

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE  
HOJAS DE *Diplostephium phylloides* (Kunth) Wedd**

**RICARDO BOHORQUEZ FAJARDO**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A.  
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA  
PRODUCTOS NATURALES U.D.C.A.  
PRONAUDCA  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D. C.  
2016**

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE  
HOJAS DE *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd.**

**RICARDO BOHORQUEZ FAJARDO**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A.  
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA  
PRODUCTOS NATURALES U.D.C.A.  
PRONAUDCA  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D. C.  
2016**

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE  
HOJAS DE *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd.**

**RICARDO BOHORQUEZ FAJARDO**

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

**RUBÉN DARÍO TORRENEGRA GUERRERO**  
Químico.

Director Trabajo de Grado.

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES UDCA**

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

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A.  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PRODUCTOS NATURALES U.D.C.A.  
PRONAUDCA  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D. C.  
2016**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE  
HOJAS DE *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd.**

**RICARDO BOHORQUEZ FAJARDO**

**APROBADO**

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

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A.  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PRODUCTOS NATURALES U.D.C.A.  
PRONAUDCA  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D. C.  
2016**

*A Dios quien me dio la paciencia  
Y sabiduría para culminar  
Con éxito este trabajo*

*A Diana Patricia Garzón mi  
esposa y a mis hijos que  
Con su apoyo me ayudaron a  
Ser posible este sueño,*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis el Dr. Rubén Darío Torrenegra y codirector Dr. Oscar Eduardo Rodríguez Aguirre por ser pacientes, por sus sabios consejos, por haber confiado en mí y por haberme tenido en cuenta para este proyecto.

A mi familia por estar allí conmigo siempre apoyándome.

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                    | PAG |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMEN .....                                                                      | 1   |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                                                | 2   |
| 2. INTRODUCCIÓN .....                                                              | 3   |
| 2.1 Justificación .....                                                            | 5   |
| 2.2 Delimitación .....                                                             | 5   |
| 3. OBJETIVOS .....                                                                 | 6   |
| 3.1 Objetivo general .....                                                         | 6   |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                                    | 6   |
| 4. MARCO TEORICO .....                                                             | 7   |
| 4.1 Familia Compositae (Asteraceae).....                                           | 7   |
| 4.1.1 Hábitats .....                                                               | 7   |
| 4.1.2 Genero <i>Diplostephium</i> .....                                            | 7   |
| 4.1.2.1 Etimología .....                                                           | 8   |
| 4.1.2.2 Propiedades biológicas del genero <i>Diplostephium</i> .....               | 8   |
| 4.1.2.3 Propiedades químicas de las <i>Diplostephium</i> .....                     | 9   |
| 4.1.2.4 Ensayos de antioxidantes sobre el género <i>Diplostephium</i> .....        | 10  |
| 4.1.2.5 Descripción taxonómica .....                                               | 10  |
| 4.1.2.6 <b><i>Diplostephium phyllicoides</i> (Kunth) Wedd</b> .....                | 11  |
| 4.1.2.7 Antecedentes .....                                                         | 11  |
| 4.2 Radicales .....                                                                | 12  |
| 4.3 Antioxidantes .....                                                            | 13  |
| 4.3.1 Sistemas antioxidantes .....                                                 | 14  |
| 4.3.2 Clasificación de los antioxidantes .....                                     | 14  |
| 4.3.2.1 Clasificación Segun fuente de origen.....                                  | 14  |
| 4.3.2.2 Clasificación Según modo de acción.....                                    | 14  |
| 4.3.2.3 Clasificación Según acción en organismos vivos .....                       | 15  |
| 4.3.2.4 Antioxidantes primarios .....                                              | 16  |
| 4.3.2.5 Antioxidantes secundarios .....                                            | 17  |
| 4.3.2.6 Antioxidantes terciarios .....                                             | 18  |
| 4.3.3 <b>Clasificación de los antioxidantes segun su mecanismo de acción</b> ....  | 18  |
| 4.4 Actividad antioxidante .....                                                   | 19  |
| 4.4.1 Medición de la actividad antioxidante .....                                  | 19  |
| 4.4.2 Ensayo de decoloración del radical 1-1Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH*)...21 |     |
| 4.4.3 Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS** .....                 | 22  |

|                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. MATERIALES Y METODOS .....                                                                                                                                                                                                             | 24 |
| 5.1 Recolección del material vegetal .....                                                                                                                                                                                                | 24 |
| 5.2 Extracción .....                                                                                                                                                                                                                      | 24 |
| 5.3 Fraccionamiento .....                                                                                                                                                                                                                 | 25 |
| 5.4 Instrumentos utilizados .....                                                                                                                                                                                                         | 25 |
| 5.4.1 Evaporador rotativo .....                                                                                                                                                                                                           | 25 |
| 5.4.2 Espectrofotómetro UV/VIS .....                                                                                                                                                                                                      | 25 |
| 5.4.3 Materiales .....                                                                                                                                                                                                                    | 25 |
| 5.5 Reactivos y solventes .....                                                                                                                                                                                                           | 26 |
| <br>                                                                                                                                                                                                                                      |    |
| 6. PARTE EXPERIMENTAL .....                                                                                                                                                                                                               | 27 |
| 6.1 Recolección del material vegetal .....                                                                                                                                                                                                | 27 |
| 6.2 Obtención de los extractos de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol de <b><i>Diplostephium phylcoides (Kunth) Wedd</i></b> .....                                                                                 | 28 |
| 6.2.1 Extracción .....                                                                                                                                                                                                                    | 28 |
| 6.3 Determinación de actividad antioxidante de los diferentes extractos obtenidos .....                                                                                                                                                   | 33 |
| 6.3.1 Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH*) .....                                                                                                                     | 33 |
| 6.3.1.1 Preparación de soluciones patrón .....                                                                                                                                                                                            | 33 |
| 6.3.1.2 Preparación de la curva de referencia .....                                                                                                                                                                                       | 34 |
| 6.3.1.3 Medición de la actividad antioxidante de los extractos de hojas de <b><i>Diplostephium phylcoides (Kunth) Wedd</i></b> .....                                                                                                      | 34 |
| 6.3.2 Metodología desarrollada para el ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS <sup>•+</sup> ) .....                                                                          | 36 |
| 6.3.2.1 Preparación de las soluciones patrón .....                                                                                                                                                                                        | 36 |
| 6.3.2.2 Preparación de la curva de referencia .....                                                                                                                                                                                       | 36 |
| 6.3.2.3 Medición de la actividad antioxidante de los extractos de hojas de <b><i>Diplostephium phylcoides (Kunth) Wedd</i></b> .....                                                                                                      | 37 |
| 7. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS .....                                                                                                                                                              | 38 |
| 7.1 Ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH*) .....                                                                                                                                                        | 38 |
| 7.1.1 Preparación de la curva de referencia .....                                                                                                                                                                                         | 38 |
| 7.1.2 Coeficiente de inhibición (IC <sub>50</sub> ) .....                                                                                                                                                                                 | 39 |
| 7.1.2.1 IC <sub>50</sub> Ácido Ascórbico .....                                                                                                                                                                                            | 39 |
| 7.1.2.2 IC <sub>50</sub> Rutina .....                                                                                                                                                                                                     | 39 |
| 7.1.3 Actividad antioxidante de los extractos de hoja de <b><i>Diplostephium phylcoides (Kunth) Wedd</i></b> .....                                                                                                                        | 40 |
| 7.1.4 Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC <sub>50</sub> ) de extractos de hojas <b><i>Diplostephium phylcoides (Kunth) Wedd.</i></b> , por el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH*) ..... | 41 |
| 7.1.5 Capacidad antioxidante de extractos de hojas <b><i>Diplostephium phylcoides (Kunth) Wedd</i></b> , por el ensayo de DPPH* .....                                                                                                     | 42 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.1.6   | Actividad antioxidante relativa (AAR)                                                                                                                                                                                                                      | 43 |
| 7.2     | Ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS <sup>•+</sup> )                                                                                                                                        | 44 |
| 7.2.1   | Preparación de la curva de referencia                                                                                                                                                                                                                      | 45 |
| 7.2.2   | Coeficiente de inhibición 50 (IC <sub>50</sub> )                                                                                                                                                                                                           | 46 |
| 7.2.2.1 | IC <sub>50</sub> Trolox                                                                                                                                                                                                                                    | 46 |
| 7.2.2.2 | IC <sub>50</sub> Rutina                                                                                                                                                                                                                                    | 46 |
| 7.2.2.3 | IC <sub>50</sub> Ácido Ascórbico                                                                                                                                                                                                                           | 47 |
| 7.2.3   | Actividad antioxidante de los extractos de hoja de <b><i>Diplostephium phylicoides</i> (Kunth) Wedd</b>                                                                                                                                                    | 48 |
| 7.2.4   | Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC <sub>50</sub> ) de extractos de hojas <b><i>Diplostephium phylicoides</i> (Kunth) Wedd</b> , por el ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)  | 49 |
| 7.2.5   | Capacidad antioxidante de extractos de hojas <b><i>Diplostephium phylicoides</i> (Kunth) Wedd</b> , por el ensayo ABTS <sup>•+</sup> .                                                                                                                     | 50 |
| 7.2.6   | Actividad antioxidante relativa (AAR)                                                                                                                                                                                                                      | 51 |
| 7.3     | Comparación del IC <sub>50</sub> de extractos de hojas de <b><i>Diplostephium phylicoides</i> (Kunth) Wedd</b> , calculados por los métodos de DPPH* y ABTS <sup>•+</sup>                                                                                  | 52 |
| 7.4     | Comparación de la actividad antioxidante relativa (AAR) de extractos de hojas de <b><i>Diplostephium phylicoides</i> (Kunth) Wedd</b> , calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> comparadas con el ácido ascórbico                            | 53 |
| 7.5     | Comparación de la actividad antioxidante relativa (AAR) de extractos de hojas de <b><i>Diplostephium phylicoides</i> (Kunth) Wedd</b> , calculados por los ensayos del radical DPPH* y de ABTS <sup>•+</sup> comparadas con la Rutina                      | 54 |
| 7.6     | Comparación de la capacidad antioxidante de extractos de hojas de <b><i>Diplostephium phylicoides</i> (Kunth) Wedd</b> , calculados por los ensayos de decoloración del radical DPPH* y del radical catiónico ABTS <sup>•+</sup> comparadas con la rutina. | 55 |
|         | <b>CONCLUSIONES</b>                                                                                                                                                                                                                                        | 56 |
|         | <b>RECOMENDACIONES</b>                                                                                                                                                                                                                                     | 57 |
|         | <b>BIBLIOGRAFIA</b>                                                                                                                                                                                                                                        | 58 |
|         | <b>ANEXOS</b>                                                                                                                                                                                                                                              | 66 |

## LISTA DE IMAGENES

|                                                                                                                                                  | PAG |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Imagen 1. Diterpeno Lactonaderivados de geraniol geranilo (M. BIITNER,* A. SCHUSTER and J. JAKUPOVIC 1991).....                                  | 9   |
| Imagen 2. Fotografía tomada por el autor en guasca 4°50'44''N 73°48'2''O'.....                                                                   | 10  |
| Imagen 3. <i>Diplostephyum phylicoides</i> . Tomado flora de la real expedición Botánica del nuevo reino de granada 19.....                      | 11  |
| Imagen 4. Clasificación antioxidantes según acción en organismos vivos (Sánchez, R.M.; 1998).....                                                | 15  |
| Imagen 5. Vías de peroxidación lipídica (Marnett 1999).....                                                                                      | 16  |
| Imagen 6. Estructuras correspondientes a los antioxidantes secundarios de los mecanismos de defensa en el organismo humano. (Podsdek, 2007)..... | 17  |
| Imagen 7. Estructura del DPPH* antes y después de la reacción con el antioxidante Alametl. 2012).....                                            | 21  |
| Imagen 8. Estructura del ABTS** antes y después de la reacción con el antioxidante. (Zuleta et al., 2009).....                                   | 23  |
| Imagen 9. <i>Diplostephium phylicoides</i> (Kunth) Wedd, recolectada el municipio de guasca (Cundinamarca). (Fuente: Autor).....                 | 27  |
| Imagen 10. Equipo de cuchilla para el molido de las hojas <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd (Fuente: Autor).....                                | 29  |
| Imagen 11. Equipo Soxhlet para la extracción de las hojas <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd (Fuente: Autor).....                                | 29  |
| Imagen 12. Rotaevaporador donde se concentran los diferentes extractos de las hojas <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd (Fuente: Autor).....      | 29  |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                  | <b>PAG</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Tabla 1. AFDP de extractos totales más activas de <i>D. tolimense</i> (Liliana Ávila, Eduard Baquero, Amparo Viña Y Elizabeth Murillo 2006).....                                                 | 8          |
| Tabla 2. Clasificación de antioxidantes según origen. (Fuente: Autor).....                                                                                                                       | 14         |
| Tabla 3. Mecanismos de acción de algunos antioxidantes (Fuente: Wilcox et al., 2004.).....                                                                                                       | 18         |
| Tabla 4. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT. (Fuente: Huang et al., 2005).....                                                                   | 20         |
| Tabla 5. Solventes y reactivos. (Fuente: Autor).....                                                                                                                                             | 26         |
| Tabla 6. Cantidad obtenida de extracto por cada Solvente. (Fuente: Autor).....                                                                                                                   | 28         |
| Tabla 7. Porcentaje de Captación del radical DPPH* empleando Ácido ascórbico. (Fuente: Autor).....                                                                                               | 38         |
| Tabla 8. Porcentaje de captación del radical DPPH* empleando rutina (Fuente: Autor).....                                                                                                         | 38         |
| Tabla 9. Porcentaje de Captación de DPPH* en extractos de hojas <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd.</i> (Fuente: Autor).....                                                                        | 40         |
| Tabla 10. IC <sub>50</sub> de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor).....                       | 42         |
| Tabla 11. Capacidad antioxidante de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor) .....                | 43         |
| Tabla 12. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor). ..... | 44         |
| Tabla 13. Porcentaje de captación del radical ABTS** empleando trolox. (Fuente: Autor). .....                                                                                                    | 45         |
| Tabla 14. Porcentaje de captación del radical ABTS** empleando ácido ascórbico. (Fuente: Autor). .....                                                                                           | 45         |

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 15. Porcentaje de captación del radical ABTS <sup>•+</sup> empleando rutina. (Fuente: Autor).....                                                                                                                                        | 45 |
| Tabla 16. Porcentaje de captación de ABTS <sup>•+</sup> en extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd.</i> (Fuente: Autor).....                                                                                                     | 48 |
| Tabla 17. . IC <sub>50</sub> de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por el método de decoloración del radical ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).....                                                     | 49 |
| Tabla 18. Capacidad antioxidante de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por el método de decoloración del radical ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor). .....                                               | 50 |
| Tabla 19. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por el método de decoloración del radical ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor).....                                   | 51 |
| Tabla 20. Comparación IC <sub>50</sub> en extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por los métodos de decoloración DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> . (Fuente: Autor). .....                                           | 52 |
| Tabla 21. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> con respecto al ácido ascórbico. (Fuente: Autor). ..... | 53 |
| Tabla 22. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> .....                                                   | 54 |
| Tabla 23. Comparación de la capacidad Actividad Antioxidante de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>•+</sup> .....                                                        | 55 |

## ÍNDICE DE GRAFICAS

|                                                                                                                                                                                         | PAG |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Gráfica 1. Curva de referencia del porcentaje de captación de DPPH* v/s concentración de ácido ascórbico. (Fuente: Autor).....                                                          | 39  |
| Gráfica 2. Curva de referencia del porcentaje de captación de DPPH* v/s concentración de Rutina. (Fuente: Autor).....                                                                   | 40  |
| Gráfica 3. Comparación del porcentaje de captación del radical DPPH* de de los diferentes extractos de hojas de <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd. (Fuente: Autor). ...                | 41  |
| Gráfica 4. Comparación IC <sub>50</sub> de extractos de hojas de <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor). ..... | 42  |
| Gráfica 5. Capacidad antioxidante de extractos de hojas de <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor). .....       | 43  |
| Gráfica 6. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos de hojas de <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd, calculados por el ensayo de DPPH*. (Fuente: Autor).....        | 44  |
| Gráfica 7. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS** v/s concentración de Trolox. (Fuente: Autor). .....                                                       | 46  |
| Gráfica 8. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS** v/s concentración de Rutina. (Fuente: Autor).....                                                         | 47  |
| Gráfica 9. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS*+ v/s concentración de ácido ascórbico. (Fuente: Autor).....                                                | 47  |
| Gráfica 10. Comparación extractos de hojas de <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd, por el método decoloración del radical ABTS**. (Fuente: Autor).....                                   | 48  |
| Gráfica 11. Comparación IC <sub>50</sub> de extractos de hojas de <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración ABTS**. (Fuente: Autor).....             | 49  |
| Gráfica 12. Capacidad antioxidante de extractos de hojas de <i>D. phylicoides</i> (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración del radical ABTS*+. (Fuente: Autor). .....     | 50  |

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfica 13. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por el ensayo de ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor).....                                              | 51 |
| Gráfica 14. Comparación IC <sub>50</sub> de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por los métodos DPPH* y ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor).....                                                           | 52 |
| Gráfica 15. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>++</sup> con respecto al ácido ascórbico. (Fuente: Autor)..... | 53 |
| Gráfica 16. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>++</sup> con respecto a la Rutina. (Fuente: Autor).....        | 54 |
| Gráfica 17. Comparación de la capacidad Actividad Antioxidante Relativa de extractos de hojas de <i>D. phyllicoides (Kunth) Wedd</i> , calculados por los ensayos DPPH* y ABTS <sup>++</sup> . (Fuente: Autor).....                            | 55 |

## LISTA DE DIAGRAMAS

|                                                                                                                                                                                                            | <b>PAG</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Diagrama 1. Diagrama de trabajo para el estudio fitoquímico por polaridad creciente de hojas <i>D. phyllicoides</i> (Kunth) Wedd. ....                                                                     | 30         |
| Diagrama 2. Descripción del proceso para obtención del extracto éter de petróleo de hojas <i>D. phyllicoides</i> (Kunth) Wedd. ....                                                                        | 30         |
| Diagrama 3. Descripción del proceso para obtención del extracto diclorometano de hojas <i>D. phyllicoides</i> (Kunth) Wedd. ....                                                                           | 31         |
| Diagrama 4. Descripción del proceso para obtención del extracto acetato de etilo de hojas <i>D. phyllicoides</i> (Kunth) Wedd. ....                                                                        | 31         |
| Diagrama 5. Descripción del proceso para obtención del extracto etanólico: de hojas <i>D. phyllicoides</i> (Kunth) Wedd. ....                                                                              | 32         |
| Diagrama 6. Descripción del proceso para la determinación de la actividad antioxidante de extractos de hojas <i>D. phyllicoides</i> (Kunth) Wedd., por el ensayo de decoloración del radical (DPPH*) ..... | 36         |

## LISTA DE ANEXOS

|                                                                                                              | <b>PAG</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Anexo 1. Cinética del Ácido Ascórbico, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....             | 66         |
| Anexo 2. Cinética de la Rutina, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....                    | 66         |
| Anexo 3. Cinética del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....   | 67         |
| Anexo 4. Cinética del extracto etanolico, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH*. (Fuente: Autor) .....          | 67         |
| Anexo 5. Cinética Ácido Ascórbico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS***. (Fuente: Autor) .....               | 67         |
| Anexo 6. Cinética Rutina, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS***. (Fuente: Autor) .....                        | 68         |
| Anexo 7. Cinética Trolox, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS***. (Fuente: Autor) .....                        | 68         |
| Anexo 8. Cinética del extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS***. (Fuente: Autor) ..... | 68         |
| Anexo 9. Cinética del extracto etanolico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS***. (Fuente: Autor) .....        | 69         |

## RESUMEN

Se le determino la actividad antioxidante por los métodos de radical libre DPPH\* y ABTS\*\* de los extractos de hojas en éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol de las hojas de *Diplostephium phylloides* (Kunth) Wedd

Las concentraciones usadas fueron 12.5, 25, 62.5, 125 y 250 mg/L de metanol, presentando mayor actividad antioxidante por el método DPPH\* y ABTS\*\* el extracto etanol con un IC<sub>50</sub> de 2.34 mg/L por el ensayo de DPPH\* y 8.63 mg/L para el ensayo de ABTS\*\* respectivamente, siguiéndole el extracto acetato de etilo 6.32 mg/L, por el método ABTS\*\*. Igualmente se evidenció esto por el método de DPPH\* con IC<sub>50</sub> de 0.43 mg/L' la capacidad antioxidante comparada con la del ácido ascórbico es un 48.87% menor, pero es mejor que la de la Rutina con un 40%.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los productos naturales provenientes de plantas son valorados por el hombre como fuente de principios activos para uso medicinal (Farnsworth et al., 1992), debido a sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios (Bye et al, 1992), que en la naturaleza funcionan como defensa química contra herbívoros.

