

Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae)

Antioxidant activity of extracts from leaves of *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae)

Oscar Eduardo Rodríguez Aguirre, William Alejandro Andrade Barreiro, Fabio Eduardo Díaz López.

Resumen

B *Bocconia frutescens* es un árbol pequeño, posee hojas profundamente lobuladas y con borde dentado, las flores están agrupadas en panículas terminales pendulares, las semillas son de color negro brillante con una cubierta carnosa de color anaranjada. Es nativa de América, es conocida con los nombres vulgares de: Sarno, Palo Amarillo o Trompeto. **Objetivos:** Evaluar la actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de *Bocconia frutescens* por los métodos DPPH[•] y ABTS^{•+}. **Métodos:** las fracciones obtenidas por Soxhlet con solventes de diferente polaridad de hojas, fueron evaluadas a concentraciones de 25, 62.5, 125 y 250 mg/LMeOH para determinar la actividad antioxidante por los métodos DPPH[•] y ABTS^{•+}. **Resultados:** Para los extractos por el método decoloración del radical DPPH[•] el Porcentaje de Captación se encontró entre 47.6 y 57.7 a 250 mg/LMeOH y para las fracciones entre 45.4 y 54.1 mg/LMeOH, a 250 mg/LMeOH. Por el método decoloración del radical ABTS^{•+}. Para los extractos el porcentaje de Captación se encontró entre 89.7 y 99.7 a 250 mg/LMeOH y para las fracciones entre 68.5 y 99.6 mg/LMeOH. **Conclusiones:** las fracciones de acetato de etilo y metanol presentaron una alta actividad antioxidante al ser evaluadas por las técnicas ABTS^{•+} y DPPH[•], la técnica ABTS^{•+} se presentó mayor sensibilidad.

Palabras clave: Antioxidante, *Bocconia frutescens*, ABTS^{•+}, DPPH[•], actividad antioxidante relativa (AAR).

Abstract

B *Bocconia frutescens* is a small tree, has deeply lobed and serrated edge leaves, flowers are grouped in pendulous panicles terminal, seeds are shiny black with a fleshy covering of orange color. It is native to America, is known under their common names: Sarno, Palo Amarillo or Trompeto. **Objectives:** Evaluate the antioxidant activity of extracts and fractions of leaves *Bocconia frutescens* by DPPH[•] and ABTS^{•+} methods. Methods: the fractions obtained by Soxhlet with solvents of different polarity of leaves, were evaluated at concentrations of 25, 62.5, 125 and 250 mg / LMeOH to determine the antioxidant activity by DPPH[•] and ABTS^{•+} methods. **Results:** Extracts for the bleaching method DPPH[•] radical the Percent Uptake was between 47.6 and 57.7 to 250 mg / LMeOH and fractions between 45.4 and 54.1 mg / LMeOH, to 250 mg / LMeOH. By the method of coloration radical ABTS^{•+}. Extracts for the percentage uptake was found between 89.7 and 99.7 and fractions between 68.5 and 99.6 mg / LMeOH, to 250 mg / LMeOH. **Conclusions:** The fractions of ethyl acetate and methanol have a high antioxidant activity to be evaluated by the ABTS^{•+} and DPPH[•] techniques, the technique ABTS^{•+} present higher sensitivity.

Keywords: Antioxidant, *Bocconia frutescens*, ABTS By the method of coloration radical ABTS^{•+}, DPPH[•], antioxidant activity relative (AAR).

Recibido / Received: Marzo 18 de 2015 Aprobado / Approved: Mayo 21 de 2015

Tipo de artículo / Type of paper: Investigación Científica y Tecnológica.

Afiliación Institucional de los autores / Institutional Affiliation of authors: Universidad El Bosque.

Autor para comunicaciones / Author communications: Oscar Eduardo Rodríguez Aguirre, rodriguezoscare@unbosque.edu.co

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Introducción

La familia Papaverácea es una familia que cuenta de 44 géneros y unas 770 especies distribuidas por las zonas templadas del planeta (sobre todo el hemisferio norte) y prácticamente ausentes en áreas netamente tropicales. Es de importancia económica pues muchas especies son cultivadas como ornamentales o medicinales, dentro de estos el único género nativo en Colombia es *Bocconia*, este género neo tropical distribuido desde México hasta Argentina consiste de 20 especies, dos de ellas en los andes centrales [1].

Bocconia frutescens es una planta de distribución amplia y propia de sitios perturbados con buena iluminación y humedad, desde los 1500 hasta cerca de los 3200 metros sobre el nivel del mar. Su uso más conocido es contra la sarna, el jugo permanente de la planta se usa como vermífugo y purgante. El arilo de las semillas es consumido por aves [2].

En colombiana se encuentra distribuida en las tres cordilleras; en el departamento de Cundinamarca se observa en la parte alta de los cerros y lomeríos de los municipios que comprenden la Sabana de Bogotá y en el flanco occidental de la cordillera Oriental, también se encuentra de forma cultivada, en la Sabana de Bogotá [3].

El árbol alcanza los 10 metros de altura y los 40 cm de diámetro en su tronco, tiene corteza fisurada, su consistencia es corchosa y su color es amarillento; su copa tiene forma ovalada y es poco densa; su follaje comprende las tonalidades del color verde oliva al color verde anaranjado y está distribuido en ramilletes; sus ramas crecen de manera oblicua a arqueada y empiezan a baja altura; sus ramitas son gruesas, vidriosas y expiden una sustancia (látex) de color anaranjado.

Las hojas miden 50 cm de largo por 28 cm de ancho aproximadamente, son simples, alternas, están dispuestas en forma de hélices (helicoidales), su borde es dentado y posee varios lóbulos, su textura es parecida a la del cuero (coriáceas), por su frente son de color verde oscuro y por su revés son de color verde ceniciento, su nerviación es pronunciada, producen un exudado que es de color naranja al estrujarlas y están agrupadas en manojos, no presentan estípulas. Las flores miden 5 mm de diámetro, son de color crema,

no poseen pétalos, tienen numerosos estambres y están agrupadas en grandes inflorescencias terminales en forma de panículas pendulares que pueden medir hasta 1 m de largo. Los frutos miden 1 cm de largo por 4 mm de ancho, son similares a legumbres que se abren por sí solas en 2 valvas carnosas y un falso tabique (silicuas), su color es gris amarillento y cada uno contiene una semilla. Las semillas miden 5 mm de largo por 3 mm de ancho, su color es negro, son brillantes y poseen una cubierta carnosa que es de color roja. Sus semillas son consumidas por las aves (avifauna). La secreción, de color naranja, producida por sus hojas y ramas se emplea como colorante. la infusión de su raíz se emplea contra la hidropesía y la ictericia; la secreción anaranjada que se produce al arrancar sus hojas o ramas se utiliza, mezclada con agua, para las ulceraciones de los párpados. Los baños de agua con sus semillas machacadas curan la sarna de los perros y elimina los piojos. Su raíz y hojas, maceradas y mezcladas entre sí, sirven como cataplasma para curar heridas que contengan hongos [3]. El látex tiene acción purgante y vermífuga a dosis de 10 gotas.

