

Tamizaje fitoquímico preliminar, evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de seis especies de *Ericaceas* colombianas

Preliminary phytochemical screening, antioxidant, and toxic activity evaluation of six species of colombian *Ericaceas*

MSc. Erika Andrea Plazas González

Jardín Botánico "José Celestino Mutis". Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Introducción: la familia *Ericaceae* cuenta con aproximadamente 4 500 especies distribuidas en regiones neotropicales. Colombia es el país con mayor número de *ericáceas*, presentes en bosques de la región andina. Se caracterizan por poseer gran importancia a nivel

ecológico, medicinal y alimenticio.

Objetivos: realizar el tamizaje fitoquímico preliminar y evaluar la actividad antioxidante *in vitro* y la toxicidad frente a *Artemia salina* en extractos de seis especies de *ericaceas* colombianas

Métodos: a partir de las hojas, flores y/o frutos verdes de las especies *Cavendishia bracteata* Hoerold, *Gaultheria erecta* Vent, *Thibaudia floribunda* Kunth, *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm, *Bejaria resinosa* Mutis ex L. f. y *Disterigma alaternoides* (Kunth) Nied, se obtuvieron los extractos etanólicos. Se realizó el tamizaje fitoquímico preliminar y se determinó la concentración total de fenoles y flavonoides por métodos colorimétricos. Se evaluó la actividad tóxica en el modelo de *Artemia salina* y la actividad antioxidante por captación de radicales DPPH.

Resultados: en el tamizaje fitoquímico preliminar se evidenció la presencia de fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, esteroides y quinonas. Todos los extractos analizados excepto el de frutos verdes de *C. bracteata* poseen altas concentraciones de fenoles y flavonoides totales. Los extractos de hojas de

G. erecta, *D. alaternoides* y flores de *T. floribunda* presentaron toxicidades medias con CL₅₀ de 229, 173 y 196 ppm frente a *Artemia salina*. Los extractos de

G. erecta, *C. bracteata* y *T. floribunda* poseen actividad antioxidante promisorias (IC₅₀ 50.61, 62.88 y 69.46 al respecto), al comprar con antioxidantes conocidos como el ácido gálico y ascórbico.

Conclusiones: se evidenció la presencia de un alto contenido de compuestos de tipo fenólico como flavonoides, quinonas y taninos. Además, los extractos de hojas de diferentes especies presentaron actividades antioxidantes promisorias y bajas toxicidades.

Palabras clave: análisis fitoquímico, fenoles totales, flavonoides totales, actividad tóxica, actividad antioxidante, *Ericaceas*.

ABSTRACT

Introduction: ericaceae family includes 4500 species distributed in neotropical regions, Colombia is the country with the highest number of Ericaceae species mainly distributed in Andean forests, these are characterized by ecological, medicinal and food importance.

Objective: preliminary phytochemical study and to evaluate the *in vitro* antioxidant activity and toxicity against *Artemia salina* in extracts of six species of Colombian Ericaceae

Methods: from the *Cavendishia bracteata* (Ruiz & Pav. ex J. St.-Hil.) Hoerold, *Gaultheria erecta* Vent, *Thibaudia floribunda* Kunth, *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm, *Bejaria resinosa* Mutis ex L. f. and *Disterigma alaternoides* (Kunth) Nied, were obtained the ethanolic extracts, performed the preliminary phytochemical analysis and determined the total concentration of phenols and flavonoids by colorimetric methods. The toxic activity was evaluated in the *Artemia salina* assay and the antioxidant activity for DPPH radical scavenging.

Results: preliminary phytochemical analysis showed the presence of phenols, flavonoids, tannins, coumarins, terpenes, steroids and quinones. All extracts tested except the green fruits of *C. bracteata* have high concentrations of total phenols and flavonoids. The leaf extracts *G. erecta* and *D. alaternoides* and flowers

T. floribunda showed stockings toxicities with LC₅₀ 229, 173 and 196 ppm against *Artemia salina*. Extracts of *G. erecta*, *C. bracteata* and *T. floribunda* possess promising antioxidant activity (IC₅₀ 50.61, 62.88 and 69.46 respectively), to compare with others antioxidants such as gallic acid and ascorbic acid.

Conclusions: this study revealed the presence of a high content of phenolic compounds such as flavonoids, quinones and tannins. Furthermore leaf extracts from different species showed promising antioxidant activities and low toxicities.