El *Diplostephium phyllicoides* prospera en la zona Cundinamarca del país y que pueden ser una especie potencialmente utilizada. Este trabajo busca desarrollar el estudio fitoquímico de las hojas de ésta especie, para determinar si los metabolitos secundarios presentan actividad antioxidante.

Por estas razones expuestas, se generó la necesidad de investigar la actividad antioxidante de estos metabolitos secundarios en los extractos de las hojas de esta planta.

Ante ello, ésta investigación se enfocó en la evaluación de antioxidantes de extractos totales con solventes de diferente polaridad de las hojas de la especie vegetal de la *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, mediante métodos de actividad antioxidante vía atrapamiento de radicales cromóforos como son: el catión radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS<sup>•+</sup>) y el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH<sup>\*</sup>), mediante el uso de la técnica espectrofotométrica UV-VIS (Ultravioleta-Visible)

## 2. INTRODUCCIÓN

Han pasado más de 250 años desde que se inició la química de productos naturales y sin embargo, sólo alrededor del 10% de las más o menos 500.000 especies de plantas que viven sobre la Tierra han sido estudiadas en busca de principios activos. Frecuentemente cuando se estudia una planta a la que se le atribuyen propiedades medicinales, no se logra aislar el principio activo, quizá porque éste es lábil en estado puro o quizá porque su actividad sólo se presenta en conjunto con otros componentes de la planta (Romo, A.; 1996).

Los antioxidantes naturales presentes en las plantas han cobrado gran interés en las últimas dos décadas puesto que el estrés oxidativo (un desbalance entre las sustancias oxidantes y prooxidantes) está implicado en un gran número de afecciones de la salud. Se ha demostrado que el daño oxidativo causado por los radicales libres está relacionado con una amplia gama de enfermedades y desordenes incluyendo: fallo cardíaco, inflamaciones, cataratas, daños cerebrales, entre otros (Youngson, 2003).

Uno de los segmentos de importancia a nivel internacional es la búsqueda y producción de compuestos antioxidantes de origen natural y obtención paralela mediante síntesis química a nivel industrial para satisfacer la demanda de bienestar de una comunidad o país, ya que prevenir el deterioro a causa de factores exógenos como temperatura, contaminantes y oxígeno, entre otros, en el deterioro de alimentos, fármacos y en diversas materias primas usadas a nivel industrial, es imperativo; y así nuevas sustancias con actividad antioxidantes para prolongar la vida útil de estos.

Del género *Diplostephium*, se han identificado en gran abundancia los flavonoides y triterpenos y/o esteroides, actividad antibacteriana y quinonas en escasa cantidad. (Autor: Ávila Lilliana, Baquero Eduard, Viña Amparo Y Murillo Elizabeth – 2006)

Son muy pocos los estudios químicos realizados con plantas del género que nos ocupa y casi ninguno relacionado con actividad biológica. Este parece ser el primer reporte, hasta la fecha conocido, de actividad antibacteriana *in vitro* para *Diplostephium tolimense*.

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de

hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas. (Marwah et al., 2007)

Por ésta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante de las hojas de la especie vegetal *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, por los métodos de decoloración de los radicales ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>.

## 2.1 JUSTIFICACIÓN

El género *Diplostephium* contiene cerca de 110 especies de las cuales 63 se encuentran en Colombia (Vargas, O. M. & S. Madriñán 2006); dentro del cual la mayoría se encuentra en la cordillera oriental donde se ha registrado hasta el momento 33 especies, Entre su relieve se destaca el altiplano cundiboyacense posee una gran variedad de especies vegetales, de las cuales muchas son de uso común en las veredas aledañas en donde se les da uso principalmente medicinal.

En los últimos años, las tendencias es la búsqueda de compuestos que contengan propiedades medicinales a través de productos de origen natural. Por otra parte, la introducción de nuevos productos de origen natural, en el ámbito de la investigación fitoquímica, ha generado un crecimiento en el tratamiento de enfermedades debido a su amplio uso, para ello es necesario seguir investigando especies que contribuyan al desarrollo de nuevos recursos para la obtención de fitofármacos.

Esto implica encontrar especies vegetales que presenten actividad biológica para ser aprovechada. Se decide investigar la acción antioxidante del *Diplostephium Phyllicoides* (Kunth) Wedd, obteniendo los extractos por extracción fraccionada con solventes de diferentes polaridades a través de sus hojas, para posible aplicación en el campo de la medicina y la farmacología.

La presente investigación se orienta para el conocimiento fitoquímico de la especie vegetal *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd

Se contribuirá con información básica y aplicada que podrá ser aprovechada por grupos de investigación multidisciplinarios para la obtención de productos sostenibles de los recursos naturales fitoterapéuticos. Con esta investigación se espera haber validado el uso de la especie *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd como fuente de antioxidantes.

## 2.2 Delimitación

En respuesta ha esta situación se delimito la presente investigación en la cual se estudiaron los extractos de diferentes polaridades de hojas de la especie vegetal *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd., obtenidas por el grupo de investigación de productos naturales PRONAUDCA y la Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad El Bosque; se determinó por los métodos de decoloración del radical DPPH\* y método de decoloración del radical ABTS\*\* la capacidad antioxidante de extractos de los extractos de hojas de la planta en estudio.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antioxidante (AA) a extractos totales obtenidas de hojas de la especie vegetal *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Obtener los extractos de diferente polaridad de las hojas *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd
- Determinar por método de radicales libres - DPPH\* la actividad antioxidante de los extractos de hojas de *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd
- Determinar por método de decoloración del radical ABTS\*\* la actividad antioxidante de los extractos de hojas de *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd
- Comparar los dos métodos de actividad antioxidante.

## 4. MARCO DE TEÓRICO

### 4.1 Familia Compositae (Asteraceae)

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

#### 4.1.1 Habitats

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

#### 4.1.2 Genero *Diplostephium*

El género *Diplostephium* contiene cerca de 100 especies de las cuales 63 se encuentran en Colombia. Se presenta una clave dicotómica para las especies de *Diplostephium* en Colombia con base en las series tratadas por Cuatrecasas para su clasificación. Se incluyen en estas divisiones aquellas especies sin serie asignada. (Vargas, O. M. & S. Madriñán 2006).

Este género de *Diplostephium* *phylicoides* es una especie de arbusto, de 0.5 a 1.5m de altura; las hojas son sésiles y/o articuladas, ovadas a lanceoladas, cuya lamina es de 5.2 a 11mm de longitud y de 2 a 4.8mm de ancho; los capítulos presentan involucre de 5 a 6mm de largo, infundibuliforme, entre 3 y 4 seriado; las lígulas son de 1.4 a 1.5cm de largo de color morado, glabras, de 1.2 a 1.6mm de ancho, y de forma elíptica. Los flósculos son de 3.2 a 4.8mm de largo, de color morado oscuro. (León, O. A 2012)

#### 4.1.2.1 Etimología

*Diplostephium* proviene del griego Diplo que significa doble y Stephanos que significa corona, lo cual hace referencia a los filamentos

#### 4.1.2.2 Propiedades biológicas del género *Diplostephium*

A través de este estudio se encontró que *Diplostephium tolimense* presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, así como también que dicha actividad se incrementó a medida que se simplificó químicamente el extracto total. La identificación de compuestos del tipo flavonoide y triterpenos y/o esteroides en el vegetal, revelan la conexión entre la actividad determinada y su composición química.

| Clase de Metabolito                                    | Extractos y Fracciones |             |      |          |            |
|--------------------------------------------------------|------------------------|-------------|------|----------|------------|
|                                                        | E. T.                  | S. E. AcOEt | F. 4 | S. F 4.3 | F.S 6 a 13 |
| Alcaloides                                             | -                      | -           | -    | -        | -          |
| Flavonoides                                            | +++                    | +++         | +++  | +++      | +++        |
| Taninos                                                | -                      | -           | -    | -        | -          |
| Saponinas                                              | -                      | -           | -    | -        | -          |
| Quinonas                                               | +                      | +           | -    | -        | -          |
| Esteroides y/o triterpenoides                          | +++                    | +++         | +++  | +++      | +++        |
| Cardiotónicos, cumarinas y/o Lactonas sesquiterpenicas | -                      | -           | -    | -        | -          |

ET.: extracto total. S.E. AcOEt: Subextracto acetato de etilo. F: fracción. F.S.: Fracción simple, (-): No detectado, (+): poca cantidad, (++) **Buena cantidad**, (+++): Muy abundante.

Tabla 1. AFDP de extractos totales y fracciones más activas de *D. tolimense*. (Autor: Ávila Liliana, Baquero Eduard, Viña Amparo Y Murillo Elizabeth – 2006)

A partir de un extracto etanólico crudo, y mediante partición biodirigida, se obtiene la fracción más simple de mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Paralelamente se realizan análisis fitoquímicos a las porciones de mayor bioactividad obtenidas durante todo el proceso. Se observa que la acción antibacteriana se incrementa al aumentar la simplicidad química del extracto, y que terpenos y flavonoides parecen estar relacionados con la acción revelada. Se trata del primer reporte, hasta la fecha conocido, de actividad antibacteriana in vitro para *D. tolimense*. (Ávila Liliana, Baquero Eduard, Viña Amparo Y Murillo Elizabeth – 2006)

#### 4.1.2.3 Propiedades químicas de las *Diplostephium*

El exudado resinoso de *Diplostephium cinereum* se obtuvo mediante la inmersión del material vegetal fresco (85g) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a temperatura ambiente. A partir del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se aislaron e identificaron por comparación con los compuestos estándar de cuatro flavonoides y su espectroscópico (FTIR, 1H RMN, VIS - UV) de datos. Los compuestos identificados fueron: 5,7,4'-trihydroxyflavanone ( Naringenina ), 5,7-dihidroxi- 4'metoxiflavanona ( isosakuranetin ), 5,7,3', 4'-tetrahydroxyflavanone ( Eriodictiol ) y 5,7,4' - trihidroxi - 3,3'- dimetoxiflavona ( 3,3'-dimethylquercetin ). Además también se aisló dos benzodihidrofuranos. Sus estructuras fueron determinadas por espectroscopía de alta resolución como: 13-(2-metilpropanoiloxi) toxol (2) y 13[(R)-3-hidroxi-3-fenilpropanoiloxi] toxol (3). (A. Urzúa, L. Andrade, E. Muñoz, M. E. Rodriguez and E. Belmonte, 1997)

*Diplostephium meyenzz II*, se determinó un nuevo diterpeno lactona. Derivados de geraniol geraniolo. Se extrajeron con petrol – Et<sub>2</sub>O, MeOH.

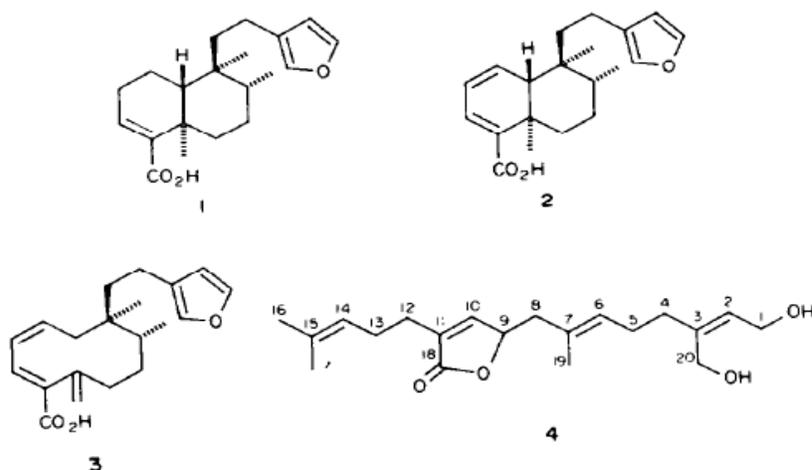


Imagen 1. Diterpeno Lactonaderivados de geraniol geraniolo. (Autor: M. Bittner,\* A. Schuster and J. Jakupovic 1991)

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

Del género *Diplostephium* no se han desarrollado pruebas para la identificación de la actividad antioxidante, se han identificado compuestos que son antioxidantes como los flavonoides encontradas en el *Diplostephium tolimense* y *Diplostephium cinereum* y diterpenos en *Diplostephium meyenii*

#### 4.1.2.5 Descripción taxonómica

|                          |                                                |
|--------------------------|------------------------------------------------|
| Reino                    | <i>Plantae</i>                                 |
| Phylum                   | <i>Magnoliophyta</i>                           |
| Clase                    | <i>Magnoliopsida</i>                           |
| Orden                    | <i>Asterales</i>                               |
| Familia                  | <i>Asteraceae</i>                              |
| Género                   | <i>Diplostephium</i>                           |
| Epíteto Específico       | <i>phylicoides</i>                             |
| Autor Epíteto Específico | (Kunth) Wedd.                                  |
| Especie                  | <i>Diplostephium phylicoides</i> (Kunth) Wedd. |



Imagen 2. Fotografía tomada por el autor en Guasca 4°50'44''N 73°48'2''O'

#### 4.1.2.6 *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd.

*Diplostephium* es un género suramericano de la familia Asteraceae, Este género cuenta con cerca de 110 especies que se distribuyen en zonas de alta montaña desde Venezuela hasta Chile, con excepción de dos especies en Costa Rica. Colombia es el país más rico con 63 especies (Vargas, O. M. & S. Madriñán 2006); y cerca de 45 especies se encuentran reportadas para los páramos colombianos. El género *Diplostephium* corresponde principalmente a arbolitos, arbustos o subarbustos que casi siempre tienen aroma a trementina y tomento blanquecino en el envés de las hojas. Las hojas son simples y alternas, cuyo margen suele ser revoluto por lo menos en la base y entero. Los capítulos de las especies del género son radiados o aparentemente discoides con las lígulas incluidas. *Diplostephium phyllicoides*, también conocida como “romero”, es una especie que esta reportada exclusivamente para Colombia (Luteyn & Churchill 1999) y cuya distribución se da principalmente en el departamento de Cundinamarca. Esta especie es casi exclusiva de los páramos de Cundinamarca, donde es muy frecuente en altitudes comprendidas entre los 2800 y los 3500 m, pudiendo alcanzar altitudes de 4000 m.

#### 4.1.2.7 Antecedentes

Se encuentra información acerca de un estudio FITOQUIMICO de las partes aéreas de la planta *Diplostephium phyllicoides* (HBK) Wedd, en el cual se identifican los metabolitos secundarios presentes en ella. Se aislaron tres triterpenos. Un isómero del UVAOL, un isómero del ACETATO DE BAURENOL y un isómero de la FRIEDELINA, TRES FLAVONOIDES sorbifolina, GENKWANINA y QUERCETINA, un alcohol EICOSAINOL, y dos quinonas; FISCION y otra aún no identificada. Los compuestos fueron aislados e identificados por técnicas cromatograficas y métodos espectroscópicos respectivamente. (Rodríguez, O. E. Bogota 1991)



Imagen 3. *Diplostephium phyllicoides*. Tomado flora de la real expedición Botánica del nuevo reino de granada 1939.

## 4.2 Radicales

Un radical libre (RL) es una especie química que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable y fugaz, con una gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena (Halliwell, B. and Gutteridge. J.M.C, 2007). Una vez generados los radicales libres éstos se aparean rápidamente el electrón desapareado, uniéndose a otro radical, ya sea cediendo o arrancando un electrón a una estructura molecular adyacente no radical, con el fin de estabilizarse.

Los RL's se sintetizan fisiológicamente en el organismo humano como parte del metabolismo energético, pero la producción se incrementa frente a diferentes agresiones como infecciones, ejercicio físico extremo, dietas desequilibradas, tóxicos alimentarios y contaminantes ambientales entre otros. Los radicales son capaces de dañar, de forma reversible o irreversible, todo tipo de compuestos bioquímicos, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos libres, lípidos, carbohidratos y macromoléculas. Los ácidos grasos poli-insaturados son altamente sensibles al ataque de los radicales libres; éstos radicales pueden alterar la actividad celular, tanto a nivel de membranas como del metabolismo y expresión génica (Valco, M. *et al.* 2007).

Desde el punto de vista médico, hay interés principalmente en dos radicales: el hidroxilo  $\text{OH}\cdot$  y el radical superóxido  $\text{O}_2\cdot^-$ ; estos pueden atacar y dañar casi cualquier molécula presente en el cuerpo. Son tan activos que, una vez formados solo transcurre una fracción de tiempo para reaccionar y formar un radical estable, pero inmediatamente la molécula atacada forma un nuevo radical libre (Festy, 2007).

Las formas en las que actúa un radical en un sistema biológico, son por medio de los procesos oxidativos, cabe señalar que la oxidación de moléculas biológicas no siempre es un proceso dañino. Hay algunas funciones fisiológicas, que dependen de la formación de productos oxidados, por ejemplo los resultados de la oxidación lipídica enzimática en la formación de prostaglandinas biológicamente activas y otros compuestos biológicamente activos, etc. Sin embargo, "el cóctel de radicales libres" puede ser una causa de potentes eventos dañinos, y por lo tanto, el organismo tiene que desarrollar potentes sistemas de protección anti-radical. Tradicionalmente, estos sistemas se denominan sistemas antioxidantes. (Yu, 2008)

### 4.3 Antioxidantes

El término antioxidante fue utilizado originalmente para referirse específicamente a un producto químico que previniera el consumo de oxígeno. A finales del siglo XIX y a principios de siglo XX, extensos estudios fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del metal, la vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en la formación de escoria en motores de combustión interna (Matill, H.A. 1947).

Por antioxidante se entiende como: toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda, inhibe o previene la oxidación de dicho sustrato; y desde el punto de vista biológico es: todo compuesto que protege los sistemas vivos de los agentes que causan deterioro oxidativo” (Halliwell, B. and Gutteridge. J.M.C. 2007). Los antioxidantes son ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos con la esperanza de mantener la salud y de prevenir enfermedades tales como el cáncer y la cardiopatía isquémica. Además de estas aplicaciones en medicina los antioxidantes tienen muchas aplicaciones industriales, tales como conservantes de alimentos, de cosméticos y la prevención de la degradación del caucho y la gasolina (Castro Dantas, T.N. *et al.* 2003; Huang, D. *et al.* 2005).

Aunque las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, también pueden ser perjudiciales; por lo tanto las plantas y los animales mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como glutatión, vitamina C, y vitamina E, así como enzimas tales como la catalasa, superóxido dismutasa y varias peroxidasas. Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células (Vickers, T. 2007).

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, es por ello que el uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva, particularmente como tratamiento para accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Sies, H. 1997). Sin embargo, se desconoce si el estrés oxidativo es la causa o la consecuencia de tales enfermedades.

### 4.3.1 Sistemas antioxidantes

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

### 4.3.2 Clasificación de los antioxidantes

No hay establecido un criterio único para la clasificación de los antioxidantes, por que varios de ellos actúan por diversos mecanismos. La literatura reporta varias formas de clasificación a saber:

#### 4.3.2.1 Clasificación según fuente de origen

En ésta clasificación encontramos los AO's naturales y los AO's sintéticos. Los antioxidantes naturales se extraen de plantas y animales. Entre los antioxidantes de origen natural se destacan los carotenoides y los polifenoles como los ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Tsao, R. and Dengb. Z. 2004) y, los antioxidantes sintéticos que en su mayoría son compuestos fenólicos con varios grupos alquilo, como el butil-hidroxianisol (BHA), butil- hidroxitolueno (BHT), ter-butil-hidroquinona (TBHQ) y propilgalato (PG); donde la estructura de éste tipo de compuestos permite donar un protón a un radical libre (Ramalho, V.C. and Jorge, N. 2006).