Una gota diluida en una cucharada del caldo es un tónico tradicional. Con las raíces, se puede preparar una decocción diurética útil en las retenciones de líquidos. Por vía externa, se aplican emplastos o cataplasmas de las hojas, que actúan como vulnerarias, mejorando la cicatrización de las heridas y cortando las hemorragias. El aceite de las semillas también se puede aplicar por vía externa con el fin de madurar abscesos, en úlceras cutáneas y en el tratamiento de la sarna y otras parasitosis de la piel. La planta ha sido tóxica en los animales de experimentación, en los cuales, si se administra por vía inyectable, posee una intensa acción analgésica, por vía oral, no se ha detectado esta toxicidad [4].

Actividad antioxidante: Método de decoloración del radical DPPH*

El DPPH* es un radical nitrogenado orgánico y estable, de un intenso color púrpura, y no necesita generación previa. El método fue planteado por Brand-Williams [5], y sirve para determinar la capacidad antioxidante con base

en la disminución de color, medida a 517 nm, por acción de un compuesto antioxidante. Dicha actividad también puede medirse por resonancia espín-electrón [6].

Autores como Sánchez-Moreno [7], clasificaron el comportamiento de la cinética en términos de tiempo, como: rápida (<5min), intermedia (5-30min), lenta (>30min), e introdujeron un parámetro de capacidad antioxidante llamado Eficiencia antirradical [8].

A continuación se describe la reacción modelo de barrido entre el radical DPPH• y el antioxidante (AH):



Un nuevo radical es formado durante la interacción del radical DPPH• y el antioxidante, y las reacciones secundarias conducen a compuestos estables [9].

El radical DPPH• se preparó al disolver 2 mg en 100 ml de metanol; alícuotas de 500 µl de la solución metanólica de cada muestra son añadidas a 1,5 ml de una solución metanólica de radicales libres DPPH•. La reacción se estabiliza a los 5 min, luego de los cuales se mide la absorbancia a 517 nm y se calcula el porcentaje de inhibición. Como control de referencia se utiliza quercetina y ácido ascórbico.

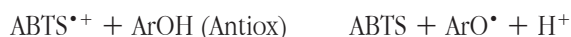
Actividad antioxidante: Método de decoloración del radical ABTS•+

Este método fue propuesto en 1993 por Miller [10] y se basa en la capacidad antioxidante del ABTS•+ para capturar aniones radicales de larga vida. En la prueba el ABTS•+ es oxidado por radicales peróxido, por persulfato de potasio [11], por peróxido de hidrógeno [12], peroxidasa de rábano [13], u otro oxidante hasta formar el catión radical ABTS•+, 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•+. Los resultados obtenidos se expresan como inhibición y se llevan a una concentración relativa de trolox, por ello el método se conoce como Capacidad Antioxidante Equi-

valente al Trolox (TEAC). El radical posee solubilidad en medios polares y apolares y no es afectado por la fuerza iónica; por tanto, evalúa antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de extractos de plantas y fluidos biológicos [14] [15] [6]. Este método se basa en la capacidad de las moléculas antioxidantes (trolox) para saciar la larga vida ABTS•+, un cromóforo azul-verde con un máximo de absorción a una longitud de onda de 754 nm.



$$\lambda_{\text{Max}} = 754 \text{ nm}$$



Asimismo, es un método de screening para la evaluación de la capacidad antioxidante de distintas sustancias hidrofílicas y lipofílicas. El radical monocatiónico 2,2-azinobis-(ácido3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) (ABTS•+) es producido por la reacción entre 50 mg de ABTS en H2O y 2.45 mg de persulfato de potasio. Dicha reacción da un compuesto coloreado que al cabo de 12 a 16 horas es estable, y luego es diluido con metanol hasta llegar a una absorbancia de 0.7 medida a 754 nm.

Porcentaje de captación de radicales

El porcentaje de captación se calcula mediante la siguiente fórmula [16]:

$$\% \text{ de captación} = (\text{A inicial} - \text{A final} / \text{A inicial})$$

La actividad antioxidante de los diferentes compuestos se mide en función del grado de decoloración que causan en la solución del radical monocatiónico ABTS•+ o del radical DPPH•. El ensayo de decoloración se basa en la capacidad que tiene la sustancia a prueba de capturar el electrón desapareado del radical o de liberar un protón.

Porcentaje de actividad antioxidante relativa (% AAR)

El porcentaje AAR es la actividad antioxidante de una sustancia comparada con la de un patrón en las mismas condiciones, y se calcula con el coeficiente de inhibición (IC 50) del patrón usado (trolox, quercetina o ácido ascórbico) por el IC 50 de la muestra analizada.

El IC 50 se calcula mediante regresión lineal o por medio de la ecuación de la recta de cada muestra o patrón de referencia analizado. El porcentaje AAR se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ AAR} = (\text{IC}50_{(m)} / \text{IC}50_{(R)}) \times 100$$

Donde IC 50_(R) es el coeficiente de inhibición del patrón de referencia usado e IC 50_(M) es el coeficiente de la muestra analizada.

Materiales

Se utilizó trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%), quercetina y ácido ascórbico como antioxidantes de referencia. El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132), ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico, A-1888), metanol, agua destilada.

Las soluciones se prepararon de la siguiente forma:

- Preparación del radical DPPH[•]: se disolvieron 2 mg de DPPH Sigma-Aldrich en 100 ml de metanol. La solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. Luego se prepararon soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.050 para todos los casos[12], a una longitud de onda de 517 nm.
- Preparación del radical ABTS^{•+}: se disolvieron 50 mg de (ABTS), la sal diamónica del 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) de Sigma-Aldrich, en 50 ml de agua desionizada y luego se adicionaron 2.45 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈). La solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 16 horas (Imagen 6). Posteriormente se prepararon soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de 0.750 ± 0.050 para todos los casos, a una longitud de onda de 754 nm.
- Preparación de ácido ascórbico C - DPPH[•]: se preparó una solución stock 1000 ppm disolviendo 10 mg de ácido ascórbico, en 10 ml de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 400 y 1 ppm.
- Preparación de quercetina DPPH[•]: se preparó una solución stock 800 ppm disolviendo 20 mg de ácido

ascórbico en 25 ml de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 20 y 1 ppm.

- Preparación de trolox ABTS^{•+}: se preparó una solución stock 2 mM disolviendo 0.005 g de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97% (trolox) de Acrös Organic, en 10 ml de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 3 y 15 μM.
- Preparación de quercetina ABTS^{•+}: se preparó una solución stock 2,6 mM disolviendo 0.02 g de quercetina, en 25 ml de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 3 y 12 μM.
- Preparación de ABTS^{•+}: se preparó una solución stock 5,7 mM disolviendo 0.01 g de ácido ascórbico (vitamina C), en 10 ml de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 3 y 12 μM.

