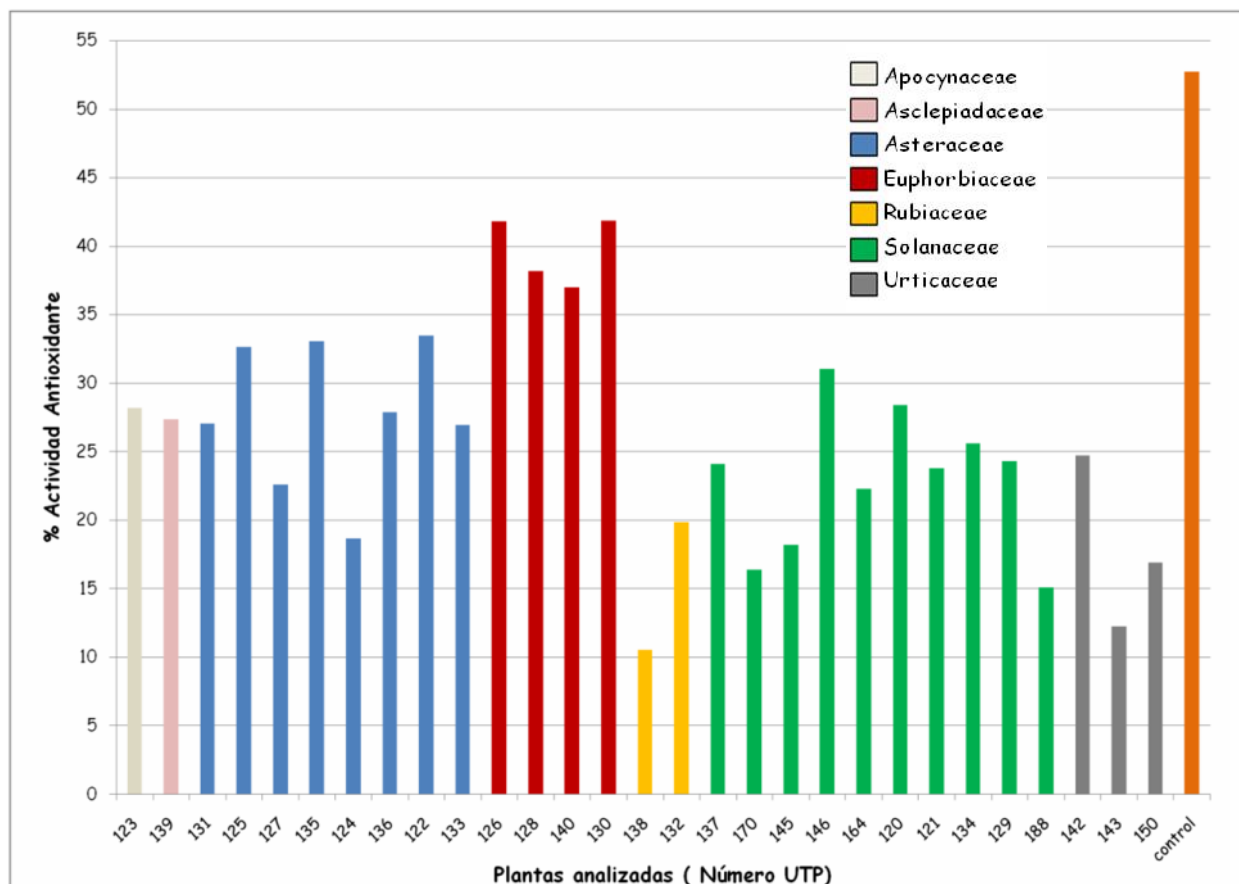


Figura 21. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las 29 especies de plantas estudiadas.

Hyeronima sp (UTP-130) y *Acalypha diversifolia* (UTP-126) ambas de la familia Euphorbiaceae, presentaron los %AA más altos con valores de 41.83 % y 41.79%, respectivamente. De la marcha fitoquímica de *Hyeronima* sp se puede inferir que su capacidad captadora de radicales libres se puede deber a compuestos de tipo fenólico, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenos; mientras que *A. diversifolia* solo mostró la presencia de fenoles y taninos. Estos resultados son comparables a los encontrados por Mosquera et al., (2007 y 2009a), quienes en dos trabajos diferentes concluyen que las especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae presentaron la mejor actividad antioxidante del total de las especies evaluadas. Peng et al., (2006) también encontraron en

extractos acuosos de plantas de esta familia una alta capacidad antioxidante que se destaca entre un grupo de especies evaluadas. Esto permite destacar a miembros de familia Euphorbiaceae como una fuente muy promisoría de moléculas con actividad biológica relacionada con la captación de radicales libres y potencial uso como antioxidantes.

Algunas plantas de la familia Euphorbiaceae han reportado otros tipos de actividad biológica; por ejemplo, el extracto etanólico de *Acalypha alopecuroidea* posee capacidad antibacteriana; los extractos etanólicos de *Acalypha guatemalensis* tiene actividad antimicrobiana contra cepas de *Salmonella typhi* (60%), *Staphylococcus aureus* (50%) y *Pseudomonas aeruginosa* (15%); además, los extractos acuosos y etanólicos de *Jatropha gossypifolia* poseen actividad molusquicida frente a *Bulinus globulus* (Mahabir, 1995). Extractos metanólicos de *Andrachne cordifolia* fueron activos frente a patógenos como *P. aeruginosa* y *S. typhi* (Ahmad et al., 2007). *Phyllanthus niruri*, también de la familia Euphorbiaceae, presentó actividad antioxidante sobresaliente y mostró actividades antitumoral y anticarcinogénica (Harish y Shivanandappa, 2006).

Otros estudios llevados a cabo en especies de la familia Euphorbiaceae demuestran su importancia. *Alchornea cordifolia* (planta empleada en medicina tradicional en África para tratar dermatitis, asma, hepatitis, esplenomegalia, entre otras enfermedades) posee un potente efecto antiinflamatorio y actividad antioxidante (Mavar-Manga et al., 2008). Las hojas de *Mallotus japonicus* tienen actividad antioxidante fuerte atribuida al alto contenido de compuestos fenólicos (Tabata et al., 2008).

Con relación a las plantas de la familia Asteraceae, de los 8 extractos metanólicos analizados 6 mostraron esta actividad, de los cuales la especie *Mikania iloensis* (UTP-136) presentó el porcentaje de actividad antioxidante más alto (27.87%). Estos resultados correlacionan con los resultados obtenidos por Parejo et al., (2003), quienes hallaron varias especies activas pertenecientes a esta misma familia, en la que sobresalían los géneros *Tagetes* y *Mikania*.

Aunque para los extractos metanólicos de las especies de la familia Rubiaceae no se encontraron porcentajes de actividad antioxidante superiores al 20%, algunos autores han encontrado especies con potente

actividad, como *Galium fissurense*, de la que se aisló una flavanona bioactiva (Orhan, 2003).

En la figura 22 se presentan los resultados de la actividad antioxidante de los extractos de diclorometano. De éstos, los pertenecientes a la familia Euphorbiaceae también fueron los que presentaron los valores más altos (*Acalypha diversifolia* (UTP-126, 40.60%) y *Alchornea calophylla* (UTP-128, 37.20%)), junto con la Asteraceae *Mikania lloensis* (UTP-136, 38.72%).

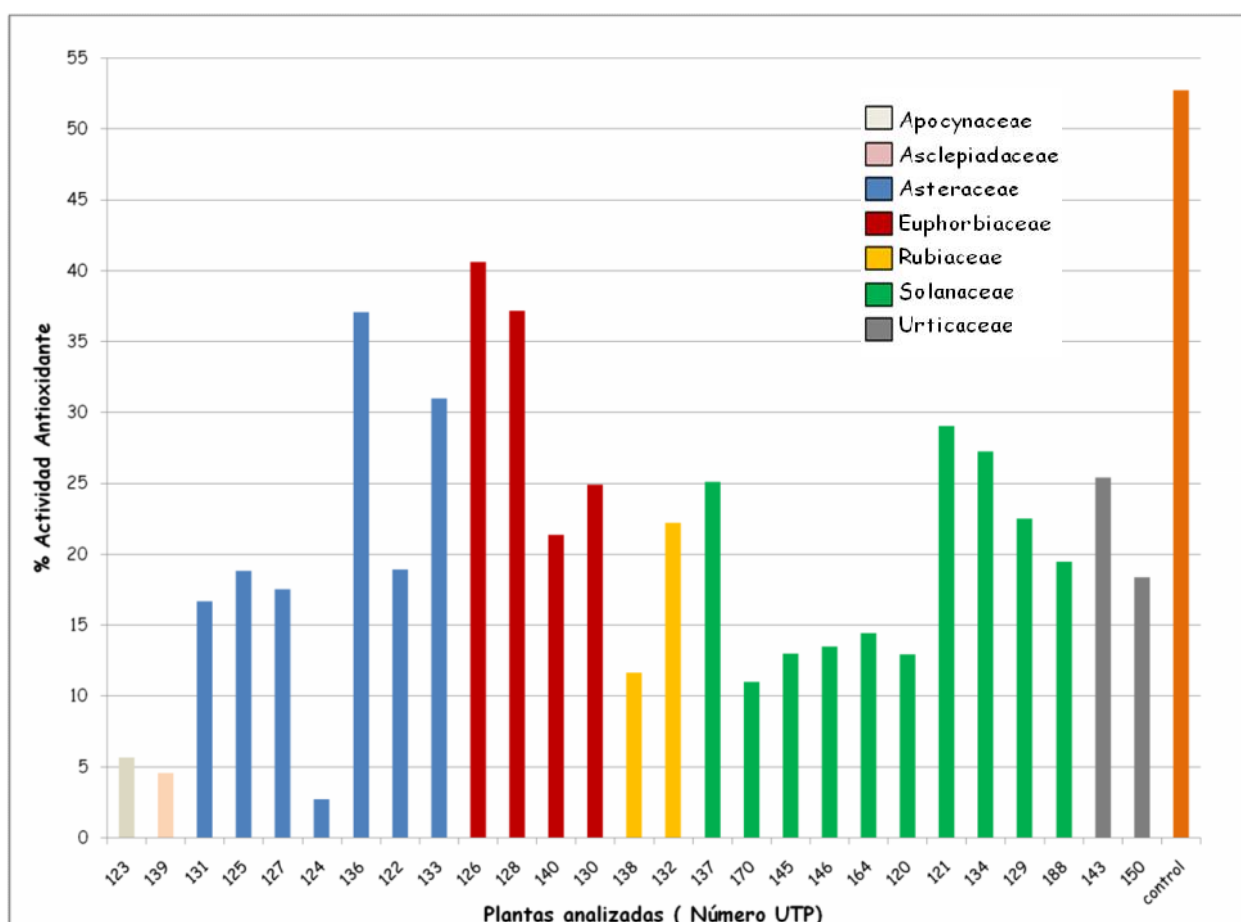


Figura 22. Actividad antioxidante de los extractos de diclorometano de las 29 especies de plantas estudiadas.

Según los resultados de la marcha fitoquímica para los extractos de diclorometano y en relación con las especies activas para este tipo de extractos se puede inferir que en la mayoría hay presencia de flavonoides (tabla 8) (5 de 8 extractos evaluados), indicando su capacidad

potencial captadora de radicales libres. Los flavonoides de las plantas superiores son reconocidos por ser excelentes agentes antioxidantes *in vitro* y numerosos estudios sugieren que la ingesta de este tipo de compuestos puede tener efectos positivos en patologías relacionadas con el estrés oxidativo (Tapia et al., 2004).

Otros metabolitos secundarios que pueden tener relación directa con la actividad antioxidante son los esteroides, triterpenos y fenoles (Mensor et al., 2001). El extracto de diclorometano activo de *Mikania lloensis* (UTP-136, Asteraceae) no dio positiva ninguna prueba de la marcha fitoquímica, indicando que su capacidad antioxidante es causada posiblemente por metabolitos distintos a los aquí estudiados. A parte de las familias de plantas analizadas, se han encontrado muchas otras que tienen especies con actividad antioxidante importante como lo son *Aronia malanocarpa* (Rosaceae) (Sikora et al., 2008), *Cuminum nigrum L.* (Apiaceae) (Ani et al., 2006) y *Lippia triphylla* (Verbenaceae) (Ono et al., 2008).