#### 4.3.2.2 Clasificación según modo de acción

En ésta clasificación se agrupan los antioxidantes como preventivos, bloqueadores de cadena (secuestradores de radicales) y de reparación. (Ver Tabla).

| Clase                     | Modo de Acción                                                                 |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Antioxidantes preventivos | Quenchers o desactivadores de $^1O_2$ , Quelantes. Reductores.                 |
| Bloqueadores de cadena    | Quenchers o atenuadores de radicales, Scavengers o secuestradores de radicales |

Tabla 2. Clasificación de antioxidantes según origen. (Fuente: Autor)

Los antioxidantes preventivos intervienen en la etapa de iniciación del proceso de oxidación. Los llamados Quenchers actúan cuando el proceso es

catalizado por sustancias capaces de excitar el oxígeno molecular disponible hasta su estado singulete, durante la colisión molecular entre el excitador o el  $^1\text{O}_2$  con el desactivador (quenchers); el exceso de energía es transmitido al medio en forma de calor sin que haya lugar a transformaciones estructurales en la molécula, ejemplo de sustancias que actúan como quenchers son:  $\beta$ -caroteno, brucina, ergotamina, etc.

Otras sustancias son capaces de incorporar rápidamente el oxígeno singulete a su estructura molecular formando productos estables, se ha propuesto que  $\alpha$ -tocoferol y algunos flavonoides poseen esta facultad, al igual que el ácido ascórbico y la carnosina en el organismo (Ahmad, S.1985).

#### 4.3.2.3 Clasificación según acción en organismos vivos

Los organismos vivos han desarrollado varias estrategias de defensa celular contra los procesos en los que intervienen las ERO's, mediante la acción de antioxidantes cuya actividad va disminuyendo con el paso del tiempo. En ésta categoría los antioxidantes se agrupan en tres sistemas. (Sánchez, R.M.; 1998).

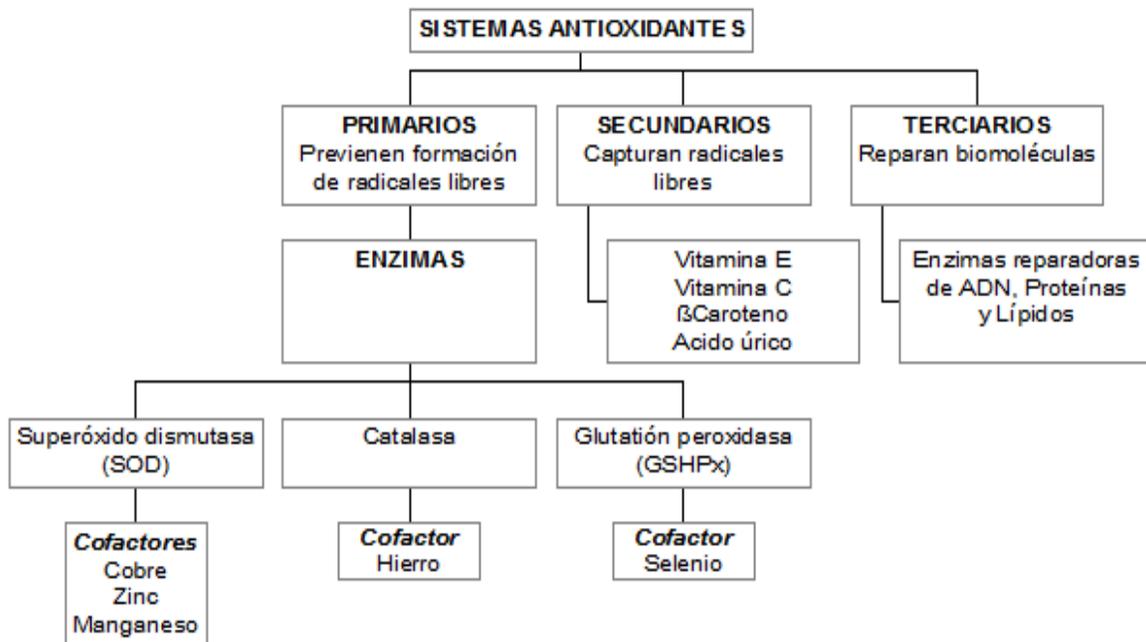


Imagen 4. Clasificaciones antioxidantes según acción en organismos vivos. (Sánchez, R.M.; 1998).

#### 4.3.2.4 Antioxidantes primarios

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

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

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

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

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

### 4.3.2.5 Antioxidantes secundarios

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

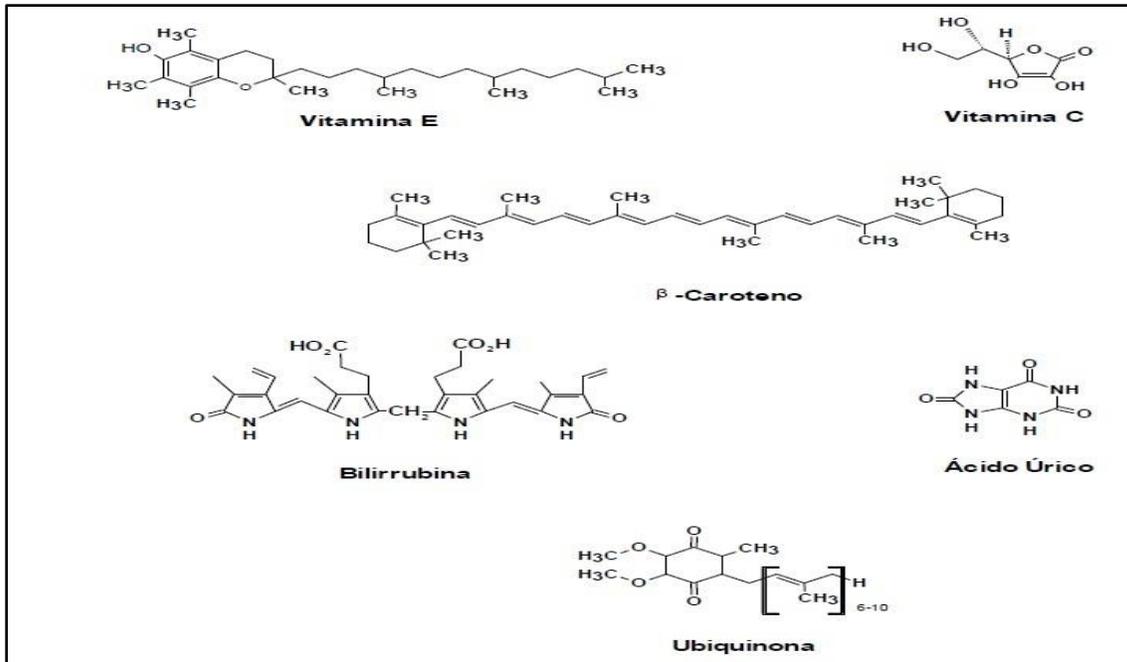


Imagen 6. Estructuras correspondientes a los antioxidantes secundarios de los mecanismos de defensa en el organismo humano. (Podsdek, 2007)

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

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

#### 4.3.2.6 Antioxidantes terciarios

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

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

#### 4.3.3 Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción.

La defensa del organismo frente al daño oxidativo tiene lugar por distintas vías según se desarrolla la reacción en cadena de oxidación. Como primera línea de defensa antioxidante se encuentran los antioxidantes preventivos. A continuación, intervienen los antioxidantes eliminadores de radicales libres, y finalmente actúan los enzimas sintetizados *de novo* o de reparación (Wilcox et al., 2004). (Tabla 3).

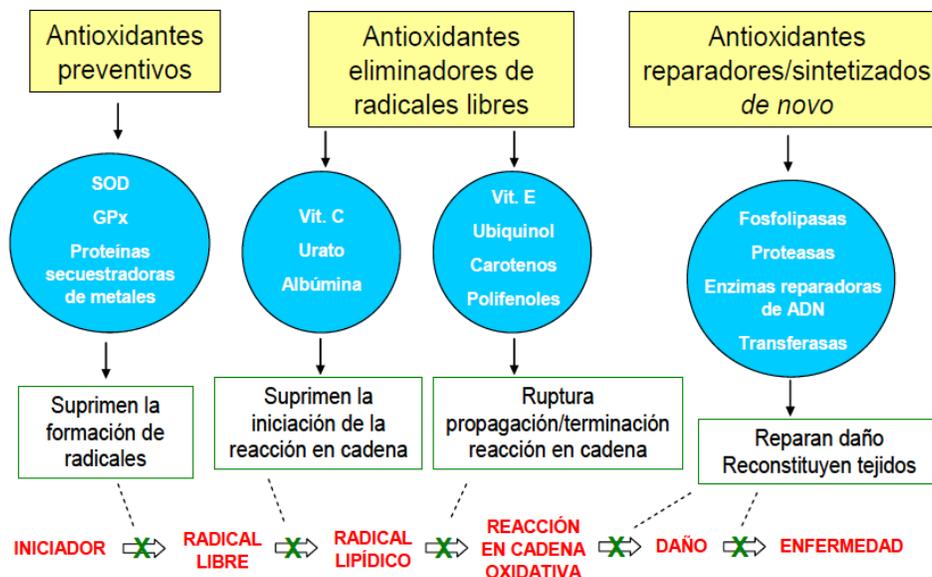


Tabla 3. Mecanismos de acción de algunos antioxidantes (Fuente: Wilcox et al., 2004).

#### 4.4 Actividad antioxidante

Muchos autores utilizan indistintamente el término Actividad Antioxidante o Capacidad Antioxidante; ya que en la literatura se encuentran términos como capacidad, eficiencia, poder, parámetro y potencial. La actividad de un compuesto AO sería sin sentido sin el contexto específico de las condiciones de reacción como presión, temperatura, medio de reacción, reactantes y coreactantes, y otros puntos de referencia (Huang, D. et al. 2005).

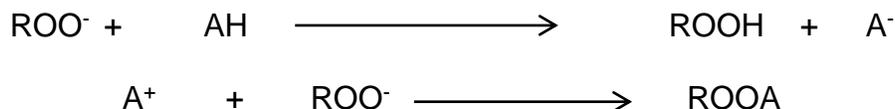
El término "Actividad Antioxidante" es usado para un ensayo individual y refleja solamente la reactividad química bajo condiciones específicas aplicadas en el ensayo y es inapropiado generalizarlo como un indicador de la "actividad antioxidante total". Los demás términos mencionados en el anterior párrafo son más independientes de reacciones específicas y tienen similar significado químico. Para ser consistentes en la revisión, usamos "capacidad" cuando se refieren a los resultados obtenidos por diferentes ensayos, como "Capacidad secuestradora de radicales peróxido", "Capacidad secuestradora de superóxido", "Capacidad reductora del ión férrico", entre otros (Huang, D. et al. 2005). Igualmente es importante distinguir entre capacidad antioxidante y reactividad. La capacidad antioxidante informa sobre la duración de la acción antioxidante, la reactividad caracteriza el inicio dinámico de la antioxidación a una determinada concentración de un antioxidante o mezcla antioxidante (Roginsky, V. and Lissi, E.A.; 2005).

##### 4.4.1 Medición de la actividad antioxidante

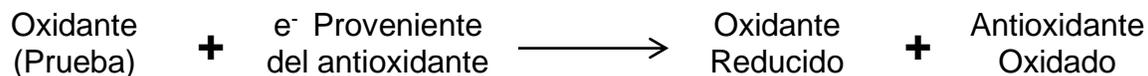
La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test in vitro para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presenten diferentes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

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

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



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



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

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

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

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

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

Tabla 4. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT. (Fuente: Huang et al., 2005).

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

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH\* para aceptar un átomo de hidrógeno (H<sup>+</sup>) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH\*) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nanómetros. Cuando la solución de DPPH\* reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.

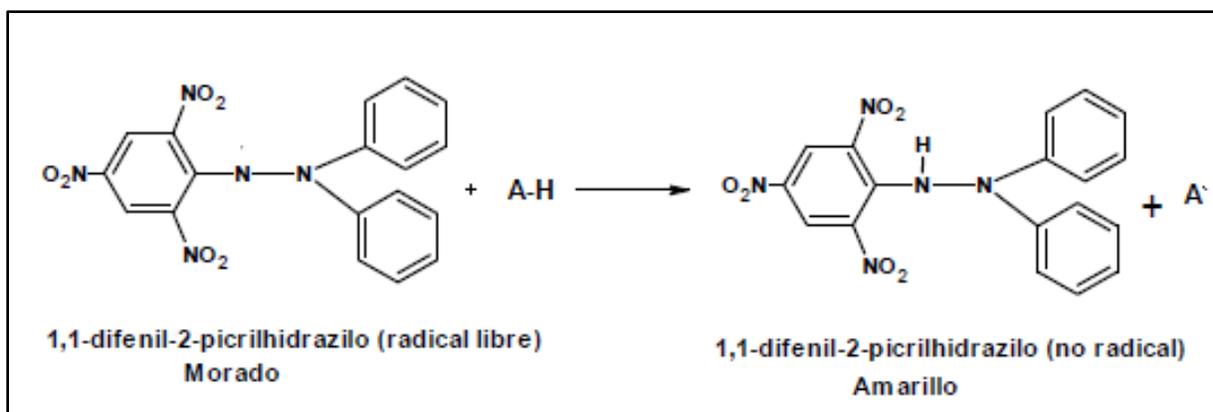


Imagen 7. Estructura del DPPH\* antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al., 2012)

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

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

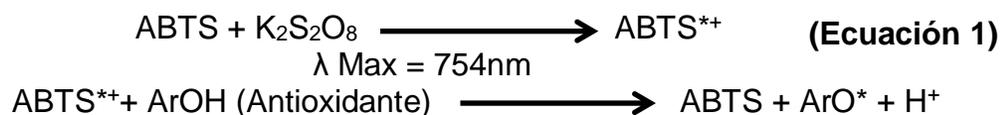
- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.
- DPPH\* es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes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

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

Método propuesto por Miller, N.J. et al. En 1993, se basa en la capacidad antioxidante del ABTS<sup>•+</sup> para secuestrar aniones radicales de larga vida. En el ensayo el ABTS<sup>•+</sup> es oxidado por radicales peróxido, por persulfato de potasio (RE 1999), por peróxido de hidrógeno (Villano, D. et al. 2004), peroxidasa de rabano (Labrinea, E.P. and Georgiu, C.A.; 2004) u otro oxidante hasta formar el catión radical ABTS<sup>•+</sup> el cual presenta un intenso color verde-azul, y en la medición los compuestos con capacidad antioxidante reaccionan directamente disminuyendo el color del catión radical ABTS<sup>•+</sup>, los resultados obtenidos son expresados como inhibición y llevados a una concentración relativa de Trolox, es por ello que el método se conoce como Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (TEAC). El radical posee solubilidad en medios polares y apolares y no es afectado por la fuerza iónica, por lo tanto, evalúa antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de extractos de plantas y fluidos biológicos (Huang, D. et al. 2005; Roginsky, V. and Lissi, E.A. 2005; Prior, R.L.; et al. 2005).

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

radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re et al., 1998).



El radical  $\text{ABTS}^{*+}$  es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los antocianos, reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. Además radical generado químicamente (persulfato potásico), fue validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente.

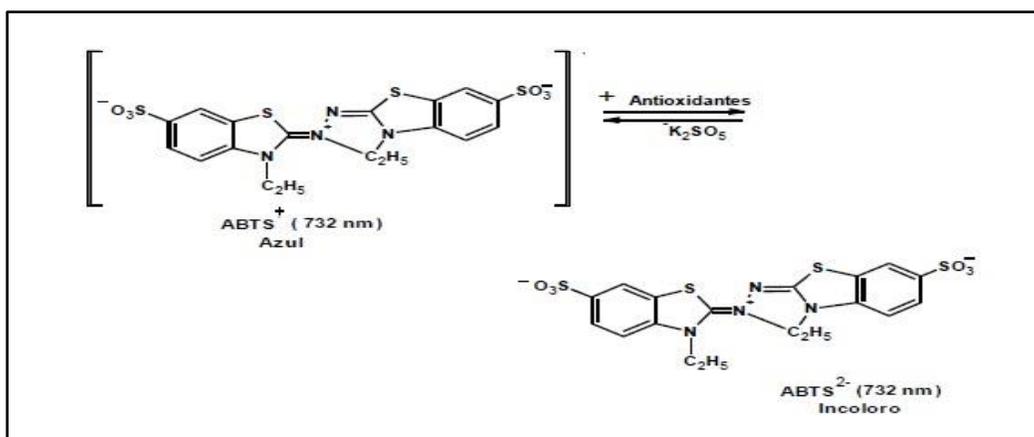


Imagen 8. Estructura del  $\text{ABTS}^{*+}$  antes y después de la reacción con el antioxidante. (Zuleta et al., 2009).

La capacidad antioxidante se calcula como el porcentaje de captación  $\text{DPPH}^*$ , según la fórmula de (Yen and Duh. et al., 1994) (ecuación 1):

$$\begin{aligned}
 \frac{\% \text{ de captación } \text{DPPH}^*}{\% \text{ de captación } \text{ABTS}^{*+}} &= \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 1)}
 \end{aligned}$$

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

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los extractos de hojas *Diplosteghium phyllicoides* (Kunth) Wedd, se basa en utilizar la metodología de recolección, extracción y determinación de la actividad antioxidante para cada uno de los anteriores.

### 5.1 Recolección del material vegetal

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

- Debe anotarse la fecha, el hábitat donde se encontró y el estado (Ejemplo: en floración) de la planta.
- Se separa una muestra testigo que será enviada al Herbario para obtener el registro taxonómico y un código de la planta.
- La planta se divide en sus correspondientes partes (Flores, Hojas, Tallos, Raíces) y se deja secar a la sombra una temperatura promedio de 25°C, para que la planta retenga un contenido de humedad no mayor del 10%.
- El material vegetal se debe pasar por un molino limpio en el cual se va a obtener el material final con que se empieza a trabajar.

### 5.2 Extracción

Las muestras de elementos y compuestos rara vez se encuentran en la naturaleza en forma pura, o casi pura, por lo que es necesario separarlos de las mezclas en las que se encuentran (Cela, R. et al. 2002).

Las técnicas de extracción más comunes son las de maceración, extracción Soxhlet y reflujo, con solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, etanol) y posterior concentración a presión reducida (Cannell R. 1998). La extracción sólido-líquido, es el método más utilizado para extraer productos naturales de sus fuentes, utilizando solventes que disuelvan el compuesto deseado, dejando los que sean insolubles con este solvente en la fuente natural.

En los procesos de extracción empleados normalmente en química orgánica, una fase es agua y la otra un solvente orgánico adecuado; el diclorometano es un solvente ampliamente utilizado en este tipo de técnicas ya que reúne muchas características útiles como su alta volatilidad, su gran capacidad como solvente y

su fácil accesibilidad. Para aumentar o disminuir la solubilidad de la sustancia en una fase, se pueden añadir distintos productos. La solubilidad de un producto en una fase puede incrementarse con la adición de un reactivo que sea capaz de formar un complejo estable y soluble en esta fase. Estos complejos pueden ser posteriormente degradados y el producto deseado recuperado. La solubilidad de una sustancia puede disminuirse, en especial en fases acuosas, por la adición de sales neutras que reducen la solubilidad de la sustancia en esta fase (Valcarcel Casas, M. y Silva Rodriguez.; 1984).

### **5.3 Fraccionamiento**

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

### **5.4 Instrumentos utilizados**

#### **5.4.1 Evaporador rotativo**

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

#### **5.4.2 Espectrofotómetro UV/VIS.**

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

#### **5.4.3 Materiales**

- Plancha de calentamiento y agitación magnética IKA (MS1 S1, Wilmintong, USA).
- Microjeringa de 10  $\mu$ L (Hewlett-Packard)
- Cubetas en cuarzo 10 x 10 x 45 mm
- Frascos de 50, 250 y 500 mL (Schott, Hofheim, Alemania)
- Pipetas volumétricas y aforadas de 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 mL, balones aforados de 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 mL, vasos de precipitados de 50, 100, 250, 600 y 1000 mL (Schott, Hofheim, Alemania).

## 5.5 Reactivos y solventes

Todos los solventes fueron grado reactivo de Merck (Darmstadt, Alemania), a saber:

- Metanol, Etanol, Acetona, Acetato de Etilo, Eter de petróleo y Diclorometano fueron usados en los procesos de extracción e implementación de métodos de actividad antioxidante.

