



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>



AT 2025-FFBB-033

CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título de **Informe final de tesis** es:

“Potencial antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

Presentado por:

SOLIS MARTINEZ KAROL ALPHA

Bachiller del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es **14%** por el cual se otorga el calificativo de:

APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Con Código de Matricula: 20142767

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.

Ica, 19 de mayo de 2025

.....
Dr. PEÑA GALINDO JULIO JOSE
DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”

VICERRECTORADO DE INVESTIGACION

Facultad de Farmacia y Bioquímica



**“Potencial antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas
de *Otholobium pubescens* “Hualhua”.**

Salud Pública y Conservación del Medio Ambiente

AUTOR

BACH. SOLIS MARTINEZ KAROL ALPHA

ICA-PERU

2025

DEDICATORIA

A Dios por haber permitido que llegase hasta esta etapa de mi vida profesional.

A mis padres, Luis y Patricia quienes han sido el ejemplo a seguir, además de ser mi sustento para llevar a cabo este logro en mi vida y poder formarme como una profesional, por lo cual les estoy eternamente agradecida.

A mis abuelos, por todo su amor y por motivarme a seguir adelante con sus consejos.

Y finalmente, a mi tía Lucy que en los momentos más difíciles de mi vida siempre estuvo a mi lado, nunca dudo de mi capacidad y siempre me incentivo a seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Quisiera comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a mi asesor de tesis Dr. Jorge A. Garcia Ceccarelli, cuya experiencia, paciencia y apoyo constante fueron fundamentales para la realización de este trabajo. Por haberme guiado en mi camino universitario con sus conocimientos profesionales.

Asimismo a todos mis docentes porque me brindaron sus enseñanzas y apoyo en todo momento.

Índice

Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. Introducción	9
II. Estrategia metodológica	25
2.1.1 Tipo de Investigación	25
2.1.2 Nivel de Investigación	25
2.1.3. Diseño de Investigación	25
2.2 Lugar de Investigación	25
2.3 Materiales de Trabajo	25
2.4. Hipótesis y variables	28
2.4.1. Hipótesis	28
2.4.2. Variables	29
2.5. Población, muestra y muestreo	30
2.6. Métodos, Técnicas y procedimiento de recolección de muestras	30
2.7. Técnicas y procesamiento de información	38
2.8. Técnicas de procesamiento, análisis e interpretación	39
2.9. Aspectos éticos	39
III. Resultados	40
IV. Discusión	48
V. Conclusiones	51
VI. Recomendaciones	52
VII. Referencias bibliográficas	53
VIII. Anexos	56

Índice de tablas

Tabla 1. Tipo de antioxidantes en el organismo	16
Tabla 2. Función de antioxidantes no enzimáticos	17
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de caracterización el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie <i>othobium pubescens</i> “hualhua”	36
Tabla 4. Determinación de Metabolitos Secundarios en el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie <i>othobium pubescens</i> “hualhua”	37
Tabla 5. Lectura de absorbancia de patrón de trolox por el método de DPPH	38
Tabla 6. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie <i>othobium pubescens</i> “hualhua” por el método DPPH	39
Tabla 7. Valores de absorbancia de las diluciones patrones de trolox por el método FRAP	40
Tabla 8. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie <i>othobium pubescens</i> “hualhua” por el método FRAP	41
Tabla 9. Lectura de absorbancias de las diluciones del patrón trolox por el método ABTS	42
Tabla 10. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie <i>othobium pubescens</i> “hualhua” por el método ABTS	43

Índice de figuras

Figura 1. <i>otholobium pubescens</i> “hualhua” en estado natural	13
Figura 2. Flores y hojas de la especie <i>otholobium pubescens</i> “hualhua”	14
Figura 3. Mapa de la provincia lugar de muestreo de la especie. Puquío	15
Figura 4. Estructura de los antioxidantes	18
Figura 5. Factores o condiciones en la generación de Radicales libres	19
Figura 6. Representación del estrés oxidativo	20
Figura 7. Correlación entre las concentraciones de trolox y el % de inhibición por el metodo radical DPPH	38
Figura 8. Correlación entre las soluciones del extracto etanólico de la especie <i>otholobium pubescens</i> y el porcentaje de inhibición por el metodo DPPH	39
Figura 9. Curva de calibración de soluciones de trolox para la determinación de la actividad antioxidante por FRAP	40
Figura 10. Correlación entre las soluciones del extracto etanólico de la especie <i>otholobium pubescens</i> y por método FRAP	41
Figura 11. Curva de calibración de soluciones de trolox para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS	42
Figura 12. Correlación entre la concentración del extracto etanólico de la especie <i>otholobium pubescens</i> y capacidad antioxidante equivalente de trolox como milimoles	43
Figura 13. Selección y secado de las flores de la especie <i>otholobium pubescens</i>	51
Figura 14. Macerando las flores de la especie <i>otholobium pubescens</i>	52
Figura 15. Filtración de la especie <i>otholobium pubescens</i>	53
Figura 16. Concentración de la especie <i>otholobium pubescens</i>	53
Figura 17. Extracto etanólico seco de <i>otholobium pubescens</i>	54
Figura 18. Fraccionamiento durante el screening	54
Figura 19. Constancia de la certificación botánica de la especie	55

RESUMEN

El uso de plantas medicinales ha sido común o se ha llevado a cabo desde tiempos ancestrales. Hoy en día, las plantas o productos medicinales con actividad antioxidante tienen una mayor demanda porque neutralizan el estrés oxidativo. El Perú cuenta con una gran variedad de flora nativa, especialmente en la región altoandina y selva tropical, donde muchas de las especies empleadas en la medicina tradicional no han sido investigadas. El objetivo de este estudio fue demostrar la actividad antioxidante de un extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *otholobium pubescens* “hualhua”, que se encuentra en la región altoandina de Sudamérica. La muestra fue recolectada en el distrito de Puquio, que se encuentra en la provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho. Utilizando etanol de 96° como solvente de extracción, se maceraron las partes aéreas para obtener el extracto. Se utilizó un tamizaje fotoquímico para identificar los metabolitos secundarios, que se identificaron mediante reacciones de coloración y/o precipitación. Los métodos DPPH, FRAP y ABTS se utilizaron para determinar la actividad antioxidante. Se identificó la presencia los metabolitos de flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides y taninos; los resultados de la actividad antioxidante se halló que por el método del radical libre DPPH se obtuvo un IC50 igual a 3,77 mg de extracto; por método de radical ABTS se encontró un valor 3,7mg es equivalente a 1mM de trolox y por método FRAP (reducción del ion férrico) se halló un valor 1,35 mg equivalente a 1 mM de trolox. Se concluye que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Otholobium pubescens* “Hualhua” exhibe una considerable actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la presencia de los metabolitos bioactivos determinados en el Screening.

Palabras clave: *Otholobium pubescens*, antioxidante, DPPH, FRAP, ABTS.

ABSTRACT

The use of medicinal plants has been common or has been carried out since ancient times. Today, medicinal plants or products with antioxidant activity are in greater demand because they neutralize oxidative stress. Peru has a wide variety of native flora, especially in the high Andean region and tropical rainforest, where many of the species used in traditional medicine have not been investigated. The objective of this study was to demonstrate the antioxidant activity of an ethanolic extract of the aerial parts of the species *Otholobium pubescens* "hualhua," found in the high Andean region of South America. The sample was collected in the district of Puquio, located in the province of Lucanas, department of Ayacucho. Using 96° ethanol as the extraction solvent, the aerial parts were macerated to obtain the extract. Photochemical screening was used to identify secondary metabolites, which were identified by coloration and/or precipitation reactions. DPPH, FRAP, and ABTS methods were used to determine antioxidant activity. The presence of flavonoid metabolites, phenolic compounds, alkaloids, and tannins was identified; the results of antioxidant activity showed that the DPPH free radical method obtained an IC₅₀ equal to 3.77 mg of extract; the ABTS radical method found a value of 3.7 mg equivalent to 1 mM of trolox; and the FRAP method (ferric ion reduction) found a value of 1.35 mg equivalent to 1 mM of trolox. It is concluded that the ethanolic extract of the aerial parts of *Otholobium pubescens* "Hualhua" exhibits considerable antioxidant activity, which could be related to the presence of bioactive metabolites determined in the screening.

Keywords: *otholobium pubescens*, antioxidant, DPPH, FRAC, ABTS

I. INTRODUCCION

Desde tiempos antiguos en todos los países, regiones o zonas del planeta existe una extensa variedad de especies vegetales las cuales han sido usadas desde épocas antiguas. Un número o cantidad significativa de estas plantas presentan propiedades farmacológicas, las mismas que en el pasado fueron utilizadas por personas a las cuales se les atribuía ciertos poderes o pactos con seres extraños del inframundo o del mundo de los muertos; estos personajes usaban estas especies vegetales, huesos u otros para ser utilizados como tratamiento eficaz para combatir malestares, dolencias o enfermedades, y así poder ayudar a los habitantes de su comarca o caserío e incluso ayudando a personas de las zonas cercanas.

La población de nuestro país utiliza plantas medicinales principalmente por razones económicas, por ser en muchos casos de fácil acceso y también por costumbres; además debido a que muchas de estas plantas crecen o se desarrollan de manera natural en muchos lugares o regiones de nuestro país, principalmente en las quebradas o serranías donde existen en un número significativo.

A la fecha existe una ardua búsqueda de alternativas sobre el uso de antioxidantes naturales, por eso en los últimos años o décadas se viene realizando una gran cantidad de estudios o investigaciones en este campo con el objetivo de encontrar y emplear antioxidantes en diferentes ámbitos, con la finalidad de prevenir, aliviar y/o curar principalmente procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres en nuestro organismo; ya que estos probablemente sean los causantes de un sin número de enfermedades las mismas que con el pasar del tiempo van tomando mayor incidencia en los padecimientos de la población de nuestro país y a nivel mundial.