Comparando la figura 21 con la 22, se puede visualizar que los extractos de metanol que superan el valor del 25% de actividad antioxidante son mucho más abundantes que los de diclorometano. Parejo et al., (2003) también pudieron comprobar esta tendencia, mostrando incluso que en extractos mas hidrofóbicos (hexano) los valores de actividad antioxidante fueron mucho más bajos.

5.2.1.2 Cuantificación de la actividad antioxidante mediante la determinación del equivalente Trolox.

En la tabla 9 se muestran los porcentajes de actividad antioxidante a diferentes concentraciones de Trolox y en la figura 23 se muestra la curva de calibración del Trolox.

El coeficiente de correlación entre de la concentración de Trolox y su porcentaje de actividad antioxidante en la curva de calibración fue 0.998, indicando confiabilidad en los resultados y una buena linealidad a las concentraciones ensayadas.

Tabla 9. Porcentaje de actividad antioxidante a diferentes concentraciones de Trolox

Concentración Trolox (μM)	Promedio %AA
1	0,00
2	0,80
4	3,35
8	6,02
16	14,86
32	28,92

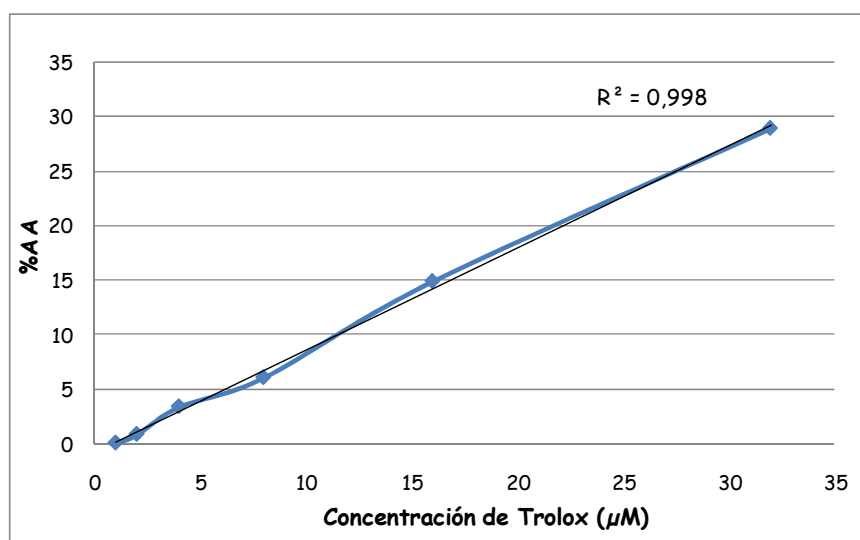


Figura 23. Curva de calibración con Trolox.

Los datos que relacionan el %AA con la concentración de Trolox de los extractos metanólicos activos (%AA superior a 25%) se muestran en la tabla 10 y para los extractos de diclorometano se muestra en la tabla 11.

Los resultados obtenidos de porcentaje de actividad antioxidante permitieron determinar cuáles de las plantas estudiadas contienen metabolitos con capacidad antioxidante promisorio. Sin embargo, el porcentaje de actividad antioxidante no es un valor confiable cuando se requiere comparar los resultados con otras investigaciones, puesto que los protocolos seguidos por cada grupo de investigación suelen variar en las cantidades de los reactivos, concentraciones y tiempos de medición.

Por ello, mediante la curva de calibración con Trolox, fue posible expresar la actividad antioxidante de las muestras en $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extracto, lo cual permite hacer comparaciones cuantitativas de actividad antioxidante frente a diferentes estudios publicados.

El rango de concentración equivalentes de Trolox en los extractos metanólicos se presentan desde $12.15 \mu\text{mol Trolox/g}$ de extracto (10.53 %AA) para *Faramea* sp (UTP-138, Rubiaceae) hasta $45.56 \mu\text{mol Trolox/g}$ de extracto (41.83 %AA) para *Hyeronima* sp (UTP-130, Euphorbiaceae) (anexo 11a).

Tabla 10. Relación porcentaje de actividad antioxidante - concentración de Trolox de los extractos metanólicos activos (%AA superior a 25%).

Familia	Nombre Científico	% AA	Trolox ($\mu\text{mol/g}$ extracto)
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	28,17	30,98
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	27,33	30,08
Asteraceae	<i>Baccharis</i> sp	27,07	29,80
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	32,66	35,77
	<i>Lepidaploa lehamannii</i>	33,07	36,20
	<i>Mikania lloensis</i>	27,87	30,65
	<i>Pentacalya urbanii</i>	33,47	36,63
	<i>Tilesia baccata</i>	26,93	29,66
Euphorbiaceae	<i>Acalypha diversifolia</i>	41,79	45,51
	<i>Alchornea calophylla</i>	38,17	41,65
	<i>Alchornea</i> sp	37,00	40,40
	<i>Hyeronima</i> sp	41,83	45,56
Solanaceae	<i>Lycianthes radiata</i>	31,06	34,06
	<i>Solanum acerifolium</i>	28,39	31,21
	<i>Solanum lepidotum</i>	25,60	28,23
Control positivo (Hidroquinona)		52,73	57,14

De igual manera el rango para los extractos de diclorometano (anexo 11b) se determinó entre $3.80 \mu\text{mol Trolox/g}$ de extracto (2.71 %AA) para *Mikania banisteriae* (UTP-124, Asteraceae) hasta $44.24 \mu\text{mol Trolox/g}$ de extracto (40.60 %AA) para *Acalypha diversifolia* (UTP-126,

Euphorbiaceae). En contraste los resultados obtenidos para la actividad captadora de radicales libres de DPPH en papas dulces de pulpa púrpura (*Ipomoea batatas*) mostraron un rango de 47.0 a 87.4 $\mu\text{mol Trolox /g}$ de muestra (Steed y Truong, 2008), superior al de las plantas analizadas en esta investigación.

Sin embargo, plantas reconocidas por su capacidad antioxidante, como *Vaccinium meridionale* SW (Ericaceae), más conocida como Mortiño, presentó valores de equivalentes Trolox por el método de DPPH del orden de 24.04 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extracto (Gaviria et al., 2009), lo que manifiesta que la capacidad antioxidante de muchas de las muestras vegetales analizadas del PRNU y la Reserva Natural Bremen-La Popa también son fuentes promisorias de compuestos con uso potencial como antioxidantes.

Tabla 11. Relación porcentaje de actividad antioxidante - concentración de Trolox de los extractos de diclorometano activos (%AA superior a 25%).

Familia	Nombre Científico	% AA	Trolox ($\mu\text{mol/g}$ extracto)
Asteraceae	<i>Mikania lloensis</i>	37,10	40,50
	<i>Tilesia baccata</i>	31,00	34,00
Euphorbiaceae	<i>Acalypha diversifolia</i>	40,60	44,24
	<i>Alchornea calophylla</i>	37,20	40,61
Solanaceae	<i>Cestrum</i> sp	25,09	27,69
	<i>Solanum cf umbellatum</i>	29,06	31,92
	<i>Solanum lepidotum</i>	27,24	29,98
Urticaceae	<i>Phenax uliginosus</i>	25,39	28,01
Control positivo (Hidroquinona)		52,73	57,14

En relación con vegetales y frutas, los extractos de col roja, (*Brassica oleracea* var. *Capitata*, Brassicaceae) (14.00 $\mu\text{mol Trolox /g}$); ajo, (*Allium sativum*, Alliaceae) (13.00 $\mu\text{mol Trolox /g}$); papa blanca, (*Solanum tuberosum*, Solanaceae) (4.0 $\mu\text{mol Trolox /g}$); manzana roja, (*Malus domestica*, Rosaceae) (14.00 $\mu\text{mol Trolox /g}$) y banano, (*Musa x paradisiaca*, Musaceae) (11.00 $\mu\text{mol Trolox /g}$) no poseen actividad

antioxidante tan alta en comparación a muchas de las especies evaluadas en este trabajo (Miller et al., 2000).

Los resultados expresados en equivalentes de Trolox fueron numéricamente cercanos a los valores expresados como porcentaje de actividad antioxidante. La representación del %AA como concentración de Trolox posibilitó hacer las comparaciones cuantitativas anteriores y no quedarse simplemente en análisis cualitativos; además, soporta mejor la conclusión de que ciertas plantas analizadas contienen compuestos capaces de evitar la oxidación de otras moléculas y atrapar radicales libres.

5.2.2 Determinación de los fenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu

El contenido de fenoles totales en las muestras permite relacionar la cantidad de estas sustancias en los extractos con su capacidad antioxidante (Magalhães et al., 2008).

Los análisis realizados por este método solo se aplicaron para las plantas que tuvieron valores de actividad antioxidante superior al 25% (exceptuando el extracto metanólico de *Solanum lepidotum*, UTP-134, por falta de muestra). Los datos están expresados en mg de ácido gálico/ mg de extracto crudo. Los resultados de la curva de calibración se muestran en la tabla 12. Los datos experimentales se reportan en el anexo 12.

Tabla 12. Absorbancia de la curva de calibración para la determinación de fenoles totales, expresados como ácido gálico.

Concentración de ácido gálico (mg/L)	Promedio Absorbancia ($\lambda=760\text{nm}$)
0	0,009
25	0,048
50	0,075
100	0,141
200	0,241
400	0,474
800	0,853

En la figura 24 se muestra la curva de calibración realizada con ácido gálico empleada para determinar el contenido de fenoles totales de las muestras (correlación de 0.997). Mientras que en la figura 25 se presenta el contenido fenólico de los extractos metanólicos que tuvieron un porcentaje de actividad antioxidante mayor al 25%.

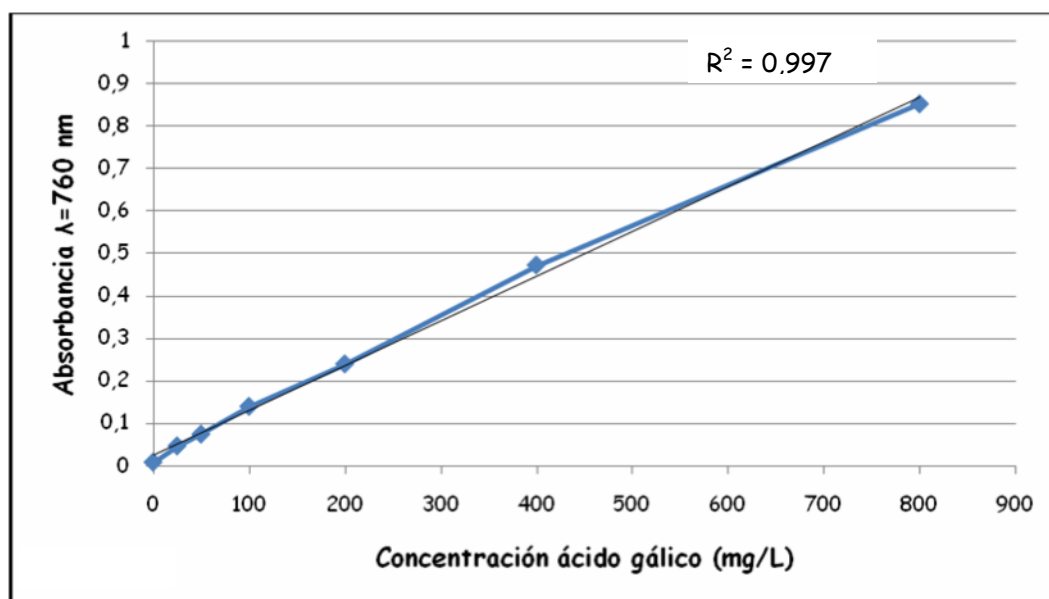


Figura 24. Curva de calibración del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