Los compuestos patrón fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA), tales como

- Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS).
- Radical  $\alpha$ ,  $\alpha$ -difeníl-  $\beta$ - Picrilhidrazilo (DPPH\*).
- Ácido-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX).
- Ácido ascórbico (Vitamina C).
- Persulfato de potasio.

| SOLVENTES Y REACTIVOS                                               | USO                                             |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Éter de Petróleo.                                                   | Extracción de material vegetal.                 |
| Diclorometano.                                                      | Extracción de material vegetal.                 |
| Acetato de Etilo.                                                   | Extracción de material vegetal.                 |
| Etanol (Alcohol Etílico).                                           | Extracción de material vegetal.                 |
| Metanol (Alcohol Metílico).                                         | Ejecución de métodos de actividad antioxidante. |
| Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS**). | Ejecución de métodos de actividad antioxidante. |
| 2,2-difenil- 1-picrilhidracilo (DPPH*).                             | Ejecución de métodos de actividad antioxidante. |
| Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX C). | Ejecución de métodos de actividad antioxidante. |
| Ácido ascórbico (Vitamina C).                                       | Ejecución de métodos de actividad antioxidante. |
| Persulfato de potasio.                                              | Ejecución de métodos de actividad antioxidante. |
| Rutina (quercetin-3-rutinósido) (fuente patrón de laboratorio)      | Ejecución de métodos de actividad antioxidante. |

Tabla 5. Solventes y reactivos. (Fuente: Autor)

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

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

### 6.1 Recolección del material vegetal

Se recolectó el material vegetal a orillas de la carretera en la vía que conduce al municipio de Paramo de Guasca, departamento de Cundinamarca, en las coordenadas 4°50'44"N, 73°48'2"O, tomando la planta completa en estado de floración, una muestra testigo fue enviada al Herbario Nacional de Colombia para su identificación taxonómica, donde fue clasificada como *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd., con numero **Col 324495**

Se secaron y molieron las hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd obteniéndose 534 g.



Imagen 9. *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, recolectada el municipio de guasca (Cundinamarca). (Fuente: Autor).

## 6.2 Obtención de los extractos de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol de hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd

Los extractos de hojas *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, fueron obtenidos en los laboratorios de la facultad de Ingeniería Ambiental de la universidad El Bosque, bajo la supervisión del grupo de investigación de productos naturales PRONAUDCA, de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

### 6.2.1 Extracción

El proceso de extracción se realizó a partir del material previamente secado y molido. Teniendo una cantidad inicial de 534 gramos de hojas secas y molidas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, este material vegetal se ingresó en su totalidad a un equipo de extracción Soxhlet, donde se realizó la extracción sólido-líquido, durante 8 días, a temperatura de ebullición según el solvente (Éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol), al completar los ciclos correspondientes de este proceso, se pasan los extractos a concentrar en el rotaevaporador a una presión de 200 mbar, temperatura de 60°C y una revolución de 60rpm, donde se recuperó el solvente y se obtuvo el extracto deseado.

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

| Parte aérea | Extracto         | Peso Final (Gramos) | %Rendimiento extracto |
|-------------|------------------|---------------------|-----------------------|
| Hojas       | Éter de petróleo | 28.7877             | 5.39                  |
|             | Diclorometano    | 27.2432             | 5.10                  |
|             | Acetato de etilo | 13.6254             | 2.55                  |
|             | Etanol           | 14.0106             | 2.62                  |

Tabla 6. Cantidad obtenida de extracto por cada Solvente. (Fuente: Autor).

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

$$\% \text{ Rendimiento extracto} = \frac{\text{Peso final extracto concentrado}}{\text{Masa Total del material vegetal}} * 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$



Imagen 10. Equipo de cuchilla para el molido de las hojas *D. phylloides* (Kunth) Wedd (Fuente: Autor).



Imagen 11. Equipo Soxhlet para la extracción de las hojas *D. phylloides* (Kunth) Wedd (Fuente: Autor).



Imagen 12. Rotaevaporador donde se concentran los diferentes extractos de las hojas *D. phylloides* (Kunth) Wedd (Fuente: Autor).

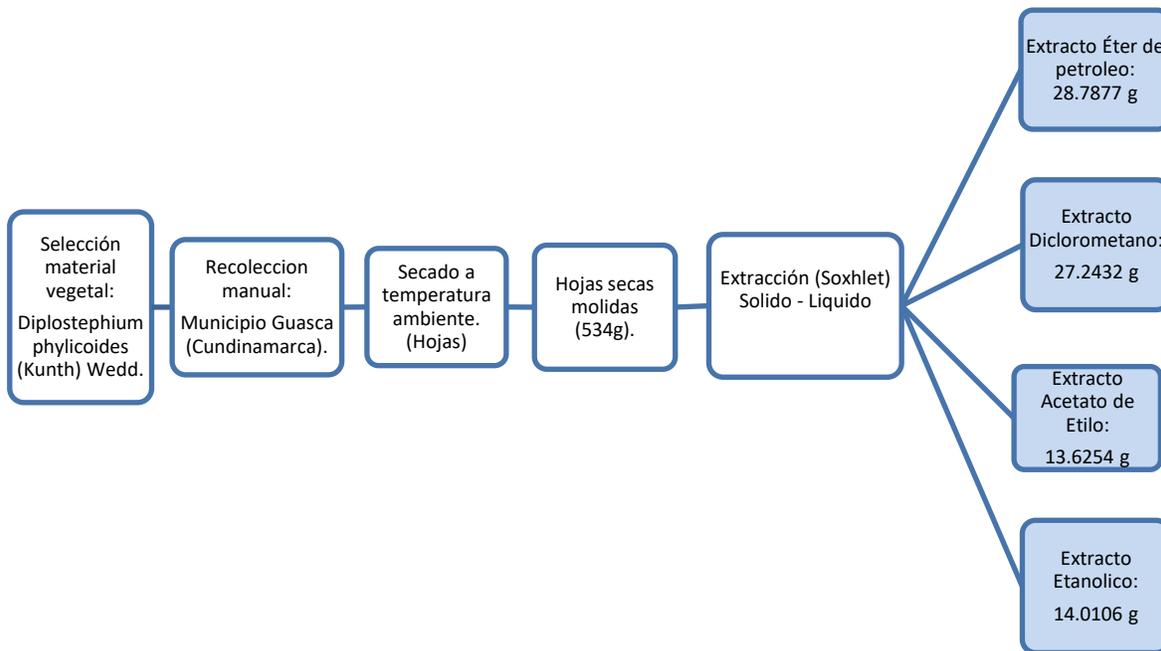


Diagrama 1. Diagrama de trabajo para el estudio fitoquímico por polaridad creciente de hojas *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd

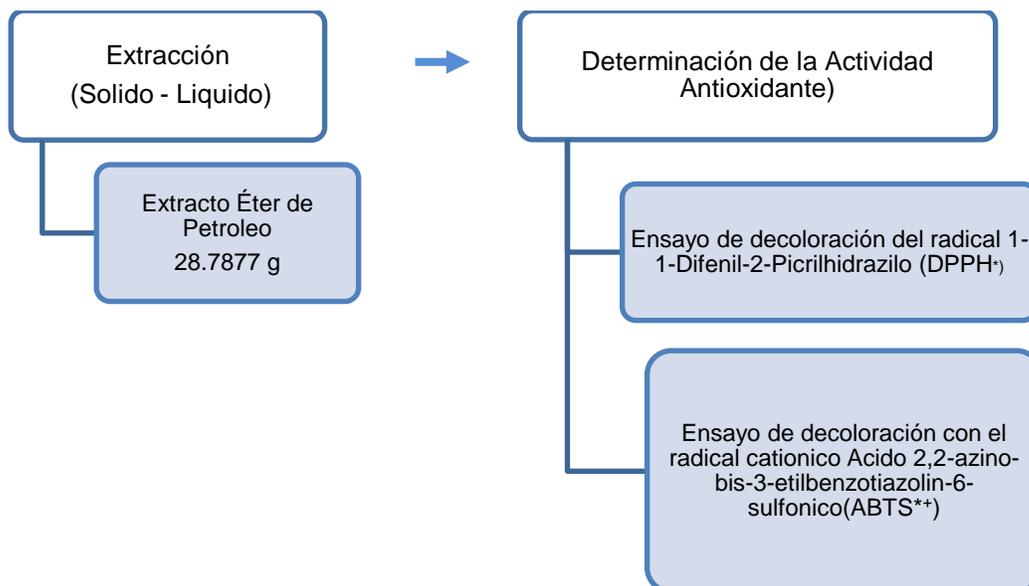


Diagrama 2. Descripción del proceso para obtención del extracto éter de petróleo de hojas *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd

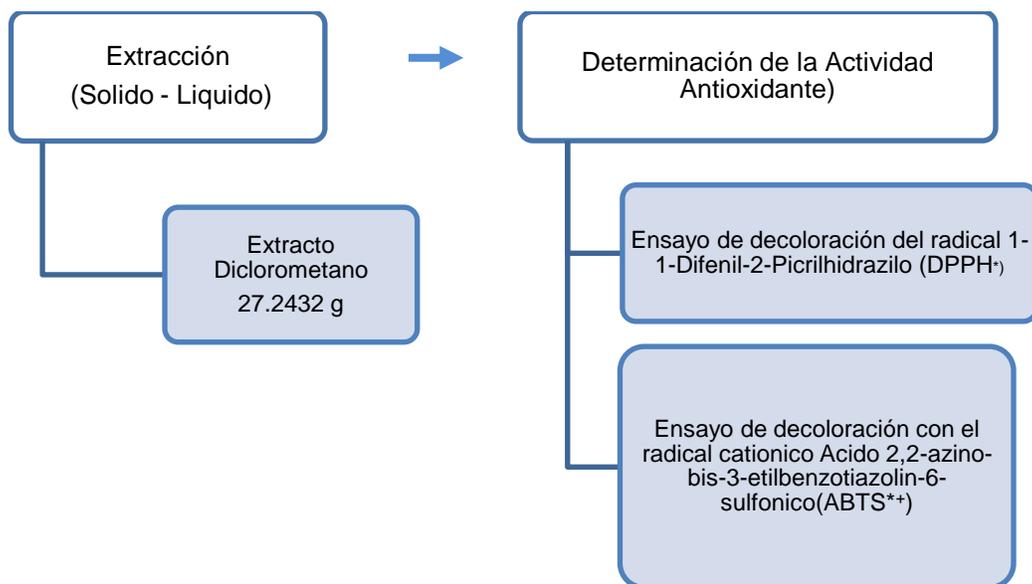


Diagrama 3. Descripción del proceso para obtención del extracto diclorometano de hojas *Diplostephium phylloides* (Kunth) Wedd

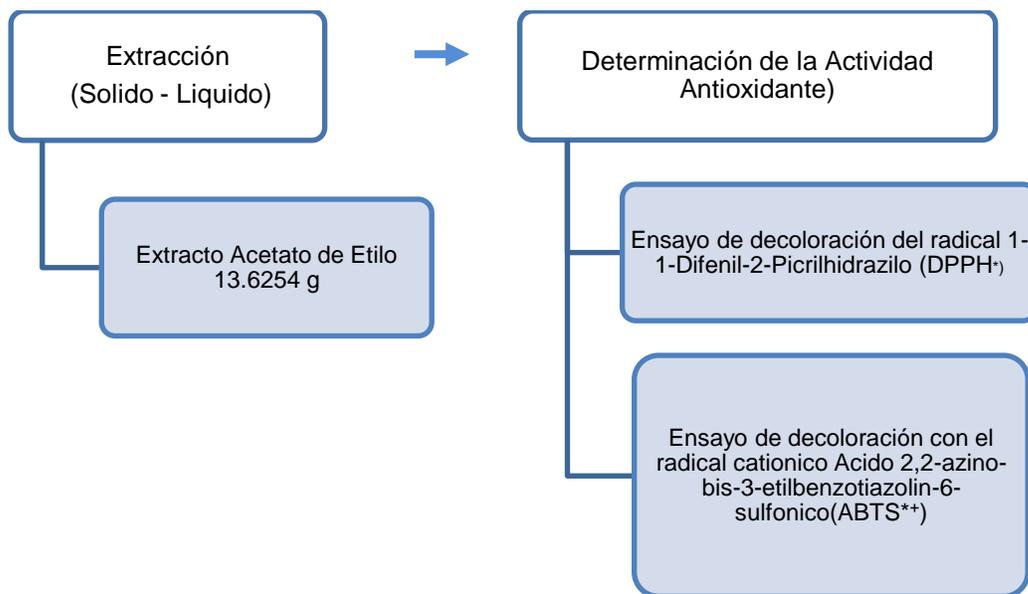


Diagrama 4. Descripción del proceso para obtención de extracto acetato de etilo de hojas *Diplostephium phylloides* (Kunth) Wedd

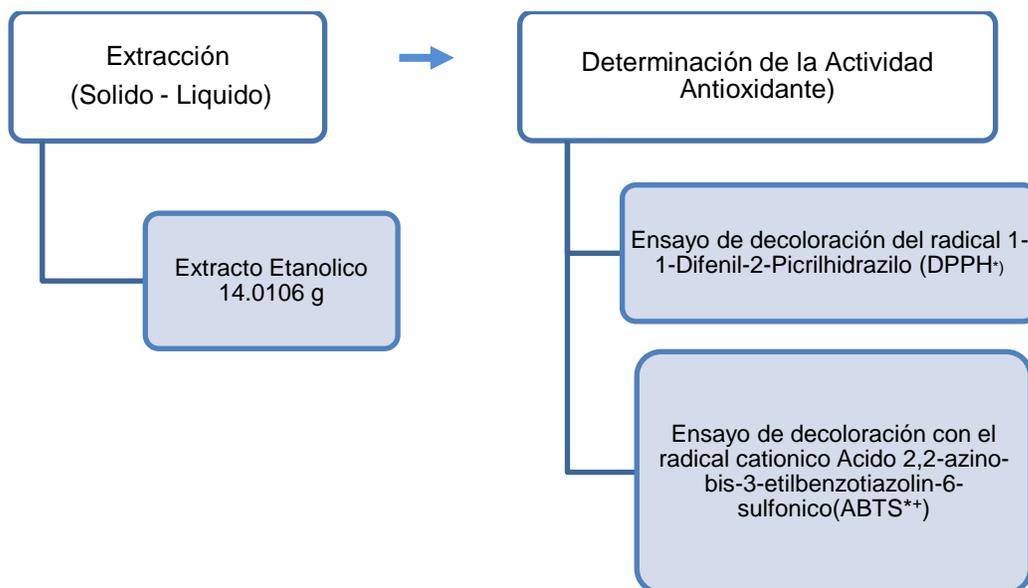


Diagrama 5. Descripción del proceso para obtención de extracto etanólico de hojas *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd

### **6.3 Determinación de actividad antioxidante de los diferentes extractos obtenidos**

Los extractos de hojas de *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd obtenidos, se determinó su actividad antioxidante por el método de decoloración con el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> (Ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y por el ensayo de decoloración de radicales DPPH<sup>•</sup> (método del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).

Las pruebas de actividad antioxidante se realizaron según el método propuesto por (RE, R. et al. 1998), empleando la capacidad antioxidante del Trolox sobre el generador de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> y su habilidad de secuestrar radicales de larga vida, el cual se basa en la decoloración del compuesto nitrogenado DPPH<sup>•</sup>.

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

##### **6.3.1.1 Preparación de soluciones patrón**

Para la preparación del radical DPPH<sup>•</sup>: Se disolvieron 2 mg de DPPH<sup>•</sup> Sigma-Aldrich, en 100 mL de metanol grado analítico, la solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas en la oscuridad. Posteriormente fueron preparadas soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de  $0.750 \pm 0.050$  para todos los casos, a una longitud de onda de 517 nm.

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

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

### 6.3.1.2 Preparación de la curva de referencia

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

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

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

### 6.3.1.3 Medición de la actividad antioxidante de los extractos de hojas de *Diplosteghium phyllicoides* (Kunth) Wedd.

En una celda de plástico de volumen reducido 1.5 mL se agregaron 600 $\mu$ L del radical DPPH\*, se midió la absorbancia inicial a 517 nm, luego se adicionaron 200 $\mu$ L de cada uno de los extracto de hojas de *Diplosteghium phyllicoides* (Kunth) Wedd y nuevamente, se midió la absorbancia cada 30 segundos durante 10 minutos, midiendo la absorbancia final a la misma longitud de onda a los 10 minutos después.

Para realizar la evaluación de la actividad antioxidante de cada una de los extractos de hojas de *Diplosteghium phyllicoides* (Kunth) Wedd, se determinó:

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

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

Por último se mide la absorbancia cada 30 segundos por 10 minutos de la mezcla del DPPH\* y de los extractos, del DPPH\* y los extractos de hojas de *Diplosteghium phyllicoides* (Kunth) Wedd.

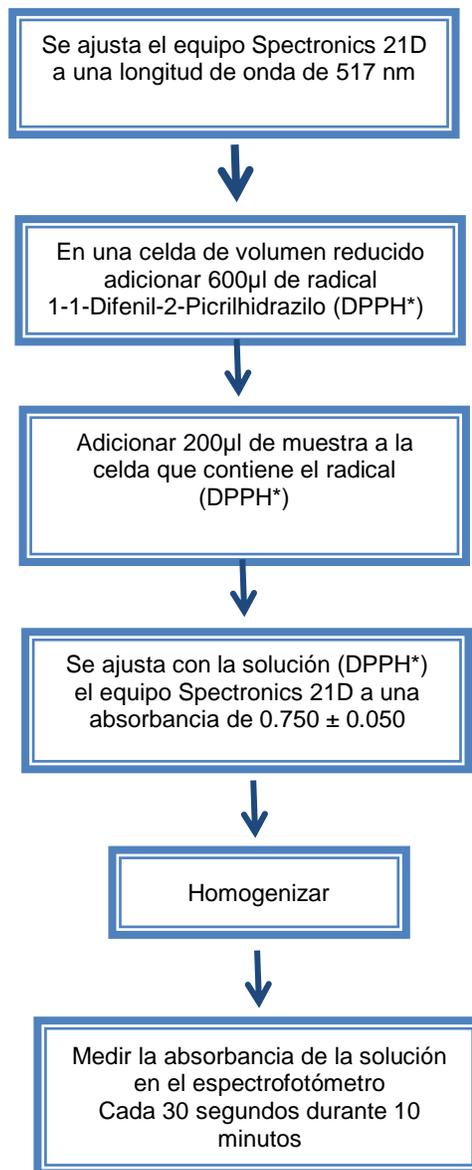


Diagrama 6. Descripción del proceso para la determinación de la actividad antioxidante de extractos de hojas *Diplostephium phylloides* (Kunth) Wedd por el ensayo de decoloración del radical (DPPH\*).

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

#### **6.3.2.1 Preparación de soluciones patrón**

En la Preparación del radical ABTS<sup>•+</sup>, Se disolvieron 50 mg de (ABTS) la diamónica del 2,2-Azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) de Sigma-Aldrich, en 50 mL de agua desionizada, luego se adicionaron 2,45 mg de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), la solución se dejó reaccionar a una temperatura de 3°C durante 48 horas en la oscuridad. Posteriormente fueron preparadas soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de 0.750 ± 0.050 para todos los casos, a una longitud de onda de 754 nm.

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

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

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

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

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

$$\% \text{ de captación de ABTS} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

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

### **6.3.2.3 Medición de la actividad antioxidante de los extractos de hojas de *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd.**

En una celda de plástico con volumen reducido 1.5 mL se agregaron 600 µL del radical ABTS<sup>•+</sup>, se midió la absorbancia a 754 nm, luego se adicionaron 200 µL del extracto de hojas de *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd, y nuevamente se midió la absorbancia final a la misma longitud de onda 10 minutos después.

Para realizar la evaluación de la actividad antioxidante de cada uno de los extractos de hojas *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd, se determinó:

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

Se procede a medir la absorbancia del ABTS<sup>•+</sup>, la cual se conoce como absorbancia inicial. Después se procedió a realizar la mezcla entre el ABTS<sup>•+</sup> y el extracto sobre la cual se realizó la evaluación de la capacidad antioxidante. Las absorbancias de la mezcla del ABTS<sup>•+</sup> y el extracto de *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd, se midieron cada 30 segundos durante 10 minutos.