Por la información revisada en diferentes bases de datos y ante lo manifestado anteriormente nos sirve de motivación para buscar una comprobación y actualización del conocimiento acerca de los usos de la especie vegetal conocida comúnmente con el nombre vulgar de “hualhua”, además esperamos contribuir y cooperar con la difusión de las propiedades

medicinales de la misma lo cual a su vez puede contribuir en el desarrollo o beneficio de los pobladores de diversas comunidades; ante esta situación planteamos que se efectuó la presente investigación “Potencial antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

1.1 Descripción de la realidad problemática.

Actual la demanda de consumo de alimentos funcionales se ha incrementado, ya sea porque que además de aportar nutrientes, contribuyen en la prevención de distintas enfermedades degenerativas como cáncer, obesidad, diabetes, hipertensión arterial entre otras. (1, 2)

Estas enfermedades degenerativas comunmente son originadas por diversos factores tales como el estilo de vida, la dieta, exposición a la radiación y algunos medicamentos que condicen al estrés oxidativo. Estos factores pueden ocasionar los radicales libres a través de las reacciones bioquímicas de oxido-reducción que suceden en el proceso del metabolismo celular.(3)

Se concibe como radicales libres a las diversas moléculas cuya estructura química presenta un electrón no apareado o desapareado en su orbital externo, lo que le proporciona una configuración espacial que origina una alta inestabilidad.(4)

El aumento de estas enfermedades crónicas-degenerativas, es un gran inconveniente para la salud de la población; por ello, se está en la constante búsqueda de diversas alternativas; las cuales involucra el estudio de plantas y alimentos que contengan sustancias capaces de inhibir la degradación oxidativa. (2)

Los antioxidantes poseen la capacidad de contener esta degradación oxidativa; los más empleados fueron los antioxidantes sintéticos; sin embargo, vistos los diversos estudios que han demostrado que poseen efectos perjudiciales para la salud, sea incrementado en el interés en la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes naturales.

1.2 Antecedentes de la Investigación

- Carrasco L. Chuman M.- En su investigación: “*Características físico – químicas de las drogas y del extracto acuoso de hojas de otholobium pubescens procedentes del caserío atema*” (2012), las características fisicoquímicas de la droga fueron: la humedad residual 9,99%, sustancias solubles 7,41%, cenizas totales 6,82%, cenizas solubles en agua 4,27% y las cenizas insolubles en ácido clorhídrico 0,30%. Las características que presento el extracto acuoso fueron: sabor dulce, color verde petróleo, olor suigéneris, consistencia líquida, densidad 0,999g/ml, índice de refracción 1,365, punto de fusión 255°C, pH 8,04, punto de ebullición 98°C, solubilidad en etanol a 90% y 95% y índice de acidez 1,79%.(5)
- Quilla N.- En su investigación: “*Actividad antiespasmódica del extracto hidroalcohólico de las hojas de otholobium pubescens (poir.) J.W. grimes “wallwa”*” (2013), demostraron que presenta actividad antiespasmódica, los metabolitos secundarios presentes son: alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, compuestos terpénicos, cumarinas, aminoácidos y catequinas, el extracto hidroalcohólico de las hojas al 15%, 20% y 30% tiene una menor actividad antiespasmódica comparada con la atropina. (6)
- Bustamante J. Paredes A.. En su investigación: “*Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico de otholobium pubescens en úlceras gástricas inducidas por indometacina en rattus norvegicus holtzman*” (2019), presentó efecto antiulceroso en *rattus norvegicus holtzman*, con úlceras inducidas por la indometacina. Se evaluó el efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico con dosis de 200mg/kg y 400mg/kg, de peso, en relación a la ranitidina, observándose que no presentaron diferencias estadísticas significativas entre estos grupos a dosis ensayadas (200mg/kg y 400mg/kg) con la ranitidina, concluyendo que la actividad antiulcerosa a diferentes dosis es casi análoga en comparación con la ranitidina. (7)

1.3 Justificación e Importancia.

En los últimos años se mencionan mucho los beneficios que los antioxidantes ofrecen a las personas, existen varios estudios y reseñas en los cuales aseguran que los alimentos que contiene antioxidantes están considerados alimentos funcionales que ayudan a controlar los radicales libres o el estrés oxidativo de las células⁷. Incluso se considera que el consumo de ciertos alimentos, frutas y vegetales ayudan o brindan beneficios a la salud desde el punto de vista de su capacidad o poder antioxidante.

En el Distrito de Puquio, Región Ayacucho, se utiliza *Otholobium pubescens*, sus partes

aéreas en base a los conocimientos ancestrales y/o tradicionales transmitidos a través de las generaciones.

Existe escaso conocimiento sobre las propiedades medicinales o terapéuticas de las partes aéreas de *Otholobium pubescens*, por lo cual se decidió investigar el potencial antioxidante de esta especie vegetal, tomando como base estudios de la familia o especie e incluso diferentes actividades realizadas, las mismas que servirán como punto de partida o fuente para fortalecer las bases científicas para este y otros futuros estudios.

El presente trabajo busca recopilar información que ayude a corroborar, comprobar o respaldar el uso de esta especie vegetal en la medicina tradicional; más aún hoy en día donde muchas enfermedades están relacionadas con el estrés oxidativo y la búsqueda de los seres humanos por paliar o aliviar enfermedades consumiendo productos con actividad antioxidante comprobada.

1.4 Objetivos de la Investigación.

a) Objetivo General:

- Evaluar el potencial antioxidante en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

b) Objetivos Específicos:

- Determinar los posibles grupos de componentes químicos responsables del potencial antioxidante en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Otholobium pubescens* “Hualhua”.
- Determinar el potencial antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Otholobium pubescens* “Hualhua” por los métodos de ABTS, FRAP y DPPH.
- Identificar el método antioxidante que presenta mayor potencial en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

1.5 Marco Teórico

1.5.1 *Otholobium pubescens* “hualhua”

Descripción de *Otholobium pubescens* “hualhua”:

Arbusto erguido, largamente ramificado que puede crecer alrededor de 1.5 metros a 3 metros de altura; presenta tallo aéreo, erguido semileñoso, densamente pubescente de color blanquecino. Hojas compuestas trifoliadas, aromáticas, las cuales poseen folíolos oblongo-lanceolados de borde entero, de 5 a 8 cm de longitud por 1.5 a 2.5 cm de ancho, con largos tricomas pubescente en el nervio de la cara inferior.

Flores lila con inflorescencia axilar alargada de 10 a 15 cm de longitud, racimosa. Fruto legumbre pequeña, oval, acuminado e indehiscente, que presenta 1 semilla. La reproducción puede hacerse mediante el sembrado de semillas durante el verano o por estacas en la época otoñal; tiene desarrollo acelerado de contar con la correcta condición de humedad. (6)



Figura 1. *Otholobium pubescens* “hualhua” en estado natural

Taxonomía de *Otholobium pubescens* “Hualhua”:

La especie fue identificada en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con vaucher N°127-USM-2018, de acuerdo al sistema de clasificación de Cronquist (1988). *otholobium pubescens* “hualhua”; inicialmente se realizó la clasificación por el Dr. blgo, David Máximo Miranda Huamán, docente de la Facultad de Ciencias Biológicas de la universidad, profesional autorizado y reconocido por su Facultad. Se tiene la siguiente posición taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Faboideae

Género: *Otholobium*

Especie: *otholobium pubescens* (Poir) J.W.Grimes

Nombre común: hualhua

Sinonimia

- *Hoita hirsuta* Rusby
- *Psoralea featherstonei* J.F. Macbr.
- *Hoita versicolor* Rusby
- *Psoralea pubescens* Poir
- *Psoralea lasiostachys* Vogel
- *Psoralea marginata* Meyen
- *Psoralea potens* J.F. Macbr.

Fuente: Colombia.inaturalist.org/taxa/717493-Otholobium-pubescens



Figura 2. Flor y hoja de la *Otholobium pubescens* “hualhua”

Distribución de *Otholobium pubescens* “hualhua”:

Es una hierba de estado silvestre, que se halla en las zonas de los andes del Perú, crece en las 10 diferentes zonas altoandinas que presenta el país, como en matorrales, en las quebradas y en los bordes de las vías y carreteras. Su florescencia se produce en los meses de junio a agosto, se les halla en varias regiones del Perú desde la sierra central y sur del país, hasta Bolivia, Chile y Argentina (6)



Figura 3. Distrito de Puquio en la provincia de Lucanas

Usos tradicionales de *Otholobium pubescens* “hualhua”.

La compilación de datos del uso tradicional y popular de esta especie refieren que se utiliza como digestivo, hipoglicemiante, antiespasmódico, antidiarreico, antibacteriano y vermífugo, empleándose la especie entera en forma de infusión o cocimiento.

También, se le atribuyen propiedades antiinflamatoria, catártica, astringente, hemostática y antiinfecciosa, es usado para mejorar las afecciones digestivas, en particular para la diarrea; también ayuda para lavar las heridas y como antihelmíntico. (6)

1.5.2 Antioxidante

Son compuestos o sustancia que posee la capacidad de retrasar o prevenir la oxidación de un sustrato, considerando como sustrato o moléculas dianas a las proteínas, hidratos de carbono,

lípidos e incluso el ADN. Un antioxidante asimismo puede ser capaz de bloquear o inactivar los radicales libres, depurando y evitando el daño producido por la oxidación acumulada.