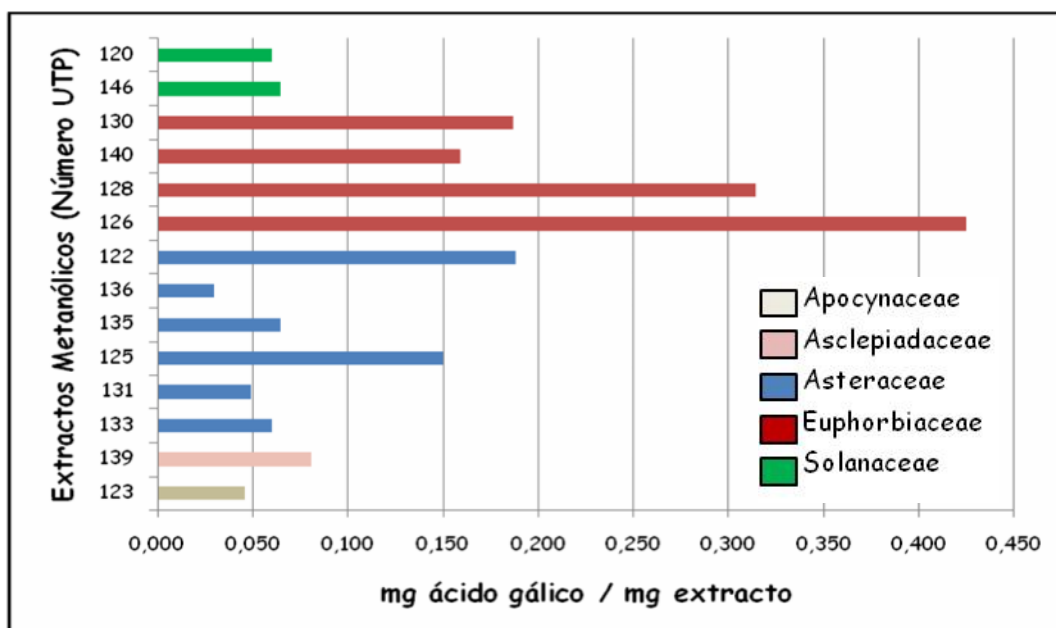


Figura 25. Contenido de fenoles totales para los extractos metanólicos con actividad antioxidante superior al 25%.

El rango de equivalentes de ácido gálico en extractos metanólicos fue de 0.046 mg /mg extracto para *Cynanchum* sp (Apocynaceae) hasta 0.424 mg / mg extracto para *Acalypha diversifolia* (Euphorbiaceae).

Los resultados de los extractos metanólicos (figura 25) muestran como las especies con mayores porcentajes de actividad antioxidante también fueron las que presentaron los valores más elevados de los equivalentes de ácido gálico. Las especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, *Acalypha diversifolia* (UTP-126), *Alchornea calophylla* (UTP-128), *Alchornea* sp (UTP-140), *Hyeronima* sp (UTP-130), así como las pertenecientes a la familia Asteraceae, *Clibadium pentaneuron* (UTP-125) y *Pentacalya urbanii* (UTP-122) presentaron los valores más destacados. Por tanto, se puede concluir que el contenido de fenoles de las especies evaluadas se relacionó de forma directamente proporcional con la actividad antioxidante que presentaron.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos es debida principalmente a sus propiedades redox, las que juegan un rol importante absorbiendo y neutralizando radicales libres (Javanmardi et al., 2003).

Generalmente, una relación positiva entre los fenoles totales y la actividad antioxidante ha sido reportada en diversas investigaciones (Bagetti et al., 2009). Javanmardi et al., (2003) determinaron una correlación de 0.71 entre la actividad antioxidante total y el contenido de fenoles de plantas de Irán, sugiriendo que el 71% de la capacidad antioxidante de dichas plantas se debía a los compuestos fenólicos. Al relacionar los resultados de capacidad antioxidante expresados como $\mu\text{mol Trolox/g extracto}$ con el contenido de fenoles totales de las muestras, se encontró un coeficiente de correlación de 0.707 para los extractos metanólicos (anexo 13) esto permite concluir la gran participación de los compuestos fenólicos en la actividad antioxidante de dichos extractos.

Una correlación satisfactoria entre el contenido de fenoles totales y los equivalentes de trolox medidos por DPPH también ha sido reportada por autores como Wong et al., (2006), explicando que los polifenoles en los extractos evaluados fueron en parte los responsables de la actividad antioxidante. Hay reportes de correlación entre el contenido de fenoles y

la capacidad antioxidante de muestras diferentes a extractos vegetales. Por ejemplo, estudios realizados con propóleos también señalan la relación entre el contenido de fenoles y la capacidad captadora de radicales DPPH ($R^2 = 0,60$), ABTS ($R^2 = 0,69$) y antioxidante FRAP ($R^2 = 0,68$), sugiriendo que entre 60 y 69% de la actividad evaluada para los propóleos resulta de la contribución de los compuestos fenólicos (Palomino et al., 2009).

En la figura 26 se muestran los datos de fenoles totales obtenidos para los extractos de diclorometano. El rango de resultados fue de 0 mg ácido gálico/mg de extracto (*Mikania lloensis*, Asteraceae) hasta 0.037 mg ácido gálico/mg de extracto (*Phenax uliginosus*, Urticaceae). El valor más alto de este grupo fue incluso inferior al más bajo del conjunto de los extractos de metanol. Se evidencia que los compuestos fenólicos no se encuentran en grandes cantidades en los extractos de diclorometano, aunque no se puede descartar su posible acción como agentes atrapadores de radicales libres. El análisis de la relación de capacidad antioxidante y fenoles totales para este tipo de extractos presentó una correlación de 4×10^{-5} (anexo 14), indicando que su actividad antioxidante no está relacionada con sustancias del tipo fenólico, y puede ser debida a otras como esteroides y triterpenos (Mensor et al., 2001), cuya presencia se evidencia en la marcha fitoquímica para los extractos de diclorometano (tabla 8).

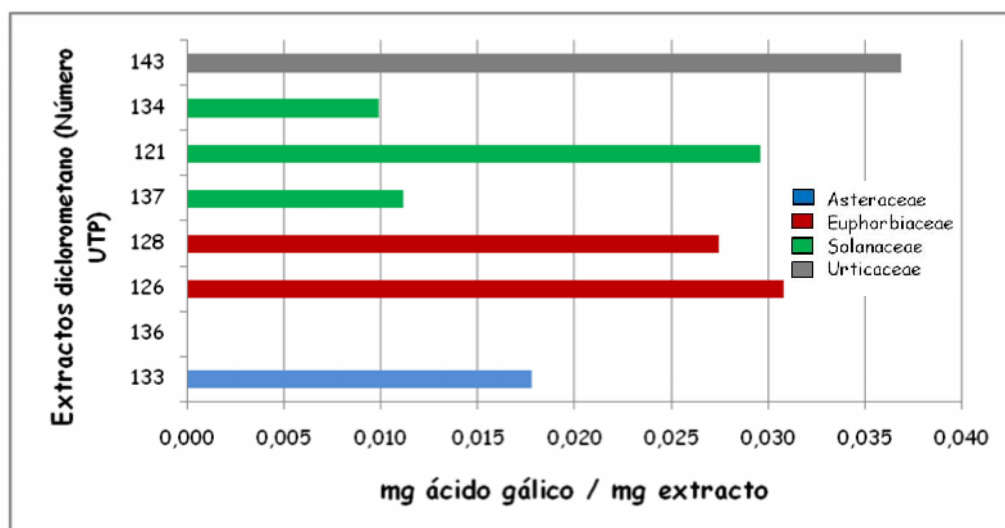


Figura 26. Contenido de fenoles totales para los extractos de diclorometano con actividad antioxidante superior al 25%.

De manera general, el contenido de fenoles para los distintos extractos es moderado, ni muy bajo o muy alto, comparado con determinaciones hechas en otros estudios con plantas. Por ejemplo, el contenido de fenoles totales en diferentes muestras de plantas del género *Ocimum* recolectadas en Irán varió desde 0.0229 a 0.0655 mg ácido gálico/g de material seco (Javanmardi et al., 2003), valores más bajos a los hallados para los extractos de diclorometano. Por otro lado, *Acantholippia deserticola*, estudiada por Morales et al., (2008) reportó valores del orden de 0.725 mg ácido gálico/g de extracto seco, superior al de *Acalypha diversifolia* (0.424 mg / mg extracto), el mejor extracto en cuanto al contenido de fenoles totales de nuestra investigación.

En este trabajo se destaca la familia Euphorbiaceae como una fuente promisoría de antioxidantes y compuestos fenólicos con uso potencial para el beneficio humano, hecho que fue confirmado con la marcha fitoquímica de sus especies, donde se detectaron fenoles, taninos y flavonoides. En esta familia también se evidenciaron esteroides y saponinas.

5.2.3 Ensayos de actividad antitopoisomerasa sobre cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

De las 29 especies de plantas evaluadas (extractos de metanol y diclorometano) para determinar la actividad antitopoisomerasa sobre las cepas mutadas de *S. cerevisiae*, ninguna reportó resultados positivos (tabla 13). Vale la pena resaltar que en un tamizado biológico los extractos de plantas deben ser evaluados por diversas actividades biológicas, porque no todas las plantas presentan actividad en los múltiples ensayos que se les puedan practicar y el que ninguna especie evaluada haya inhibido el crecimiento de las levaduras no significa que no posean metabolitos de interés.

Se han realizado varias investigaciones en las que a pesar de analizar un número considerable de plantas o compuestos puros no se logran encontrar muchos que presentaran la actividad biológica estudiada. Por ejemplo, en una 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.

Tabla 13. Valores del IC₁₂ en el bioensayo de actividad antitopoisomerasa para la totalidad de extractos evaluados.

Familia	Nombre Científico de la especie	Extracto	Cepas de <i>S. cerevisiae</i> . Valor de IC ₁₂ (µg/mL)		
			RJ03	R52Y	RS321
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	MeOH ¹	-	-	-
		DCM ²	-	-	-
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
Asteraceae	<i>Baccharis</i> sp	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Critoniella acuminata</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Lepidaploa lehamanii</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Mikania banisteriae</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Mikania lloensis</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Pentacalya urbanii</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
<i>Tilesia baccata</i>	MeOH	-	-	-	
	DCM	-	-	-	
Euphorbiaceae	<i>Acalypha diversifolia</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Alchornea calophylla</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Alchornea</i> sp	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
<i>Hyeronima</i> sp	MeOH	-	-	-	
	DCM	-	-	-	
Rubiaceae	<i>Faramea</i> sp	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Rubiacea</i> sp	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
Solanaceae	<i>Cestrum</i> sp	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Depprea aff sachapapa</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Dunalia solanacea</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-

Continuación tabla 13.

Familia	Nombre Científico de la especie	Extracto	Cepas de <i>S. cerevisiae</i> . Valor de IC ₁₂ (µg/mL)		
			RJ03	R52Y	RS321
Solanaceae	<i>Lycianthes radiata</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Solandra coriacea</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Solanum acerifolium</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Solanum cf umbellatum</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Solanum lepidotum</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Solanum sp</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Solanum trachycyphum</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
Urticaceae	<i>Boehmeria bullata</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Phenax uliginosus</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
	<i>Urera ballotaewfolia</i>	MeOH	-	-	-
		DCM	-	-	-
Control Positivo		Nistatina	40	40	65

MeOH¹ = Metanol DCM² = Diclorometano

En estudios realizados sobre *Cnidocolus texanus* (Euphorbiaceae) se lograron aislar 26 compuestos, entre los que se hallaban 15 flavonoides de los cuales todos fueron inactivos frente a la topoisomerasa I (Yuan et al., 2007). Mendoza et al., (2007) estudiaron un total de 93 extractos de etanol para determinar su efecto antifúngico sobre *Photophthora palminova* y *Colletotrichum gloeosporioides* pero ninguno mostró actividad como inhibidores del crecimiento micelial de estos hongos.