## 7. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS

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

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

#### 7.1.1 Preparación de la curva de referencia

Para realizar la curva de referencia se prepararon soluciones de ácido ascórbico (Vitamina C) y Rutina en concentraciones de 1,25, 6,25 y 12,5 mg/L de metanol respectivamente, se realizó la medición del porcentaje de captación de DPPH\* empleando la ecuación 2. Los resultados de la medición del porcentaje de captación de DPPH\* se encuentran en la tabla 7 y 8.

| Concentración mg/ L MeOH | Log Concentración | A inicial | A final | % de captación de DPPH* |
|--------------------------|-------------------|-----------|---------|-------------------------|
| 1,25                     | 0,10              | 0,786     | 0,397   | 49,49                   |
| 6,25                     | 0,80              | 0,784     | 0,097   | 87,63                   |
| 12,5                     | 1,10              | 0,792     | 0,097   | 87,75                   |

Tabla 7. Porcentaje de Captación del radical DPPH\* empleando Ácido ascórbico. (Fuente: Autor)

Partiendo de los datos obtenidos del porcentaje de captación del radical DPPH\* causado por el ácido ascórbico, se construyó una curva de referencia (**Grafica 1**) que permite verificar la dependencia lineal del porcentaje de captación del radical Vs la concentración del ácido ascórbico obteniéndose un  $R^2$  de 0,916, el cual nos permite calcular el porcentaje de concentración efectiva 50 ( $IC_{50}$ ) por medio de la ecuación de la gráfica 1.

| Concentración mg/ L MeOH | Log Concentración | A inicial | A final | % de captación de DPPH** |
|--------------------------|-------------------|-----------|---------|--------------------------|
| 1,25                     | 0,10              | 0,793     | 0,561   | 29,26                    |
| 6,25                     | 0,80              | 0,796     | 0,392   | 50,75                    |
| 12,5                     | 1,10              | 0,791     | 0,330   | 58,28                    |

Tabla 8. Porcentaje de captación del radical DPPH\* empleando Rutina (Fuente: Autor).

Al igual que con el ácido ascórbico se realizó la curva de referencia con la Rutina, siguiendo los datos de la tabla 7, y se realizó la curva de referencia (**Grafica 2**)

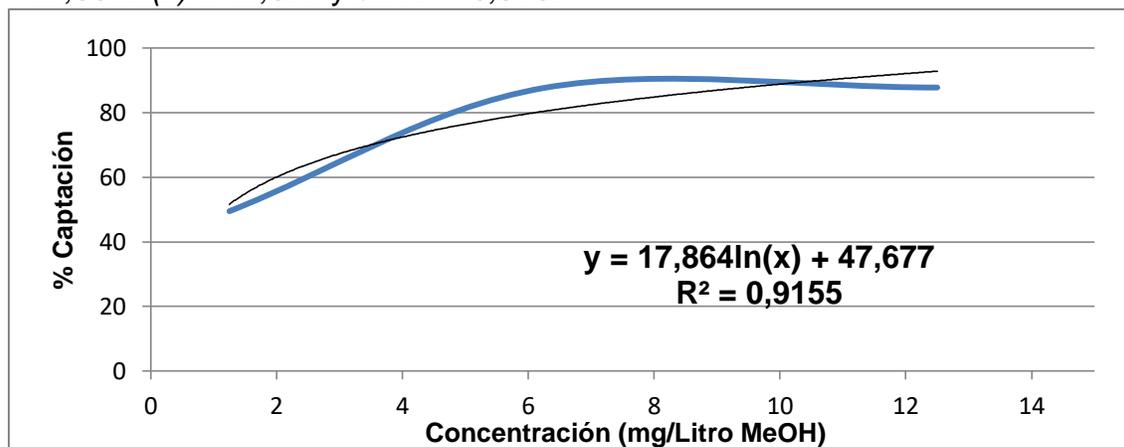
que permite verificar la dependencia lineal del porcentaje de captación del radical Vs la concentración de la rutina en mg/L de metanol, obteniéndose un  $R^2$  de 0,999.

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

El coeficiente de Inhibición ( $IC_{50}$ ) se calcula con la ecuación de la recta, la cual se obtiene de la curva de referencia de cada patrón analizado (ácido ascórbico y Rutina) para el método de decoloración del radical DPPH\*. Para el método de decoloración del radical ABTS\*\* se utilizaron ácido ascórbico, rutina y trolox. Para calcular el  $IC_{50}$  se sustituye ( $y$ ) por 50, y así calculamos la concentración, o mediante un análisis de regresión del porcentaje de captación de DPPH\* o porcentaje de inhibición del radical ABTS\*\*, versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical DPPH\*, o ABTS\*\* (Brand-Williams et al. 1995).

#### 7.1.2.1 $IC_{50}$ Ácido ascórbico

Según la gráfica 1 la curva de referencia del ácido ascórbico da una ecuación:  $y = 17,864 \ln(x) + 47,677$  y un  $R^2 = 0,916$ .

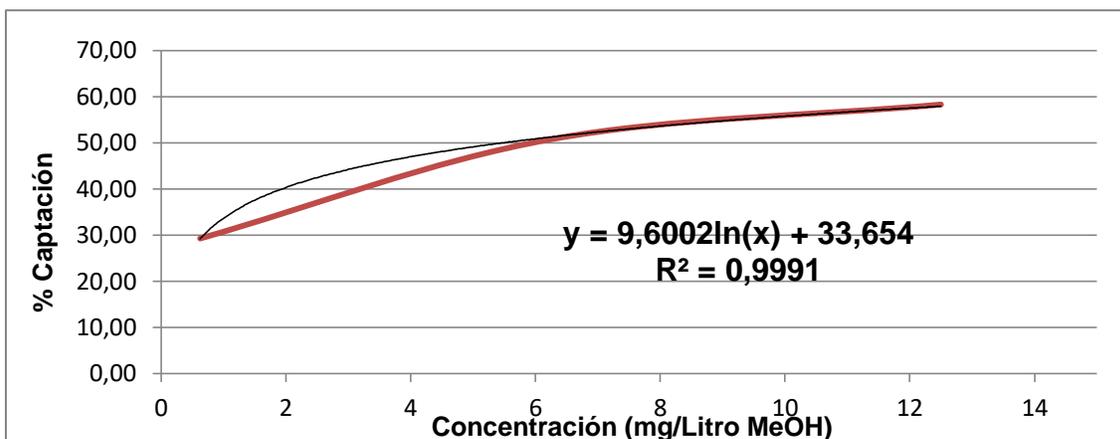


Gráfica 1. Curva de referencia del porcentaje de captación de DPPH\* v/s concentración de ácido ascórbico. (Fuente: Autor).

$e^x = \frac{50-47,677}{17,864}$  Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado obtenido para el ácido ascórbico es de 1.13 mg/L de metanol.

#### 7.1.2.2 $IC_{50}$ RUTINA

La curva de referencia de la rutina (**Gráfica 2**), da una ecuación:  $y = 9,6002 \ln x - 33,654$  y un  $R^2 = 0,999$ .



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

$e^x = \frac{50-33,654}{9,6002}$  Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado obtenido para obtener la concentración de rutina es: 5,88 mg/L de metanol.

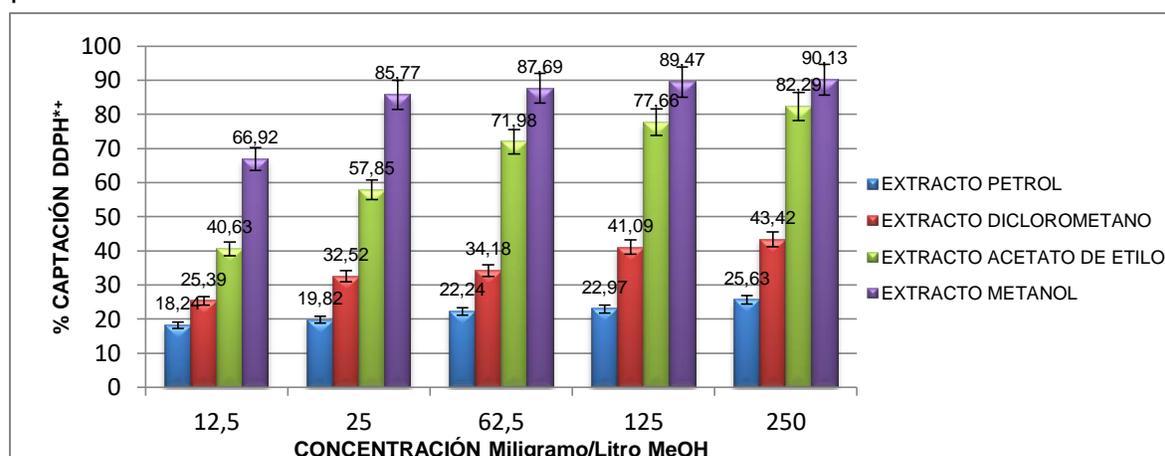
### 7.1.3 Actividad antioxidante de los extractos de hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd.

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

| Concentración mg/ L MeOH | Extracto Petrol |                | Extracto Diclorometano |                | Extracto Acetato de Etilo |                | Extracto Etanol |                |
|--------------------------|-----------------|----------------|------------------------|----------------|---------------------------|----------------|-----------------|----------------|
|                          | % captación     | Error relativo | % captación            | Error relativo | % captación               | Error relativo | % captación     | Error relativo |
| 12,5                     | 18,24           | +/- 0,072      | 25,39                  | +/- 0,098      | 40,63                     | +/- 0,161      | 66,92           | +/- 0,261      |
| 25                       | 19,82           | +/- 0,079      | 32,52                  | +/- 0,123      | 57,85                     | +/- 0,229      | 85,77           | +/- 0,335      |
| 62,5                     | 22,24           | +/- 0,089      | 34,18                  | +/- 0,134      | 71,98                     | +/- 0,287      | 87,69           | +/- 0,342      |
| 125                      | 22,97           | +/- 0,091      | 41,09                  | +/- 0,162      | 77,66                     | +/- 0,306      | 89,41           | +/- 0,351      |
| 250                      | 25,63           | +/- 0,102      | 43,42                  | +/- 0,172      | 82,29                     | +/- 0,328      | 90,13           | +/- 0,352      |

Tabla 9. Porcentaje de Captación de DPPH\* en los extracto de hojas *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd. (Fuente: Autor).

La actividad antioxidante fue evaluada los extractos de hojas *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd, a las concentraciones de 12.5, 25, 62.5, 125 y 250 mg/L de metanol, con la aplicación del método decoloración del radical DPPH\*, observando que en los solventes de mayor polaridad presentan la mejor captación por DPPH\*



Gráfica 3. Comparación del porcentaje de captación del radical DPPH\* de los diferentes extractos de hojas de *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd. (Fuente: Autor).

En los extractos de menor polaridad en ninguna de las concentraciones el porcentaje de captación supera el 50%, por otra parte el extracto total de etanol, en todas las concentraciones supera el 60% de captación de DPPH\*. El extracto acetato de etilo del extracto total acetato de etilo, presenta porcentajes de captación superiores al 50% en las concentraciones de 62.5, 125 y 250 miligramo por litro de metanol, con esto se puede concluir que estos extractos pueden presentar una buena actividad antioxidante.

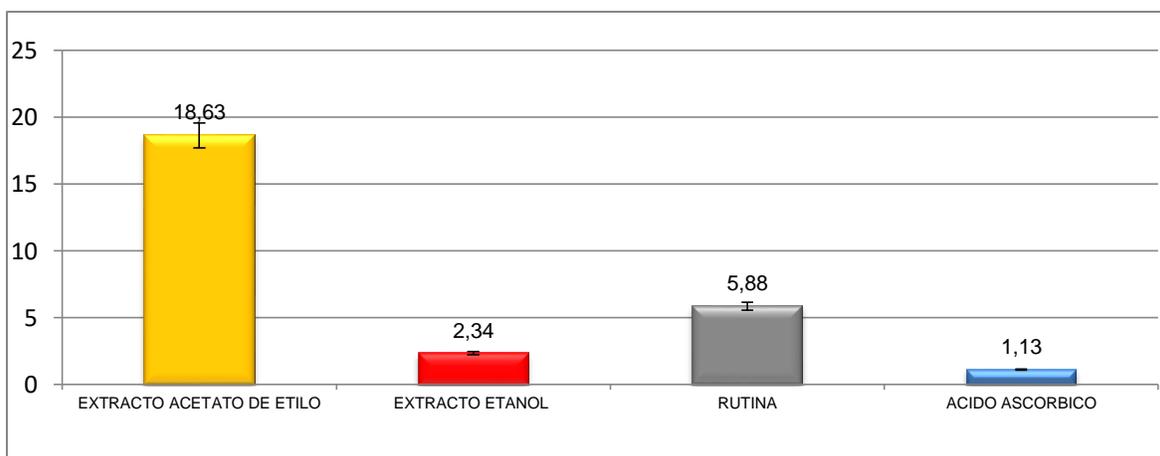
#### 7.1.4 Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC<sub>50</sub>) de extractos de hojas *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd por el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH\*)

Con base en las curvas de concentración vs porcentaje de captación obtenidos de los extractos de hojas *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd, se obtuvieron las ecuaciones de las curvas, las cuales se utilizaron para calcular el IC<sub>50</sub> de cada uno de los mencionados. En la tabla 10 se observa los IC<sub>50</sub> para los extractos evaluados, evidenciándose que los extractos con solventes de mayor polaridad mostraron mejor concentración inhibitoria 50 evidenciándose que el extracto total etanolico presenta mayor IC<sub>50</sub> para este método.

| Extracto                  | IC <sub>50</sub> (mg / L MeOH) |
|---------------------------|--------------------------------|
| Extracto Acetato de etilo | 18,63                          |
| Extracto Etanol           | 2,34                           |

Tabla 10. IC<sub>50</sub> de extractos de hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).

Se comparó los resultados obtenidos con el IC<sub>50</sub> del ácido ascórbico (1.13 mg/Lde MeOH) y la Rutina (5.88 mg/Lde MeOH), observándose que el extracto etanolico de hojas *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, presento mejor concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>) para este método en 2.34 mg/Lde MeOH. El extracto acetato de etilo presenta el IC<sub>50</sub> mas alto para el extracto activas 18.63 mg/Lde MeOH



Gráfica 4. Comparación IC<sub>50</sub> de extractos de hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).

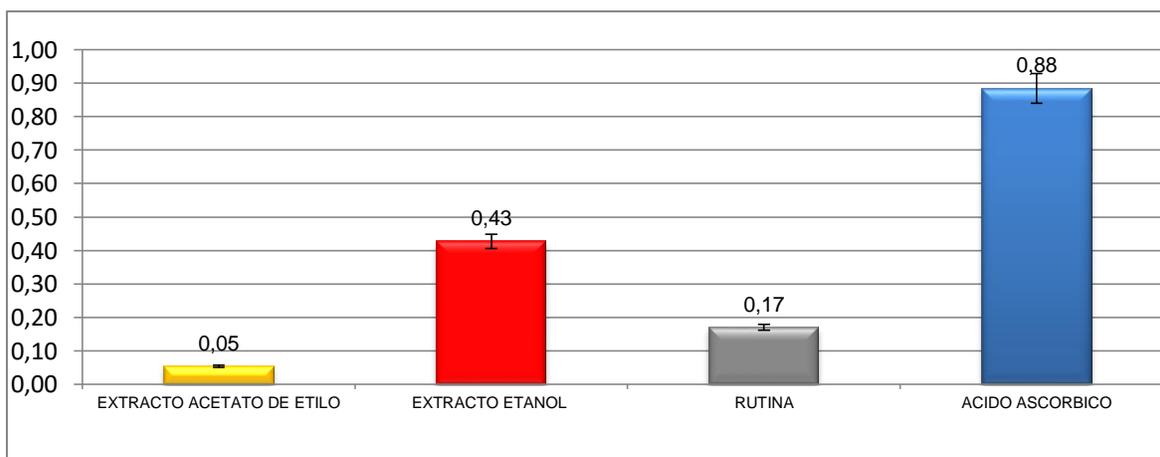
### 7.1.5 Capacidad antioxidante de extractos de hojas *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, por el ensayo de DPPH\*

La capacidad antioxidante significa la captación que tiene un miligramo de antioxidante para atrapar radicales libres en un litro de metanol, para este ensayo se evidencia que la mayor capacidad antioxidante la presenta el extracto etanolico con 0.43 mg/Lde metanol, la capacidad antioxidante comparada con la del ácido ascórbico es un 48.87% menor, pero es mejor que la de la Rutina en un 40%.

| Extracto                  | Capacidad antioxidante (mg / L MeOH) |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Extracto Acetato de etilo | 0,05                                 |
| Extracto Etanol           | 0,43                                 |
| Acido Ascorbico           | 0,88                                 |
| Rutina                    | 0,17                                 |

Tabla 11. Capacidad antioxidante de extractos de hojas de *D. phylloides* (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor)

En la gráfica 6. Se evidencia que el extracto de etanol tiene una buena capacidad antioxidante respecto a la Rutina. Los extractos acetato de etilo y etanolico la capacidad antioxidante no varía mucho.



Gráfica 5. Capacidad antioxidante de extractos de hojas de *Diplostephium phylloides* (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).

### 7.1.6 Actividad antioxidante relativa (AAR)

La actividad antioxidante relativa (AAR), de extractos de hojas de *Diplostephium phylloides* (Kunth) Wedd, para el método de decoloración del radical DPPH\*, se calculó con la ecuación 4.

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

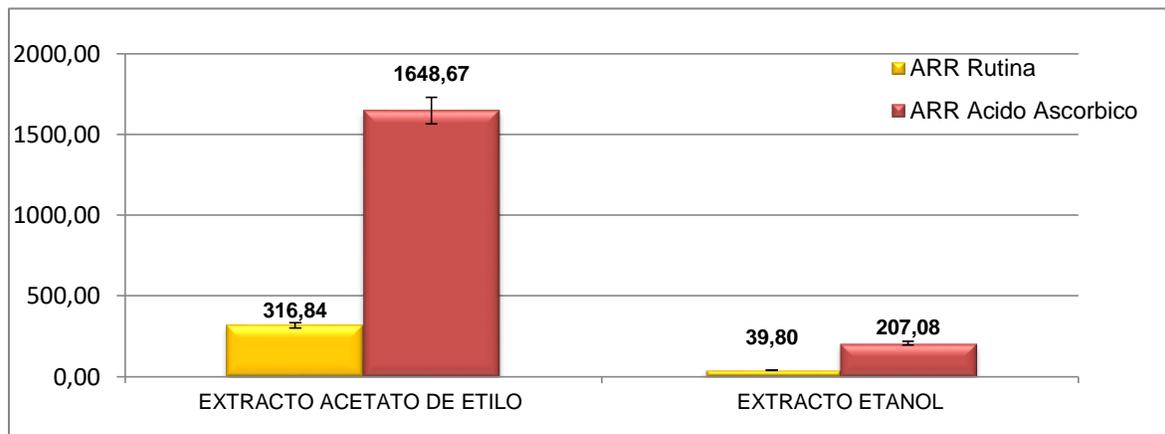
El AAR, muestra el comportamiento de los extractos analizados comparados con los patrones usados, los resultados son obtenidos en actividad antioxidante relativa. Estos resultados aunque diferentes para cada uno de los patrones, muestran el mismo orden de resultados (**Tabla 12**). El extracto etanolico presentó

un 207.08 AAR comparado con el ácido ascórbico y 39.80 de AAR con la Rutina, siendo el extracto etanol el que presenta mejor actividad relativa, seguido por el extracto acetato de etilo con 1648.67 de AAR para el ácido ascórbico y 316.84 AAR para la Rutina.

La actividad antioxidante relativa entre mayor sea el valor menor es la capacidad antioxidante en concentración de mg/L de metanol

| Extracto                  | AAR<br>Ácido Ascórbico | AAR<br>Rutina |
|---------------------------|------------------------|---------------|
| Extracto Acetato de etilo | 1648.67                | 316.84        |
| Extracto Etanol           | 207.08                 | 39.80         |

Tabla 12. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos de hojas de *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd calculados por el método de decoloración del radical DPPH\*. (Fuente: Autor).



Gráfica 6. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos de *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd, calculados por el ensayo de DPPH\*. (Fuente: Autor).

En la gráfica 6. Se observa que por el ensayo de decoloración DPPH\*, hay mayor actividad antioxidante relativa con respecto a la rutina verificando que a mayor valor menor capacidad de atrapar radicales libres.

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

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

### 7.2.1 Preparación de la curva de referencia

Para realizar las curvas de referencia se prepararon soluciones de Trolox, ácido ascórbico y rutina, en concentraciones de 0,625 a 25 mg/L de metanol y se realizó la medición del porcentaje de captación empleando la ecuación 2.