Tabla 1. Tipos de antioxidantes en el organismo

Exógenos	Endógenos No enzimáticos.
Vitamina E (VE)	Glutación. Coenzima Q
Vitamina C (VC)	Ácido tiótico.
Betacaroteno (BC)	Enzimáticos. Cofactor.
Flavonoides	Superóxidodismutasa (SOD), cobre, manganeso, zinc. Catalasa (CAT), hierro
Licopeno	Glutaciónperoxidasa (GPX) Selenio

Fuente: Mayor R. 2010 (<http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>)⁸

Beneficios que presentan los antioxidantes

Los antioxidantes brindan diversos beneficios para la salud, en lo relativo a la prevención de enfermedades o males que perturban la salud de las personas como: el cáncer de pulmones, enfermedades del corazón, cataratas, mal del Párkinson, envejecimiento, enfermedades autoinmunes, enfermedades degenerativas de los ojos, la piel y el cerebro. En el caso particular del cáncer se sostiene que, estos pueden impedir que surja, aunque se desconoce con certeza cómo. Ciertos mecanismos o vías de acción serían: Contribuyendo a contener las mutaciones liberadas por el agresión de los radicales libres. La adición del β caroteno ayudaría a inmovilizar las transformaciones malignas ocasionadas por los radicales libres, previniendo que éstos ataquen el material hereditario en las células.(10, 2)

TABLA 2	
Función de antioxidantes no enzimáticos	
Antioxidantes no enzimático	Función Fisiológica
Vitamina E	Principal antioxidante presente en la membrana celular
Vitamina C	Efecto eliminador de radicales y recicla la vitamina E.
Ácido úrico	Su efecto es eliminar los radicales hidroxilo
Glutation	Tiene varios efectos en la defensa antioxidante celular.
Ácido lipoico	Antioxidante eficaz, y es un sustituto eficaz del glutatión.
Carotenoides	Antioxidante de lípidos
Bilirrubina	Producto del metabolismo del grupo hem de la hemoglobina y tiene un efecto antioxidante a nivel extracelular
Ubiquinonas	Derivado de quinonas lipídicas solubles, cuyas formas reducidas tienen efectos eficaces como antioxidantes

Fuente: Zamora 2007¹¹

1.5.3 Radicales Libres

Los radicales libres son especies muy reactivas que poseen un electrón no apareado; su tiempo de permanencia es muy breve, antes de interactuar con otra molécula a la cual pueden extraer o conceder un electrón para llegar conseguir la estabilidad. Esto, originan un radical nuevo a partir del sustrato con el cual han colisionado. La primordial forma en la cual se neutraliza un radical libre, y así dar termino a la reacción en cadena, es la reacción entre dos radicales libres, Por lo tanto los electrones desapareados de ambos se comparte formado un par en una de las moléculas iniciales. Este hecho es extraño, por el muy breve tiempo de vida media que posee un radical individual y las bajas concentraciones en que se encuentran los radicales libres en los tejidos del organismo. Los radicales libres más perjudiciales para los sistemas biológicos, son aquellos derivados del oxígeno (designados comúnmente como especies reactivas de oxígeno EROs), en especial hidroxilo, superóxido y perhidroxilo. El detrimento en el tejido originado por los radicales de oxígeno suelen denominarse daño

oxidativo. (13)

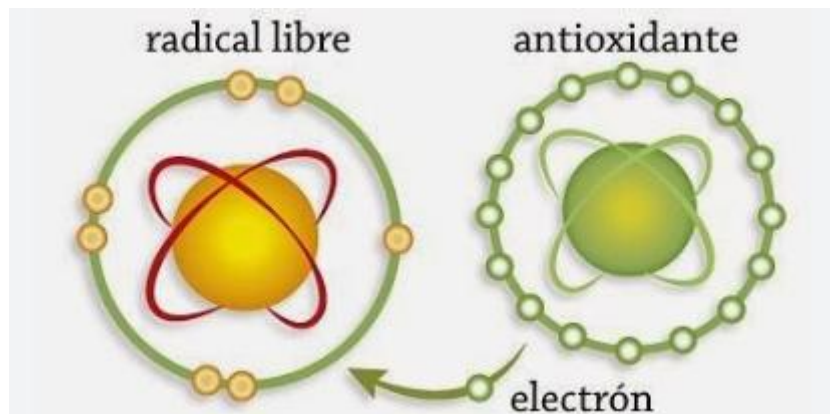


Figura 4. Estructura representativa de antioxidante

Las EROs.- son radicales libres que proceden de una molécula de oxígeno (O_2) que sufre una reducción química parcial. En este espectro de compuestos se consideran los peróxidos de hidrógeno (H_2O_2), ocasionados cuando el Oxígeno es reducido con dos electrones, y las diversas especies reactivas del oxígeno, involucran a los superóxidos y al radical hidroxilo ($OH\cdot$). (2)

Las EROs que produce en el organismo desempeñan un papel importante e indiscutible en los múltiples procesos fisiológicos habituales a nivel celular; pero asimismo, un incremento pueden provocar efectos tóxicos. Las EROs son consecuencias del propio metabolismo y son esenciales en el proceso de obtención de energía, en el proceso fagocitario y la biosíntesis de los compuestos biológicamente esenciales que son procesos fundamentales intrínsecos del sistema inmunológico. También, desarrollan un rol primordial en la transducción de señales, es esencial para las interacciones y función de las células. En los últimos años se ha incrementado las pruebas que señalan que las EROs logran ser las responsables de distintos padecimientos, enfermedades coronarias, el envejecimiento e incluso del cáncer. El ataque del radical hidroxilo sobre a las grasas insaturadas es la torrente más escrupuloso de daño celular a nivel del ADN, inducido por radicales libres. (13)

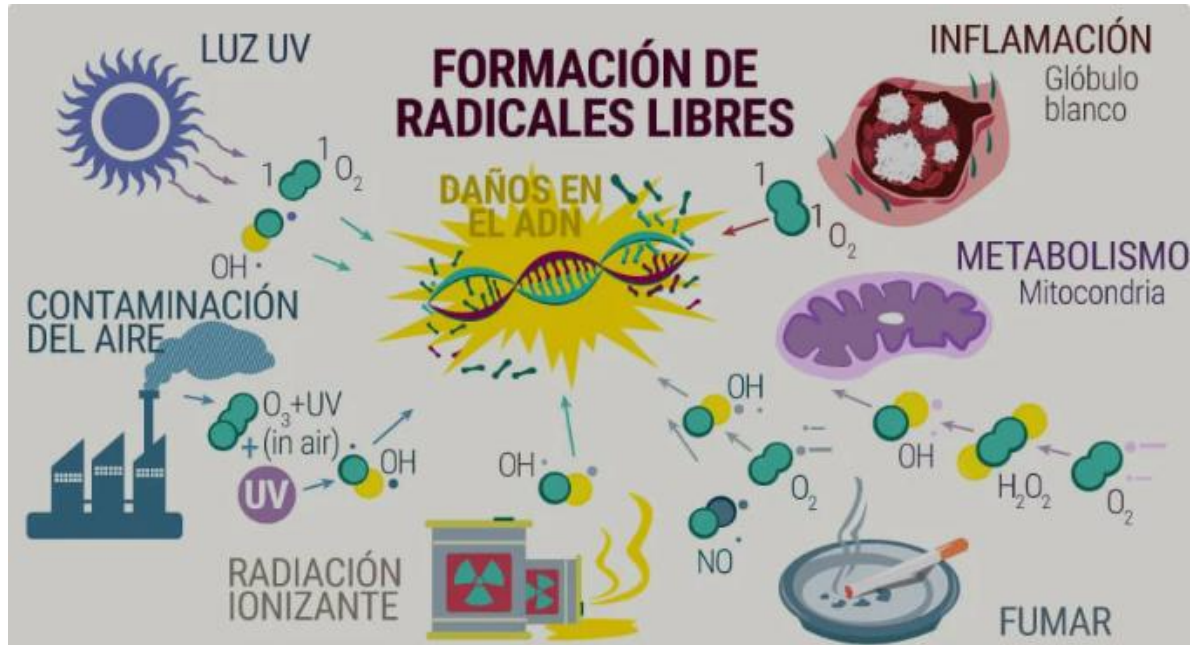


Figura 5. Factores o condiciones en la formación de radicales libres.

1.5.5 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es un desequilibrio originado cuando diversos procesos patológicos o ciertas condiciones particulares como el envejecimiento incrementan la producción de EROs. En este desequilibrio existen múltiples factores de crecimiento, citosinas, así como también ciertas enzimas entre la que destaca la NADPH oxidasa que forman EROs como agentes mediadores del proceso de señalización. El estrés oxidativo está asociado con los procesos de oxidación/reducción en los residuos de cisteína a nivel de grupos sulfhidricos (-SH), en algunos espacios catalíticos de ciertas proteínas que se intervienen como detectoras del estado redox. Estas proteínas afectan su estructura conformacional al oxidar o reducir los grupos sulfhídricos (-SH) presentes y cambiar -S-S-, por lo se conseguirían activar algunas rutas de señalización o activar algunos factores de transcripción que se liberan y son capaces de inducir translocación a nivel nuclear. (14)



Figura 6. Representación del estrés oxidativo

Fuente: <https://www.institutovalencianodeozonoterapia.com/estres-oxidativo/>

II. ESTRATEGIA METODOLOGICA

2.1 Tipo, Nivel y Diseño de la Investigación

2.1.1 Tipo de Investigación:

Básica.- Porque permite la adquisición de conocimientos fundamentales sobre la especie en estudios

2.1.2 Nivel de Investigación:

Descriptivo – Explicativo.- nos permite describir las condiciones en la cual se encuentra la especie, y los procesos para adquisición de los conocimientos básicos y explicar los resultados obtenidos en relación a la variables estudiadas

2.1.3 Diseño de Investigación:

Analítico.- porque se realizaron determinaciones o análisis, en base a procedimientos estandarizados que nos permitió obtener resultados confiables

2.2 Lugar de Investigación:

Facultad de Farmacia y Bioquímica, departamento de Ciencias Químicas en la Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

2.3 Materiales de Trabajo

2.3.1 Materiales de Laboratorio:

- Matraces Erlenmeyer
- Balones
- Probetas 50 ml, 100 ml y 1000ml
- Agitadores de vidrio
- Fiolas

- Vasos de precipitado
- Placa petri
- Crisoles
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Vasos beaker
- Espátulas de metal
- Pinzas metálicas
- Embudos
- Luna de reloj
- Micropipetas automáticas de 100uL
- Micropipetas automáticas de 1000uL
- puntas o tips para las micropipetas
- Pipetas de 1 ml, 2 ml y 5 ml
- Propipetas
- Peras de decantación
- Placa con excavación para reacción
- Soporte Universal
- Pizetas
- Aro de Soporte
- Embudos

2.3.2 Equipos de Laboratorio:

- Balanza Analítica
- Balanza de precisión
- Estufa
- PHmetro
- Refractómetro
- Mufla
- Baño ultrasonido
- Evaporador rotatorio
- Espectrofotómetro UV-Visible

2.3.3 Reactivos

- Agua destilada
- Alcohol 70°
- Etanol 96°
- Nihidrina
- Acetona
- Limadura de magnesio
- Tricloruro férrico
- Diclorometano
- Ácido Clorhídrico
- Sulfato de sodio anhidro
- Hidróxido de Amonio 25%
- Ácido acético glacial
- Anhidrido acético

- Reactivo de Dragenffor
- Yodo
- Yoduro de potasio
- Ácido pícrico
- Gelatina
- Cloruro de sodio
- 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH)
- 2,4,6- tripiridyl-s-triazida (TPTZ)
- Acetato de sodio
- Trolox Hoffmann
- Persulfato de sodio
- ABTS
- Ácido sulfúrico