A pesar de no haber encontrado extractos de plantas activas en este proyecto, al igual que ha ocurrido en otras investigaciones realizadas por diversos grupos de investigación de diferentes países, se deja como avance el estudio de actividad biológica en plantas que han sido poco estudiadas y se adelanta la búsqueda de principios activos que el ser humano pueda aprovechar. Esto es de gran relevancia, si se tiene en cuenta que sólo el 10% de las plantas del mundo han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica (Harvey, 2000).

En el trabajo realizado por Niño et al., (2007a) para determinar la actividad antitopoisomerasa empleando cepas mutadas de *S. cerevisiae* se evaluaron ciento treinta y ocho extractos entre metanol y diclorometano de plantas recolectadas en la Ecorregión Cafetera Colombiana, de los cuales 6 extractos metanólicos y solo 3 de diclorometano resultaron activos. El extracto metanólico de *Cestrum olivaceum* (Solanaceae) mostró actividad fuerte hacia la topo I, mientras que el extracto de diclorometano de *Solanum deflexiflorum* (Solanaceae) inhibió la topo II. En dicha investigación se encontró que los mejores resultados fueron presentados por plantas de la familia Solanaceae, debido probablemente a metabolitos del tipo alcaloidal. Sin embargo, los extractos de las plantas de géneros activos (*Cestrum* y *Solanum*) fueron evaluados en el presente proyecto (como *Cestrum* sp o *Solanum acerifolium*) y no reportaron actividad antitopoisomerasa positiva, lo que permite inferir que los compuestos activos están en muy bajas concentraciones en dichas especies o no están distribuidos en todas las plantas del mismo género.

Otros investigadores han evaluado la actividad antitopoisomerasa en plantas pertenecientes a familias diferentes a las analizadas en este trabajo. Hosein et al., (2002) encontraron que el extracto de *Dorema ammoniacum* D. Don (Umbelliferae), una planta empleada comúnmente para tratar problemas gástricos, posee actividad citotóxica sobre las cepas mutadas de *S. cerevisiae* deficientes de rad52, indicando que posee compuestos con mecanismos de acción similares a la camptotecina.

Ocotea leucoxydon (Lauraceae) contiene alcaloides que presentan actividad selectiva inhibitoria hacia las topoisomerasas I (Zhou et al., 2000b). Otros estudios han mostrado como los flavonoides también pueden tener este tipo de actividad; 7"-O-metil- agathisflavona y

amentoflavona son biflavonoides aislados de las plantas *Ouratea hexasperma* y *O. semiserrata* (Ochnaceae), respectivamente. Estos biflavonoides son inhibidores de la topoisomerasa humana de tipo I, además la agathisflavona también mostró actividad sobre la topo II (Grynberg et al., 2002). En la tabla 14 se muestran otros ejemplos de plantas que han reportado actividad antitopoisomerasa:

Tabla 14. Algunas plantas con actividad antitopoisomerasa

PLANTA	FAMILIA	REFERENCIA
<i>Camptotheca acuminata</i>	Nyssaceae	Zhou et al., (2000a)
<i>Casearia sylvestris</i>	Flacourtiaceae	Carvalho et al., (1998)
<i>Psychotria spectabilis</i>	Rubiaceae	Coelho et al., (2005)
<i>Myriocarpa stipitata</i>	Urticaceae	Cardona, (2005)
<i>Solanum deflexiflorum</i>	Solanaceae	Niño et al., (2007a)
<i>Arrabidaea samyoides</i>	Bignoniaceae	Mendonça y Da Silva, (2003)

Ciertas plantas estudiadas en este proyecto han reportado actividad insecticida contra la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), como las especies *Alchornea calophylla* (UTP-128, Euphorbiaceae), *Critoniella acuminata* (UTP-127, Asteraceae), *Depprea aff sachapapa* (UTP-170, Solanaceae), *Dunalia solanacea* (UTP-145, Solanaceae) y *Phenax uliginosus* (UTP-143, Urticaceae) (Bustamante, 2007 y Henao, 2008). *Lepidaploa lehmannii* (UTP-193, Asteraceae) y *Ureara ballotaefolia* (UTP-150, Urticaceae) presentaron actividad inhibitoria sobre *Sigatoka negra* (*Mycosphaerella fijiensis*), debido posiblemente a compuestos como alcaloides, esteroides, triterpenos, fenoles, flavonoides y taninos (Mosquera et al., 2009b); los cuales también están presentes en las plantas estudiadas en este proyecto. Estos resultados demuestran que no todas las plantas poseen las actividades biológicas que se estudian y que los metabolitos producidos por ellas no son igual de efectivos frente a los diferentes bioensayos.

6. CONCLUSIONES

- En total se pudieron encontrar 8 extractos de diclorometano y 15 de metanol con actividad antioxidante. Los extractos metanólicos de las plantas *Hyeronima* sp y *Acalypha diversifolia* (Euphorbiaceae) tienen los porcentajes de actividad antioxidante más altos del conjunto total de plantas evaluadas: 41.83 % (45.56 $\mu\text{mol Trolox} / \text{g extracto}$) y 41.79% (45.51 $\mu\text{mol Trolox} / \text{g extracto}$) , respectivamente.
- La familia de plantas que mejores resultados arrojó en cuanto capacidad antioxidante fue la Euphorbiaceae. Sus porcentajes de actividad antioxidante se relaciona con un alto contenido de fenoles totales. Esta familia es promisoría como fuente de metabolitos secundarios en la búsqueda de compuestos con actividad antioxidante de tipo fenólico.
- Se evaluó la actividad antitopoisomerasas I y/o II de los extractos vegetales sobre cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae*, pero no se encontró ningún extracto que presentara dicha actividad biológica.
- 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 que puedan ser empleadas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios más minuciosos sobre especies de plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, puesto que presentaron la mejor capacidad antioxidante. Se pueden realizar separaciones cromatográficas bio guiadas que permitan aislar los compuestos responsables de dicha actividad.
- Aplicar metodologías diferentes a las empleadas en este proyecto para la determinación de la actividad antioxidante de extractos de plantas en futuras investigaciones, así como determinar el contenido de flavonoides y otras clases de compuestos fenólicos, con el fin de realizar análisis más detallados que relacionen los tipos de metabolitos con la actividad antioxidante.
- Continuar con la bioprospección de especies de la flora regional, debido a que la presencia de diferentes metabolitos las hace fuentes de estudio importantes en la búsqueda de biomoléculas activas para el hombre.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdulladzhanova N, Mavlyanov S, Dalimov D. (2003). Polyphenols of certain plants of the Euphorbiaceae family. *Chemistry of Natural Compounds*. 39: 399-401.

Ahmad B, Hassan S. M, Bashir S, Nisar M, Iqbal M. (2007). Antibacterial and antifungal activities of *Andrachne cordifolia* muell. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 22: 726-729.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Waler. (2006). *Introducción a la biología celular* 2 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. p. 170-177.

Álvarez E, Orallo F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago. *Offarm*. 22: 130-140.

Alves E, Chicharo A, Assirati L, Aracari N, Andrade M, Cunha W, Gomes C. (2008). Estudio comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*. 31: 1224-1229.

American Cancer Society. (2008). What is cancer? [fecha de consulta: 20 de octubre de 2008]. <http://www.cancer.org/docroot/home/index.asp>

Andreu C, Martínez G, Perurena M, Illnait M, Valdés I. (2005). La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí": funciones y retos. *Revista cubana de medicina tropical*. 57: 1-7.

Ani V, Varadaraj M, Akhilender K. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European Food Research and Technology*. 224: 109-115.

Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonald S, Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. 127: 183 - 198.

Andersson L. (1992). A provisional check-list of Neotropical Rubiaceae. *Scripta Botanica Belgica*. 1: 1-199.

Bagetti M, Pesamosca E, Bobrowski D, Vizzotto M, Emanuelli T. (2009). Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. *Ciência Rural*. 39: 2504-2510.

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.

Buitrago D. (2004). Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de veinticinco plantas procedentes de zonas de reserva de la región cafetera colombiana. Tesis Universidad Tecnológica de Pereira. p. 5, 38.

Bustamante A. (2007). Evaluación de 42 extractos vegetales para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari). Tesis Universidad Tecnológica de Pereira. p. 20.

Cardenas M, Cruz C, Del Poeta M, Chung N, Perfect J, Heitman J. (1999). Antifungal Activities of Antineoplastic Agents: *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System to Study Drug Action. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 583-611.

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.

CARDER (Corporación Autónoma Regional de Risaralda). (2002). Ecorregión Eje Cafetero: Un territorio de oportunidades. p. 98-122.

Cardona G. (2005). Actividad biológica de extractos de plantas del Parque Regional Natural La Marcada sobre *Saccharomyces cerevisiae* mutada. Tesis Universidad Tecnológica de Pereira. p. 37-42.

Carvalho P, Furlan M, Young M, Kingston D, Bolzani V. (1998). Acetylated DNA-Damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochemistry*. 49: 1659-1662.

Classen S, Olland S, Berger J. (2003). Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 10629-10634.

Coelho P, Marx M, Bolzani V. (2005). Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*. *Pharmaceutical biology*. 42: 565-569.

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.

CRQ (Corporación Autónoma Regional del Quindío). Reserva Natural Bremen - La Popa. [fecha de consulta: 24 de junio de 2008].http://www.crq.gov.co/area_bremen_lapopa.html

de Souza L, Massae R, Samara A, Sarragiotto M. (2003). Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*. 26: 825-827.

Deweese J, Osheroff N. (2009). The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Research*. 37: 738-748.

Echavarría B, Franco A, Martínez A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae*. 16: 126-131.

Furnari G, Pavone P, Guglielmo A, Longhitano N, Salmeri C, Scelsi F. (2002). Proyecto: L'Orto Botanico Multimediale. [fecha de consulta: 26 de julio de 2008]. www.dipbot.unict.it/sistematica/Index.html

Galao R, Scheller N, Alves-Rodrigues I, Breinig T, Meyerhans A, Díes J. (2007). *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile eukaryotic system in virology. *Microbial Cell Factories*. 6: 32.

Galeano M, Bernal R. (1993). Guía de las plantas del Parque Regional Natural Ucumarí. Tomo I. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. CARDER. p. 11-49.

Ganesan A. (2008). The impact of natural products upon modern drug discovery. *Chemical Biology*. 12: 306-307.

García H. (1992). Flora Medicinal Colombiana. Segunda Edición. Editorial Tercer Mundo. Tomos I-III.

Gartner L, Hiatt J. (2002). Texto atlas de histología. W.B. Saunders Company. McGraw-Hill interamericana editores, S.A. Segunda edición. p. 56.

Gaviria C, Ochoa C, Sánchez N, Medina C, Lobo M, Galeano P, Mosquera A, Tamayo A, Lopera Y, Rojano B. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8: 519-528.

Gonzalez M, Muñiz P, Vall V. (2002), Actividad antioxidante de la cerveza estudios *in vitro* e *in vivo*. *Cerveza y Salud*. 154: 47-54.

González A, Valenzuela L. (2008). *Saccharomyces cerevisiae*. [fecha de consulta: 20 de octubre de 2008]. http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_20/Capitulo20.pdf

Grynberg N.F., Carvalho M.G., Velandia J.R., Oliveira M.C., Moreira I.C., Braz-Filho R., Echevarria A. (2002). DNA topoisomerase

inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 35: 819-822.

Gunatilaka L, Kingston D, Johnaon R. (1994). Mechanism-based isolation and structures of some anticancer active natural products. *Pure & Applied Chemistry*. 66: 2219-2222.

Harish R, Shivanandappa T. (2006). Antioxidant activity and hepatoprotective potencial of *Phyllanthus niruri*. *Food Chemistry*. 95: 180-185.

Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. 5: 294-300. [Fecha de consulta: 14 de octubre del 2009]. <http://www.ibmb.uni.wroc.pl/prace2/praca18.pdf>

Henao L. (2008). Control de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) con extractos vegetales de plantas de la flora regional. Tesis Universidad Tecnológica de Pereira. p. 48.