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

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

Partiendo de los datos obtenidos del porcentaje de captación del radical catiónico Acido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>), se construyó una curva de referencia (**Grafica 8**) que permite verificar la dependencia lineal del porcentaje de captación del radical ABTS<sup>•+</sup> Vs la concentración del trolox, obteniéndose un R<sup>2</sup> de 0,968, el cual nos permite calcular el porcentaje de concentración efectiva 50 (IC<sub>50</sub>) por medio de la ecuación de la gráfica 8.

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

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

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

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

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

Al igual que con el trolox y ácido ascórbico se realizó la curva de referencia con la rutina, partiendo de los datos de la tabla 15, y se realizó la curva de referencia

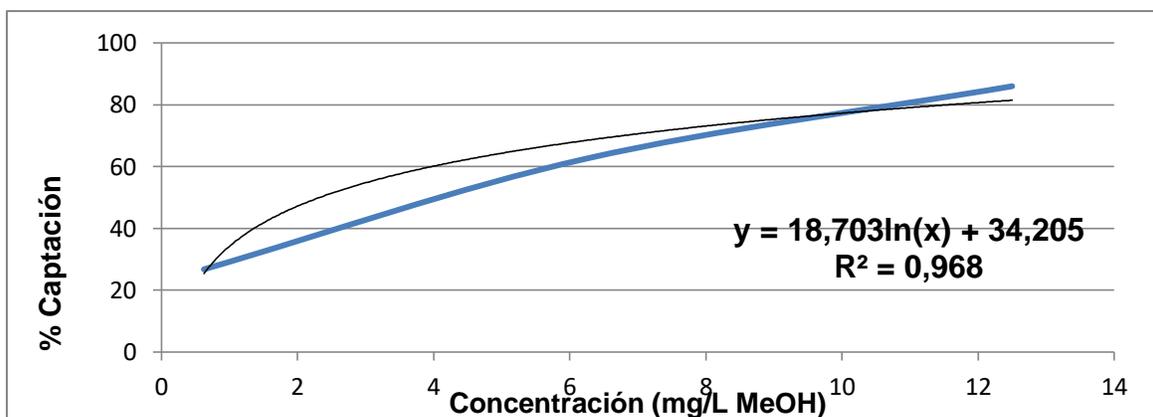
(**Grafica 9**) que permite verificar el porcentaje de captación del radical ABTS<sup>+</sup> Vs la concentración de la Rutina obteniéndose un  $R^2$  de 0,9477.

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

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

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

Partiendo de los datos obtenidos de la captación del radical ABTS<sup>+</sup> causado por el trolox, se construyó la curva de referencia (**Grafica 8**) que permite verificar la dependencia lineal del porcentaje (%) de captación contra concentración de trolox obteniéndose un  $R^2$  de 0,968. La curva de referencia de trolox da una ecuación de recta  $y = 18,703 \ln x + 34,205$ .



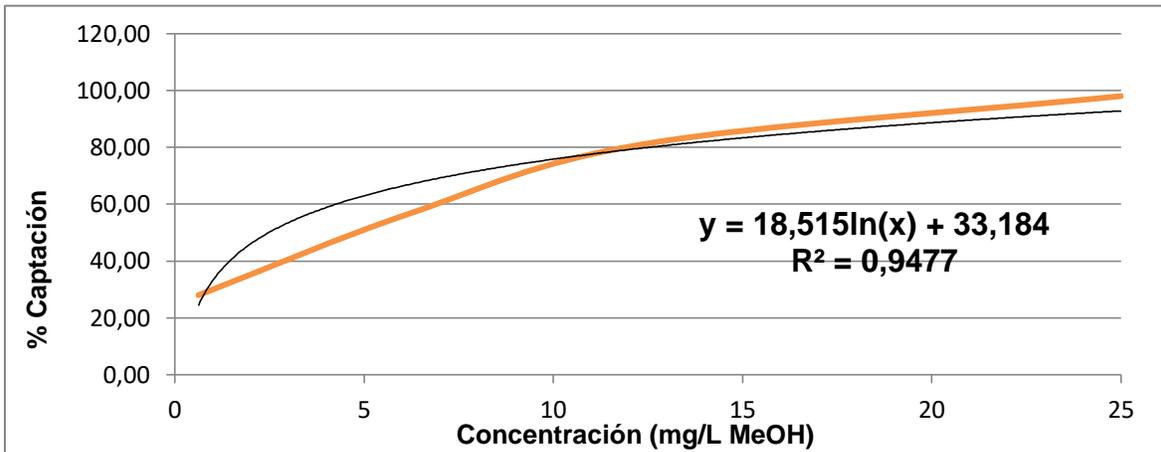
Gráfica 7. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS<sup>+</sup> v/s concentración de Trolox. (Fuente: Autor).

$\frac{50 - 34.205}{18.703} = e^x$  Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado para el IC<sub>50</sub> del trolox es de 2.32 mg/L de metanol.

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

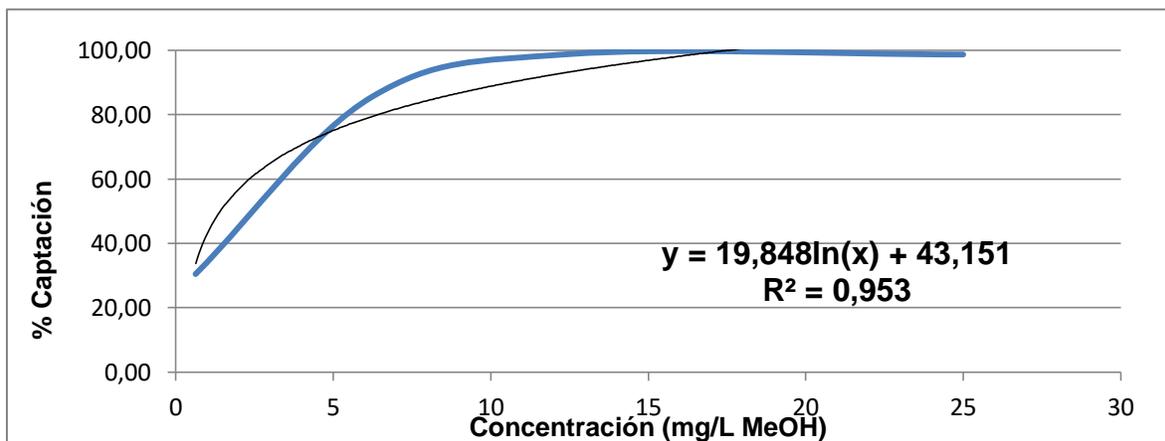
Según la gráfica 9, la curva de referencia de la rutina da la ecuación de la recta:  $y = 18,515 \ln x + 33,184$ , y un  $R^2$  de 0,9477.

$\frac{50 - 33.184}{18.515} = e^x$  Obteniendo un IC<sub>50</sub> de 2.48 miligramos de rutina por litro de metanol.



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

Cómo se ha venido calculando el IC<sub>50</sub> para los patrones, el del ácido ascórbico se obtuvo en base a la ecuación de la recta, de la gráfica 10.  $y = 19,848 \ln x + 43,151$  y un  $R^2: 0,953$



En la grafica anterior se observa el comportamiento del ácido ascórbico,  $\frac{50 - 43.151}{19.848} = e^x$  Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado obtenido de la concentración de ácido ascórbico es de 1,41 mg/Lde metanol.

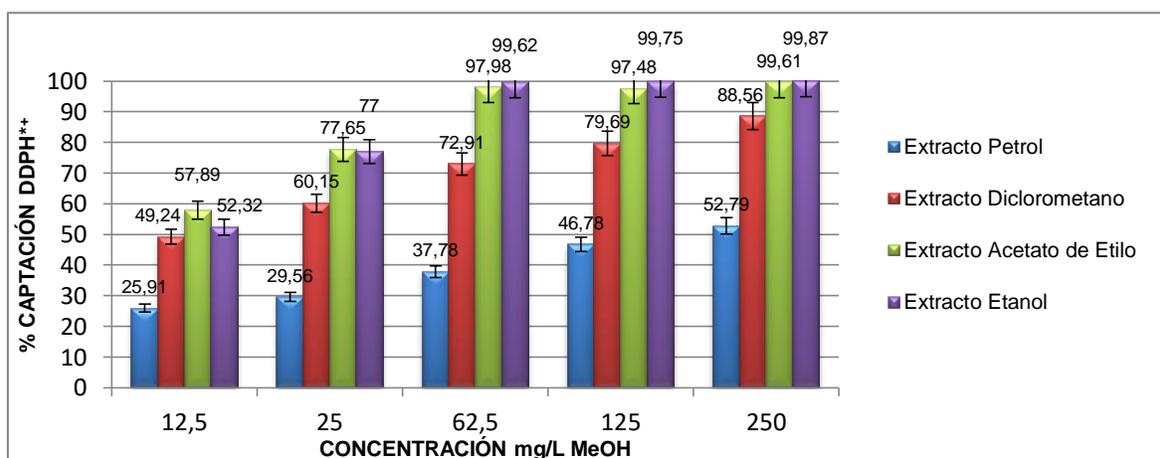
### 7.2.3 Actividad antioxidante de los extractos de hojas de *D. phyllicoides* (Kunth) Wedd

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

| Concentración mg/ L MeOH | Extracto Petrol |                | Extracto Diclorometano |                | Extracto Acetato de Etilo |                | Extracto Etanol |                |
|--------------------------|-----------------|----------------|------------------------|----------------|---------------------------|----------------|-----------------|----------------|
|                          | % captación     | Error relativo | % captación            | Error relativo | % captación               | Error relativo | % captación     | Error relativo |
| 12,5                     | 25,91           | +/- 0,095      | 49,24                  | +/- 0,196      | 57,89                     | +/- 0,231      | 52,32           | +/- 0,202      |
| 25                       | 29,56           | +/- 0,115      | 60,15                  | +/- 0,204      | 77,65                     | +/- 0,307      | 77,00           | +/- 0,298      |
| 62,5                     | 37,78           | +/- 0,181      | 72,91                  | +/- 0,318      | 97,98                     | +/- 0,390      | 99,62           | +/- 0,397      |
| 125                      | 46,18           | +/- 0,181      | 79,69                  | +/- 0,318      | 97,48                     | +/- 0,388      | 99,75           | +/- 0,396      |
| 250                      | 52,79           | +/- 0,208      | 88,56                  | +/- 0,352      | 99,61                     | +/- 0,391      | 99,87           | +/- 0,393      |

Tabla 16. Porcentaje de Captación de ABTS\*\* los extractos de hojas *D. phyllicoides* (Kunth) Wedd. (Fuente: Autor).

El extracto petrol presento menor actividad con respecto otras los extractos mas polares de hojas de *D. phyllicoides* (Kunth) Wedd, por el método de ABTS\*\* se nota mayor sensibilidad, en los solventes de mayor polaridad el porcentaje de captación supera el 53% en las concentraciones de 125 y 250 miligramos de extracto por litro de metanol. (Tabla 16).



Gráfica 10. Comparación de los extractos de hojas de *D. phyllicoides* (Kunth) Wedd, por el método decoloración del radical ABTS\*\*. (Fuente: Autor).

En la grafica anterior Se evidencia que a la concentración de 250 mg/Lde MeOH la el extracto etanólico presentan un porcentaje de captación de ABTS<sup>•+</sup> mayor al 99%. El extracto petrol a una concentración de 250ppm, solo alcanza a superar el 53% de captación, lo que sugiere actividad antioxidante baja a esta concentración.

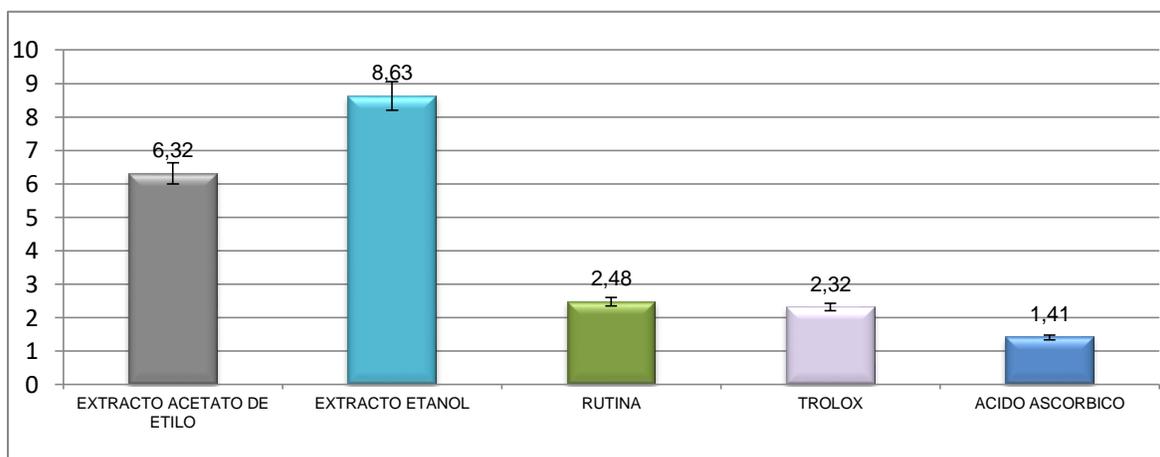
#### 7.2.4 Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC<sub>50</sub>) de extractos de hojas *D. phylloides* (Kunth) Wedd, por el método de ABTS<sup>•+</sup>

Los resultados se compararon con los patrones usados para el método de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>, el ácido ascórbico (1.41 mg/LMeOH), rutina (2.48 mg/LMeOH) y trolox (2.32 mg/LMeOH), obteniéndose resultados que tienen mayor IC<sub>50</sub> que el los patrones, concluyendo que la actividad antioxidante es baja en relación al ácido ascórbico, rutina y trolox.

| Extracto                  | IC <sub>50</sub> (mg / L MeOH) |
|---------------------------|--------------------------------|
| Extracto Acetato de etilo | 6.32                           |
| Extracto Etanol           | 8.63                           |

Tabla 17. IC<sub>50</sub> de extractos de hojas *D. phylloides* (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor).

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



Gráfica 11. Comparación IC<sub>50</sub> de extractos de hojas de *D. phylloides* (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor).

En la anterior grafica se observa que por este ensayo los extracto evaluados presentan una capacidad antioxidante baja respecto al acido ascorbico,trolox y rutina..

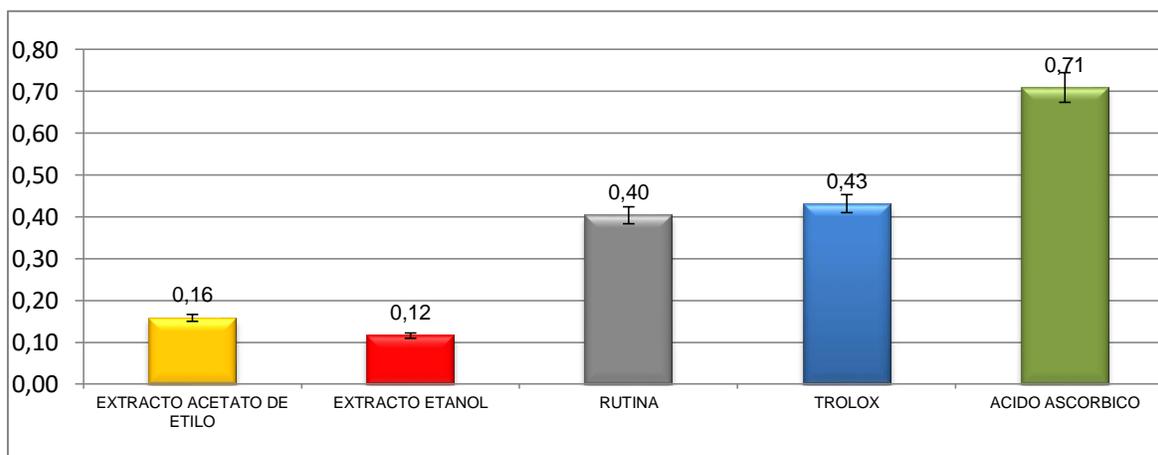
### 7.2.5 Capacidad antioxidante de extractos de hojas *D. phyllicoides (Kunth) Wedd*, por el ensayo ABTS\*\*.

La capacidad antioxidante por este método es baja comparada con los patrones para todas las muestras evaluadas, el extracto acetato de etilo presenta un valor de 0.16 mg/L de metanol, comparada con el ácido ascórbico que alcanza un 0.65 mg/L.

| Extracto                  | Capacidad antioxidante (mg / L MeOH) |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Extracto Acetato de etilo | 0,16                                 |
| Extracto Etanol           | 0,12                                 |

Tabla 18. Capacidad antioxidante de extractos de hojas de *D. phyllicoides (Kunth) Wedd*, calculados por el método de decoloración del radical ABTS\*\*. (Fuente: Autor).

En la grafica 12. Se observa la comparación de la capacidad antioxidante de los extractos activos por este metodo, se evidencia que los patrones captan mas radicales libres en un gramos de muestra. Los extractos solo alcanza a captar 0.12 y 0.16 miligramo por litro de metanol de radicales libres.



Gráfica 12. Capacidad antioxidante de los extractos de hojas de *D. phyllicoides (Kunth) Wedd*, calculados por el método de decoloración del radical ABTS. (Fuente: Autor).

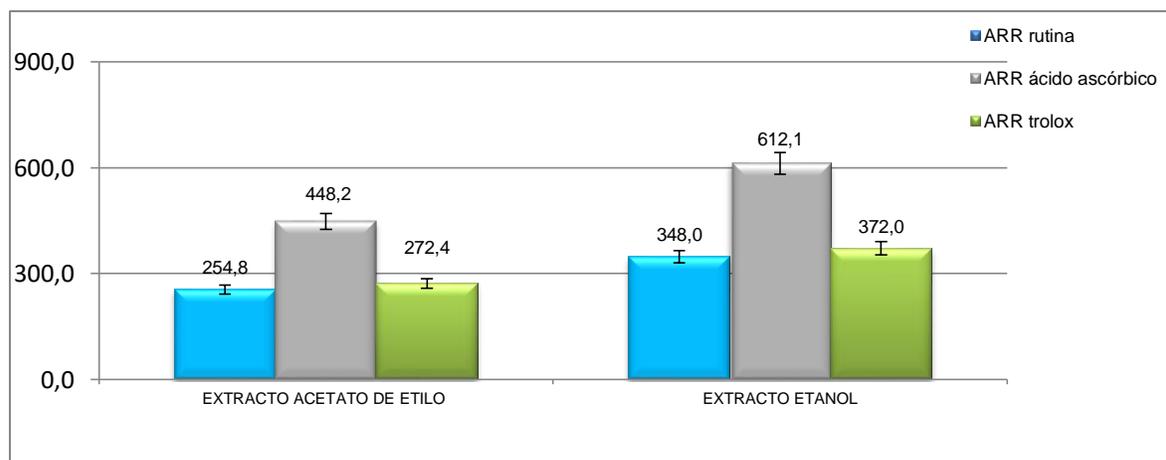
### 7.2.6 Actividad antioxidante relativa (AAR).

La actividad antioxidante relativa de los extractos de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, por el ensayo de ABTS<sup>•+</sup>, se calculó con la ecuación 3. El extracto que presento menor porcentaje de Actividad Antioxidante Relativa (AAR) fue la del extracto acetato de etilo con 272,4 de AAR con respecto al trolox, 254,8 AAR con respecto a la rutina, y 448,2 AAR con respecto al acido ascórbico, esto indica que para este ensayo de ABTS<sup>•+</sup> las muestras evaluadas presentan una capacidad antioxidante baja, ya que los valores comparados con las muestras control son mas altos. (Tabla 19)

| Extracto                  | AAR ácido ascórbico | AAR rutina | AAR trolox |
|---------------------------|---------------------|------------|------------|
| Extracto acetato de etilo | 448,2               | 254,8      | 272,4      |
| Extracto etanol           | 612,1               | 348,0      | 372,0      |

Tabla 19. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos de hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por el método de decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor).

En la gráfica 15 se observa que la actividad antioxidante relativa para los extractos de hojas *D. phyllicoides* (Kunth) Wedd por el ensayo de ABTS<sup>•+</sup> los resultados comparados con la rutina son más bajos con respecto a las otras dos muestras control. El AAR de una sustancia a menor valor presenta mayor capacidad antioxidante.