Keywords: phytochemical analysis, totals phenols, totals flavonoids, toxic activity, antioxidant activity, Ericaceae.

INTRODUCCIÓN

La familia *Ericaceae* cuenta con 125 géneros y cerca de 4 500 especies distribuidas en las regiones neotropicales, en tierras ácidas de regiones templadas, subárticas y en bosques húmedos de regiones andinas de Latinoamérica.^{1,2} Colombia es el país con mayor número de *ericaceae*s en el Neotrópico, con un aproximado de 270 especies de 17 géneros, muchas de las cuales se encuentran exclusivo en este

territorio. Estas especies se distribuyen en la región andina, en la cordillera central y occidental. Los géneros más representativos para Colombia son, *Cavendishia*, *Disterigma*, *Gaultheria*, *Macleania*, *Pernettya* y *Vaccinium*.³

Las especies del género *Gaultheria*, son conocidas como "wintergreen" en América del norte y Asia. A partir de las hojas de estas especies se realiza la extracción del aceite de gaultheria, compuesto en su mayoría por salicilato de metilo y utilizado para el alivio de dolencias musculares, articulares y enfermedades como hipertensión, artritis y reumatismo entre otras.⁴ La especie *M. rupestris* es la más representativa del género, por su amplia distribución y abundancia, se conoce en lo popular como "Uva camarona", es usada en la medicina tradicional para disminuir la disentería y también como astringente.⁵

Los estudios químicos permiten asilar e identificar metabolitos secundarios, en lo esencial de tipo fenólico como, flavonoides, antocianinas, taninos, tanto hidrolizables como condensados y derivados del ácido hidroxibenzóico e hidroxicinámico, entre otros. Muchos de esos componentes muestran marcada actividad biológica como antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y vaso dilatatoria. Los flavonoides son los metabolitos más representativos de la familia *Ericaceae*; se han aislado a partir de diferentes especies de los géneros *Erica* y *Vaccinium* flavonoles, antocianinas y flavonas como la catequina, quercetina y miricetina.⁶ Este tipo de metabolitos tiene un interés científico especial desde hace varios años, debido a su amplio espectro de actividades biológicas y fisiológicas, atribuidas especial, a su capacidad antioxidante, su estabilidad química y la variedad estructural.⁷

Pese a la importancia en distribución y usos de las especies de *Ericaceas* en Colombia, la mayoría de ellas no poseen reportes de estudios químicos y de actividad biológica. El presente estudio pretende realizar el tamizaje fitoquímico preliminar y evaluar la actividad antioxidante *in vitro* y la toxicidad frente a *Artemia salina* en extractos de seis especies de *Ericaceas* colombianas.

MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal de las especies *Cavendishia bracteata* Hoerold, *Gaultheria erecta* Vent, *Thibaudia floribunda* Kunth, *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm, *Bejaria resinosa* Mutis ex L. f. y *Disterigma alaternoides* (Kunth) Nied, fue colectado en la vereda San Francisco del páramo de Cruz Verde, vía Bogotá-Choachí en el Departamento de Cundinamarca, Colombia. Un espécimen de cada muestra reposa en el herbario del Jardín Botánico de Bogotá "José Celestino Mutis", con los números de colección HL 3036, 3058, 3088, 3094 y 4015 al respecto.

Obtención de extractos

El material vegetal recolectado se separó en los diferentes órganos: hojas, frutos y flores. Se limpió y se secó en un horno con convección de aire a 40 °C durante 24 h. El material seco y molido se sometió a extracción por maceración con etanol del 96 % a temperatura ambiente. El extracto etanólico resultante se concentró y eliminó el solvente por destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio.

Tamizaje fitoquímico preliminar

Se tomaron 2 g de los extractos etanólicos de hojas, flores y frutos de las seis especies y se realizaron las pruebas cualitativas, se siguió un protocolo y se modificó basado en diferentes metodologías propuestas por diferentes autores.⁸⁻¹⁰ Para corroborar la presencia de grupos de metabolitos secundarios se usaron controles positivos y negativos en cada ensayo.