Hernández J, Florez Y, Vallejo G. (2010). Evaluación de la actividad insecticida de *Solanum macranthum* (Dunal) sobre ninfas de los estadios IV y V de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius colombiensis*. *Revista Cubana de Farmacia*. 44: 71-78.

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.

Huang D, Ou B, Prior R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agricultural and food chemistry*. 53: 1841 - 1856.

Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco J.M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*. 83: 547-550.

Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurad E, Shiwaku K, Yamane Y. (2004). Screening for Antioxidant Activity in Edible Plant

Products: Comparison of Low-Density Lipoprotein Oxidation Assay, DPPH Radical Scavenging Assay, and Folin-Ciocalteu Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 2391-2396.

Lotito L, Russo A, Chillemi G, Bueno S, Cavaliere D, Capranico G. (2008). Global transcription regulation by DNA topoisomerase I in exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells: Activation of telomere-proximal genes by top I deletion. *Journal of Molecular Biology*. 377: 311-22.

Magalhães L, Segundo M, Reis S, Lima J. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. 613: 1-19.

Mahabir G. (1995). 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santa Fe de Bogotá. Primera edición. p.360-400.

Maiti R, Villarreal L, Treviño A, Valades-Cerda M. (2002). Some aspects on pharmacognosy of ten species of the family Solanaceae utilized in traditional medicine. *Caldasia*. 24: 317-321.

Mavar-Manga H, Haddad M, Pieters L, Baccelli C, Penge A, Quetin-Leclercq J. (2008). Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Mull. Arg. *Journal of Ethnopharmacology*. 115: 25-29.

McClain D, Kalinich J, Ramakrishnan N. (1995). Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocytes. *The FASEB journal*. 9: 1345-1354.

Mendonça P, Da Silva V. (2003). Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides*. *Química Nova*. 26: 641-643.

Mendoza C, Moreno M, Weil M, Elango F. (2007). Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *Photophthora palminova* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. *Tierra Tropical*. 3: 81-89.

Mensor L, Menezes F, Leitão G, Reis A, dos Santos T, Coube C, Leitão S. (2001). Screenig of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*. 15: 127-130.

Miller H, Rigelhof F, Marquart L, Prakash A, Kanter M. (2000). Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables. *Journal of the American College of Nutrition*. 19: 312-319.

Ministerio de la Protección Social. (2009). Plan nacional para el control de cáncer en Colombia 2010-2019. [fecha de consulta: 09 de noviembre de 2009].

<http://www.cancer.gov.co/documentos/Plannacionalparacontroldelcancer/PlanControlCancer.pdf>

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. *Journal of Vacuum Science and Technology*. 26: 211-219.

Morales G, Paredes A, Sierra P, Loyola LA. (2008). Antioxidant activity of 50% aqueous-ethanol extract from *Acantholippia deserticola*. *Biological Research*. 41: 151-5.

Mosquera O, Correa Y, Buitrago D, Niño J. (2007) Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 102: 631-634.

Mosquera O, Correa Y, Niño J. (2009a). Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19: 382-387.

Mosquera O, Echeverry L, Niño J. (2009b). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia et Technica*. 41: 232-236.

Murillo J. (2004). Las Euphorbiaceae de Colombia. *Biota Colombiana*. 5: 183-200.

Niño J, Morales P, Batero J, Correa Y, Mosquera O. (2007a). 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.

Niño J, Bustamante A, Correa Y, Mosquera O. (2007b). Evaluación de extractos vegetales para el control de la broca del café (*Hypothenemus ampei Ferrari*). *Scientia et Technica*. 13: 383-385.

Nittiss J, Wang J. (1988). DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85: 7501-7505.

Ono M, Oda E, Tanaka T, Iida Y, Yamasaki T, Masuoka C, Ikeda Y, Nohara T. (2008). DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. *Journal of Natural Medicines*. 62: 101-106.

Orhan D. (2003). Novel flavanone glucoside with free radical scavenging properties from *Galium fissurense*. *Pharmaceutical Biology*. 41: 475-478.

Orta M, Mateos S, Cantero G, Wolff L, Cortés F. (2007). Protection of halogenated DNA from strand breakage and sister-chromatid exchange induced by the topoisomerase I inhibitor camptothecin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 637: 40-48.

Palomino L, García C, Gil J, Rojano B, Durango D. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*. 16: 388-395.

Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Saavedra G, Murcia M, Jiménez A, Codina C. (2003). Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*. 73: 1667-1681.

Peng S, Peng L, Hoe J. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. 99: 755-783.

Pommier Y, Barcelo J, Ashutosh V, Sordet O, Jobson A, Thibaut L, Miao Z, Seiler J, Zhang H, Marchand C, Agama K, Redon C. (2006). Repair of Topoisomerase I-Mediated DNA Damage. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology*. 81: 179-229.

Prakash A, Rigelhof F, Miller E. (2007). Antioxidant Activity. Medallion Laboratories. [fecha de consulta: 15 de junio de 2009]. http://www.medallionlabs.com/Downloads/Antiox_acti_.pdf

Pung T. (2002). The isolation of natural products from plants extract. Thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg. Virginia. p. 71.

Ramírez R, Echeverri F. (2007). ¿Son seguros y efectivos los antioxidantes?. *Scientia et Technica*. 33: 41-44.

Recio M.C, Ríos J.L, Villar A. (1989). A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytoterapy Research*. 3: 117-125.

Ríos J.L, Recio M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Pharmacology*. 100: 80-84.

Ríos J.L., Recio M.C., Villar A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*. 23: 127-49.

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.

Robertis E. (2002). *Biología celular y molecular*. 15 ed. Argentina: Editorial el Ateneo librería Jenny S.A. p. 351-371, 383-387, 441-443.

Roca, J. (1998). Topoisomerases. *Advances in genome biology*. 5: 463-485.

Salama A, Polo A, Contreras C, Maldonado L. (1987). Análisis fitoquímico y farmacológico preliminar de las hojas de *Baccharis decusata*. *Revista Colombiana Ciencias Químico Farmacéuticas*. 16: 45-50.

Salceda J, Fernández X, Roca J. (2006). Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA. *The EMBO Journal*. 25: 2575-2583.

Sanabria A, Mantilla J. (1986). Actividad antifúngica de plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 15: 17-22.

Shumway SW, Letcher SL, Friberg A, DeMelo D. (2009). Rainforest Plants. [fecha de consulta: 17 de diciembre de 2009]. http://wikis.wheatonma.edu/rainforest/index.php/Main_Page

Singleton V, Rossi J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-58.

Sikora E, Cieslik E, Topolska K. (2008). The sources of natural antioxidants. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 7: 5-17.

Steed L, Truong V. (2008). Anthocyanin Content, Antioxidant Activity, and Selected Physical Properties of Flowable Purple-Fleshed Sweetpotato Purees. *Journal of Food Science*. 73: 215-221.

Surveswaran S, Cai Y, Corke H. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food chemistry*. 102: 938-953.

Tabata H, Katsube T, Tsuma T, Ohta Y, Imawaka N, Utsumi T. (2008). Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the

antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicas*. Food Chemistry. 109: 64-71.

Taiz L, Zeiger E. (2002). Plant physiology, tercera edición. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA, USA. p. 283-307.

Tapia A, Rodriguez J, Theoduloz C, Lopez S, Egly G, Schmeda-Hirshmann G. (2004). Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. Journal of Ethnopharmacology. 95: 155-161.

Wetwitayaklung P, Phaechamud T, Limmatvapirat C, Keokitichai S. (2006). The study of antioxidant capacity in various parts of *Areca catechu* L. Naresuan University Journal. 14: 1-14.

Wong S, Leong L, William J. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry. 99: 775-783.

Yuan W, Li S, Ownby S, Zhang Z, Wang P, Zhang W, Beasley RS. (2007). Flavonoids, coumarins and triterpenes from the aerial parts of *Cnidocolus texanus*. Planta Medica. 73:1304-8.

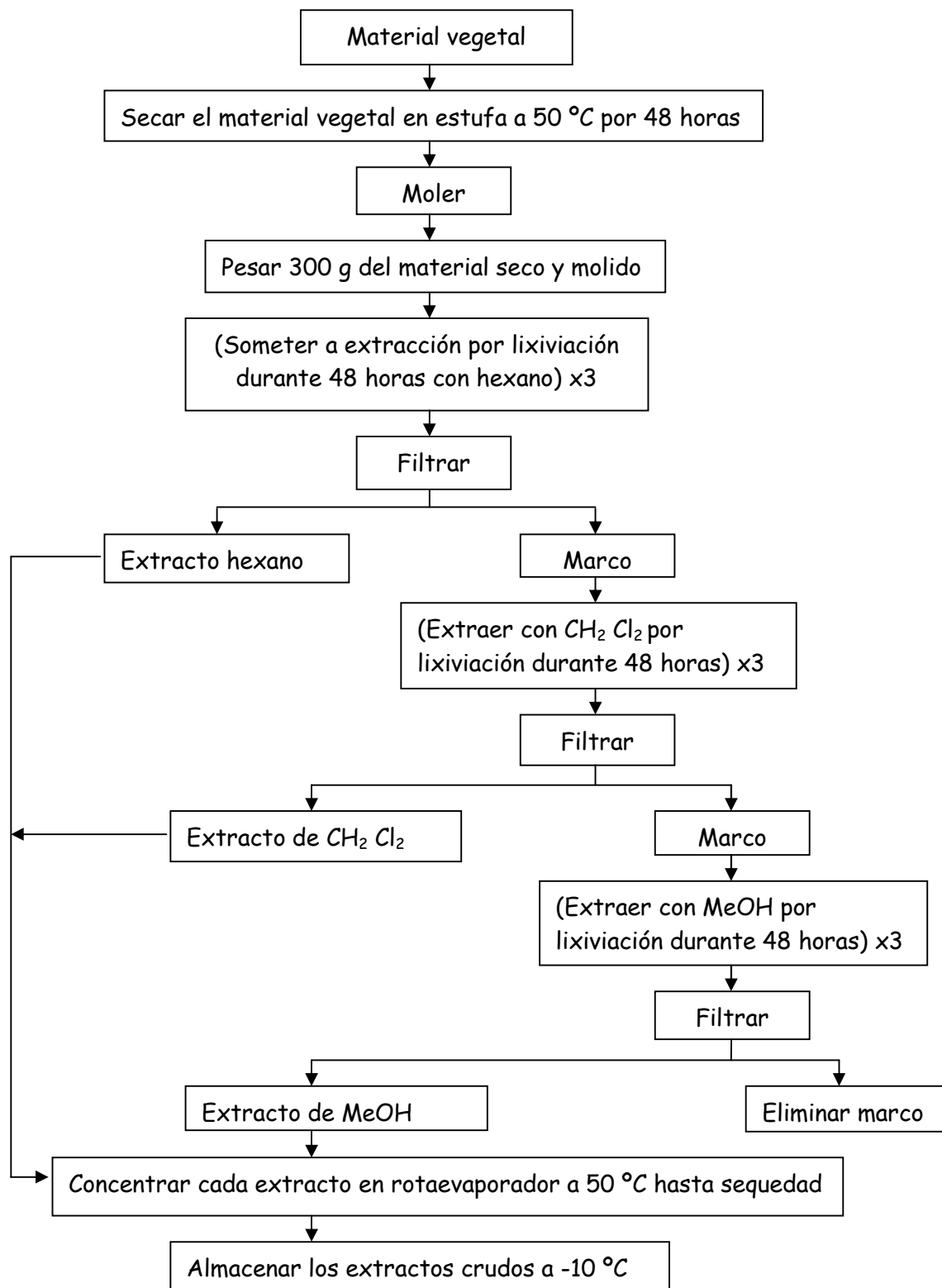
Zentella M, Saldaña Y. (1996). Papel fisiológico de los radicales libres. Boletín de Educación Bioquímica (México). 15: 152-161.