Experimental y resultados

Obtención de extractos y fracciones de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae)

Extracción

la planta colectada en Bogotá fue desecada y molida, para una extracción con etanol en Equipo Soxhlet, (Foto 1) obteniéndose el extracto etanólico total concentrado en Rotaevaporador.

Fraccionamiento sólido-líquido

A los extractos etanólicos totales de hojas y flores se les realizó un fraccionamiento sólido líquido (percolación) empleando como fase estacionaria sílica gel 60 (MN Kieselgel 60 0.063 0.2 mm/70 -230 mest ASTM), y como fase móvil, éter de petróleo. Se continuó con diclorometano, acetato de etilo y metanol, obteniéndose las fracciones de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol, las cuales se concentraron en rotaevaporador.

Foto 1. obtención de extractos y fracciones por la técnica Soxhlet (autor)



Actividad antioxidante de los diferentes extractos y fracciones

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:

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 miligramos por litro de metanol respectivamente, se realizó la medición del porcentaje de captación de DPPH[•]. Los resultados de la medición del porcentaje de captación de DPPH[•] se encuentran en la tabla 1 y 12.

Tabla 1. Porcentaje de Captación del radical DPPH[•] empleando Ácido ascórbico. (Fuente: Autor)

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

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 R² de 0,916, el cual nos permite calcular el porcentaje de concentración efectiva 50 (IC₅₀) por medio de la ecuación de la gráfica 1.

Tabla 2. Porcentaje de captación del radical DPPH[•] empleando Rutina (Fuente: Autor).

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

Al igual que con el ácido ascórbico se realizó la curva de referencia con la Rutina, siguiendo los datos de la tabla 2, y se realizó la curva de referencia (Grafica 2) que permite verificar la dependencia lineal del porcentaje de captación del radical Vs la concentración de la rutina en miligramos por litro de metanol, obteniéndose un R² de 0,999.

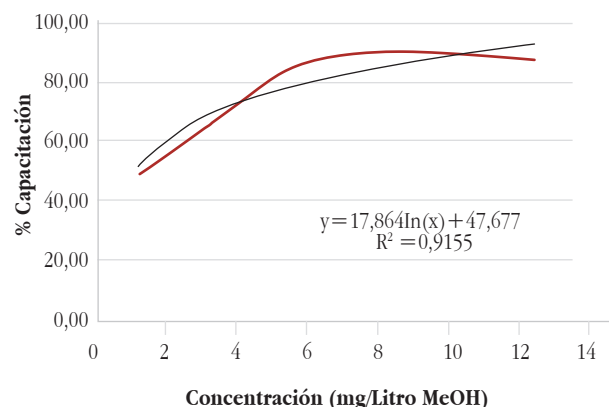
Coefficiente de inhibición (IC₅₀)

El coeficiente de Inhibición (IC₅₀) 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 IC₅₀ 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^{•+} [5].

IC₅₀ 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 R² = 0,916.

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

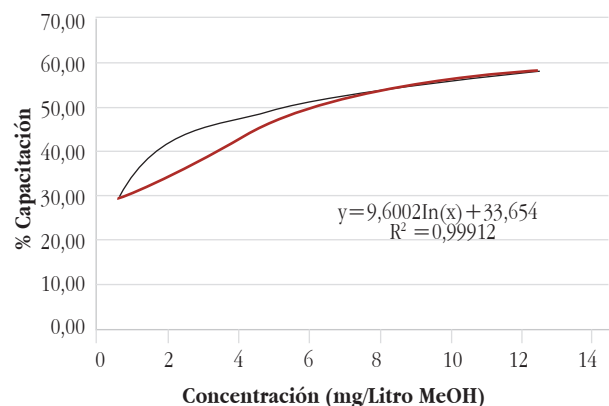


$e^x = (50 - 47,677) / 17,864$ Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado obtenido para el ácido ascórbico es de 1.13 miligramos por litro de metanol.

IC₅₀ 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).



Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado obtenido para obtener la concentración de rutina es: 5,49 miligramos por litro de metanol.

Actividad antioxidante de los extractos

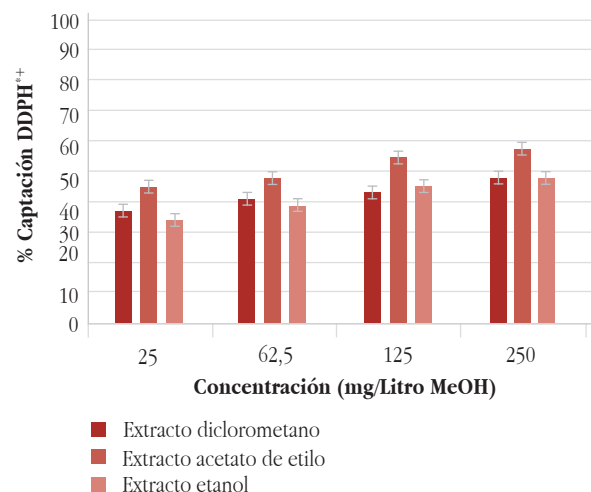
La actividad antioxidante fue evaluada para los extractos de *Bocconia frutescens* obtenidos de los solventes de diferentes polaridades (Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol), en diferentes concentraciones (25, 62,5, 125 y 250 miligramos por litro MeOH), mediante la aplicación del método decoloración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

Tabla 3. Porcentaje de Captación de DPPH* en extractos. (Fuente: Autor).

Concentración mg/ L MeOH	Extracto Diclorometano	Extracto Acetato de Etilo	Extracto Etanol
25	36.4	44.5	33.5
62.5	40.7	47.7	38.5
125	43.2	54.7	44.9
250	47.6	57.7	47.6

El extractos de Acetato de Etilo presento mayor captación, en las concentraciones de 62.5, 125 y 250, esto demuestra que pueden no presenta un porcentaje de captación de radicales libres, el extracto de diclorometano presento menor variación en la absorbancia, lo que se traduce en porcentaje de captación de DPPH* (Tabla 3).

Gráfica 3. Comparación de los extractos por el método decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor).