Determinación de fenoles totales

El contenido total de fenoles en el extracto etanólico fue determinado espectrofotométricamente de acuerdo al método *Follin-Ciocalteu*, se usó como patrón una solución stock 200 mg/L ácido gálico (reactivo analítico). Para el análisis de las muestras, se pesó 1 mg de la muestra y se disolvió en 1 mL de metanol, luego se aforó a 10 mL con agua destilada, se obtuvo una solución de 100 mg/L. Posterior, se tomó una alícuota de 1 mL de esta solución y se le agregó 5 mL del reactivo Follin-Ciocalteu (diluído en proporción 1:10 con agua destilada), se dejó en reposo 5 minutos y se le agregó 4 mL de una solución 7,5 % de carbonato de sodio; la solución se agitó y se guardó en un lugar oscuro a temperatura ambiente por 2 h.¹¹⁻¹³

Los ensayos se hicieron por triplicado y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico por g de extracto (mg GA/g extracto).

Determinación de flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se determinó de acuerdo al método colorimétrico de cloruro de aluminio, se usó como patrón una solución stock de quercetina (0,5 mg/mL). Para las muestras, se pesaron 5 mg y se disolvieron en 1 mL de agua o metanol, después se diluyó 1:10. A cada una de las muestras y patrones preparados se les adicionó 1250 µL de agua destilada, 75 µL de NaNO₂ al 5 %, se dejó reposar por 6 minutos, se adicionaron 150 µL de AlCl₃ al 10 % y se dejó reposar otros 5 minutos, a continuación se adicionaron 500 µL de NaOH 1M y en lo final se completó el volumen de cada una de las muestras a 2,5 mL con agua destilada.¹⁴

Los ensayos se hicieron por triplicado y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm. La concentración total de flavonoides se calculó a partir de la curva de calibración y los resultados se expresaron en mg de quercetina por g de extracto (mg de Q/g extracto).

Actividad antioxidante (DPPH)

La capacidad antioxidante medida como la capacidad captadora de radicales libres se determinó cualitativamente por el método DPPH. El ensayo fue estandarizado y se implementó por triplicado, se tomó una alícuota de 100 µl de solución en metanol de la muestra a tres concentraciones distintas (150, 100 y 50 mg/L), después se adicionaron 900 µl de DPPH en solución metanólica 60 mg/L; una vez mezclados, se leyó su absorbancia de inmediato a 517 nm en un espectrofotómetro UV-VIS, la actividad fue monitoreada cada minuto hasta que la disminución de la absorbancia se estabilizó. Como control positivo, se utilizaron ácido ascórbico y ácido gálico en solución metanólica 100, 50 y 10 mg/L.¹⁵⁻¹⁷

El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición del DPPH} = \frac{(A_{\text{Blanco}} - A_{\text{Muestra}})}{A_{\text{Blanco}}} * 100)$$

A es la absorbancia.

Una vez que se determina el valor del porcentaje de inhibición de cada una de las concentraciones, se procede a realizar una regresión lineal con dichos valores, de esta forma, se obtuvo la ecuación de la forma:

$$Y = a + bX$$

Para calcular la IC₅₀ se debe remplazar, el valor correspondiente al 50 % de inhibición del DPPH en Y, obteniéndose en X la concentración de antioxidante necesaria para inhibir en un 50 % el DPPH.

Evaluación de la toxicidad

Para el ensayo de toxicidad se usó el modelo de letalidad en *A. salina* de acuerdo con el protocolo sugerido por *McLaughlin y colaboradores*.¹⁸ Los huevos de *A. salina* se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 28 °C en un medio de cultivo de sal marina a una concentración de 38 g/L. Los ensayos se realizaron por triplicado empleando 10 nauplios por pozo, los cuales se expusieron a concentraciones de 1 000, 500, 250, 100 y 10 mg/mL de extractos. Al cabo de 24 h se hicieron las lecturas, y se registró el número de sobrevivientes en cada pozo. Los datos obtenidos se procesaron con el programa estadístico "*Epa probit analysisprogram*" para determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) y un rango de confianza de 95 %.

RESULTADOS

Rendimientos de extracción

Los rendimientos de extracción fueron variables en todos los órganos de las especies de estudio y se encuentran entre 12 y 53 %. Los mayores se presentaron en la obtención de extractos de frutos y flores, lo que indica una mayor cantidad de metabolitos secundarios solubles en etanol (tabla 1).