Zhou G M, Li X Q, Chu J M, Chen Z A, Xu S Y. (2000a). *Camptotheca acuminata*: the law of growth and character correlation of young trees and sprouting branches. Journal of Zhejiang Forestry College. 17: 355-359.

Zhou B, Johnson R, Mattern M, Wang W, Hecht S, Beck H, Ortiz A, Kingston D. (2000b). Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxyloides*. Journal of Natural Products. 63: 217-221.

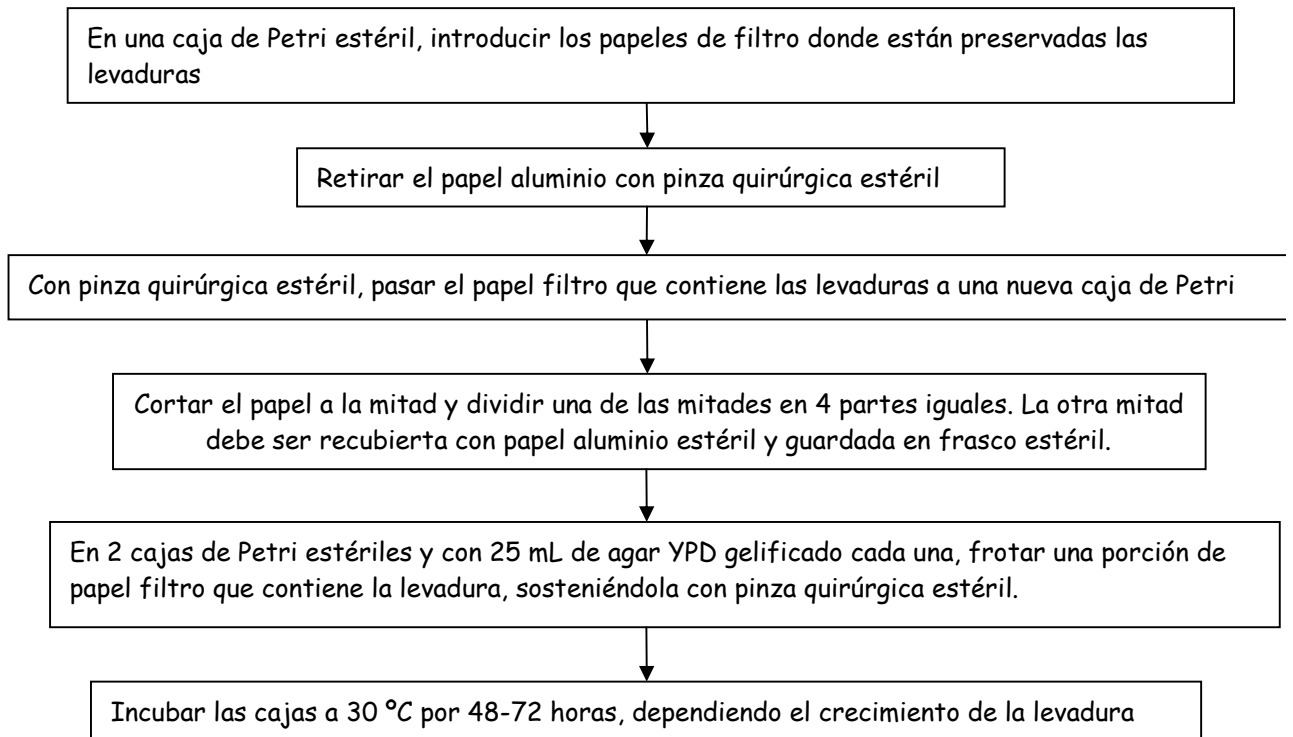
ANEXOS

Anexo 1. Metodología de la obtención de los extractos crudos de metanol y diclorometano (Niño et al., 2007a)

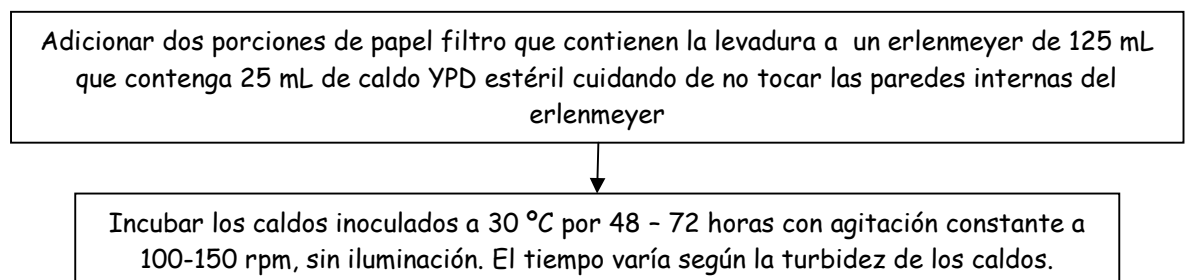


Anexo 2. Etapas para la reactivación de las cepas que se encuentran almacenadas en papel filtro.

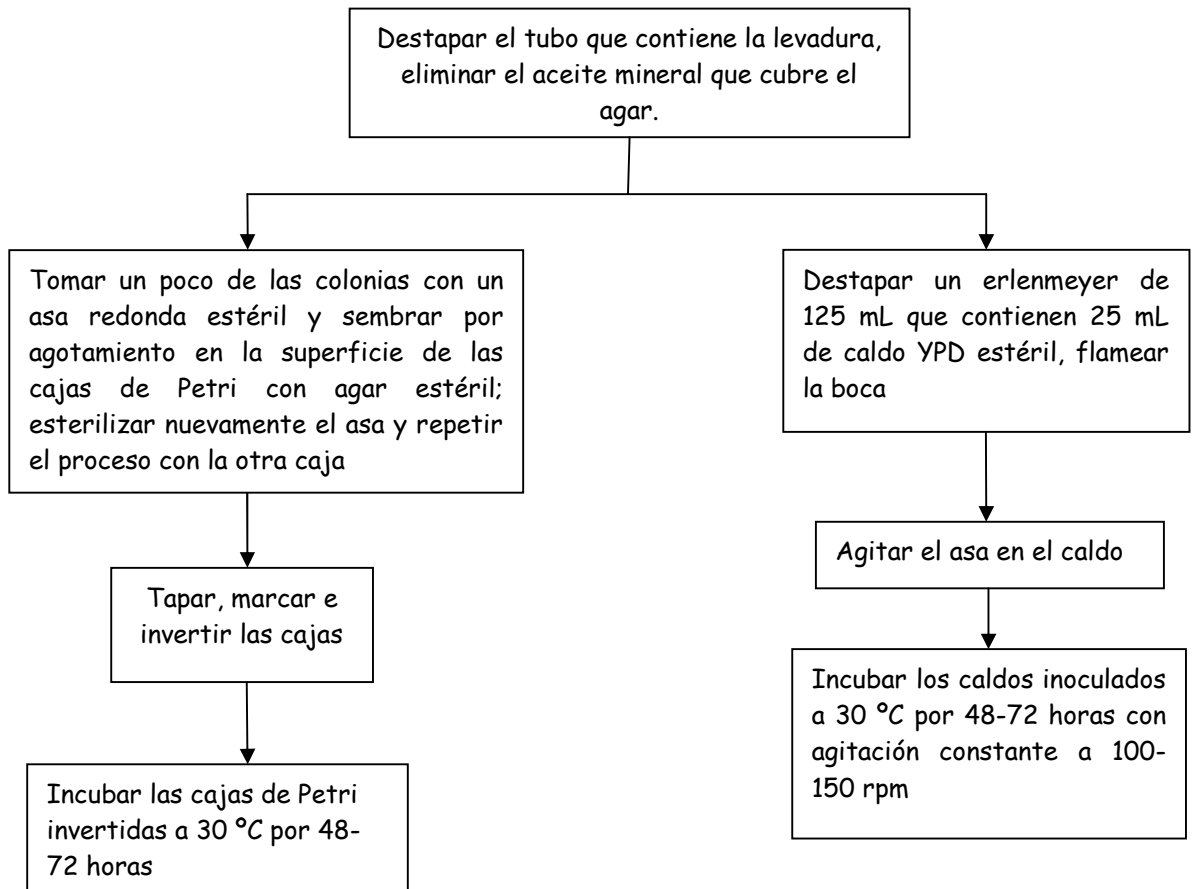
a. Reactivación en agar. Todas las operaciones se deben realizar en condiciones estériles.