2.3.4 Otros

- Papel de filtro
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Papel Tisú
- Guantes
- Mascarillas
- Viales
- Tijeras
- Lapiceros
- Plumón marcador
- Lápiz
- frasco goteros

2.4 Hipótesis y Variables.

2.4.1 Hipótesis

a. General:

- El extracto etanólico de las partes aéreas de *Otholobium pubescens* “Hualhua” presenta un apreciable potencial antioxidante.

b. **Específicas:**

- Los grupos de componentes químicos responsables del potencial antioxidante del extracto etanólico *Otholobium pubescens* “Hualhua” podrían ser los flavonoides.
- El extracto etanólico de las partes aéreas de la planta *Otholobium pubescens* “Hualhua” presenta un apreciable potencial antioxidante por los tres métodos analizados.
- El método ABTS presentará mayor potencial antioxidante en el extracto etanólico de las partes aéreas de la planta *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

2.4.2 Variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA VALORATIVA
VARIABLE INDEPENDIENTE			
Extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Otholobium pubescens</i> "Hualhua"	Conceptual: El extracto etanólico es obtenido de la maceración de las partes aéreas secas, seguido de un proceso de filtrado para obtener el concentrado utilizando un evaporador rotatorio	-	-
	Operacional: <u>Estudio fitoquímico:</u> Reacciones de identificación de metabolitos secundarios: - Flavonoides. - Triterpenos. - Esteroides - Catequinas - Saponinas	- Cambio de coloración. - Formación de precipitado.	(+) Presencia (-) Ausencia
VARIABLE DEPENDIENTE			
Actividad antioxidante	Conceptual: La actividad Antioxidante tiene la capacidad de neutralizar los radicales libres de un compuesto.	-	-
	Operacional: Inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH).	Decoloración de la solución de DPPH	Concentración inhibitoria media IC 50
	Operacional: Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP).	Generación de una coloración azul	mM equivalentes Trolox/mL muestra.
	Operacional: Inhibición frente al radical 2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)	Decoloración de la solución del radical ABTS	mM equivalentes Trolox/mL muestra

2.5 Población y Muestra

2.5.1 Población:

La población del presente estudio estuvo constituida por la especie *Otholobium pubescens* “Hualhua” que crece en el Departamento de Ayacucho, provincia de Lucanas, distrito de Puquio.

2.5.2 Muestra:

La muestra fue una porción de las partes aéreas de la especie *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

2.6 Métodos, técnicas y procedimientos para la recolección de datos

2.6.1 Recolección y clasificación de la muestra vegetal

Las plantas de *Otholobium pubescens*, fueron colectada por la autora en una zona del Distrito de Puquio, Provincia de Lucanas, Región Ayacucho. La colección se efectuó en las primeras horas de la mañana, con la ayuda de tijeras y empleando bolsas de papel Kraft, para depositarlas y ser transportada a los ambientes de laboratorios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”.

Para la clasificación taxonómica, fue llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, dicha clasificación fue según el sistema Croquist (1988); además como se indicó en párrafos anteriores, también fue clasificada en la facultad de Biológica de nuestra Universidad por el Dr. Miranda Huamán David Máximo.

2.6.2 Tratamiento de la muestra vegetal

Una vez realizada la recolección, se seleccionó la muestra vegetal en buen estado, se procedió a la limpieza para eliminar los residuos de tierra, suciedad u otras materias. Posterior se procedió al secado a temperatura ambiente en un ambiente con buena ventilación y bajo sombra (laboratorio de química general). Luego las partes aéreas de la planta fueron fraccionadas manualmente hasta un tamaño adecuado.

2.6.3 Obtención del extracto etanólico

La planta seca y molida se empleó para la extracción con etanol 96° por un periodo de 15 días, con agitación frecuente interdiaria.

Posteriormente se procedió a llevar a cabo el filtrado del sobrenadante del macerado, efectuando la concentración en un evaporador rotatorio, para finalmente secado a temperatura menor a los 40 °C en una estufa.

2.6.4 Screening Fitoquímico:

El tamizaje o screening fitoquímico es la fase inicial de toda investigación fitoquímica, lo que nos lleva a identificar cualitativamente los principales grupos químicos de los metabolitos presentes en los extractos de las especies vegetales o en las plantas mismas. Después de esto, podemos proceder a la extracción y/o fraccionamiento de las plantas para aislar y estudiar los grupos más relevantes. El tamizaje fitoquímico implica la extracción de metabolitos de medicamentos o plantas con solventes adecuados, seguido de reacciones de coloración y precipitación para permitir su identificación. Estos deberían permitir una evaluación o identificación rápida, con reacciones sensibles y reproducibles.

(15)

Obtención de Fracciones

Se tomaron 600 g de las partes aéreas secas y pulverizadas de *Otholobium pubescens* “Hualhua” se adicionó alcohol al 96 % y se macero, con agitación periódica para optimizar la extracción de los metabolitos primarios y secundarios, se filtró y luego se utilizó un evaporador rotario para obtener un extracto seco. Se dividió una porción a la que se le llamo **Fracción A**.

Luego se extraerá con HCl al 1% (2x20 mL), se filtró y se obtuvieron dos partes:

Insoluble: Se lavo con agua destilada hasta que el pH sea neutro, luego se disolvió con 5 mL de diclorometano, se seca con el reactivo sulfato de sodio anhidro y se filtra. El filtrado constituye la **Fracción B** del extracto. (2,15)

Solución ácida: que resultado del filtrado, se alcalinizó con de amoniaco diluido y

posteriormente se extrajo dos porciones de diclorometano (100mL c/u) en dos pasos:

- **Fase Diclorometano:** Se lavo esta fase orgánica con 10 mL de agua destilada, seguidamente se efectuó un secado de la fase diclorometánica con sulfato de sodio anhidro, se filtró para obtener **la Fracción C** del extracto (15).
- **Fase Acuosa:** Se saturó con 5 g, de sulfato de sodio anhidro y se extrajo con dos porciones de la mezcla diclorometano:etanol (3:2) de 100mL. Obteniéndose dos fases:(15)

Fase Orgánica: (Diclorometanol-etanol). fue lavada con 10 mL de solución de sulfato de sodio anhidro, juntando las todas fases acuosas, la fase orgánica se deshidrata con 1g de sulfato de sodio anhidro. Se filtró y fase orgánica forma **la Fracción D**.(15)

Fase Acuosa: todos los residuos acuosos obtenidos en los diversos lavados de las fases orgánicas se reúnen, esto constituye **la Fracción E**. (15)

Independientemente, se toma 1g de especie seca se adiciona un volumen de 20 mL de agua destilada, se remueve y se hirvió por 15 minutos. Se filtro en caliente y llevo a volumen de 10 mL a lavando el filtro, se enfrió a temperatura ambiente, esto constituyo la **Fracción F**. (15)

Una vez logrado el fraccionamiento se procedió a realizar reacciones de coloración o precipitación para los procesos de reconocimiento de los grupos funcionales y grupos de metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

Reacciones sobre las fracciones:

FRACCION A

Detección de Taninos:

1. **Reacción de gelatina-Sal.-** Se tomaron tres tubos de ensayo a los que se le adicionó 0.5 mL de extracto: al 1° tubo se adicionó 1 mL de NaCl 5%, al 2° tubo se adicionó gelatina 1% y al 3° tubo gelatina – sal; la presencia de

precipitado en el tubo 3° o en ambos tubos 1° y 2° indica la presencia de taninos, es un falso positivo si ocurre solamente con el 1°.(2)

Reacción de Cloruro Férrico.- En un tubo de ensayo se depositó 0,5 mL de la fracción A y se agregó de la disolución acuosa de FeCl₃ 1% unas gotas. La aparición de colores azul-negro, verde o azul verdoso indica que la reacción resulta positiva.(2,15)

Detección de Flavonoides

1. Reacción de Shinoda.- Se colocó de la Fracción A dos gotas en un tubo de ensayo, se adicionó unas limaduras de magnesio y HCl concentrado unas 3 gotas. La aparición de tonos de color rojo, anaranjado y violeta indica que la reacción es positiva. (2, 15)

Detección de Aminoácidos

1. Reacción de Ninhidrina.- En papel filtro en tiras, con una pipeta capilar se colocaron:

1. Una gota de Fracción A, más una gota de ninhidrina al 2%.
2. Blanco: gotas de Solución de ninhidrina al 2%.

Se secan temperatura ambiente, luego las tiras se ubicaron en una estufa a 100°C, hasta la aparición de un color en el blanco.

La reacción es positiva si se presenta un color azul violáceo en el papel de la muestra. ()

FRACCION B

Detección de Triterpenoides y/o Esteroides:

1. Reacción de Liebermann Burchard: Se tomó 1 mL de la fracción y añadieron gotas de ácido acético (5 gotas), consecutivamente se agregó 3 mL

de anhídrido acético/ácido sulfúrico (50:1).

La aparición de colores verdes, azul verdoso (vías rojo o azul) indica reacción positiva.() .

Detección de Antraquinonas:

1. **Reacción de Bornträger:** Se disolvió una porción de la fracción B en diclorometano, a la que se añadió 5 mL de NaOH 5%, se agitó suavemente. La aparición de un color rojo en la fase acuosa es reacción positiva. ()

FRACCION C

Detección de Triterpenoides y/o Esteroides:

Se aplico la reacción de Liebermann Burchard antes indica .

Detección de Alcaloides

En 4 tubos de ensayo se colocaron 2 mL de Fracción C en cada uno independientemente y se adiciona 1 mL de solución de HCl 1% y luego se adiciono lo siguiente:

- ✓ **Blanco:** tubo 1: solo los reactivos antes indicados
- ✓ **Dragendorff:** Tubo 2: 2-4 gotas de reactivo y observar precipitado anaranjado.
- ✓ **Mayer:** Tubo 3: 2 - 4 gotas de reactivo y apreciar precipitado blanco.
- ✓ **Hager:** Tubo 4: 2 - 4 gotas de reactivo observar formación de precipitado amarillo.