Tamizaje fitoquímico preliminar

En la tabla 2 se resumen los resultados del análisis fitoquímico preliminar para los 15 extractos de las seis especies, objeto de estudio, el signo (+) es para las sustancias que están presentes en el extracto, mientras que el signo (-) significa que están ausentes.

Por medio del análisis cualitativo se determinó la presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios en los extractos de hojas, flores y frutos de las seis especies de la familia *Ericaceae*. Todas las especies evidenciaron pruebas positivas para fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, esteroides y quinonas. Los metabolitos más abundantes en todos los extractos resultaron ser los fenoles y los flavonoides. Los extractos de frutos y flores de las diferentes especies mostraron la presencia de antocianinas y la ausencia de quinonas. Las antocianinas son los metabolitos responsables de los colores morados y rojos, característicos de algunas flores y de los frutos maduros en especies de *ericáceas*.

Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

En la tabla 3 se reportan los resultados de la cuantificación de fenoles y flavonoides en los diferentes extractos de estudio. El contenido de compuestos fenólicos en plantas, podría clasificarse en tres categorías:

- Bajo (entre 1-10)
- Medio (entre 11-40)
- Alto con más de 40 mg de AG/g de extracto.¹¹

De acuerdo con lo anterior es posible decir que todos los extractos analizados, excepto el de frutos verdes de *C. bracteata* poseen altas concentraciones de fenoles totales. Todos los extractos evidenciaron la presencia de flavonoides por el método colorimétrico de *Liu*.

Tabla 1. Rendimientos de obtención de extractos etanólicos

Especie	Órgano	Peso del material vegetal seco (g)	Peso del extracto seco (g)	% Rendimiento
<i>C. bracteata</i>	Hojas	67,9	8,16	12,0
	Flores	9,5	2,49	26,2
	Frutos verdes	28,2	3,78	13,4
<i>M. rupestris</i>	Hojas	124,0	14,2	11,5
	Flores	76,4	7,23	9,6
	Frutos	8,1	2,48	30,6
<i>B. resinosa</i>	Hojas	56,2	8,10	14,4
	Flores	5,4	2,07	38,3
	Frutos	4,6	1,26	27,4
<i>G. erecta</i>	Hojas	55,0	7,6	13,8
	Flores	12,9	2,60	20,2
	Frutos	3,8	2,02	53,2
<i>T. floribunda</i>	Hojas	67,6	7,98	11,8
	Flores	4,3	1,9	44,2
<i>D. alaternoides</i>	Hojas	42,7	7,01	16,4

Tabla 2. Resultados del tamizaje fitoquímico preliminar

METABOLITO	PRUEBA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Flavonoides	Shinoda	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	antocianidinas	-	+	+	-	+	+	+	-	+	++	+++	+++	-	+++	++	++
	Rosenhein	+	+	+	+	+	+	++	-	+	+	++	++	+	++	++	++
Quinonas	Zn/HCl	++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-	+	++	++	++
	Zn/NaOH	++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-	+	++	++	++
	Borträger-Kraus	++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-	+	++	++	++
Taninos	FeCl ₃	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	++
	Gelatina-sal	+	+	+	++	+	++	++	+	+	+	++	++	++	+	++	+
Saponinas	Espuma Rosenthaler	++	++	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
Cardiotónicos	Baljet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Antrona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	Erich	++	++	-	++	+	+	++	++	+	++	++	++	+	+	+	+
	Fluorescencia	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+
Esteroides	Salkowski	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	Liebermman-Burchard	++	++	+	++	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	+	++
	VAO	++	++	+	++	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	+	+
Alcaloides	Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Valser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C. bracteata: 1 hojas, 2 flores y 3 frutos verdes.
M. rupestris: 4 hojas, 5 flores y 6 frutos verdes.
B. resinosa: 7 hojas, 8 flores y 9 frutos.
G. erecta: 10 hojas, 11 flores y 12 frutos.
T. floribunda: 13 hojas, 14 flores.
D. alaternoides: 15 hojas.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada por el método de captación de radicales DPPH y fue expresada como actividad antioxidante equivalente al ácido ascórbico mg/L (VCEAC). El porcentaje de inhibición indica la capacidad del antioxidante para neutralizar el radical libre DPPH a las concentraciones y condiciones específicas, entre más alto el porcentaje, mayor es su potencial como antioxidante. De forma complementaria el valor IC₅₀ indica la concentración del antioxidante necesaria para neutralizar la mitad de la concentración del radical libre DPPH, por lo tanto a menor IC₅₀ mayor poder del antioxidante.^{19,20} De acuerdo a lo anterior es posible observar que los extractos de hojas de todas las especies evaluadas que mostraron porcentajes de inhibición superiores al 60 % y CI₅₀ inferiores a 100 ppm son promisorias en el ensayo de actividad antioxidante por captación de radicales (tabla 4).