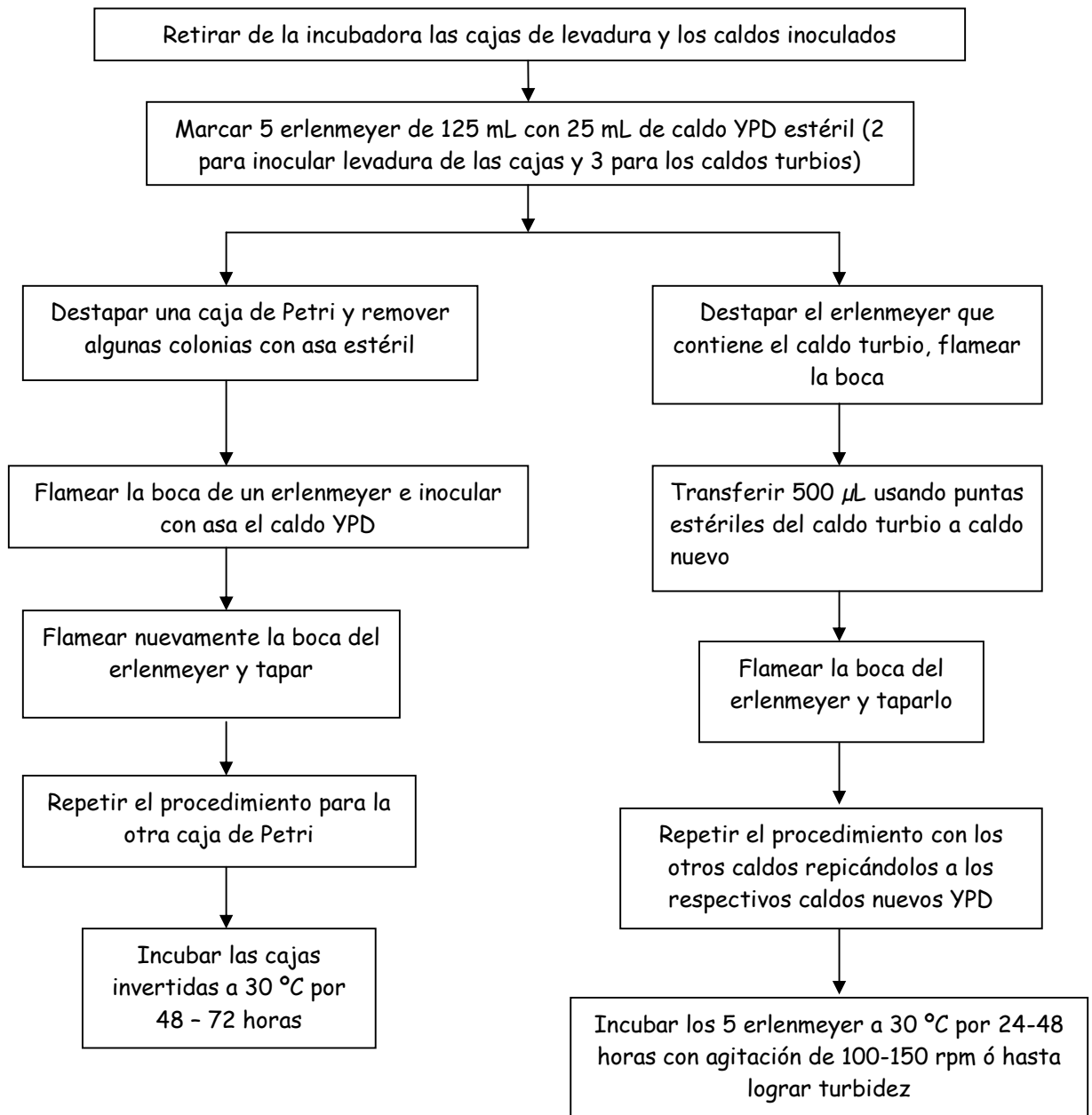
b. Reactivación en caldo



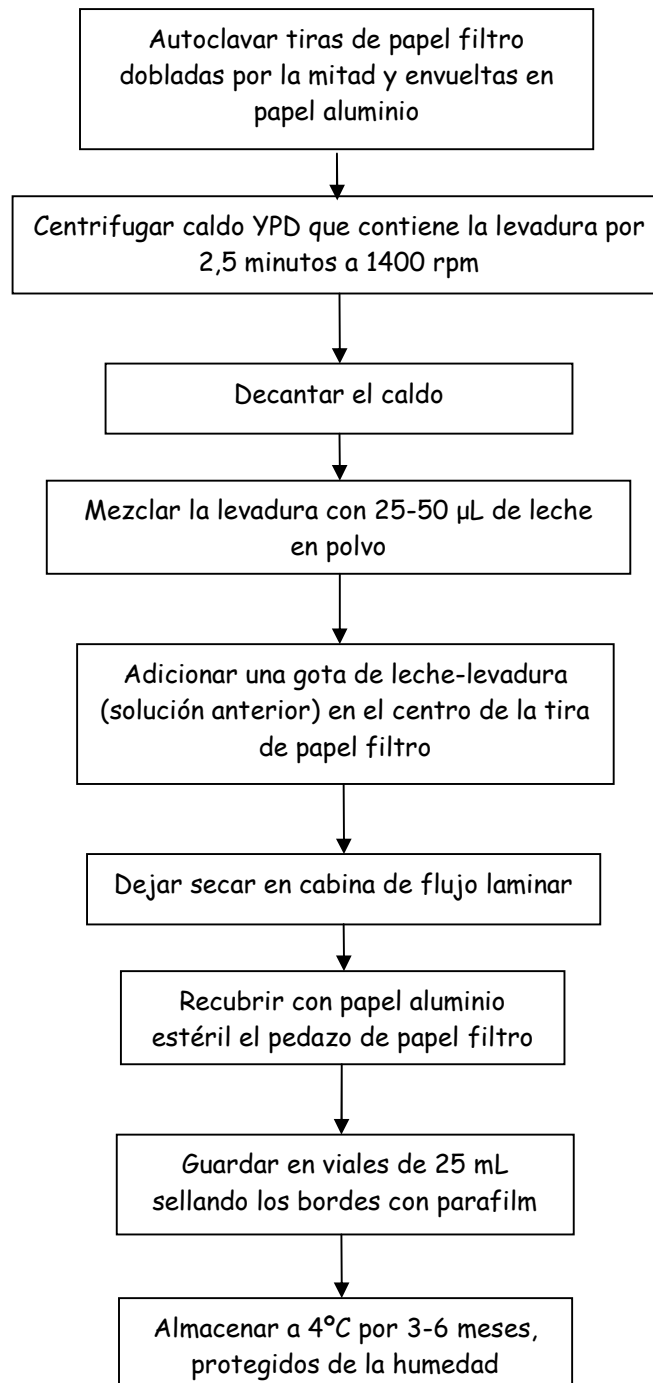
Anexo 3. Reactivación de las cepas preservadas en tubos de ensayo en posición de cuña.



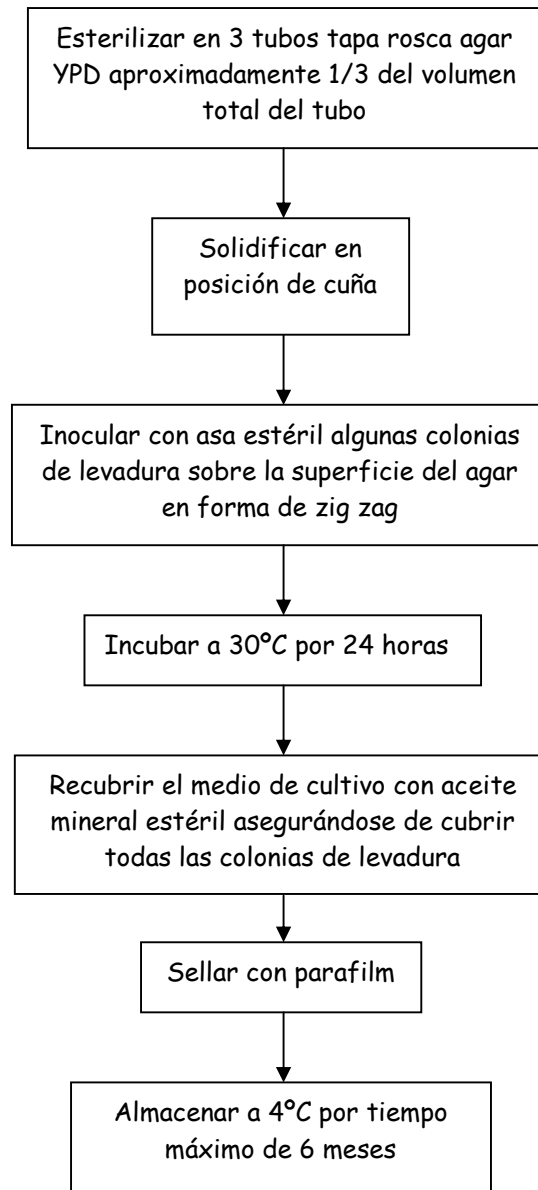
Anexo 4. Crecimiento de las levaduras.



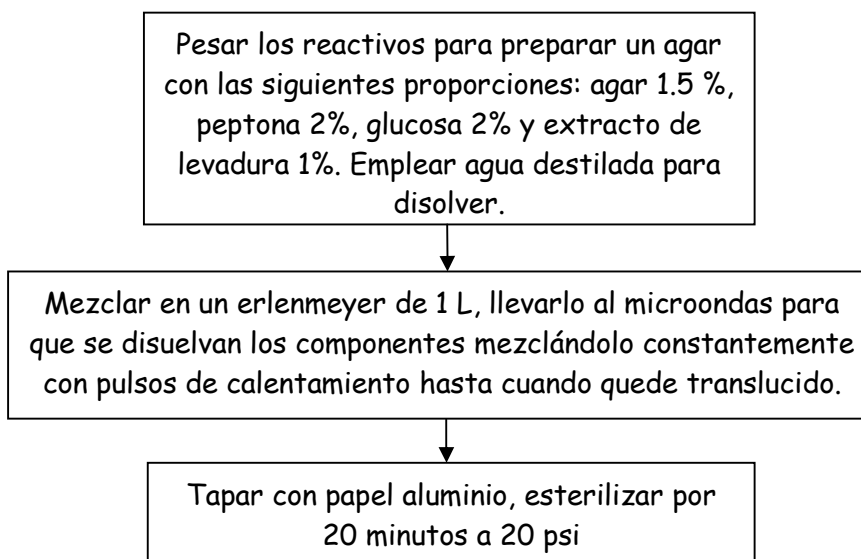
Anexo 5. Conservación de las levaduras en base seca.



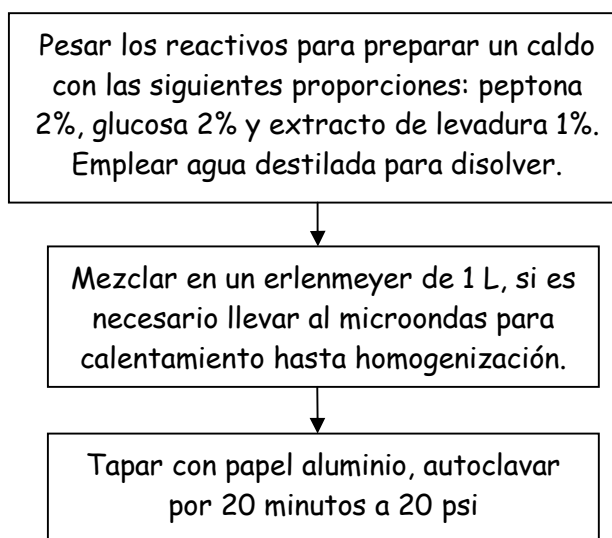
Anexo 6. Conservación de las levaduras en tubo de ensayo en posición de cuña.



Anexo 7. Procedimiento para preparar 500 mL de agar YPD



Anexo 8. Procedimiento para preparar 500 mL de caldo YPD

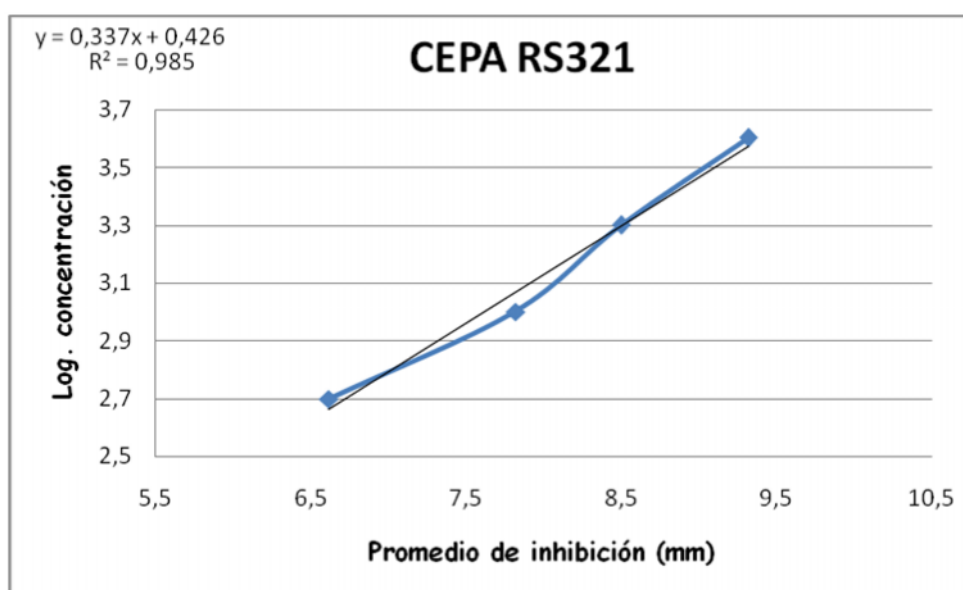


Anexo 9. Procedimiento para hallar el IC₁₂. Ejemplo con la planta UTP 60.

Después de realizar la lectura de los halos de inhibición de las 5 concentraciones, se calculó el promedio de inhibición para cada una, con las tres cajas sembradas y su respectiva repetición. Se calculó el logaritmo de las concentraciones evaluadas y se estableció la regresión lineal de el logaritmo de la concentración (y) vs el promedio del halo de inhibición (x), obteniéndose también el coeficiente de correlación y el pronóstico de y cuando x=12. Los siguientes datos son los obtenidos a evaluar un extracto que resultó activo en investigaciones pasadas.

Concentración evaluada (mg/L)	Logaritmo de la concentración	Promedio de inhibición
4000	3,602	9,32
2000	3,301	8,50
1000	3,000	7,82
500	2,699	6,62
250	2,40	-----

Curva para calcular IC₁₂ del extracto UTP 60, evaluado en cepa RS321.



Con la ecuación $Y = 0.337X + 0.426$, se calcula la concentración necesaria para obtener un halo de inhibición de 12 mm de diámetro.

$$X=12$$

$$Y= (0,3378 * 12) + 0,426$$

$Y=4,4801 \rightarrow$ logaritmo de la concentración que daría el IC_{12} . Por lo tanto:

$$IC_{12} = 10^{4,4801}$$

$$IC_{12} = 30\ 206,47 \text{ mg/L}$$

Anexo 10. Datos del %AA por el método del DPPH de las plantas del PRNU y Bremen - La Popa. (Límites de confiabilidad de 95%).

a. Extractos metanólicos.