FRACCION D

Se lleva a sequedad y luego se añadió 2,5 mL de etanol, se efectuó las siguientes reacciones:

Detección de Flavonoides:

Reacción de Shinoda. mencionada anteriormente

Detección de Leucoantocianidinas y catequinas:

1. **Reacción de Rosenheim:** se colocaron 0,2 mL de la fracción D, se agregaron 0,1 mL de HCl concentrado, se calentó por 10 minutos a 100 °C. Se enfrió, y se adicionó 2 mL de agua y 0,4 mL de alcohol amílico, sacudiendo suavemente y se observa la aparición de color en la fase amfílica. La aparición de colores indica reacción positiva, y va desde el rosado débil hasta el carmesí oscuro. Rojo revela presencia de antocianidinas, marrón muestra presencia de catequinas. ()

Detección de Cardenólidos:

Mediante la reacción de kedde. ante indicada

Detección de Esteroides y/o Triterpenoides:

Mediante reacción de Liebermann Burchard.

Detección de Alcaloides:

Mediante las reacciones de Dragendorff, Hager, Mayer,

FRACCIÓN E

Detección de Flavonoides:

A través de la reacción de Shinoda.

Detección de Leucoantocianidinas:

A través de la reacción de Rosenheim.

FRACCIÓN F

Detección de Saponinas

1. **Prueba de Espuma.-** En dos tubos de ensayo se colocó 2,5 mL del extracto y se agitó por un minuto. Se dejaron en reposo por 15 minutos y se observó la formación de espuma. la reacción es negativa si la altura de la espuma es menor de 5 mm. ()

2.6.5 Caracterización Fisicoquímica del extracto

Sólidos totales.- AOAC 925.03B

Se pesó 2 a 3 g del extracto con exactitud, en una placa Petri, la cual previamente se había secado a 105° en la estufa y enfriado un desecador para ser pesada, cuando alcanzó la temperatura ambiente. La placa conteniendo la muestra se instaló en la estufa por espacio de dos hora a la temperatura de 105°C, luego se enfrió y peso, se reportó el residuo como porcentaje de solidos totales (16).

Sólidos solubles: AOAC 932.12.

Se determinó por el método físico del refractometro, en el cual se efectuó una suspensión al 10% y se filtra, colocando unas gotas en el prisma, previa calibración del equipo, se realizó la medición directamente. (16)

Cenizas: AOAC 923.03

Se pesó de 1 a 3 g del extracto en un crisol de porcelana previamente incinerado a la temperatura de trabajo (550°) y enfriado a temperatura ambiente en un desecador. Se incineró en la mufla a 550° hasta la aparición de cenizas blancas. Se Enfrió en el desecador y peso, cuando alcanzo la temperatura ambiente. Se reportó el residuo como porcentajes de cenizas totales. ()

pH: AOAC 981.12

Se determinó mediante el método potenciométrico. Se disolvió 1g del extracto con 10 ml de agua destilada dentro de un vaso precipitado de 25 ml, se calibro el potenciómetro con buffers de pH 7 y pH 4; luego se sumerge el electrodo en la solución, se procedió a leer el resultado al estabilizar la lectura. ()

2.6.6 Determinación de la actividad antioxidante

2.6.6.2 Método 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

El método Brand-Willians et al ²³ para la actividad antioxidante del extracto se realizó con con algunas modificaciones.

Elaboración del DPPH:

Se preparó el radical pesando 3,6 mg del reactivo DPPH y se agregó en 100 mL de etanol en un fiola que se llevó a ultrasonido para asegurar la total disolución. y luego se verificó que la absorbancia de la solución estuviera ente 0,9 y 1,1 a

una longitud de onda de 517 nm.(2)

Elaboración de la muestra:

Se preparo una disolución madre del extracto en etanol; tomando un peso 0,076,8 g de muestra se agregó 5 mL de etanol, a partir de este se preparó una batería de diluciones. Se tomo 2,9 mL de la solución de DPPH, a la que se adiciono 0,1 mL de cada una de las diluciones respectivas, se agito y se dejó reposar en la oscuridad por un promedio de 30 min. Pasando este periodo de tiempo las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro de UV/VIS a 517 nm. Se utilizó como blanco al etanol.

El ensayo fueron realizados por duplicado. Los resultados experimentales se formularon como el valor IC_{50} , es decir, la concentración de una muestra problema que se requiere para producir una inhibición del 50% la absorbancia del radical libre DPPH.¹⁷

2.6.6.2 Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)

Se siguió método descrito por Benzie y col¹⁸ algunas pequeñas modificaciones.

El método se fundamenta la capacidad de una muestra de reducir el ion hierro férrico (Fe+3) de un complejo formado por 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta el estado ferroso (Fe+2), a la longitud de onda de 593nm.

El reactivo FRAP se prepara mezclando el buffer acetato 300 mM (pH = 3.6), la solución del reactivo TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y solución acuosa de tricloruro férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 20 mM en proporción 10:1:1 (v:v:v). Para la reacción se añade 3 mL de este reactivo en una cubeta y se mide la absorbancia a 593 nm inicial. Posteriormente se agrega 100 μ L de las diluciones del extracto, se agita. Se deja en reposo por 6 min y se realiza la lectura de absorbancia a 593 nm. Para obtener la absorbancia final se tiene que restar de la absorbancia del blanco o inicial.

Los resultados se formularon en relación al patrón trolox. Para ello se efectuó una curva de cuantificación en un rango de concentraciones de 1.00 - 0.03 mM y se procede de forma igual como la muestras. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado. Los resultados de absorbancia de la muestra se extrapolan en la curva patrón mediante la ecuación de esta para expresar la actividad antioxidante en relación con los milimoles de trolox.²⁶

2.6.2.3 Método de reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin-6 sulfonato de amonio) (ABTS)

Según el método de Re y col.¹⁹. en el cual se valora la decoloración del radical libre ABTS•+, originada por la reacción con especies donadoras de electrones o átomos de hidrógeno. El radical ABTS•+ es un radical catiónico y colorante que posee varios picos de absorción, siendo la longitud de onda de 734 nm donde presenta menos interferencias. El radical es formado por la oxidación del 2,2'-azino-bis-3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS) con persulfato de potasio.(2)

El reactivo de trabajo se preparó pesando 0.0504g de la sal amónica cristalizada del reactivo ABTS, que fue disuelta en 5 ml de agua grado HPLC, luego se adiciono 6.7 mg del oxidante persulfato de potasio (K2S2O2), se llevó al ultrasonido y luego se dejó en reposo por un promedio de media hora en oscuridad, transcurrido el tiempo se enraso en un matraz volumétrico (fiola) de 10 ml con agua grado HPLC y se dejó interaccionar durante 16 a 18 horas protegido de la luz. La solución de trabajo se preparó, utilizando 1 ml del radical formado y se adicionó alrededor de 70 ml de alcohol a 96 v/v, se homogeniza y se midió la absorbancia a 734 nm la cual debe estar en 0.680 ± 0.2 .

La actividad antioxidante de las soluciones del extracto, se realizó tomando 2

mL del radical ABTS* en una celda midiendo la absorbencia inicial a 734 nm, se adiciona 50 µl de cada diluciones del extracto independientemente, se agita durante 10 segundos y se dejó interaccionar por 30 minutos en incubación, protegido de la luz, se midió la absorbencia final. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Los resultados se expresaron en mM de Trolox por miligramo de extracto. Para cual se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox frente de absorbencias determinadas. Se efectuaron diluciones de trolox en un intervalo de 0,50 a 0,03 mM y se analizaron manera similar que el extracto etanólico¹⁹.

2.7 Técnicas de procesamiento de la información

➤ Recolección de datos analíticos

Todos los datos de los procesos analíticos aplicados al tratamiento de las muestra para alcanzar los objetivos trazados fueron registrados en los cuadernos de trabajo respectivos de donde se obtuvieron para los procesamientos en cada caso.

➤ Procesamiento de datos

Los datos se analizaron en programa estadístico Microsoft Excel 2019 y se enunciaron como promedios; así como, en los casos de hallar los gráficos de correlación que se utilizaron cuando el ensayo lo amerito.

2.8 Técnicas de Análisis e interpretación de la información

Los resultados obtenidos durante los diversos procesos de análisis de la determinación caracterización y de la actividad antioxidante se procesaron mediante técnicas de análisis paramétricas, que involucran el promedio de cada determinación y su correspondiente desviación estándar, y técnicas de análisis no paramétricas, para hallar coeficientes de correlación para encontrar tanto el IC50

o TEAC correspondientes al método utilizado.

2.9 Aspectos éticos

En la presente investigación, hemos considerado los diversos aspectos éticos pertinentes a cualquier estudio universitario de investigación como herramienta de conocimiento científico que ayude avanzar la sociedad. Por lo tanto los autores declaran no tener ningún conflictos de interés y respetar todos los criterios éticos que ello involucra, como una citación adecuada de los artículos científicos referencias.

III. RESULTADOS

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de caracterización el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

Parámetros	Resultados	Unidades
Solidos totales	85,24	g/100g
Humedad	14,76	g/100g
Solidos solubles	4,6	° Brix
pH	2,57	--
Cenizas	1,09	g/100g
Color	Negro verdoso	--
Aspecto	Pasta densa y viscosa	--
Olor	Suigéneris	--

Los valores son promedios de tres repeticiones

Tabla 4. Determinación de Metabolitos secundarios del extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

Fracciones obtenidas	Metabolito secundario	Reacción de Identificación	Resultados
A	Rx Flavonoide	Shinoda	+ Positivo
	Taninos	Gelatina	- Negativo
		Cloruro férrico	- Negativo
	Aminoácidos libres	Ninhidrina	+ Positivo
B	Rx Esteroides/Triterpenos	Liebermann Burchard	+ Positivo
	Rx de Bornträger	Antraquinonas	- Negativo
C	Rx Triterpenos/esteroides	Liebermann Burchard	+ Positivo
	Rx Alcaloides	Wagner	- Negativo
		M Mayer	- Negativo
Drangedorff		- Negativo	
D	Rx Alcaloides	Wagner	- Negativo
		M Mayer	- Negativo
		Drangedorff	- Negativo
	Rx Flavonoides	Shinoda	+ Positivo
	Rx Catequinas	Rosenheim	+ Positivo
	Rx Triterpenos/esteroides	Liebermann Burchard	+ Positivo
E	Rx Flavonoides	Shinoda	+ Positivo
	Rx Catequinas	Rosenheim	+ Positivo