Tabla 3. Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos etanolicos

Especie	Órgano	mg de AG/g de extracto	mg de Q/g de extracto
<i>C. bracteata</i>	Hojas	205,6	107,0
	Flores	213,3	60,7
	Frutos verdes	24,4	31,0
<i>M. rupestris</i>	Hojas	202,2	116,7
	Flores	41,1	81,3
	Frutos	68,9	23,7
<i>B. resinosa</i>	Hojas	142,2	88,3
	Flores	44,4	37,0
	Frutos	47,8	20,7
<i>G. erecta</i>	Hojas	230,0	143,7
	Flores	271,1	151,3
	Frutos	105,6	90,7
<i>T. floribunda</i>	Hojas	237,8	98,0
	Flores	158,9	71,0
<i>D. alaternoides</i>	Hojas	125,6	89,7

Tabla 4. Actividad captadora de radicales DPPH de los extractos de seis especies de *Ericaceas*

Especie	Muestra	% Inhibición DPPH (100 mg muestra/L)	IC ₅₀ * VCEAC (mg/L)
<i>C. bracteata</i>	Hojas	71,14	62,88± 2,01
	Flores	46,39	175,12± 10,51
	Frutos verdes	10,21	806,44± 65,75
<i>M. rupestris</i>	Hojas	64,15	88,66 ± 4,45
	Flores	22,13	282,84± 26,34
	Frutos verdes	12,03	546,60± 88,24
<i>B. resinosa</i>	Hojas	18,38	372,84± 10,61
	Flores	10,61	588,44± 48,35
	Frutos	10,01	859,58± 55,67
<i>G. erecta</i>	Hojas	86,34	50,61 ± 1,46
	Flores	78,66	84,76 ± 3,01
	Frutos	16,38	203,077± 8,42
<i>T. floribunda</i>	Hojas	61,45	69,46± 1,89
	Flores	44,280	235,705± 3,18
<i>D. alaternoides</i>	Hojas	71,753	90,86 ± 2,60
	Ácido ascórbico	86,254	52,463± 1,52
	Ácido gálico	94,114	43,757± 1,24

*Media de tres determinaciones +/- desviación estándar.

Valores con la misma letra como superíndice no son significativamente diferentes (p> 0,05).

Evaluación de la toxicidad

En la tabla 5 se reportan las concentraciones letales cincuenta calculadas para los extractos de las especies de estudio, se empleó el método estadístico EPA probit.

Tabla 5. CL₅₀ y CL₉₉ calculadas por el método Probit

Especie	Órgano	CL ₅₀ ppm
<i>C. bracteata</i>	Hojas	448
	Flores	754
	Frutos verdes	708
<i>M. rupestris</i>	Hojas	425
	Flores	566
	Frutos	>1000
<i>G. erecta</i>	Hojas	229
	Flores	300
	Frutos	>1000
<i>B. recinosa</i>	Hojas	22
	Flores	277
	Frutos	304
<i>T. floribunda</i>	Hojas	307
	Flores	173
<i>D. alaternoides</i>	Hojas	196

En el ensayo de toxicidad en *Artemia salina*, valores entre 100 y 250 µg/mL son considerados de toxicidad media, entre 250 y 500 µg/mL toxicidad baja y superiores a 500 µg/mL no tóxicos. Los extractos que presentan CL₅₀ inferiores a 100 µg/mL son considerados tóxicos aunque los extractos de mayor toxicidad presentan valores desde 1-10 µg/mL.²¹ De acuerdo, con la escala de toxicidad es posible ver que la mayoría de los extractos analizados poseen toxicidades bajas o moderadas. Los extractos de frutos de *M. rupestris* y *G. erecta* poseen CL₅₀ superiores a 1000 ppm, a la mayor concentración ensayada no afectaron a la mitad de la población del microcrustáceo. Los extractos de hojas de *G. erecta* y *D. alaternoides* y flores de *T. floribunda* presentaron toxicidades medias con CL₅₀ de 229, 173 y 196 ppm.

