



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

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

UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE LA ESPECIE
*Tristerix chodatianus (Patschovsky) Kuijt "Pupa".***

AUTOR

BACH. ALARCÓN ACUÑA, JUAN DIEGO

ICA – PERU

2020

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de estar vivo, de disfrutar de mi familia y por brindarme la fuerza para luchar por mis sueños y objetivos.

A mi madre Sonia, por su amor y apoyo incondicional; por su esfuerzo y sacrificio; por hacer de mí una persona de bien y ser la persona más importante en mi vida.

A mi abuelo Pablo; por inculcar la lectura en mí, por creer en mi capacidad; por enseñarme que todo problema tiene solución y demostrarme el gran poder que tienen las palabras. Pase lo que pase la función debe continuar...

A mi abuela Elizabeth, mi tía Blanca, mi tío Juan Pablo, Jorge y Toño; por siempre apoyarme en cada etapa que me ha tocado vivir. Gracias por sus consejos, amor y amistad. A mis primas Flavia, Ana Paula y Micaela por todo su cariño y por ser las hermanas que no he tenido.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por brindarme la oportunidad de cumplir una de mis metas más anheladas. Por cada día que me permitió despertar con salud, fuerzas y empeño para enfrentar las adversidades y aprender de ellas.

A la Universidad San Luis Gonzaga, por haberme permitido formar parte de su alumnado, por darme la oportunidad de estudiar la hermosa carrera de Farmacia y Bioquímica y conocer a cada uno de los maestros que me brindaron sus conocimientos y consejos, y estuvieron siempre predispuestos a resolver mis dudas.

A mi asesor Q.F Felipe Surco Laos, por apoyarme durante todo el proceso de realización de mi tesis; por su predisposición para orientarme a resolver mis dudas y por sus consejos para poder ir superando mis dificultades, buscando siempre soluciones acertadas gracias a su conocimiento científico.

A mi asesora Q.F Haydee Chávez Orellana, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico; por su paciencia para guiarme durante el desarrollo de la tesis y por su motivación para poder concluir satisfactoriamente mi trabajo de investigación, y hacer crecer en mí la vocación por mi carrera.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	x
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.1. Descripción de la realidad problemática	13
1.2. Formulación del problema	15
a) Problema General	15
b) Problemas Específicos	15
1.3 Justificación e importancia	16
1.4 Objetivos de la investigación	17
a) Objetivo General	17
b) Objetivos Específicos	17
1.5 Hipótesis y variables	17
1.5.1 Hipótesis	17
a) Hipótesis General	17
b) Hipótesis Específicas	18
1.5.2 Variables	19
CAPÍTULO II– BASES TEÓRICAS	20
2.1 Antecedentes	20
2.2 Marco teórico	23
2.2.1 Descripción	23
2.2.2 Clasificación botánica	23
2.2.3 Hábitat	24
2.2.4 Usos tradicionales	24
2.2.5 Término antioxidante	25
2.2.6 Oxidación	25
2.2.7 Antioxidantes	31

2.2.8 Tipos de antioxidantes	32
2.2.9 Antioxidantes primarios o Tipo I	34
2.2.10 Antioxidantes secundarios o tipo II	37
2.2.11 Tipos de antioxidantes fitoquímicos	40
2.2.12 Metabolitos responsables de la actividad	41
2.3 Marco conceptual	41
CAPÍTULO III – ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS	48
3.1. Tipo, Nivel y Diseño de la Investigación	48
3.1.1 Tipo de Investigación	48
3.1.2 Nivel de Investigación	48
3.1.3 Diseño de Investigación	49
3.2. Materiales de trabajo	49
3.3. Población y muestra	52
3.4. Métodos, técnicas y procedimientos de recolección de datos	52
3.4.1 Métodos y Técnicas	52
3.4.2 Lugar de la investigación	63
3.4.3 Técnicas de procesamiento de la información	63
3.4.4 Análisis estadístico	64
3.4.5 Contrastación de hipótesis	64
CAPÍTULO IV –RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1. Resultados	67
4.2. Discusión	71
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	79
FUENTES DE INFORMACIÓN	80
ANEXOS	
Anexo N°1 Matriz de Consistencia	87