Tabla 5. Lectura de absorbancia de patrón de trolox por el método de DPPH

IC 50= 1,92 Mm de Trolox				
trolox mM	% Inh	Abs Prom	Abs1	Abs2
1,936	50,1	0,509	0,499	0,518
0,968	26,2	0,739	0,738	0,74
0,484	14,6	0,850	0,854	0,845
0,242	7,5	0,921	0,925	0,916
0,121	4,4	0,945	0,956	0,934
Blanco	1,00			

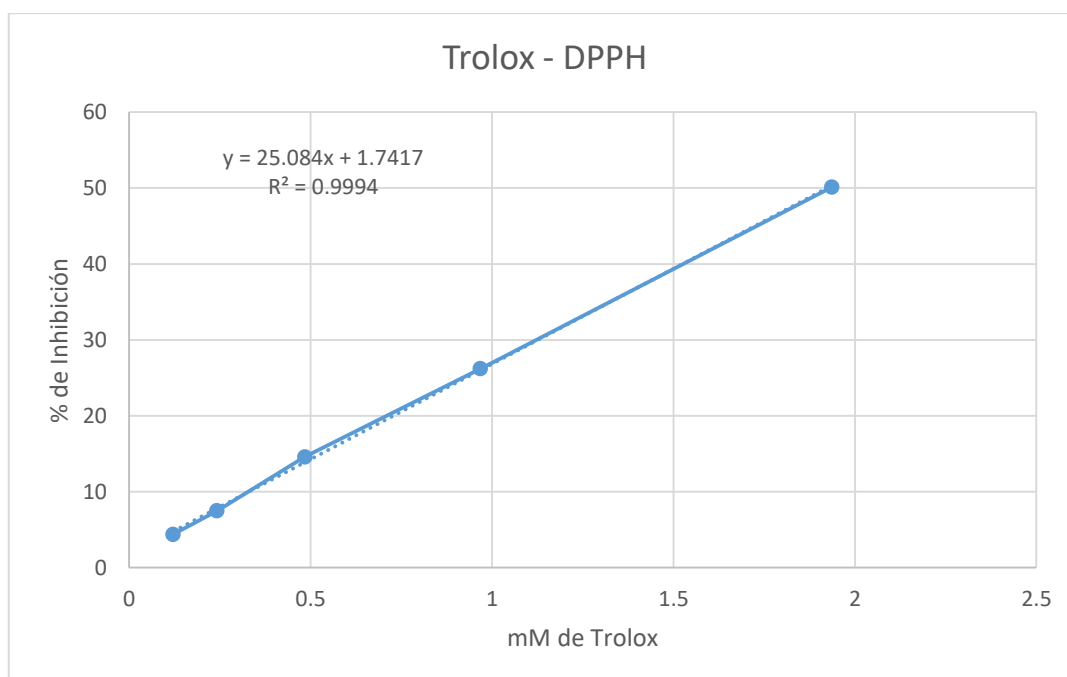


Figura 7. Correlación entre las concentraciones de trolox y % de inhibición del radical DPPH

Tabla 6. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie *Otholobium pubescens* “Hualhua” por el método DPPH.

IC 50 = 3,77 mg/mL del extracto				
Extracto				
mg/mL	% Inh	Abs Prom	Abs1	Abs2
3,715	49,15	0,509	0,518	0,499
1,858	26,1	0,739	0,738	0,74
0,929	15,05	0,850	0,845	0,854
0,464	7,95	0,921	0,925	0,916
0,232	5,5	0,945	0,956	0,934
Blanco	1,00			

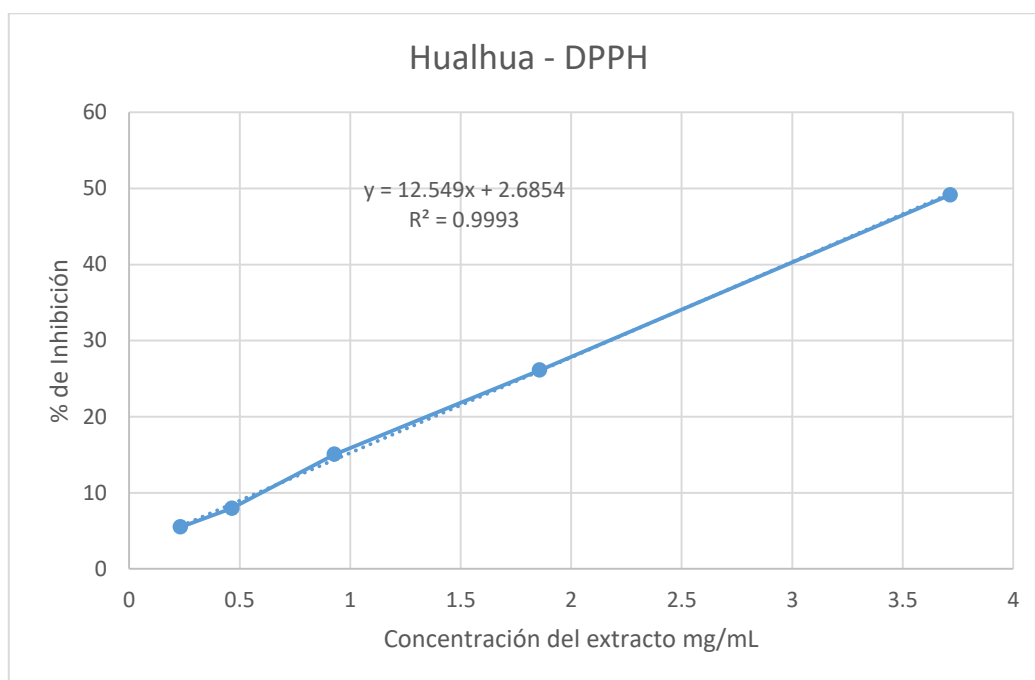


Figura 8. Correlación entre concentración del extracto y porcentaje de inhibición

1,92 mM de Trolox equivale a 3,77 mg/mL del extracto
 1 mM de Trolox equivale a 1,97 mg/mL del extracto

Tabla 7. Valores de absorbancia de las diluciones patrones de trolox por el método FRAP

Trolox mM	Prom	Abs1	Abs2
1,936	1,509	1,505	1,513
0,968	0,875	0,872	0,877
0,484	0,423	0,425	0,421
0,242	0,244	0,247	0,241
0,121	0,127	0,129	0,124
0,061	0,070	0,076	0,063

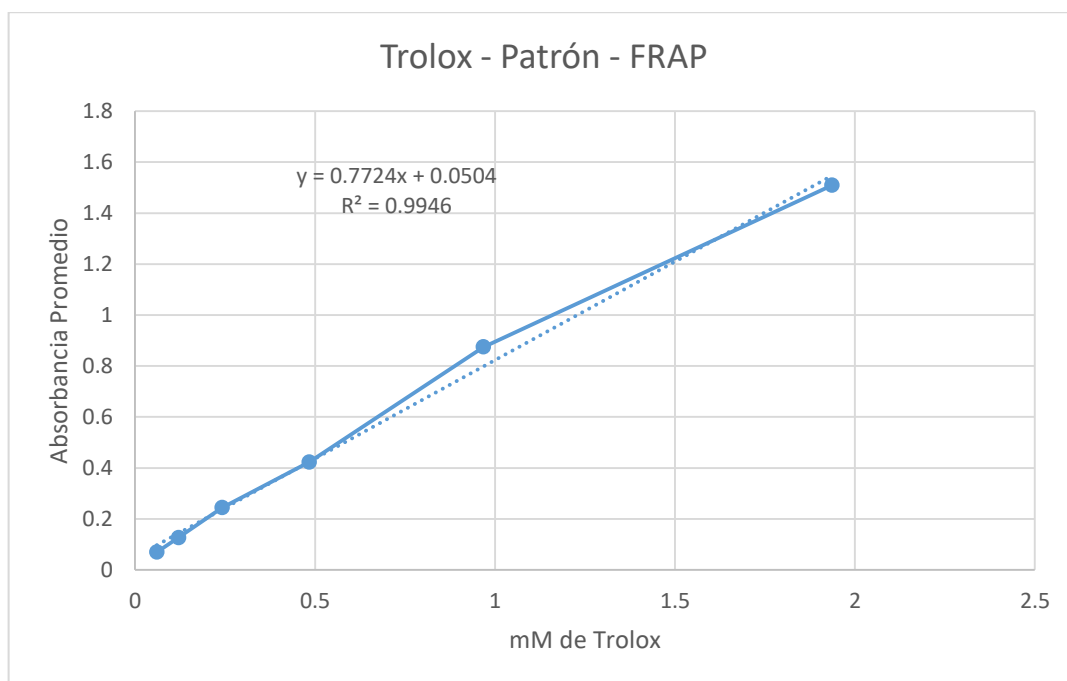


Figura 9. Curva de cuantificación para la determinación de la actividad antioxidante con trolox por el método FRAP

Tabla 8. Capacidad antioxidante de las soluciones del extracto etanólico de la especie *Otholobium pubescens* “Hualhua” por el método FRAP.