Actividad antioxidante de las fracciones de los extractos

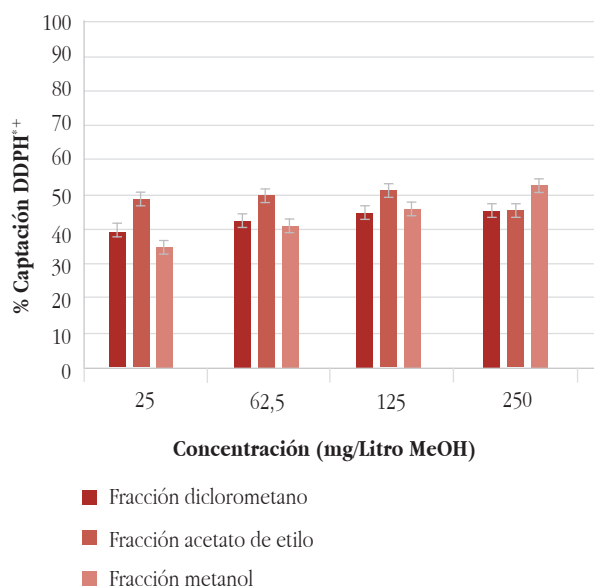
De igual forma como en los extractos, La Acetato de Etilo presenta los mayores porcentajes de captación evidenciándose actividad antioxidante para esta fracción como se demuestra en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de Captación de DPPH* en Fracciones (Fuente: Autor).

Concentración mg/ L MeOH	Fracción Diclorometano	Fracción Acetato de Etilo	Fracción Metanol
25	39.1	48	34.5
62.5	42.4	49.4	41
125	44.8	50.9	45.6
250	45.4	54.1	52.8

La actividad antioxidante fue evaluada para las fracciones obtenidas de los extractos, a las concentraciones de 25, 62.5, 125 y 250 miligramos por litro de metanol, con la aplicación del método decoloración del radical DPPH*, observando que en los solventes de mayor polaridad presentan la mejor captación por DPPH*

Gráfica 4. Comparación del porcentaje de captación del radical DPPH* de las fracciones de los diferentes extractos. (Fuente: Autor).



En la fracción de menor polaridad en ninguna de las concentraciones el porcentaje de captación supera el 50%. La fracción acetato de etilo del extracto total acetato de etilo, presenta porcentajes de captación superiores al 50% en las concentraciones de 125 y 250 miligramo por litro de metanol, con esto se puede concluir que esta fracciones pueden presentar actividad antioxidante.

Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC50) de extractos y fracciones por el ensayo de decoloración del radical 1-1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH')

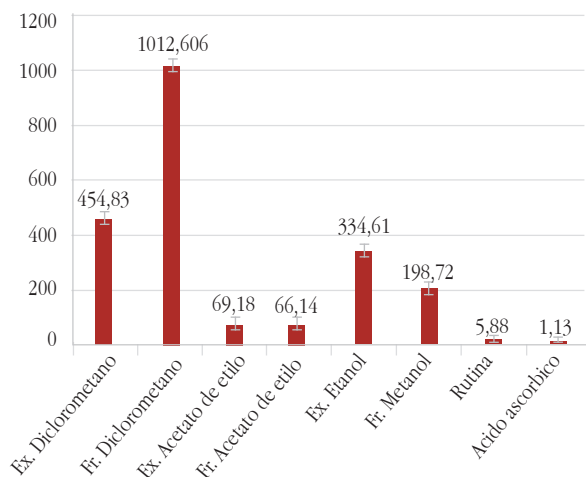
Con base en las curvas de concentración vs porcentaje de captación obtenida de los extractos y las fracciones, se obtuvieron las ecuaciones de las curvas, las cuales se utilizaron para calcular el IC₅₀ de cada uno de los mencionados. En la tabla 5 se observa los IC₅₀ para las fracciones y los extractos evaluados, evidenciándose que los extractos y fracciones con solventes de mayor polaridad mostraron mejor concentración inhibitoria 50 para este método.

Tabla 5. IC50 de extractos y fracciones de hojas calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor).

Extracto o fracción	IC50 DPPH' miligramo/ LMeOH
Extracto. Diclorometano	454,83
Fracción Diclorometano	1012,606
Extracto. Acetato de etilo	69,18
Fracción Acetato de etilo	66,14
Extracto. Etanol	334,61
Fracción. Metanol	198,72
Rutina	5,88
Acido Ascorbico	1,13

Se comparó los resultados obtenidos con el IC₅₀ del ácido ascórbico (1.13 miligramos por litro de MeOH) y la Rutina (5.88 miligramos por litro de MeOH), observándose que la fracción y extracto total de Acetato de Etilo presento mejor concentración inhibitoria (IC₅₀) para este método en 66.14 y 69.18 miligramos por litro de MeOH respectivamente.

Gráfica 5. Comparación IC50 de extractos y fracciones calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor).



Capacidad antioxidante de extractos y fracciones por el ensayo de DPPH*

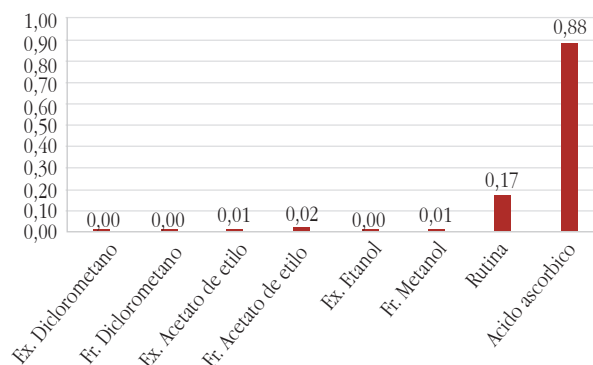
La capacidad antioxidante significa la captación que tiene un miligramo de antioxidante para atrapar radicales libres en un litro de metanol, para este ensayo se evidencia que la mayor capacidad antioxidante de las muestras evaluadas la tiene la fracción Acetato de etilo con 0.02 miligramos por litro de metanol, la capacidad antioxidante comparada con la del ácido ascórbico es un 88.87% menor.

Tabla 6. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor)

Extracto o fracción	Capacidad antioxidante miligramo/ LMeOH
Extracto. Diclorometano	0
Fraccion Diclorometano	0
Extracto. Acetato de etilo	0,01
Fraccion Acetato de etilo	0,02
Extracto. Etanol	0
Fraccion. Metanol	0,01
Rutina	0,17
Acido Ascorbico	0,88

En la gráfica 6. Se evidencia que la fracción en Acetato de etilo tiene no tiene una buena capacidad antioxidante respecto a la patrones (Rutina y Acido Ascorbico).

Gráfica 6. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor).



Actividad antioxidante relativa (AAR)

La actividad antioxidante relativa (AAR), de extractos y fracciones Wedd, para el método de decoloración del radical DPPH*, se calculó con la ecuación

El AAR, muestra el comportamiento de las fracciones y extractos analizados comparados con los patrones usados, los resultados son obtenidos en actividad antioxidante relativa. Estos resultados aunque diferentes para cada uno de los patrones, muestran el mismo orden de resultados (Tabla 7). La fracción Acetato de etilo presentó un 58,53 AAR comparado con el ácido ascórbico y 11,25 de AAR con la Rutina, siendo la fracción analizada con mejor actividad relativa, seguido por la extracto en Acetato de Etilo con 61,62 de AAR para el ácido ascórbico y 11,77 AAR para la Rutina.