RESUMEN

Introducción: *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa” pertenece a la Familia Loranthaceae, conocido comúnmente como pupa en la provincia de Ayacucho. Es endémica de Perú. Es una planta usada en la medicina tradicional peruana en infusiones de hojas para aliviar infecciones genitourinarias. **Objetivo general:** Evaluar la actividad antioxidante del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa”. **Materiales y métodos:** El extracto fue obtenido por maceración de las hojas utilizando como solvente etanol 96°. Adicionalmente, el marco se sometió a reflujo por 4 horas; usando como solvente etanol 96°. Posterior a ello, los filtrados obtenidos fueron concentrados en un evaporador rotatorio a presión reducida a 45 °C hasta sequedad. La presencia de los metabolitos secundarios se determinó mediante un tamizaje fitoquímico. La actividad antioxidante se determinó a través del método de poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) y el método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH). **Resultados:** Se obtuvo 400 g de extracto etanólico a partir de 1 kg de hojas secas y molidas. En el tamizaje fitoquímico, se obtuvo reacción positiva para las pruebas de identificación de grupos fenólicos libres, flavonoides, grupos aminos libres, esteroides y/o terpenoides, leucoantocianidinas, catequinas y saponinas. Los resultados de la actividad antioxidante por el método FRAP del extracto etanólico de

hojas de la especie *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" presenta un TEAC de 0,642 +/- 0,008 (mg/mL~1mM trolox). Por el método DPPH, tuvo un IC₅₀ de 0,2420 +/- 0,02 mg/mL.

Conclusiones: El extracto etanólico de hojas de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" tiene un rendimiento de 40% y los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de hojas de la especie fueron: grupos fenólicos libres, flavonoides, grupos aminos libres, esteroides y/o terpenoides, leucoantocianidinas, catequinas y saponinas.

Palabras Clave: *Tristerix chodatianus*, antioxidante, trolox, DPPH, FRAP

ABSTRACT

Introduction: *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" belongs to the Family Loranthaceae, known as pupa in the province of Ayacucho. It is endemic to Peru. It is a plant used in traditional Peruvian medicine in leaf infusions to avoid genitourinary infections. **General purpose:** To evaluate the antioxidant activity of the ethanolic extract obtained from the leaves of *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa". **Materials and methods:** The extract was obtained by macerating the leaves using 96 ° ethanol as solvent. Additionally, the frame was refluxed for 4 hours; using 96 ° ethanol as solvent. Subsequently, the filtrates obtained were concentrated in a rotary evaporator at reduced pressure at 45 ° C until dry. The presence of secondary metabolites was determined by phytochemical screening. Antioxidant activity was determined using the ferric reducing antioxidant power method (FRAP) and the free radical inhibition method 2,2-Diphenyl-1-picrilhydrazil (DPPH). **Results:** 400 g of ethanolic extract was obtained from 1 kg of dried and ground leaves. In the phytochemical screening, a positive reaction was obtained for the identification tests of free phenolic groups, flavonoids, free amino groups, steroids and / or terpenoids, leucoanthocyanidins, catechins and saponins. The results of the antioxidant activity by the FRAP method of the ethanolic extract of leaves of the species *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" presents a TEAC of 0,642 +/- 0,008 (mg / mL ~ 1mM trolox). By the DPPH method, it had an IC50 of 0,2420 +/- 0,02 mg / mL. **Conclusions:** The ethanolic extract of leaves of *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" has a yield of 40% and the

secondary metabolites identified in the ethanolic extract of leaves of the species were: free phenolic groups, flavonoids, free amino groups, steroids and / or terpenoids, leucoanthocyanidins, catechins and saponins. In addition, it presented antioxidant activity by the DPPH and FRAP method.

Keywords: *Tristerix chodatianus*, antioxidant, trolox, DPPH, FRAP

INTRODUCCIÓN

En el Perú un sector de la población aprovecha las plantas medicinales por sus propiedades curativas; estas son utilizadas de manera empírica, es decir, sin verdaderos fundamentos de sus cualidades curativas, sino simplemente basados en conocimientos no comprobados (Nayra, 2014)¹.

Tristerix chodatianus (Pastochovsky) “Pupa” es una especie de la flora medicinal peruana utilizada popularmente como agente diurético y específicamente contra infecciones genitourinarias, motivo por el que ha sido objeto de investigaciones para comprobar los usos antes mencionados. En el trabajo de investigación “Determinación de la actividad diurética de la *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) “pupa”, se identificó que el extracto etanólico presenta metabolitos secundarios como flavonoides, esteroides y/o triterpenoides, taninos, leucoantocianidinas, compuestos fenólicos y se determinó la presencia de actividad diurética (Medrano y Huamaní, 2017)².