Extracto mg/mL	TEAC	Prom	Abs1	Abs2
3,715	2,700	2,136	2,094	2,178
1,858	1,358	1,100	1,099	1,1
0,929	0,679	0,575	0,577	0,573
0,464	0,368	0,335	0,338	0,332
0,232	0,200	0,205	0,211	0,199

Nota: Abs = absorbancia

Prom = promedio

TEAC = Capacidad antioxidante equivalente al trolox

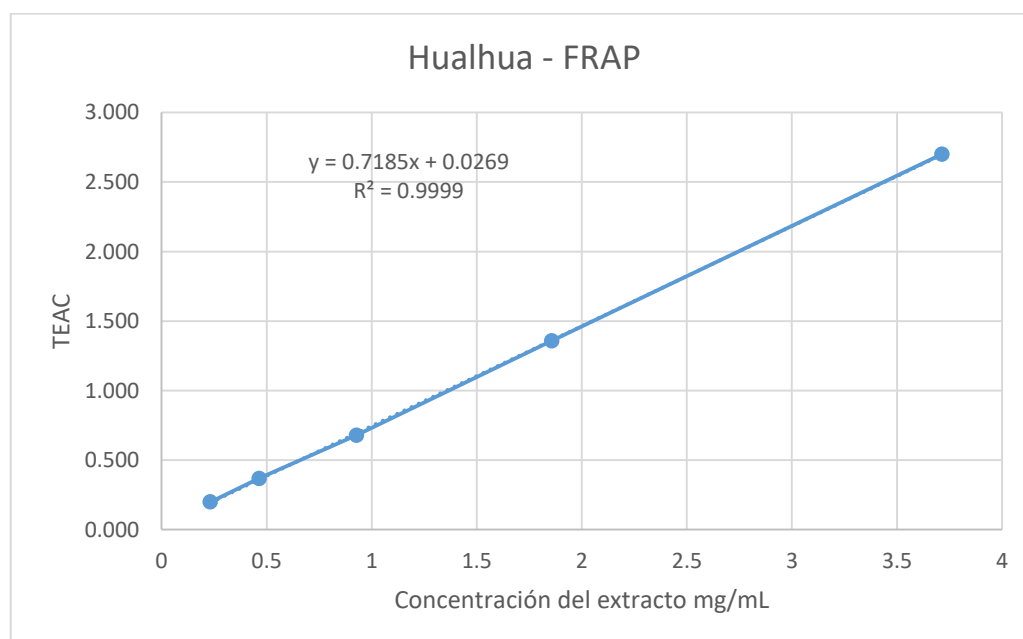


Figura 10. Curva de correlación entre concentración del extracto etanólico de la especie *Otholobium pubescens* y TEAC expresado en mM

1mM de trolox equivale a 1,35 mg/mL de extracto

Tabla 9. Absorbancia de las disoluciones de patrón trolox por el método de ABTS.

Trolox mM	Abs final	Prom	Abs1	Abs 2
1,936	0,659	0,022	0,023	0,02
0,968	0,401	0,279	0,281	0,277
0,484	0,229	0,451	0,453	0,449
0,242	0,147	0,534	0,536	0,531

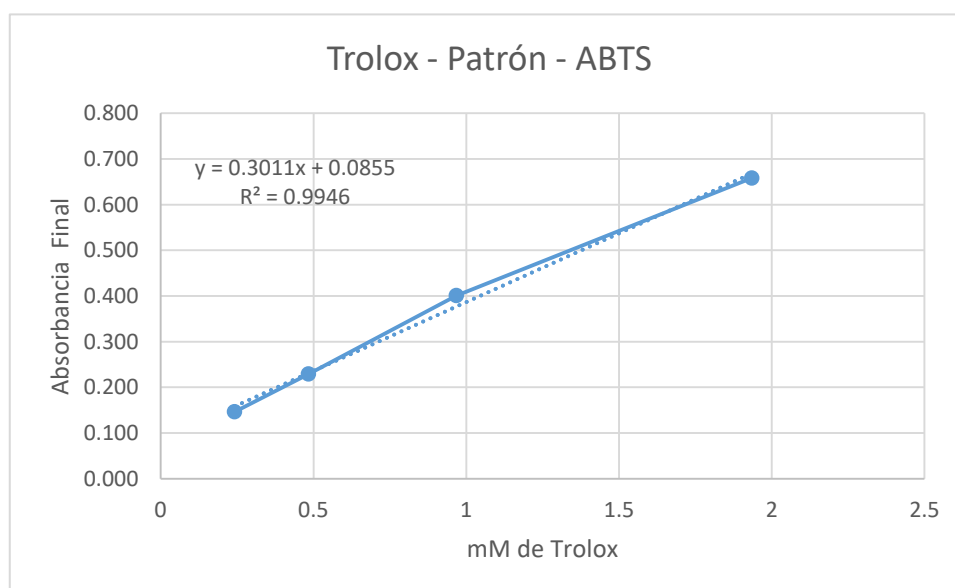


Figura 11. Curva de cuantificación para la determinación de la actividad antioxidante con trolox por el método ABTS

Tabla 10. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie *Otholobium pubescens* “Hualhua” por el método ABTS.

mg/mL de extracto	TEAC	Abs Final	Prom	Abs1	Abs2
3,715	1,005	0,672	0,009	0,011	0,006
1,858	0,522	0,39	0,29	0,292	0,288
0,929	0,310	0,266	0,414	0,414	0,414
0,464	0,155	0,176	0,504	0,456	0,552

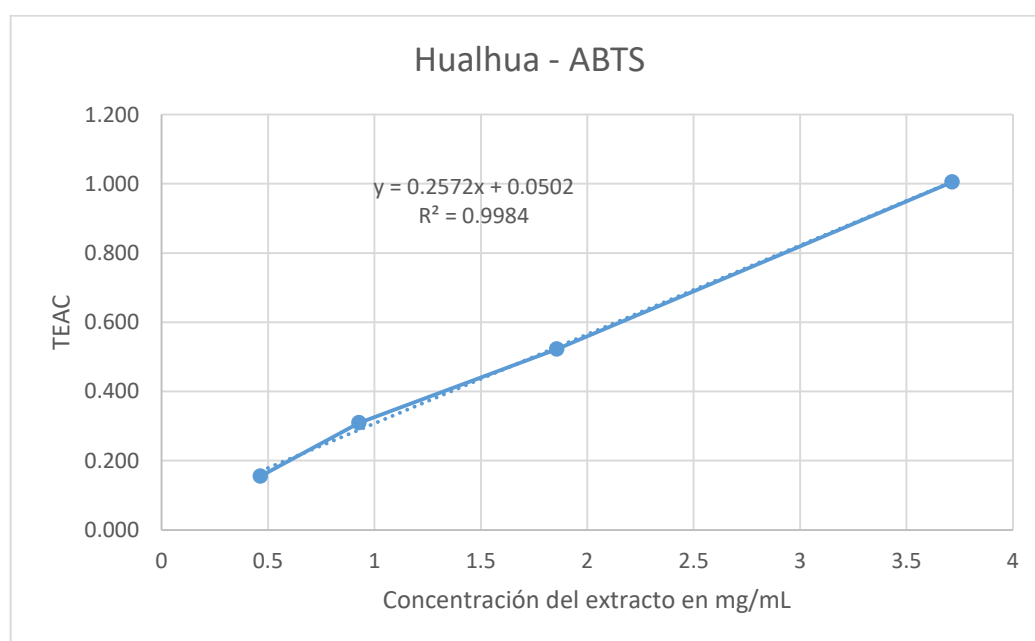


Figura 12. Curva de correlación de concentraciones del extracto etanólico de la especie *Otholobium pubescens* y capacidad antioxidante equivalente a trolox expresado milimoles.

1mM de trolox equivale a 3,7 mg/mL del extracto

IV. DISCUSION

Nuestro país sobresale en el planeta como uno de los de mayor biodiversidad, gracias a los diversos nichos ecológicos que posee a lo largo de su territorio. Su flora se estima cerca de 25 mil especies, de las cuales casi un tercio son endémicas. Un gran número de estas especies las podemos encontrar en la Amazonía y en varios nichos ecológicos de la región de los Andes, siendo muchas de ellas no identificadas todavía (20). En muchos países en vías de desarrollo, un gran porcentaje de la población no tiene acceso a la medicina galénica o y escogen como alternativa la medicinas tradicionales en sus distintas versiones. En la medicina tradicional, la utilización de especies vegetales como propiedades medicinales medicinales son esenciales en el tratamiento o prevención de numerosas enfermedades, basándose en los conocimientos ancestrales que fueron transmitidos de una generación a otra. (2) Con el desarrollo y avance que alcanzo la medicina moderna, estos saberes ancestrales comenzaron a ser ensombrecido, por la aplicación de los profesionales sanitarios que se orientaron en los fármacos industrializados, que fueron incorporados gradualmente en la actividad diaria de la sociedad; Sin embargo, actualmente, los sistemas de salud, esta dando una mira retrospectiva y han vuelto enfocar su atención en el uso de las plantas medicinales, tal es así, que en muchos sistemas de salud se han implementado el area de medicinas complementaria. Una especie propia de las regiones andinas y empleada en la medicina tradicional que ha sido escasamente estudiada, es la especie *Otholobium pubescens* "Hualhua", oriunda de los Andes sudamericanos. Dentro del departamento Ayacucho, provincia de Lucanas y el distrito de Puquio, fue el lugar de colección de la especie vegetal para el presente estudio de las que se consiguieron las partes aéreas como por hojas, tallos herbáceos y unidades floridas.

El extracto etanólico fue conseguido por un proceso de maceración en alcohol de 96 v/v en un periodo de 15 días, que luego se ser filtrado y concentrado, se alcanzó las características descritas en la Tabla 1, de una pasta densa viscosa y de color negro verdoso, con un contenido de humedad de 14,76 % (agua residual); por lo tanto, siendo los sólidos totales

alrededor de 85,24%, los que están constituidos por las sustancias o compuestos de naturaleza orgánicas e inorgánicas, de estos un porcentaje de aproximadamente el 4 por ciento constituyen los sólidos solubles, es decir compuestos solubles en agua, a pesar de ser extraídos con etanol como solvente, esto nos permite inducir que existen compuestos de naturaleza polar como de mediana polaridad; con respecto al valor de cenizas es el contenido de los compuestos inorgánicos en el extracto, es aproximadamente un 1,09%; siendo esto bastante bajo e indicando que en el extracto, prima los compuestos orgánicos. El extracto preparado a una solución al 10% posee un rango ácido con un pH de 2,57; todos estos parámetros de caracterización del extracto, no han podido ser comparados con ninguna investigación publicada de la especie, debido a que no se reportan; sin embargo, Carrasco et al 2012, reporta características físicas químicas de la especie y en su caso obtuvo un extracto acuoso en el que determinó otros parámetros, por lo tanto, estos parámetros resultarían relevantes en un proceso de normalización del extracto obtenido de esta especie. En la tabla 2, podemos observar los resultados de las reacciones de identificación de los grupos de compuestos bioactivos en las diversas fracciones que se obtuvieron del screening fitoquímico aplicado al extracto crudo. En la fracción A se obtuvo resultado positivo para el caso flavonoides y aminoácidos libres, la reacción para identificación de taninos fue negativa; con respecto a la fracción B, en nuestro estudio solo reporto presencia de triterpenos /esteroides; sin embargo, no se reportada la ausencia de antraquinonas, por la reacción negativa de Bornträger. En lo respecta a las fracciones C y D coinciden en la ausencia de alcaloides, pues todas las reacciones fueron negativas y coincide en resultado positivo para triterpenos/esteroides; sin embargo debemos tener en cuenta que la fracción D también se obtuvo resultado positivo para la presencia de flavonoides y catequinas, todos estos metabolitos son asociados a la propiedad antioxidantes; por último en la fracción E, nuevamente se obtuvo resultado positivo para la presencia de flavonoides y catequinas. De los casos de referencias existe una alta coincidencia en la determinación de estos compuestos bioactivos con lo reportado por Quilla N, 2013 quien reporta la presencia de los metabolitos secundarios presentes son: alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos,

taninos, compuestos terpénicos, cumarinas, aminoácidos y catequinas, el extracto hidroalcohólico de las hojas; siendo solo la diferencia los alcaloides.