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

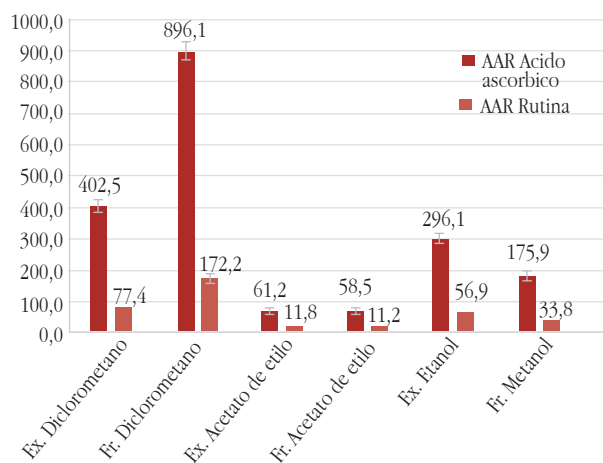
Tabla 7. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones calculados por el método de decoloración del radical DPPH*. (Fuente: Autor).

Extracto o Fracción	AAR Ácido Ascórbico	AAR Rutina
Extracto. Diclorometano	402,5	77,35
Fraccion Diclorometano	896,11	172,21

Extracto o Fracción	AAR Ácido Ascórbico	AAR Rutina
Extracto. Acetato de etilo	61,22	11,77
Fraccion Acetato de etilo	58,53	11,25
Extracto. Etanol	296,12	56,91
Fraccion. Metanol	175,86	33,80

En la gráfica 7. Se observa que por el ensayo de decoloración DPPH*, hay menor actividad antioxidante relativa con respecto a las sustancias de control, verificando que a mayor valor menor capacidad de atrapar radicales libres.

Gráfica 7. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones de calculados por el ensayo de DPPH*. (Fuente: Autor).



Ensayo de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS^{•+})

La metodología desarrollada para el método de decoloración del radical ABTS^{•+}, se determinó de acuerdo a los parámetros establecidos según referencias.

Analisis de resultados

Preparación de la curva de referencia

Para realizar las curvas de referencia se prepararon soluciones de Trolox, ácido ascórbico y rutina, en concen-

traciones de 0,625 a 25 miligramos por litro de metanol y se realizó la medición del porcentaje de captación.

Tabla 8. Porcentaje de captación del radical ABTS^{•+} empleando trolox. (Fuente: Autor).

Concen-tración mg/ L MeOH	Log Concen-tración	A inicial	A final	% de captación de ABTS ^{•+}
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

Partiendo de los datos obtenidos del porcentaje de captación del radical catiónico Acido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS^{•+}), se construyó una curva de referencia (Gráfica 8) que permite verificar la dependencia lineal del % de captación del radical ABTS^{•+} Vs la concentración del trolox, obteniéndose un R² de 0,968, el cual nos permite calcular el porcentaje de concentración efectiva 50 (IC₅₀) por medio de la ecuación de la gráfica 8.

Tabla 9. Porcentaje de captación del radical ABTS^{•+} empleando ácido ascórbico. (Fuente: Autor).

Concen-tración mg/ L MeOH	Log Concen-tración	A inicial	A final	% de captación de ABTS ^{•+}
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

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

Tabla 10. Porcentaje de captación del radical ABTS^{•+} empleando rutina. (Fuente: Autor).

Concen-tración mg/ L MeOH	Log Concen-tración	A inicial	A final	% de captación de ABTS ^{•+}
0,625	- 0,20	0,788	0,567	28,05

Concentración mg/ L MeOH	Log Concentración	A inicial	A final	% de captación de ABTS*+
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

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*+ Vs la concentración de la Rutina obteniéndose un R² de 0,9477.

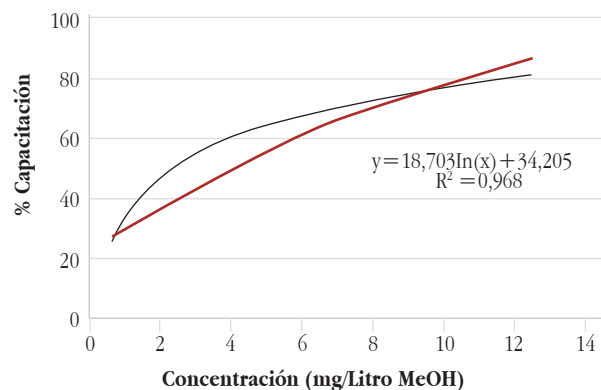
Coefficiente de inhibición IC₅₀

Como se calculó anteriormente para el método del DPPH*, el IC₅₀ se calcula con la fórmula de la ecuación de la recta.

IC₅₀ Trolox

Partiendo de los datos obtenidos de la captación del radical ABTS*+ 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 R² de 0,968. La curva de referencia de trolox da una ecuación de recta $y = 18,703 \ln x + 34,205$.

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



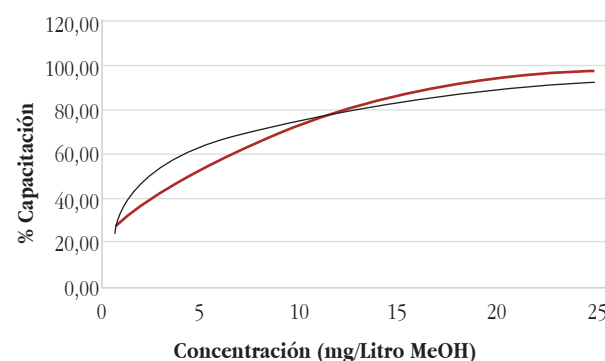
$(50 - 34.205) / 18.703 = e^x$ Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado para el IC₅₀ del trolox es de 2.32 miligramos por litro de metanol.

IC₅₀ 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 R² de 0,9477.

Obteniendo un IC₅₀ de 2.48 miligramos de rutina por litro de metanol.

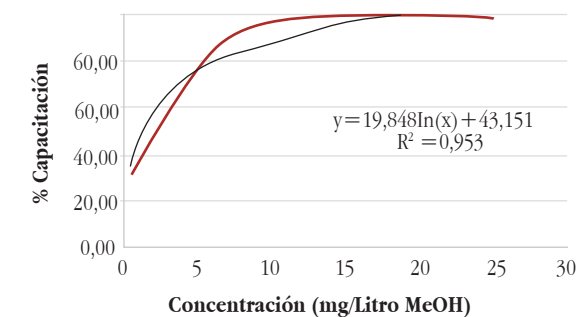
Gráfica 9. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS*+ v/s concentración de rutina. (Fuente: Autor).