DISCUSIÓN

La extracción de los diferentes órganos de las especies de estudio se realizó de forma exhaustiva con el fin de determinar el rendimiento del proceso. Se pudo observar que las flores y frutos de las especies de estudio evidenciaron mayor efectividad en la extracción con etanol con rendimientos superiores a los 26 % comparados con las hojas de todas las especies de estudio. Los rendimientos indican una mayor presencia de metabolitos solubles en etanol en flores y frutos, comparados con las hojas, en donde se presume una mayor presencia de celulosa y lignina que no se extraen con el solvente empleado.²²

Por medio del tamizaje fitoquímico preliminar fue posible determinar la presencia de metabolitos secundarios que se caracterizan por poseer un núcleo fenólico como: flavonoides, antocianinas, taninos y derivados del ácido benzoico. Los metabolitos más abundantes en todos los extractos resultaron ser los flavonoides. Estos resultados son coherentes con los reportes químicos realizados en otras especies de la familia *Ericaceae* en donde se destaca la presencia de flavonoides responsables de una amplia gama de factores biológicos y actividades fisiológicas, en lo principal antioxidantes. La abundante presencia de los flavonoides en la familia *Ericaceae* los constituyen en marcadores quimio-taxonómicos.^{23,24}

Al tener en cuenta los resultados del tamizaje fitoquímico preliminar se realizó la cuantificación de fenoles y flavonoides con el fin de determinar su correlación con la capacidad antioxidante en extractos de seis especies colombianas de la familia *Ericaceae*. Por medio de la cuantificación de fenoles totales, y al emplear el método colorimétrico de *Folin* se determinó que los extractos de hojas poseen mayor contenido de este tipo de compuestos, respecto a los demás órganos de la planta (tabla 3). Lo anterior podría estar asociado a una mayor presencia de taninos, puesto que este tipo de compuestos son abundantes en las hojas de especies de esta familia.²⁵

Los frutos de la especie *C. bracteata* evidenciaron la menor concentración de fenoles, al comparar con las demás especies, esto puede tener relación con el estado de maduración de los frutos, debido a que los análisis se realizaron con frutos inmaduros. Para comprobar esta hipótesis debe realizarse un análisis de cuantificación que emplee frutos con diferentes estados de maduración; para ello debe hacerse un seguimiento al estado fenológico de la planta en un periodo mínimo de un año, de tal forma que se asegure que se cumpla por lo menos un ciclo de fructificación.

Al comparar los resultados obtenidos para la cuantificación de fenoles totales en las seis especies estudiadas con otras especies de la familia *Ericaceae*, se puede resaltar una mayor concentración en los extractos de hojas de las especies de estudio respecto a otras especies del género *Erica* como: *E. andevalensis* 37.15, *E. australis* 112.39 y *E. arborea* 81.37 mg de AG/g de extracto.²⁰ Estos resultados sugieren un importante potencial químico y biológico de las especies de *ericaceas* colombianas. Se tiene en cuenta que los fenoles son sustancias orgánicas muy amplias distribuidas en el reino vegetal, que se sintetizan para cumplir funciones de defensa, para dar propiedades de color, astringencia y "flavor" (sabor y aroma) y que han demostrado un amplio número de actividades biológicas antioxidante y antiinflamatoria.²¹⁻²⁴

Con el fin de determinar qué cantidad de los compuestos fenólicos poseen núcleos de tipo flavonoide se realizó la cuantificación por el método espectrofotométrico de *Liu*, que se basa en la capacidad que tienen los hidroxilos fenólicos sobre el núcleo de flavonoide en posiciones orto, para quelatarse con el cloruro de aluminio anhidro ($AlCl_3$), se genera desplazamientos batocrómicos en el espectro UV.²⁶ La especie *G. erecta* presentó el mayor contenido de flavonoides comparado con las demás especies, seguida por *C. bracteata* y *T. floribunda* (tabla 3). En general los extractos de hojas mostraron mayor cantidad de flavonoides respecto a los demás órganos de la planta, sin embargo, en la especie *G. erecta* las flores poseen cantidades superiores que las hojas, este comportamiento se puede asociar a la presencia de pigmentos antocianicos y flavonoides glicosilados muy comunes en las flores de especies de esta familia.²⁷ Los altos contenidos de flavonoides en las especies de estudio les otorgan un importante valor agregado, se tiene en cuenta que este tipo de metabolitos se caracterizan por poseer diferentes espectros de actividades biológicas, en lo principal asociados a la capacidad antioxidante.²³