Gráfica 13. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos de hojas de *D. phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por el ensayo de ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor).

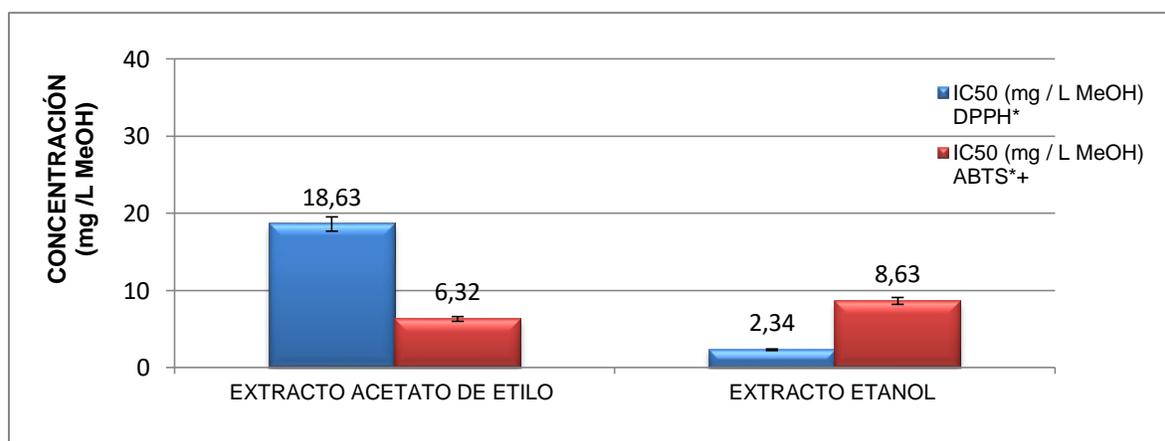
### 7.3 Comparación del IC<sub>50</sub> de extractos de hojas de *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd., calculados por los métodos de DPPH\* y ABTS\*\*

Se determinó la concentración media inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de la actividad antioxidante mediante por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\* (Tabla 22) de los extractos de hojas *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd, para el extracto acetato de etilo se encontró el mayor valor de IC<sub>50</sub>. Por el método de DPPH\* el extracto total de etanol presenta el menor valor con un IC<sub>50</sub> de 2.34 mg/L de metanol, siendo el extracto mas activa.

| Extracto                        | IC <sub>50</sub> (mg / L MeOH) DPPH* | IC <sub>50</sub> (mg / L MeOH) ABTS** |
|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Extracto acetato de etilo etilo | 18,63                                | 6.32                                  |
| Extracto etanol                 | 2.34                                 | 8.63                                  |

Tabla 20. Comparación IC<sub>50</sub> en extractos de hojas de *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por los métodos de decoloración del radical DPPH\* y decoloración del radical ABTS\*\*. (Fuente: Autor).

Por el metodo de ABTS\*\* se obtuvieron resultados diferentes, en este método se presenta mayor sensibilidad ya que lo valores de IC<sub>50</sub> son mas bajos comparados con los del ensayo de DPPH\*, presentando.



Gráfica 14. Comparación IC<sub>50</sub> de extractos de hojas de *D. phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por los métodos DPPH\* y ABTS\*\*. (Fuente: Autor).

En la gráfica 14 se observa que en mayor parte los IC<sub>50</sub> calculados por el método DPPH\* las concentraciones son mayores que los calculados por el ensayo de ABTS\*\*. Siendo el ensayo ABTS\*\* más sensible. Evidenciándose que el extracto

de etanol por el ensayo DPPH\* tiene el IC<sub>50</sub> más bajo, concluyendo que muestra evaluada presenta mejor actividad antioxidante por ambos métodos.

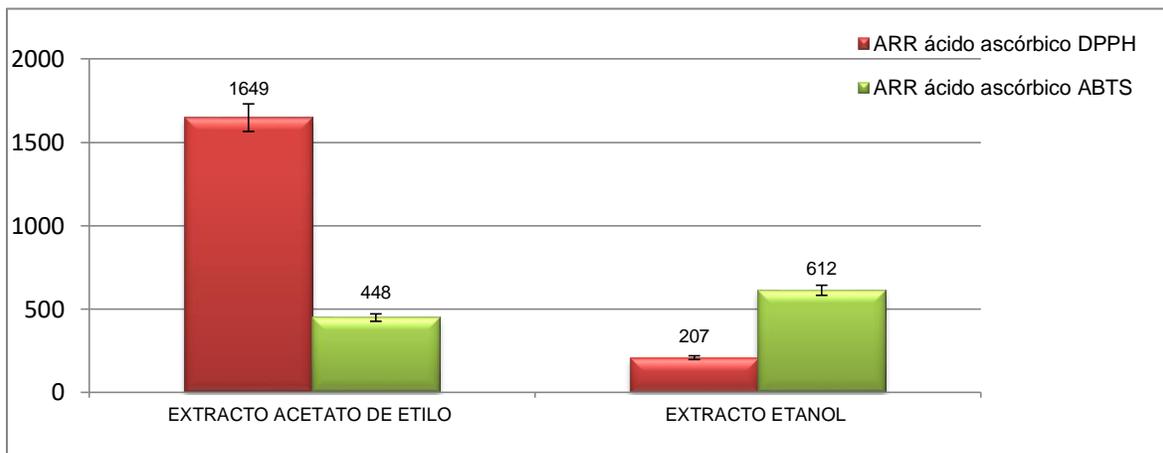
#### 7.4 Comparación de la actividad antioxidante relativa (AAR) de extractos de hojas de *D. phylloides* (Kunth) Wedd, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\* comparadas con el ácido ascórbico

Los porcentajes de actividad antioxidante relativa (AAR) evaluados con respecto al ácido ascórbico se relacionan en la tabla 23. Se evidencia que para el extracto etanolico determinado por el método de DDPH\* la capacidad antioxidante es mas alta.

| Extracto                  | AAR acido ascorbico DPPH* | AAR acido ascorbico ABTS** |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Extracto Acetato de etilo | 1648,67                   | 448,2                      |
| Extracto Etanol           | 207,08                    | 612,1                      |

Tabla 21. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos de hojas de *D. phylloides* (Kunth) Wedd, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\* con respecto al ácido ascórbico. (Fuente: Autor).

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



Gráfica 15. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos de hojas de *D. phylloides* (Kunth) Wedd, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\* con respecto al ácido ascórbico. (Fuente: Autor).

En la gráfica 15. Se observa que por el ensayo de DPPH\* el extracto total de etanol tiene el mejor comportamiento con respecto a las otras muestras

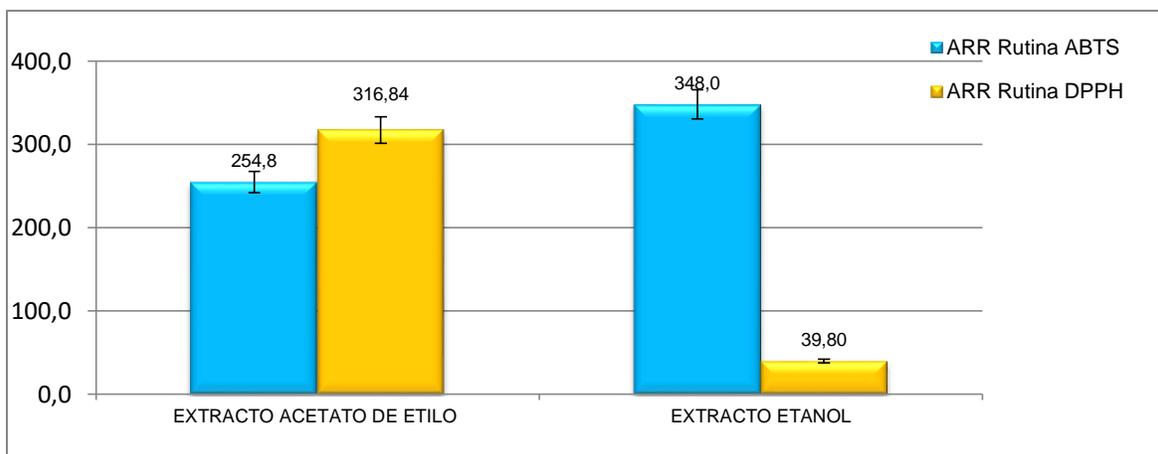
evaluadas, traduciendo en una actividad antioxidante excelente con respecto a las otras muestras evaluadas.

### 7.5 Comparación de la actividad antioxidante relativa (AAR) de extractos de hojas de *Diplosteghium phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por los ensayos de radical DPPH\* y de ABTS\*\* comparadas con la rutina

Los datos de la actividad antioxidante realtiva (AAR) evaluadas y comparadas con la rutina por ambos metodos, en ella podemos concluir que el extracto etilico presenta el menor valor de antioxidante relativa, ya que el valor por el ensayo DPPH\* es 39,80, por el ensayo de ABTS\*\* la muestra con menor valor pero mejor actividas antioxidante relativa es el extracto acetato de etilo con un valor de 254,8 AAR, concluyendo que estos extractos poseen una capacidad antioxidante buena respecto a las otras muestras.

| Extracto                  | AAR rutina DPPH* | AAR rutina ABTS** |
|---------------------------|------------------|-------------------|
| Extracto acetato de etilo | 316,84           | 254,8             |
| Extracto etanol           | 39,80            | 348,0             |

Tabla 22. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos de hojas de *Diplosteghium phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\*



Gráfica 16. Comparación de la Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de extractos de hojas de *D. phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS\*\* con respecto a la Rutina. (Fuente: Autor).

En la grafica 18. Se evidencia que el extracto de etanol presenta el mejor comportamiento con un porcentaje de AAR de 39,80 por el ensayo de DPPH\* traduciéndose como el extracto con mayor capacidad antioxidante. AAR por el ensayo de DPPH\* se observa que es mas sensible, esto por que se evidencia en

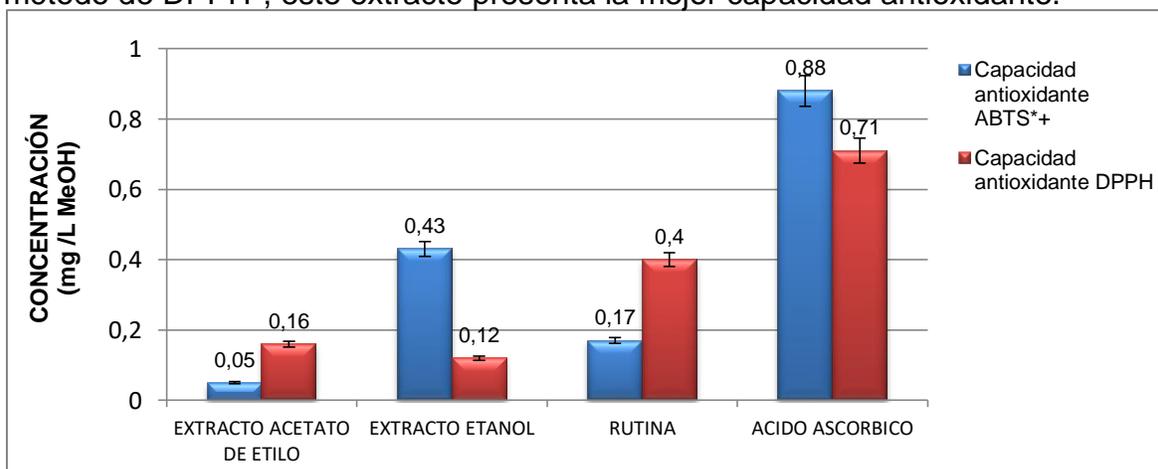
la grafica que en el porcentaje de las muestras evaluadas es mayor la actividad antioxidante comparada con el ensayo de ABTS<sup>++</sup> Con la grafica concluimos que el ensayo de DPPH\* es mas sensible que el método de ABTS<sup>++</sup>

### 7.6 Comparación de la capacidad antioxidante de extractos de hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS<sup>++</sup>

| Extracto                  | Capacidad antioxidante DPPH* | Capacidad antioxidante ABTS <sup>++</sup> |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|
| Extracto acetato de etilo | 0,05                         | 0,10                                      |
| Extracto etanol           | 0,43                         | 0,12                                      |

Tabla 23. Comparación de la capacidad Actividad Antioxidante de extractos de hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS<sup>++</sup>

La comparación de la capacidad antioxidante evaluada por ambos métodos concluye que el extracto total de etanol por el método de DPPH\* presenta la mayor captación de radicales libres por miligramo de sustancia en un litro de metanol con un 0,43, esta capacidad es mayor evaluada frente a Rutina por el método de DPPH\*, este extracto presenta la mejor capacidad antioxidante.



Grafica 17. Comparación de la capacidad Actividad Antioxidante de extractos de hojas de *D. phyllicoides* (Kunth) Wedd, calculados por los ensayos DPPH\* y ABTS<sup>++</sup>. (Fuente: Autor).

En la anterior grafica se observa que la mayor capacidad antioxidante para las muestras de la investigación de los extractos de hojas de la especie vegetal *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd corresponde a el extracto acetato de etilo por el método de DPPH\*, para el extractos totales de etanol la capacidad antioxidante es mayor por el ensayo de ABTS<sup>++</sup>.

## CONCLUSIONES

Los extractos con los solventes de mayor polaridad de las hojas de *Diplostephium phyllicoides (Kunth) Wedd*, presentan actividad antioxidante, el extracto etanolico es la mas activa con  $IC_{50}$  2,34 mg/L MeOH, el extracto en AcOEt tiene  $IC_{50}$  18,63 mg/L MeOH, estos valores fueron calculados por el ensayo de DPPH\*.

Por el ensayo de DPPH\*, el extracto en etanol de las hojas de *Diplostephium phyllicoides (Kunth) Wedd* tiene actividad antioxidante mayor que la rutina, esto lo calculamos por el resultado de la capacidad antioxidante, esta muestra no supera la actividad antioxidante del acido ascórbico.

Los extractos polares de las hojas de *Diplostephium phyllicoides (Kunth) Wedd*, tienen actividad antioxidante, el extracto etanolico con  $IC_{50}$  8,63 mg/L, el extracto AcOEt tiene  $IC_{50}$  6,32 mg/L, estos valores obtenidos por e ensayo de ABTS\*\*.

El extracto de etanol presenta el mejor comportamiento con un porcentaje de AAR de 39,80 comparado con el patrón rutina por el ensayo de DPPH\* traduciéndose como el extracto con mayor capacidad antioxidante. AAR por el ensayo de DPPH\* se observa que es mas sensible, debido a que en porcentaje de las muestras evaluadas es mayor la actividad antioxidante comparada con el ensayo de ABTS\*\*.

Los extractos con solventes de baja polaridad (Éter de petróleo y diclorometano) de hojas *Diplostephium phyllicoides (Kunth) Wedd*, no presentan actividad antioxidante al evaluarse por los ensayos de DPPH\* y ABTS\*\*.

Los resultados obtenidos por los métodos de DPPH\* y ABTS\*\* de hojas *Diplostephium phyllicoides (Kunth) Wedd*, cuantifican todas las moléculas antioxidantes presentes. Los extractos que presentan mejor actividad antioxidante son extractos Etanol y AcOEt la diferencia de los resultados de los dos métodos se encuentra en la solubilidad donde DPPH\* es soluble en medio polar antioxidantes hidrofílicos y ABTS\*\* presenta solubilidad en medio polar y apolar evaluando antioxidantes hidrofílicos y liposolubles

## RECOMENDACIONES

La implementación de métodos de actividad antioxidante vía atrapamiento de radicales usando la técnica de espectrometría molecular ultravioleta-visible es una alternativa rápida, viable y económica para realizar estudios biodirigidos de extractos totales y compuestos activos de plantas promisorias donde su aplicación se oriente hacia la industria de alimentos, farmacéutica, cosmética, polímeros y combustibles, entre otras.

Los resultados de AAR muestran que la especie *Diplosteghium phyllicoides* (Kunth) Wedd es un planta promisorio en principios activos, por ello es importante evaluar otro tipo de actividades como antibacterial, antifúngica, citotóxica, entre otras.

Purificar los compuestos del extracto etanolico y extracto acetato de etilo; y posteriormente realizar caracterización mediante la obtención de derivados tiometilados usando GC-EM, RMN-1H y RMN-13C, para ubicar la posición de los dobles enlaces de los Flavonoides.

Implementar la técnica de Voltametría Cíclica (Voltamperometría) como medida de la actividad antioxidante, puesto que los métodos electroquímicos ofrecen mayor sensibilidad.

## BIBLIOGRAFÍA

Ávila Liliana, Baquero Eduard, Viña Amparo Y Murillo Elizabeth – 2006. VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA ISSN 0121-4004 Volumen 13 número 1, Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia. págs. 55-60

Ahmad, S. 1985. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Ed. Chapman & Hall, New York, USA, 457 p.

A. Urzúa, L. Andrade, E. Muñoz, M. E. Rodriguez and E. Belmonte, 1997. Biochem. Syst. Ecol., 25, 681.

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

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

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

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

Aviram, M. 2000. [Review](#) of Human Studies on Oxidative Damage and Antioxidant Protection Related to Cardiovascular Diseases. *Free Radic. Res.* 33 Suppl: S85–97

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

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

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

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

Bye, R., E. Estrada L., and E. Linares. 1992. Recursos genéticos en plantas medicinales de México. *In: Plantas medicinales de México, introducción a su estudio*. 4ª edición. Estrada L., E. (ed). Universidad Autónoma Chapingo, México pp. 362–370.

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

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

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

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

Castro Dantas, T.N.; Dantas, M.S.G.; Dantas Neto, A.A.; D'ornellas, C.V. and Queiroz; L.R. 2003. Novel Antioxidants from Cashew Nut Shell Liquid Applied to Gasoline Stabilization. *Fuel* 82, 1465–1469.

Cela, R.; Lorenzo, R. A. y Casais, M.C. 2002. Técnicas de Separación en Química Analítica. Editorial Síntesis. Madrid- España. 638 p.

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

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

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

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

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

Diaz, T. and Villanueva, M. 1998. Preliminary Phytochemistry Investigation of the *Anacardium excelsum*: Ethanol Extract. *Natura* (Panamá), 3, 21-23.

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

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

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

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

Drog, W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.

Dugan, L.R. 1980. Natural Antioxidants. In: *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Ed. Plenum Press, New York, USA, p. 281-282.

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

Festy D. (2007). *Oxidantes y antioxidantes: guía práctica*. Ediciones Robinboock. Barcelona. 256 P.

Fridowich, I., 1978. The Biology of Oxygen Radicals. *Science*, 201, p.p. 875-88.

Fogliano, V.; Verde, V.; Randazzo, G. and Ritiene, A., 1999. Method for Measuring Antioxidant Activity and its Application to Monitoring the

- Antioxidant Capacity of Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 47, p.p. 1035-1040.
- Funk, V.A., A. Susanna, T.F. Stuessy & R.J. Bayer (eds.). 2009. Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy. Institute of Botany. University of Vienna. Vienna.
- Halliwell, B., 2000. The Antioxidant Paradox. *The Lancet*, 355, 1179-1180.
- Halliwell, B. and Gutteridge. J.M.C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. United Kingdom. 704 p.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 1841–1856.
- Hernández, J. A. 2011. Caracterización Fitoquímica, Actividad Antibacteriana y Antioxidante de Extractos de Plantas Medicinales.
- Horan, I.; Clotworthy, M.; Fokunang, C.N. and Tomkings, P.T. 2003. The Development of an In Vitro Screening Strategy for Topically Applied Products. *J. Ethnopharmacology*, 89, 81-90.
- Hostettmann, K. 1998. Strategy for the Biological and Chemical Evaluation of Plants. *Pure Appl. Chem.* 70, 1-9.
- Jaitak V., Sharma K., Kalia K., Kumar N., Singh H.P., Kaul V.K., Singh B. 2010. Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western Himalaya. *Journal of Food Composition and Analysis*; 23: 142–147.
- Jimenez, P. Girbes, T. 2013. Metodo del radical DPPH\*. 2,2-DIFENIL -1-Picrylhydrazyl. Determinación de la capacidad antioxidante en extractos de manzana, brocoli y alcachofa. *Nutrición y Bromatología*, facultad de biología. Universidad de Valladolid.
- Katalinic V., Modun D., Music I., Boban M. 2005. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3- thylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & pharmacology*; 140: 47-52.
- King, R.M. and Robinson, H. 1970b. Studies in the Eupatorieae (Compositae). XXV. A new genus Eupatoriadelphus. *Phytologia* 19, 431– 432.