IC₅₀ Ácido Ascórbico

Cómo se ha venido calculando el IC₅₀ 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 R²: 0,953

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



En la grafica anterior se observa el comportamiento del ácido ascórbico, $(50 - 43.151) / 19.848 = e^x$ 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 miligramos por litro de metanol.

Actividad antioxidante de los extractos

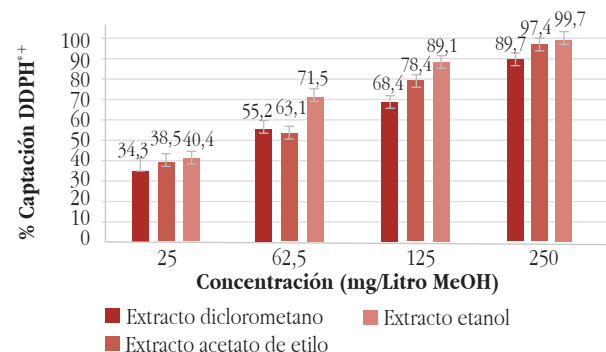
Como se aplicó para el método de decoloración del radical DPPH[•], para el método de decoloración del ABTS^{•+}, se utilizaron las mismas concentraciones de los extractos (25, 62,5, 125 y 250 miligramos por litros de MeOH). Para éste método también observamos que hay tendencia de mayor actividad antioxidante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

Tabla 11. Porcentaje de captación de ABTS^{•+} en extractos. (Fuente: Autor).

Concentración mg/ L MeOH	Extracto Diclorometano	Extracto Acetato de Etilo	Extracto Etanol
25	34,3	38,5	40,4
62,5	55,2	53,1	71,5
125	68,4	78,8	89,1
250	89,7	97,4	99,7

El extracto de Diclorometano presento el menor porcentaje de captación con respecto a los extractos de acetato de etilo y etanol, ya que estos extractos sobrepasaron el 90% de captación del radical ABTS^{•+} en la concentración de 250 miligramos por litro de metanol (Tabla 11).

Gráfica 11. Comparación extractos por el método decoloración del radical ABTS^{•+}. (Fuente: Autor).



El extracto de diclorometano mostro un comportamiento más conservador, presentando una menor disminución de la absorbancia, su mayor porcentaje de captación se presentó a 250 miligramos de extracto por litro de Metanol con un porcentaje de 89,7% de captación.

En la también se observa los porcentajes de captación del extracto Etanol, este presenta mayor porcentaje de inhibición en las concentraciones de 62,5, 125 y 250 miligramos de extracto por litro de metanol, con unos porcentajes de 71,5%, 89,1% y 99,7% de captación de ABTS^{•+}.

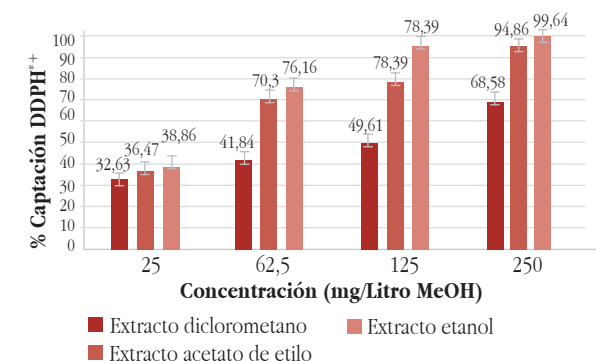
Actividad antioxidante de las fracciones

Tabla 12. Porcentaje de Captación de ABTS^{•+} en Fracciones. (Fuente: Autor).

Concentración mg/ L MeOH	Extracto Diclorometano	Extracto Acetato de Etilo	Extracto Etanol
25	32,63	36,47	38,86
62,5	41,84	70,3	76,16
125	49,61	78,39	94,89
250	68,54	94,86	99,64

La fracción en Acetato de Etilo presento menor actividad con respecto a la fracción de metanol para las fracciones por el método de ABTS^{•+} se nota mayor sensibilidad, en los solventes de mayor polaridad el porcentaje de captación supera el 50% en las concentraciones de 62,5, 125 y 250 miligramos por litro de Metanol. (Tabla 12).

Gráfica 12. Comparación de las fracciones de los extractos de hojas de *D. phyllicodes* (Kunth) Wedd, por el método decoloración del radical ABTS^{•+}. (Fuente: Autor).



En la anterior grafica se evidencia que a la concentración de 250 miligramos por litro de MeOH la fracción metanolica del extracto etanolico presentan un porcentaje de captación de ABTS^{•+} mayor al 99%. En la fracción diclorometano a una concentración de 250ppm, solo alcanza a superar el 50% de captación, lo que sugiere actividad antioxidante baja a esta concentración.

Comparación del coeficiente de inhibición 50 (IC₅₀) de extractos y fracciones por el método de ABTS^{•+}

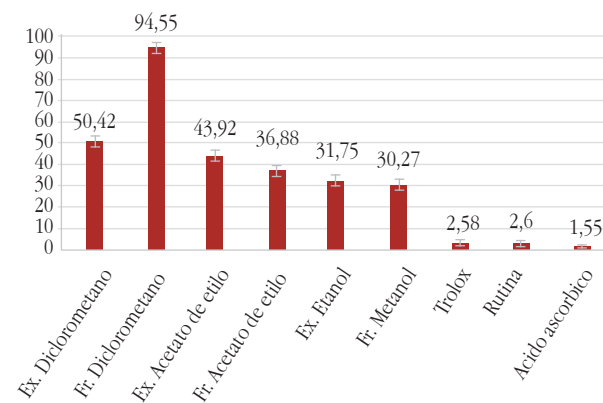
Los resultados se compararon con los patrones usados para el método de decoloración del radical ABTS^{•+}, el ácido ascórbico (1.55 miligramos por litro MeOH), rutina (2.60 miligramos por litro MeOH) y trolox (2.58 miligramos por litro MeOH), obteniéndose resultados que tienen mayor IC₅₀ que el los patrones, concluyendo que la actividad antioxidante es baja en relación al ácido ascórbico, rutina y trolox.

Tabla 13. IC₅₀ de extractos y fracciones calculados por el método de decoloración del radical ABTS^{•+}. (Fuente: Autor).

Extracto o fracción	IC ₅₀ DPPH miligramo/ LMeOH
Extracto. Diclorometano	50,42
Fraccion Diclorometano	94,55
Extracto. Acetato de etilo	43,92
Fraccion Acetato de etilo	36,88
Extracto. Etanol	31,75
Fraccion. Metanol	30,27
Trolox	2,58
Rutina	2,60
Acido Ascorbico	1,55

Se comparó los resultados obtenidos con el IC₅₀ del ácido ascórbico, la rutina y el trolox, observándose que la fracción metanol y el extracto etanolico presentan similar IC₅₀ para este método.

Gráfica 13. Comparación IC₅₀ de extractos y fracciones de hojas de calculados por el método de decoloración ABTS^{•+}. (Fuente: Autor).