PLANTA (UTP)	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE			Promedio	Desviación estándar	Límites de confiabilidad
	%AA1	%AA2	%AA3			
120	27,751	26,794	30,622	28,389	1,992	2,254
121	22,488	23,923	24,880	23,764	1,204	1,363
122	33,468	33,468	33,468	33,468	0,000	0,000
123	27,381	28,571	28,571	28,174	0,687	0,777
124	18,548	18,145	19,355	18,683	0,616	0,697
125	32,661	32,661	32,661	32,661	0,000	0,000
126	41,951	41,951	41,463	41,789	0,282	0,319
127	22,177	22,581	22,984	22,581	0,403	0,456
128	38,710	37,903	37,903	38,172	0,466	0,527
129	23,790	24,597	24,597	24,328	0,466	0,527
130	42,500	41,000	42,000	41,833	0,764	0,864
131	26,400	28,000	26,800	27,067	0,833	0,942
132	21,200	17,200	21,200	19,867	2,309	2,613
133	26,800	26,800	27,200	26,933	0,231	0,261
134	25,200	25,200	26,400	25,600	0,693	0,784
135	33,600	32,400	33,200	33,067	0,611	0,691
136	26,400	28,800	28,400	27,867	1,286	1,455
137	26,500	27,500	27,500	27,167	0,577	0,653
138	9,600	10,800	11,200	10,533	0,833	0,942
139	27,500	27,000	27,500	27,333	0,289	0,327
140	37,000	37,000	37,000	37,000	0,000	0,000
142	24,878	24,390	24,878	24,715	0,282	0,319
143	10,545	12,727	13,455	12,242	1,514	1,714
145	17,561	18,537	18,537	18,211	0,563	0,637
146	30,732	31,220	31,220	31,057	0,282	0,319
150	16,585	17,073	17,073	16,911	0,282	0,319
164	21,390	23,529	21,925	22,282	1,113	1,260
170	15,812	16,239	17,094	16,382	0,653	0,739
188	14,957	15,385	14,957	15,100	0,247	0,279

b. Extractos de diclorometano.

PLANTA (UTP)	% ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE			PROMEDIO	Desviación estándar	Límites de confiabilidad
	%AA1	%AA2	%AA3			
120	12,821	13,248	12,821	12,963	0,247	0,279
121	28,877	29,412	28,877	29,055	0,309	0,349
122	24,359	19,658	12,821	18,946	5,802	6,566
123	4,472	6,504	6,098	5,691	1,075	1,217
124	2,991	2,991	2,137	2,707	0,493	0,558
125	19,324	19,324	17,874	18,841	0,837	0,947
126	44,444	38,889	38,462	40,598	3,338	3,777
127	17,094	17,094	18,376	17,521	0,740	0,838
128	32,367	38,647	40,580	37,198	4,294	4,859
129	22,222	22,650	22,650	22,507	0,247	0,279
130	25,269	27,419	22,043	24,910	2,706	3,062
131	13,978	18,817	17,204	16,667	2,464	2,788
132	19,892	23,118	23,656	22,222	2,035	2,303
133	31,720	31,720	29,570	31,004	1,242	1,405
134	27,957	28,495	25,269	27,240	1,728	1,956
135	NE ¹	NE	NE	-	-	-
136	37,634	37,097	36,559	37,097	0,538	0,608
137	26,882	24,194	24,194	25,090	1,552	1,756
138	7,547	13,208	14,151	11,635	3,572	4,042
139	4,245	4,245	5,189	4,560	0,545	0,616
140	24,057	20,283	19,811	21,384	2,327	2,633
142	NE	NE	NE	-	-	-
143	32,886	24,832	18,456	25,391	7,231	8,183
145	12,195	13,008	13,821	13,008	0,813	0,920
146	13,208	13,208	14,151	13,522	0,545	0,616
150	17,925	17,925	19,340	18,396	0,817	0,925
164	8,019	22,642	12,736	14,465	7,463	8,445
170	15,094	10,849	7,075	11,006	4,012	4,540
188	22,170	18,868	17,453	19,497	2,421	2,739

NE¹ = No evaluado.

Anexo 11. Relación porcentaje de actividad antioxidante - concentración de Trolox de los extractos evaluados.

a. Extractos metanólicos

Familia	Nombre Científico	% AA	Trolox ($\mu\text{mol/g}$ extracto)
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	28,17	30,98
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	27,33	30,08
Asteraceae	<i>Baccharis</i> sp	27,07	29,80
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	32,66	35,77
	<i>Critoniella acuminata</i>	22,58	25,01
	<i>Lepidaploa lehamanii</i>	33,07	36,20
	<i>Mikania banisteriae</i>	18,68	20,85
	<i>Mikania lloensis</i>	27,87	30,65
	<i>Pentacalya urbanii</i>	33,47	36,63
Euphorbiaceae	<i>Tilesia baccata</i>	26,93	29,66
	<i>Acalypha diversifolia</i>	41,79	45,51
	<i>Alchornea calophylla</i>	38,17	41,65
	<i>Alchornea</i> sp	37,00	40,40
Rubiaceae	<i>Hyeronima</i> sp	41,83	45,56
	<i>Faramea</i> sp	10,53	12,15
Solanaceae	<i>Rubiacea</i> sp	19,87	22,11
	<i>Cestrum</i> sp	24,12	26,66
	<i>Depprea aff sachapapa</i>	16,38	18,40
	<i>Dunalia solanacea</i>	18,21	20,35
	<i>Lycianthes radiata</i>	31,06	34,06
	<i>Solandra coriacea</i>	22,28	24,69
	<i>Solanum acerifolium</i>	28,39	31,21
	<i>Solanum cf umbellatum</i>	23,76	26,27
	<i>Solanum lepidotum</i>	25,60	28,23
	<i>Solanum</i> sp	24,33	26,88
Urticaceae	<i>Solanum trachycyphum</i>	15,10	17,03
	<i>Boehmeria bullata</i>	24,72	27,29
	<i>Phenax uliginosus</i>	12,24	13,98
	<i>Urera ballotaewfolia</i>	16,91	18,96

b. Extractos de diclorometano

Familia	Nombre Científico	% AA	Trolox ($\mu\text{mol/g}$ extracto)
Apocynaceae	<i>Cynanchum</i> sp	5,69	6,99
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	4,56	5,78
Asteraceae	<i>Baccharis</i> sp	16,67	18,70
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	18,84	21,02
	<i>Critoniella acuminata</i>	17,52	19,61
	<i>Lepidaploa lehamannii</i>	NE ¹	NE
	<i>Mikania banisteriae</i>	2,71	3,80
	<i>Mikania lloensis</i>	37,10	40,50
	<i>Pentacalya urbanii</i>	18,95	21,13
Euphorbiaceae	<i>Tilesia baccata</i>	31,00	34,00
	<i>Acalypha diversifolia</i>	40,60	44,24
	<i>Alchornea calophylla</i>	37,20	40,61
	<i>Alchornea</i> sp	21,38	23,73
Rubiaceae	<i>Hyeronima</i> sp	24,91	27,50
	<i>Faramea</i> sp	11,64	13,33
Solanaceae	<i>Rubiaceae</i> sp	22,22	24,63
	<i>Cestrum</i> sp	25,09	27,69
	<i>Depprea aff sachapapa</i>	11,01	12,66
	<i>Dunalia solanacea</i>	13,01	14,80
	<i>Lycianthes radiata</i>	13,52	15,34
	<i>Solandra coriacea</i>	14,47	16,35
	<i>Solanum acerifolium</i>	12,96	14,75
	<i>Solanum cf umbellatum</i>	29,06	31,92
	<i>Solanum lepidotum</i>	27,24	29,98
	<i>Solanum</i> sp	22,51	24,93
Urticaceae	<i>Solanum trachycyphum</i>	19,50	21,72
	<i>Boehmeria bullata</i>	NE	NE
	<i>Phenax uliginosus</i>	25,39	28,01
	<i>Urera ballotaewfolia</i>	18,40	20,55

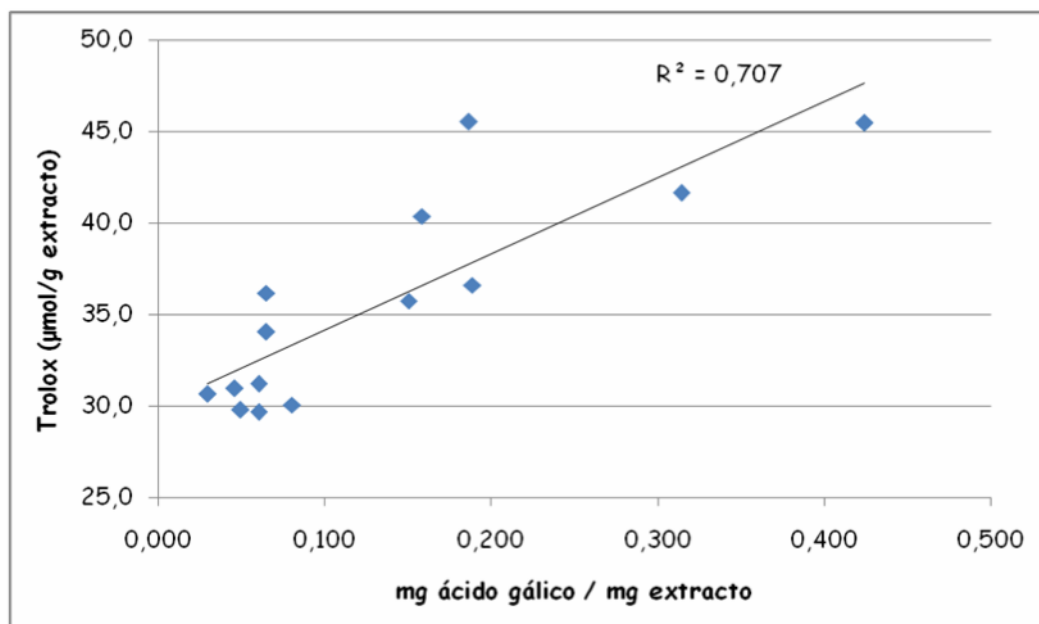
NE¹ = No evaluado

Anexo 12. Contenido de fenoles totales para los extractos vegetales con actividad antioxidante superior al 25%.

Extracto (No. UTP)	Lectura absorbancia $\lambda = 760\text{nm}$			Promedio	Desv. estándar	Equivalente ácido gálico (mg/mg extracto)
	1	2	3			
120M ¹	0,086	0,095	0,096	0,092	0,004	0,060
122M	0,210	0,244	0,246	0,233	0,017	0,188
123M	0,072	0,079	0,079	0,077	0,003	0,046
125M	0,178	0,203	0,193	0,191	0,010	0,150
126M	0,455	0,506	0,517	0,493	0,027	0,424
128M	0,380	0,394	0,341	0,372	0,022	0,314
130M	0,231	0,234	0,229	0,231	0,002	0,187
131M	0,077	0,081	0,083	0,080	0,002	0,049
133M	0,087	0,096	0,094	0,092	0,004	0,060
135M	0,092	0,099	0,101	0,097	0,004	0,065
136M	0,062	0,057	0,058	0,059	0,002	0,030
139M	0,106	0,116	0,122	0,115	0,007	0,081
140M	0,193	0,203	0,205	0,200	0,005	0,158
146M	0,092	0,099	0,101	0,097	0,004	0,065
121D ²	0,057	0,060	0,059	0,059	0,001	0,030
126D	0,057	0,060	0,063	0,060	0,002	0,031
128D	0,053	0,058	0,058	0,056	0,002	0,027
133D	0,048	0,046	0,043	0,046	0,002	0,018
134D	0,036	0,037	0,038	0,037	0,001	0,010
136D	0,024	0,023	0,022	0,023	0,001	-0,003
137D	0,036	0,040	0,039	0,038	0,002	0,011
143D	0,063	0,070	0,067	0,067	0,003	0,037

M¹ = Extracto de metanol D² = Extracto de diclorometano

Anexo 13. Correlación entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante para los extractos metanólicos.



Anexo 14. Correlación entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante para los extractos de diclorometano.