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

Kim, D.O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; and Lee, C.Y. 2002. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals *J. Agric. Food Chem.* 50, 3713-371.

Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Mancini-Filho, J. and Fett, R. 2005. Aplicación de Diversos Métodos Químicos para Determinar Actividad Antioxidante en Pulpa de Frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 25, 726-732

Labrinea, E.P. and Georgiu, C.A. 2004. Stopped-Flow Method for Assessment of pH and Timing Effect on the ABTS Total Antioxidant Capacity Assay. *Anal. Chim. Acta* 526, 63-68.

Luteyn, j.l., and s.p. Churchill, 1999. *Páramos: a checklist of plant diversity, geographical distribution, and botanical literature*, New York Botanical Garden Press New York.

M. Bittner, A. Schuster and S. Jakupovic, 1991. *Phytochemistry*, 30, No. 4, pp. 1329 - 1330.

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

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

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

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

Mattil, H.A. 1947. Antioxidant. *Annu. Rev. Biochem.* 16, 177-192.

Milardovic, S.; Ivekovic, D. and Grabaric, B.S. 2005. A Novel Amperometric Method for Antioxidant Activity Determination Using DPPH Free Radical. *Bioelectrochem.* 68, 180-185.

- Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Dominguez, J.M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Nuñez, M.J. and Parajó, J.C. 2001. [Review](#): Natural Antioxidants from Residual Sources. *Food Chem.* 72, 145-171.
- Mulder A.M., Connellan P.A., Oliver C.J., Morris C.A. 2008. Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males. *Nutrition Research*; 28: 583–589.
- Muñoz Juarez, M. A., Gutierrez D. M. 2012. Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca*. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Ocampo C. Rogelio.; Rios V. L. Amalia.; Betancur L. Adriana y Ocampo S. Diana.. 2008. Curso Práctico de Química Orgánica: enfocado a Biología y Alimentos. Manizales: Universidad de Caldas. p. 61-62.
- Page H., Salmon A., Leiser S., Robb E., Brown M., Milter R., Stuart J. 2009. Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroblast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*; 46: 1109-1118.
- Parcker Lester, Cardenas Enrique. 2002. Handbook of antioxidants. University of southern California. School of pharmacy. California. Second edition.
- Podsędek A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*; 40: 1–11.
- Prior, R.L.; Wu, X. and Schaich, K. 2005. Standardized Methods for Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, p.p. 4290- 4302.
- Re Roberta, Pellegrini Nicoletta, Rteggente Anna, Rannala Ananth, Min Yang, Rice-Livans Catherine. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. International Antioxidant Research Centre, Guy's, King's and St Thomas' School of Biomedical Sciences, Kings College-Guy's Campus, London SE1 9RT, UK. p. 7.
- Ramalho, V.C. and Jorge, N. 2006. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. *Quim. Nova* 29, 755-760.
- Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E. 2008. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters*; 582: 1783–1787.

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

Romo, A. 1996. Importancia de las plantas en la vida del hombre: Usos mágicos y medicinales. En: <http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/menu.htm>. Consultada el 02 de enero de 2008.

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

Sánchez R.M., Mendoza N.V. M. y Vargas, L.A. 1998. Niveles de Antioxidantes Totales en una Muestra de la Población Gerontológica de la Ciudad de México. *Bioquímica* 23, 848-856.

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

Sies, H. 1997. Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidants. *Exp. Physiology*. 82, 291-295.

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

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

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

Tsao, R. and Dengb. Z. 2004. Review: Separation Procedures for Naturally Occurring Antioxidant Phytochemicals. *J. Chromatogr. B.* 812, 85–99.

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

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

Valco, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M. and Telser, J. 2007. Review Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Internat. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84

Valcarcel Casas, M. y Silva Rodriguez. 1984. Teoría y Práctica de la Extracción Líquido-Líquido. Editorial Alambra. México 376 p.

Vargas, O. M. & S. Madriñán 2006. Clave para la identificación de las especies del género *Diplostephium* (Asteraceae, Astereae) en Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 30 (117): 489-494.

Vickers, T. 2007. Antioxidant. *Wikipedia the Free Encyclopedia*. En: [http://en.wikipedia.org/wiki/Main\\_Page](http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page). Consultada el 30 de Junio de 2007.

Wilcox, J. K.; Ash, S. L.; Catignani, G. L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 275-295.

Villano, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Troncoso, A.M. and García-Parilla, M.C. 2004. The Antioxidant Activity of Wines Determined by ABTS<sup>•+</sup> Method: Influence of Simple dilution and Time. *Talanta* 64, 501-509.

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

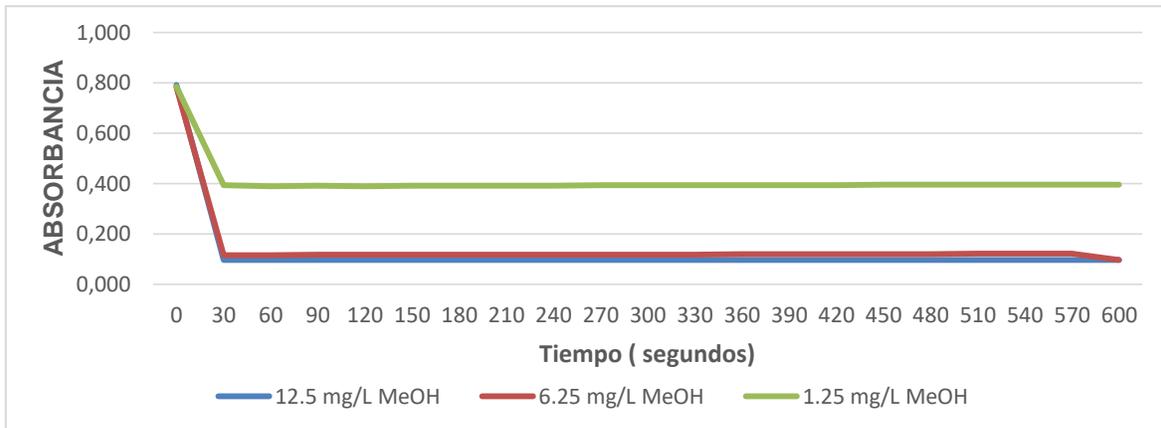
Yu Liangly. 2008. Wheat antioxidants by Liangly Yu. The University of Maryland. Department of nutrition and food science. Wiley – Interscience. New Jersey.

Youngson R. 2003. Antioxidantes y Radicales Libres. Editorial Edaf, S.A. Madrid. España. 171.

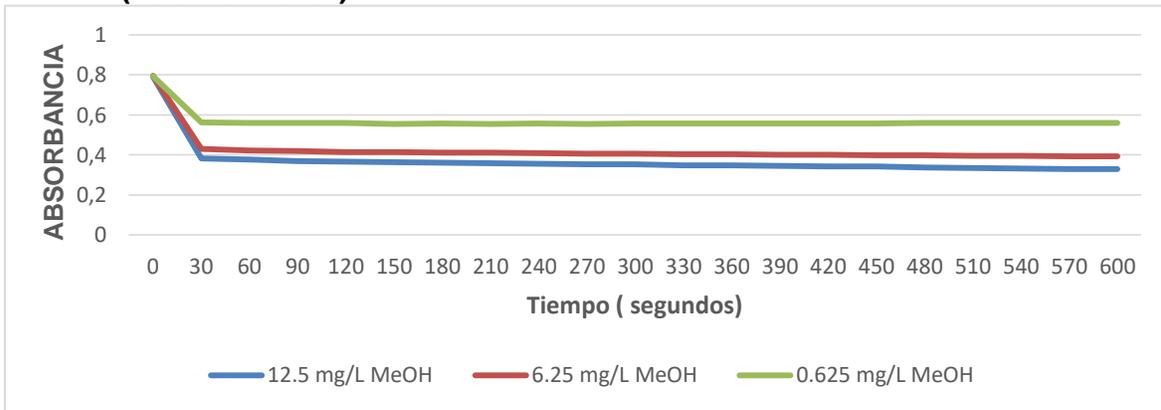
Zuleta A., Esteve M., Frigola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*; 114: 310-316

## ANEXOS

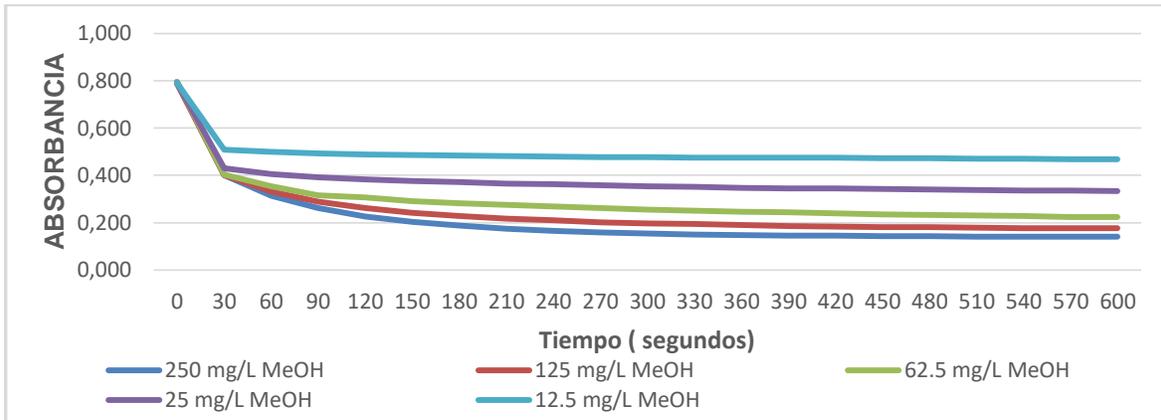
Cinéticas comparativas entre ambos métodos de decoloración de los radicales ABTS\*\* y DPPH\*, realizados para extractos de hojas *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd



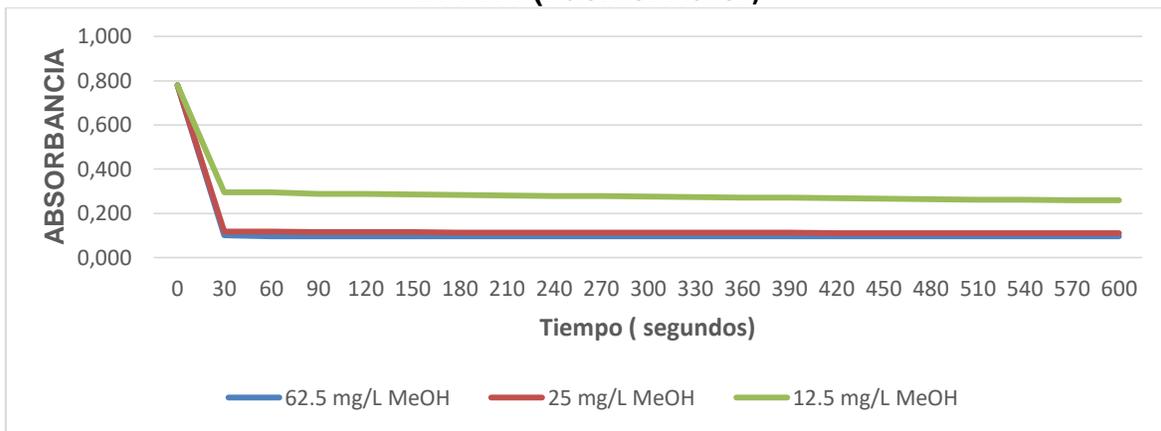
**Anexo 1. Cinética del Ácido Ascórbico, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**



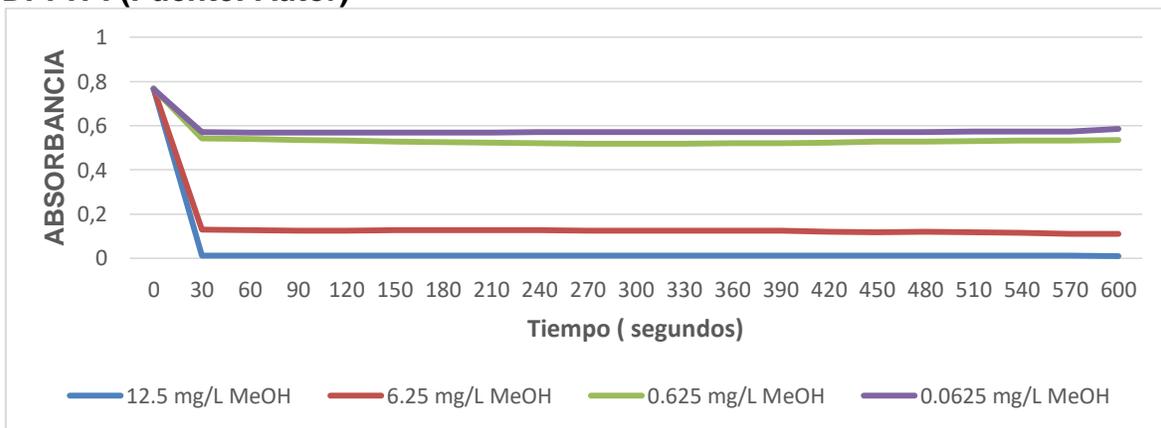
**Anexo 2. Cinética de la Rutina, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**



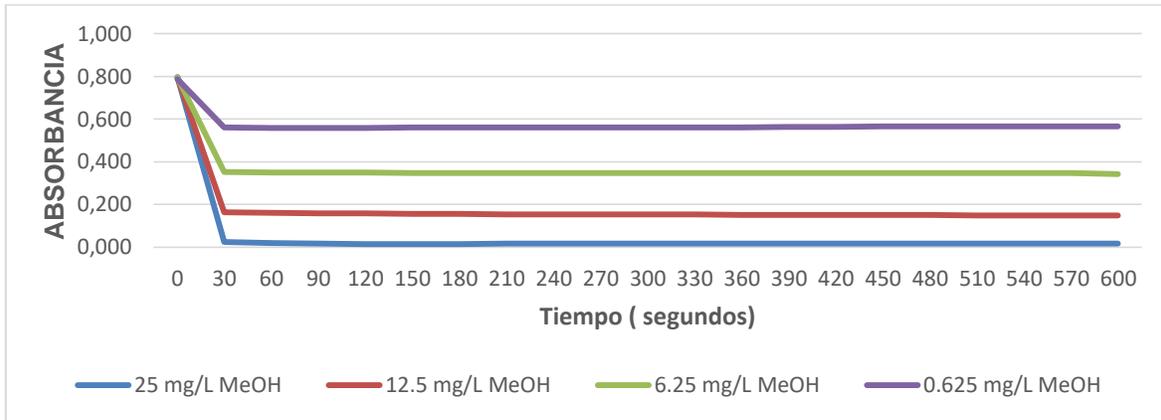
**Anexo 3. Cinética el extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**



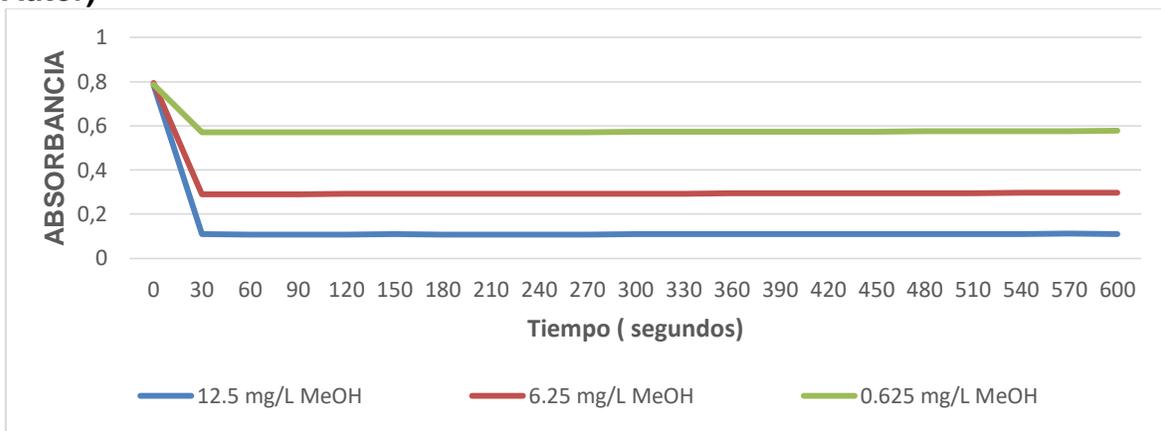
**Anexo 4. Cinética el extracto etanolico, tiempo vs absorbancia ensayo DPPH\*. (Fuente: Autor)**



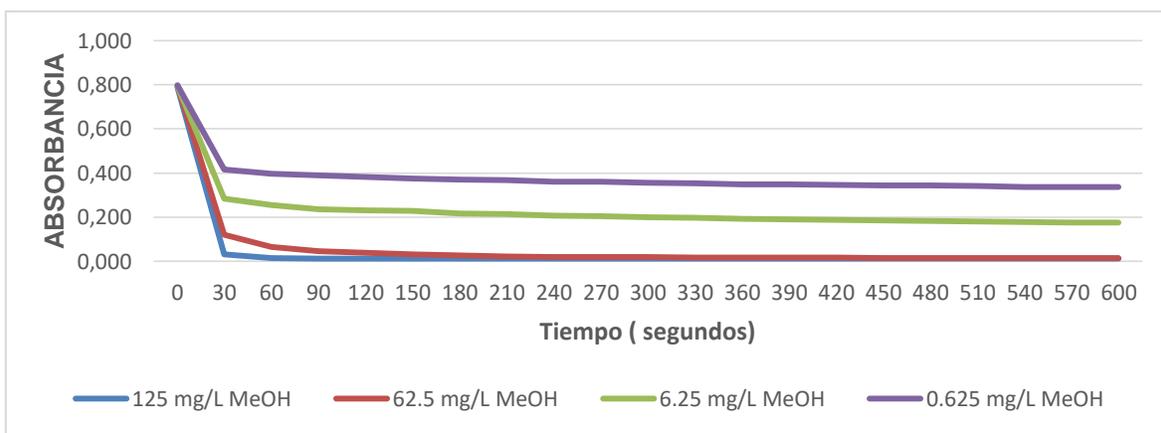
**Anexo 5. Cinética Ácido Ascórbico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS\*\*. (Fuente: Autor)**



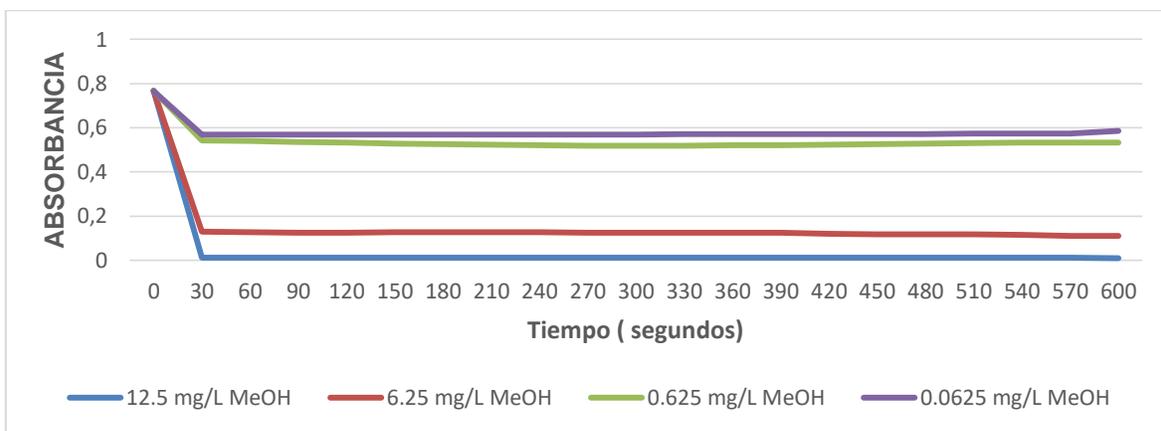
**Anexo 6. Cinética Rutina, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**



**Anexo 7. Cinética trolox, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**



**Anexo 8. Cinética el extracto acetato de etilo, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS<sup>•+</sup>. (Fuente: Autor)**



**Anexo 9. Cinética del extracto etanólico, tiempo vs absorbancia ensayo ABTS\*\*.** (Fuente: Autor)