En la anterior grafica se observa que por este ensayo los extracto y fracciones edvaluados presentan una capacidad antioxidante baja respecto a las sustancias antioxidantes de referencia.

Capacidad antioxidante de extractos y fracciones por el ensayo ABTS^{•+}.

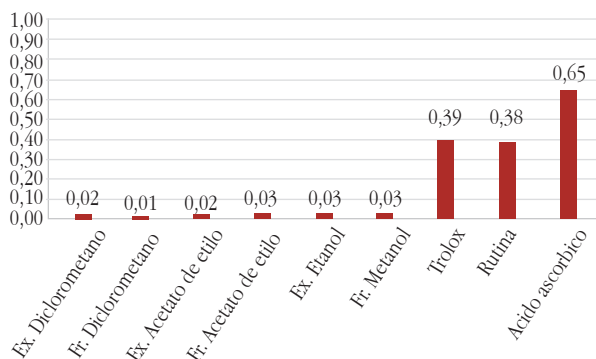
La capacidad antioxidante por este metodo es baja comparada con los patrones para todas las muestras evaluadas, en la fracción acetato de etilo del extracto acetato de etilo presenta un valor de 0.10 mg/L de metanol, comparada con el ácido ascórbico que alcanza un 0.65 mg/L.

Tabla 14. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones calculados por el método de decoloración del radical ABTS^{•+}. (Fuente: Autor).

Extracto o fracción	Capacidad antioxidante miligramo/ LMeOH
Extracto. Diclorometano	0,02
Fraccion Diclorometano	0,01
Extracto. Acetato de etilo	0,02
Fraccion Acetato de etilo	0,03
Extracto. Etanol	0,03
Fraccion. Metanol	0,03
Trolox	0,39
Rutina	0,38
Acido Ascorbico	0,65

En la grafica se observa la comparación de la capacidad antioxidante de los extractos y fracciones activos por este metodo, se evidencia que los patrones captan mas radicales libres en un gramos de muestra. Las fracciones y extractos solo alcanza a captar 0.03 miligramos por litro de metanol de radicales libres.

Gráfica 14. Capacidad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de calculados ABTS*+.



Actividad antioxidante relativa (AAR)

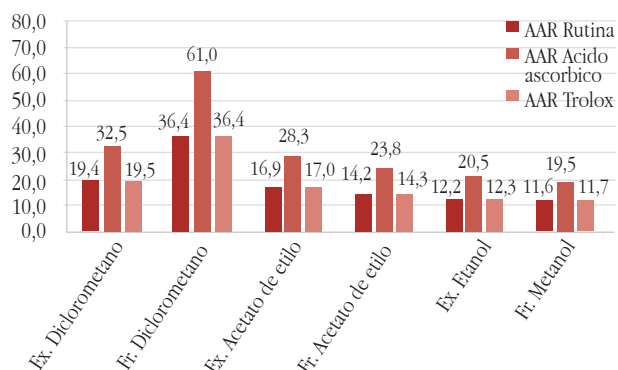
La actividad antioxidante relativa de los extractos, por el ensayo de ABTS*+, la fracción que presento menor porcentaje de Actividad Antioxidante Relativa (AAR) de los extractos y fracciones evaluadas fue la del extracto acetato de etilo fracción acetato de etilo con 2.7 de AAR con respecto al trolox, 2.5 AAR con respecto a la rutina, y 4,5 AAR con respecto al acido ascórbico, esto indica que para este ensayo de ABTS*+ las muestras evaluadas presentan una capacidad antioxidante baja, ya que los valores comparados con las muestras control son mas altos.

Tabla 15. AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones calculados por el método de decoloración del radical ABTS*+. (Fuente: Autor).

Extracto o Fracción	AAR ácido ascórbico	AAR rutina	AAR trolox
Extracto. Diclorometano	32,53	19,39	19,54
Fraccion Diclorometano	61,00	36,37	36,37
Extracto. Acetato de etilo	28,34	16,89	17,02
Fraccion Acetato de etilo	23,79	14,18	14,29
Extracto. Etanol	20,48	12,21	12,31
Fraccion. Metanol	19,53	11,64	11,73

En la gráfica 15 se observa que la actividad antioxidante relativa para los extractos y fracciones por el ensayo de ABTS*+ 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 15. Comparación AAR: actividad antioxidante relativa de extractos y fracciones calculados por el ensayo de ABTS*+. (Fuente: Autor).



Comparación del IC50 de extractos y calculados por los métodos de DPPH* y ABTS*+

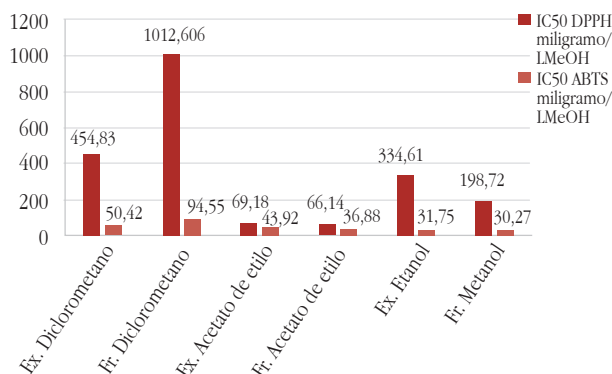
Se determinó la concentración media inhibitoria 50 (IC50) de la actividad antioxidante mediante por los ensayos DPPH* y ABTS*+ (Tabla 21) de los extractos y fracciones de hojas *Bocconia frutescens*, para el extracto acetato de etilo se encontró el mayor valor de IC50. Por el método de DPPH* la fracción metanolica del extracto total de etanol presenta el menor valor con un IC50 de 2.34 mg/L de metanol, siendo la fracción mas activa.

Tabla 16. Comparación IC50 en extractos y fracciones calculados por los métodos de decoloración del radical DPPH* y decoloración del radical ABTS*+. (Fuente: Autor).

Extracto o Fracción	IC50 DPPH* miligramo/LMeOH	IC50 ABTS*+ miligramo/LMeOH
Extracto. Diclorometano	454,83	50,42
Fraccion Diclorometano	1012,606	94,55
Extracto. Acetato de etilo	69,18	43,92
Fraccion Acetato de etilo	66,14	36,88
Extracto. Etanol	334,61	31,75
Fraccion. Metanol	198,72	30,27

Por el método de ABTS^{•+} se obtuvieron resultados diferentes resultados, en este método se presenta mayor sensibilidad ya que los valores de IC50 son más bajos comparados con los del ensayo de DPPH[•], presentando.

Gráfica 16. Comparación IC50 de extractos y fracciones calculados por los métodos DPPH[•] y ABTS^{•+}. (Fuente: Autor).



En la gráfica 16 se observa que en mayor parte los IC50 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 la fracción metanol del extracto de etanol por el ensayo ABTS^{•+} tiene el IC50 más bajo, concluyendo que muestra evaluada presenta mejor actividad antioxidante por ambos métodos.