Al comparar los valores del contenido de fenoles con el de flavonoides en un gramo de extracto seco para las especies de estudio, se puede ver que el porcentaje de flavonoides varía entre un 30 y 80 %, depende del órgano de la especie. Los flavonoides representan un aproximado de 50 % del total de fenoles en las hojas de todas las especies y valores cercanos al 80 % en los frutos. La cantidad restante de compuestos fenólicos que no son de tipo flavonoide pueden ser, derivados de ácido benzoico, taninos, quinonas o cumarinas, de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar y la quimiotaxonomía de la familia *Ericaceae*.

En el ensayo de actividad antioxidante por captación de radicales DPPH, los extractos de hojas de *C. bracteata*, *M. rupestris*, *G. erecta*, *T. floribunda*, *D. alaternoides* y flores de *G. erecta* presentaron altos porcentajes de captación de radicales DPPH. Sin embargo sólo se consideran activos aquellos con IC_{50} cercanas a los controles (ácido ascórbico y ácido gálico), son los extractos más promisorios los extractos de hojas de *G. erecta*, *C. bracteata* y *T. floribunda*. Los extractos de frutos presentaron valores muy bajos, inhibición del radical y concentraciones inhibitorias altas, por lo que se consideran inactivos.

Al correlacionar la actividad antioxidante con el contenido de fenoles totales y flavonoides se observa que los extractos de hojas que poseen altas concentraciones de fenoles y flavonoides presentan en todos los casos las mejores actividades antioxidantes. En diferentes estudios realizados en extractos de la familia se ha observado correlaciones directas de las concentraciones de fenoles totales con las actividades captadoras de radicales libres.²⁸

Para el desarrollo de antioxidantes seguros y efectivos se requieren que estos tengan baja toxicidad. Para complementar la actividad antioxidante evidenciada por los tres extractos promisorios, se evaluó la actividad tóxica preliminar en el modelo de *A. salina* (tabla 5). Los frutos de las especies del género *Gaultheria* son considerados tóxicos por los pobladores de las áreas rurales del Distrito Capital y por lo tanto no son consumidos, los resultados preliminares de toxicidad indican que los frutos de la especie *G. erecta* poseen una toxicidad comparable con los frutos de la "uva camarona"; seguros para el consumo.

La toxicidad en hojas de diferentes especies del género *Gaultheria* se asocia a altas concentraciones de salicilato de metilo, que es un metabolito secundario típico de este género responsable de las actividades antiinflamatorias y antireumáticas, pero que en concentraciones muy altas posee toxicidad media.²⁹ El extracto de hojas de *B. resinosa* presentó una alta toxicidad con una CL₅₀ de 22 ppm, debido a que no existen muchos estudios químicos y de actividad biológica de especies de este género, no es posible asociar la toxicidad evidenciada a un tipo de metabolito específico, por lo tanto es recomendable realizar un estudio bio dirigido para el aislamiento de los principios activos de la especie.

Por medio del tamizaje fitoquímico preliminar y el estudio de la variabilidad de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de seis especies colombianas de la familia *Ericaceae* (*C. bracteata*, *G. erecta*, *T. floribunda*, *M. rupestris*, *B. resinosa* y *D. alaternoides*) fue posible determinar un alto contenido de compuestos de tipo fenólico y flavonoide en las hojas de todas las especies y bajas concentraciones en los frutos. Los extractos de hojas resultaron ser promisorios en el ensayo de actividad antioxidante por captación de radicales DPPH, mientras que los extractos de frutos fueron inactivos. Estos resultados sugieren una correlación directa de la concentración de fenoles totales con las actividad captadora de radicales libres.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Luteyn JL, Pedraza JP. Neotropical blueberries, the plant family Ericaceae. New York: The New York Botanical Garden;2007 [citado 20 Ago 2011]. Disponible en <http://www.nybg.org/bsci/res/lut2/>
2. Bruneton J. Plantas Tóxicas, vegetales peligrosos para el hombre y los animales. Zaragoza: Editorial Acribia S.A;2001.
3. Salinas NR, Betancur J. Las Ericáceas de la Vertiente Pacífica de Nariño, Colombia. 1^{ra} edición. Bogotá: Instituto de Investigación y Recursos Biológicos, Alexander von Humboldt; 2005.