Considerando que la búsqueda de antioxidantes naturales están cobrando gran interés, por la relación hallada entre un gran número de enfermedades degenerativas y el estrés oxidativo, y los resultados hallados en lo referente a compuestos bioactivos esta especie podría representar una alternativa en el uso o en la prevención de esas enfermedades degenerativas.

La determinación *in vitro*, de la actividad antioxidante de los extractos vegetales se realiza por diversos métodos, se basan en los mecanismos diferentes que existen como son: la transferencia de electrones libres (SET) y la transferencia de átomos de hidrogeno (HAT). Los métodos pueden actuar por uno o más mecanismo; así mismo, lo complejo de la composición de los extractos vegetales, se requiere para poder determinar la posible actividad antioxidante de una especie establecerla por más de un método, que implique el accionar por diferentes mecanismos. En ese contexto en el presente estudio determinó la actividad antioxidante, por tres de los métodos *in vitro* más empleados como son: DPPH ABTS y FRAP.

En determinación de la capacidad antioxidante por la captación del radical DPPH, se fundamenta en la actuación de ambos mecanismos indicados, sin embargo hay una priorización de la transferencia de átomos de hidrogeno, en este método dicha capacidad comúnmente se expresa mediante la expresión IC₅₀ (que es la concentración que inhibe en las condiciones utilizadas el 50% de la absorbancia del radical), aunque últimamente también se está expresando como equivalentes de trolox. Según los resultados obtenidos se aprecia una actividad antioxidante considerable, con un IC₅₀ de 3,77 mg/mL para el extracto, que al correlacionarlo con el trolox nos permite establecer que 1mM de trolox equivale a 1,97 mg/mL de extracto, por lo que creemos que dicha actividad está fuertemente relacionada con los tipos metabolitos secundarios identificados (Tabla 5 y 6).

En la tabla 7 y grafico 9 se aprecia los valores de las diversas soluciones preparadas de trolox, utilizado patrón de referencia que nos permite establecer la curva de cuantificación de la actividad antioxidante por el método de FRAP; para los valores del extracto obtenido como se refleja en la tabla 8 y grafico 10, nos permite visualizar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las partes aérea de la *Otholobium pubescens* “Hualhua” con un valor apreciable, de 1mM de trolox equivalente a 1,35mg/ml de extracto; este método en el cual el ion férrico es reducido a ion ferroso dentro del complejo TPTZ, en medio ácido hace uso exclusivo del mecanismo de transferencia de electrones, y solo es aplicable a compuestos hidrosolubles.. Si bien es cierto no hemos hallado ningún trabajo que determine la actividad antioxidante por este método para esta especie, los valores obtenidos nos permite considera una actividad antioxidante relativamente alta.

En la tabla 10 y su correspondiente gráfico 12, se exponen los resultados de la determinación de la actividad antioxidante método del radical libre ABTS para el extracto etanólico de la especie, en estudio, este método, implican ambos mecanismos de acción, pero con la priorización de la transferencia de electrones simples (SET), donde se obtuvo un valor de 1mM de trolox equivale a 3,7 mg/mL, que se puede considerar una actividad buena; al igual que el caso anterior no se pudo hallar referencia de la actividad de la especie por el método, lo que no lleva a pensar que el presente trabajo es uno de primeros aplicados en este aspecto a la especie en estudio.

V. CONCLUSION.

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio titulado Potencial antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Otholobium pubescens* “Hualhua” concluimos:

- El extracto etanólico presenta una buena actividad antioxidante por los tres métodos ensayados.
- Los grupos de componentes químicos presentes en el extracto etanólico de la parte aérea de *Otholobium pubescens* “Hualhua” fueron principalmente flavonoides, aminoácidos libres, triterpenos y catequinas.
- El extracto etanólico de la parte aérea de *Otholobium pubescens* “Hualhua” presenta una mayor actividad antioxidante por el método del FRAP.

VI. RECOMENDACIONES.

- Con una amplia variedad de flora en Perú, se aconseja a la comunidad académica continuar con los estudios de las diversas especies, tanto conocidas como no conocidas, con el fin de establecer las distintas propiedades terapéuticas de estas.
- Proseguir con los estudios de investigación de la actividad antioxidante de la especie *Otholobium pubescens* “Hualhua”; utilizando otros métodos para la evaluación de la misma.
- Determinación del tipo de compuestos flavonoides presentes por métodos cromatográficos y espectroscópicos.
- Seguir con la presente investigación para determinar futuras formas farmacéuticas en que se utilice *Otholobium pubescens* “Hualhua”.

VII. FUENTES DE INFORMACION.

1. M.E., López, M., Sainz, T.D. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 58-68.
2. Bendezú L.E. Compuestos bioactivos y propiedad antioxidante del extracto etanolico de as partes aereas *Mutisia acuminata* chinchilcoma. Tesis. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional San Luis Gonzaga 2023
3. Sánchez, V., Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*, 20(3), 161-168.
4. Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cub. Med. Mil [Internet]*. 2001 Mar [Citado 2020 Feb 24]; 30(1): 15-20. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572001000100007&lng=es
5. Carrasco L. Chuman M. "Características físico - químicas de las drogas y del extracto acuoso de hojas de *Otholobium pubescens* procedentes del caserío atema" (2012).
6. Quilla N. "Actividad antiespasmódica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Otholobium pubescens* (poir) J.W. grimes "wallwa" (2013).
7. Bustamante J. Paredes A. "Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico de *Otholobium pubescens* en úlceras gástricas inducidas por indometacina en *Rattus norvegicus* Holtzman" (2019).
8. Coronado H. M, Vega y Leon S, Gutierrez T. R, Vazquez F. M, Radilla V. C. "Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana". *Revista chilena de nutrición*. 2015; 42(2): p. 14-15.
9. Santander M, Osorio M. Evaluación de propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de una bebida mixta durante almacenamiento refrigerado. *Rev. Cienc. Agr. España*. Junio 2017 (Internet), 84-97p (Citado 2018 Set. 10) 34 (1) Disponible en: [file:///C:/Users/pc/Downloads/document%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/pc/Downloads/document%20(4).pdf)
10. Zamora S Juan Diego. ANTIOXIDANTES: MICRONUTRIENTES EN LUCHA POR LA SALUD. *Rev. chil. nutr. [Internet]*. 2007 Mar [citado 2023 Mar 27] ; 34(1): 17-26. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000100002&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182007000100002>.
11. Muray k, Mayes A. *Bioquímica de Harper* 15a Ed. Editorial el Manual Moderno, S.A. de CV. Mexico D.F.2001.742p.
12. Carrillo R, Díaz JA, Peña CA, Flores OI, Neri R., Zepeda A.D. et al., Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Rev. UNAM*. 2016; 59(1):6-18

13. Coronado H, et al. Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. Revista Chil. Nutr. Vol. 42, N°2, Chile. Junio 2015 (Internet) (citado 2018 Agos. 05) Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
14. Olga L. , Investigación Fitoquímica Métodos en el estudio de productos naturales, ,(1994) Perú- Lima ,2°edicion,PUCP, pág 7
15. AOAC. Methods Officials of Analysis. AOAC International, 16ª Edition. Rockville, Maryland. 2012.
16. Lock de Ugaz O. "Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos Naturales". Segunda ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Peru; 1994.
17. Brand-Willlliams W, Cuvelier M, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol. 1995;28:25-30.
18. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plas- ma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. Anal Biochem.1996;239:70-6
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26:1231-7
20. INS. Instituto Nacional de Salud. Plantas Medicinales. Ministerio de Salud. 2022. Disponible en: <https://web.ins.gob.pe/es/salud-intercultural/medicina-tradicional/plantas-medicinales>
21. Heisler Elisa Vanessa, Budó Maria de Lourdes Denardin, Schimith Maria Denise, Badke Marcio Rossato, Ceolin Silvana, Heck Rita Maria. Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña. Enferm. glob. [Internet]. 2015 Jul [citado 2023 Abr 03] ; 14(39): 390-403. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1695-61412015000300018&lng=es.
22. Alvarado B. “Actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la cordillera negra” Tesis maestría. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Mayor de San Marcos . 2017- Perú
23. Aronés-Jara, Marco Rolando, Cárdenas-Landeo, Edgar, Luna-Molero, Hugo Roberto, Barbarán-Vilcatoma, Stephany Massiell, & Gómez-Quispe, Mónica. (2022). Tamizaje fitoquímico, contenido de compuestos fenólicos y potencial antioxidante de trece plantas medicinales de los afloramientos rocosos del Bosque de Piedras de Huaraca en Perú. Revista de la Sociedad Química del Perú, 88(2), 165-179. Epub 30 de octubre de 2022.<https://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v88i2.388>

VIII. Anexos

8.1 Fotos



Figura 13. Selección y secado de las flores de la especie



Figura 14. Macerando las flores de la especie



Figura 16. Filtración



Figura 15. Concentración



Figura 17. Extracto seco de la especie



Figura 18. Fraccionamiento durante el screening



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

MUSEO DE HISTORIA NATURAL



“Año de la unidad, la paz y el desarrollo”

CONSTANCIA N° 206-USM-MHN-2023

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (fértil) recibida de **Karol Alpha Solis Martínez**, estudiantes de la Universidad San Luis Gonzaga ha sido estudiada y clasificada como: *Othobium pubescens* (Poir.) J.W.Grimes y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

ORDEN : Fabales

FAMILIA : FABACEAE

GÉNERO : *Othobium*

ESPECIE : *Othobium pubescens* (Poir.) J.W.Grimes

Nombre vulgar: “Hualhua”

Procedencia: Puquio

Determinado por: MSc. Hamilton Beltrán Santiago.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 31 de agosto de 2023

Dra. Joaquina Alban Castillo

JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)