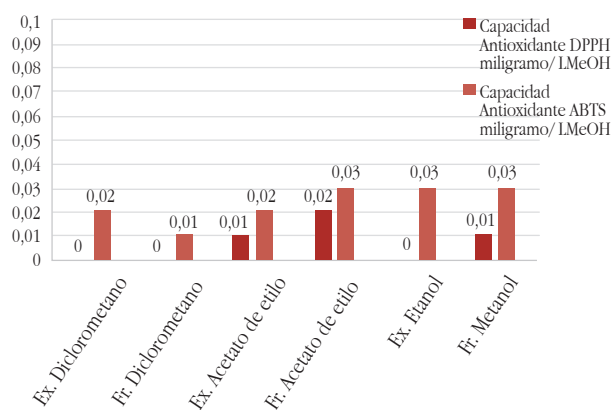
Comparación de la capacidad antioxidante de extractos y fracciones calculados por los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+} comparadas con la Rutina

Tabla 17. Comparación de la capacidad Antioxidante de extractos y fracciones calculados por los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+}. (Fuente: Autor).

Extracto o Fracción	Capacidad Antioxidante DPPH [•] miligramo/LMeOH	Capacidad Antioxidante ABTS ^{•+} miligramo/LMeOH
Extracto. Diclorometano	0	0,02
Fraccion Diclorometano	0	0,01
Extracto. Acetato de etilo	0,01	0,02
Fraccion Acetato de etilo	0,02	0,03
Extracto. Etanol	0	0,03
Fraccion. Metanol	0,01	0,03

La comparación de la capacidad antioxidante evaluada por ambos métodos concluye que la fracción metanol, el extracto total de etanol el método de ABTS^{•+} presentan la mayor captación de radicales libres por miligramo de sustancia en un litro de metanol con un 0,03, esta capacidad es mayor evaluada frente a Rutina por el método de DPPH[•], esta fracción presenta la mejor capacidad antioxidante de las muestras de estudio. [17] [18] [19].

Gráfica 19. Comparación de la capacidad Antioxidante de extractos y fracciones calculados por los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+}. (Fuente: Autor).



En la anterior grafica se observa que la capacidad antioxidante el comportamiento es similar por ambos métodos, se evidencia que las muestras con mayor capacidad antioxidante son en el ensayo de DPPH

Conclusiones

Las fracciones acetato de etilo y metanol de hojas de *Bocconia frutescens* presentaron una alta actividad antioxidante evaluadas por las técnicas ABTS^{•+} y DPPH[•] presentando mayor sensibilidad la técnica ABTS^{•+}.

Agradecimientos

Agradecemos a la Facultad de Ingeniería Programa Ingeniera Ambiental de la Universidad El Bosque.

Referencias

[1] University of Hawaii Botany. 2002. *Bocconia frutescens*, *bocconia*, *Papaveraceae*. http://www.botany.hawaii.edu/faculty/cw_smith/boc_fru.htm. 1 p.

- [2] Vargas, W.G. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales. Manizales: Editorial Universidad de Caldas. 2002;497 – 498.
- [3] Mahecha Vega, G.E.. Vegetación del territorio CAR, 450 especies de sus llanuras y montañas. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. Colombia. 2004; 565 – 789.
- [4] Berdonces, J.L. (2010). Llorasangre. En Gran enciclopedia de las plantas medicinales: de la A a la Z. 2, 695.
- [5] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebens. Wiss. u.Technol*, 1995; 28:25-30.
- [6] Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem*, 2005; 53:4290-302
- [7] Sánchez-Moreno C, Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Saura-Calixto F. Evaluation of Free Radical Scavenging of Dietary Carotenoids by the Stable Radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J. Sci. Food Agric.*, 2000; 80:1686-90.
- [8] Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53:1841-56.
- [9] Suja KP, Jayalekshmy A, Arumughuan C. Free Radical Scavenging Behaviour of Antioxidant Compounds of Sesame (*Sesame indicum* L.) in DPPH• System. *J. Agric. Food Chem*, 2004; 52:912-15.
- [10] Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin. Sci*. 1993; 84:407-12.
- [11] Re R, Pellegrini N, Protegente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying and Improved ABTS + • Radical Cation Decolorization Assay. *Free Rad. Biol. Med*, 1999; 26:1231-37
- [12] Villano D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parilla MC. The Antioxidant Activity of Wines Determined by ABTS•+ Method: Influence of Simple dilution and Time. *Talanta*, 2004; 64:501-9.
- [13] Labrinea EP, Georgiu CA. Stopped-Flow Method for Assessment of pH and Timing Effect on the ABTS Total Antioxidant Capacity Assay. *Anal. Chim. Acta* 2004;526:63-8.
- [14] Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chem*. 2005: 235-54.
- [15] Krishanti M, Xavier R, Kasi M, Ayyalu D, Surash R, Sadasivam K, Sreeramanan S. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic leaf extracts of *Ficus religiosa* L., *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson, *Cynodon dactylon* (L.) Pers. and *Tridax procumbens* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2010; 3(5):348-50
- [16] Kulisic T, Radonic A, Katalini V, Milos M. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, *Food Chemistry*, 2004;85:633-40.
- [17] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, CisnerosZevallos L, Hawkins D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts *Journal of Food Composition and Analysis* 2006; 19:669-75.
- [18] Floegel A, Dae-Ok K, Sang-Jin C, Sung K, and Ock C. “Comparison of ABTS/DPPH Assays to Measure Antioxidant Capacity in Popular Antioxidant-Rich US Foods.” *Journal of Food Composition and Analysis* 2011; 24(7):1043–48. 9.
- [19] Thang PT, Patrick S, Teik LS, Yung CS. Anti-oxidant effects of the extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine–xanthine oxidase induced damage, *Burns* 2001; 27: 319-27.

Los Autores



Oscar Eduardo Rodríguez Aguirre - Lic- M.Sc. – Ph.D.

Profesor Investigador: Core Faculty : Facultad de Ingeniería , Universidad El Bosque

<https://www.orcid.org/0000-0002-5934-0451>

https://www.researchgate.net/profile/Oscar_E_Rodriguez_A/stats

<http://www.scopus.com/authid/detail.url?authorId=26658764600>



William A. Andrade B.

Ingeniero Químico, Universidad Nacional de Colombia (1995), Especialista en Educación Ambiental Universidad El Bosque (1998), Especialista en Docencia Universitaria, Universidad El Bosque (2004), candidato a Maestría en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana (2015).



Fabio E. Díaz L.

Ingeniero Químico Universidad Nacional de Colombia (1998), Especialista en Docencia Universitaria Universidad El Bosque (2006), Magister en Ingeniería Civil área de Ingeniería Ambiental Universidad de Los Andes (2002).