4. Lu L, Fritsch PW, Cruz BC, Wang H, Li D. Reticulate evolution, cryptic species, and character convergence in the core East Asian clade of *Gaultheria* (*Ericaceae*). *Mol Phylogenet Evol.* 2010;57(1):364-79.
5. García BH. Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica. Tomo II. 2^{da} edición. Bogotá: Tercer Mundo Ediciones;1992.
6. Pawlowska AM, De Leo M, Braca A. Phenolics of *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *J Agric Food Chem.* 2006;54(26):10234-38.
7. Luillier A. Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (*Ericaceae*) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1160(1-2):13-20.
8. Sanabria A. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Bogotá: Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia;1983.
9. Bilbao M. Investigación fitoquímica. Pereira: Universidad del Quindío. Facultad de Ciencias Básicas y tecnológicas. Programa de Química de Productos Vegetales; 1994.
10. Merck E. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel. Darmstadt. R. F. Alemania: Merck;2000.
11. Stanojević L. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *Sensors.* 2009;9(7):5702-14.
12. Singleton L, Orthofer R, Lamuela R. Analysis of total phenolics by means of Folin-Ciocalteu reagent Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants. Part A. San Diego: Ed. Lester Packer. Academic Press;1999.
13. García NM. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Primer Verano de Introducción a la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro. 2007 [citado 12 Ago 2011]. Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava
14. Chlopicka J, Pasko P, Gorinstein S, Jedryas A, Zagrodzki P. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. *Int J Food Sci Technol.* 2012;46:548-55.
15. Sharma O, Bhat T. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 2009;113(4):1202-05.

16. Mishra K, Ojha H, Chaudhury N. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chem. 2012;130(4):1036-43.
17. Deng J, Cheng W, Yang G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using DPPH assay. Food Chem. 2011;125(4):1430-35.
18. Mclaughlin JL, Rogers LL. The use of biological assays to evaluate botanicals. Drug Inf J. 1998;32(2):513-24.
19. Márquez B, Fernández M, Córdoba F. Phenolic composition in *Erica sp.* Differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. Bioresour. Technol. 2009;100(1):446-51.
20. Valentao P. Antioxidante properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L) infusion against superoxide radical, hidroxi radical and hypochlorusnacid. J. Agric. Food Chem. 2002;50(1):4989-93.
21. Pisutthanan S, Plianbangchang P, Pisutthanan N, Ruanruay S, Muanrit O. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. Naresuan University Journal. 2004;12(2):13-8.
22. Hostettmann K, Gupta MP, Marston A, Ferreira E. Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. Colombia: Convenio Andrés Bello y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo;2008.
23. Oliviera I, Coelho V, Baltasar R, Pereira J. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. Food and Chem Toxicol. 2009;47(1):1507-11.
24. Orhan I, Küpeli E, Terzioğlu S, Yesilada E. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-*O*- β -D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. J of Ethnopharmacol. 2007;114(1):32-7.
25. Abreu OA, Cuéllar A, Prieto S. Fitoquímica del género *Vaccinium* (Ericaceae). Rev Cubana de Plantas Medicinales. 2008;13(3):1028-4796.
26. Markham K. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London-New York-Paris;1982.
27. Bennini B, Chulia AJ. Flavonol glycosides from *Erica cinérea*. J. nat. Prod. 1994;57(1):178-80.
28. Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 49(8):4076-82.

29. Huffman DW, Zasada JC, Stein WI. *Gaultheria L.* wintergreen. [citado 9 Ago 2011]. Disponible en: <http://www.nsl.fs.fed.us/F&G%20genera.pdf>

Recibido: 12 de noviembre de 2013.

Aprobado: 8 de febrero de 2015.

Erika Andrea Plazas González. Jardín Botánico "José Celestino Mutis". Bogotá, Colombia.
Correo electrónico: erikaandrea.plazasgonzalez@gmail.com