El género *Tristerix*, según la revisión realizada por Kuijt (1988), está constituido por dos subgéneros: *Tristerix* (*T. aphyllus* y *T. corymbosus*) y *Metastachys* (las nueve especies restantes). Esta clasificación se basó principalmente en la presencia o ausencia de bracteolas y en el número de pétalos. Este género se extiende a lo largo de la Cordillera de los Andes desde el norte-centro de Colombia hasta el sur de Chile. En la zona norte, las especies se encuentran a elevaciones mayores a 2000 m.s.n.m., mientras que en la zona sur ocupa áreas de elevación más baja,

adyacentes a los Andes (Nickrentlab.siu.edu., 2009)³ (Medel, Botto-Mahan, Smith-Ramírez, Méndez, Ossa, Caputo y Gonzáles, 2002)⁴.

Tristerix presenta su mayor diversidad en Perú, donde se encuentran siete de las 11 especies, cuatro de las cuales solo se encuentran en este país (Nickrentlab.siu.edu., 2009)³, en los cuales se han determinado metabolitos a los que se le atribuyen propiedades contra los radicales libres.

En los últimos años, la importancia de los radicales libres y su relación con el envejecimiento celular se han incrementado. Los radicales libres son especies químicas que se constituyen en agentes causales del estrés oxidativo, relacionado directamente con el envejecimiento celular y algunos procesos fisiopatológicos como enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, cataratas y determinadas formas de cáncer (Alarcón Arias, Salcedo Páucar y Sosaya Salazar, 2018)⁵.

A raíz de las consecuencias que pueden generar los radicales libres; la importancia de los antioxidantes se ha incrementado considerablemente en el campo de la investigación.

Los antioxidantes constituyen un grupo de sustancias que, cuando están presentes en bajas concentraciones (en relación con otros compuestos oxidables), retrasan o inhiben los procesos oxidativos, a través de un mecanismo que suele conllevar su propia oxidación (Nayra, 2014)¹.

En ese sentido con el conocimiento que en las hojas de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa” se ha determinado la presencia de flavonoides, metabolitos secundarios que son muy reconocidos por sus

propiedades antioxidantes (Alarcón Arias et al., 2018)⁵; nace la inquietud de investigar si el extracto etanólico de las hojas de la especie presenta actividad antioxidante.

En base a lo anteriormente expuesto; se fomenta la práctica e investigación enfocada a la fitoterapia, para utilizarla como una alternativa preventiva y paliativa frente a las distintas enfermedades relacionadas con el envejecimiento celular.

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Descripción de la realidad problemática.

El desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico-degenerativas con impacto epidemiológico está relacionado con el establecimiento del estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno (EROs) a través de su impacto en una extensa variedad de funciones fisiológicas.

El estrés oxidativo es el resultado de reacciones metabólicas que utilizan oxígeno y representa una alteración en el equilibrio pro-oxidante/antioxidante en los sistemas vivos; esta alteración genera un aumento de radicales libres, los que tienen la capacidad de oxidar biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN) e inhiben su estructura y función normal.

Limitados eventos han tenido el impacto tan profundo y diversificado con respuestas versátiles como el acontecido a consecuencia del entendimiento de los radicales libres y de su influjo variable en los seres vivos.

Se entiende como radicales libres a aquellas moléculas cuya estructura atómica presenta un electrón impar o desapareado en el orbital externo, proporcionándole una configuración espacial que produce una alta inestabilidad (Rodríguez Perón, Menéndez López y Trujillo López, 2001)⁶.

En consecuencia, un radical libre es extremadamente reactivo y de vida efímera, con una inmensa facultad para acoplarse inespecíficamente en la

mayoría de los casos, así como con la variedad de moléculas que componen la estructura celular: proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos, entre los que se pueden mencionar la inhibición de enzimas como la superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas.

Derivan de una extensa variedad de fuentes y se encuentran tanto en los alimentos como en los sistemas biológicos (Rodríguez Perón et al., 2001)⁶ (Figueroa Díaz y Mollinedo Moncada, 2017)⁷.

Sin embargo, los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de interrumpir o inhibir las reacciones de transformación que causan daños a las mencionadas biomoléculas.

Los antioxidantes sintéticos son los más empleados por la industria alimentaria en virtud de su alto grado de eficacia, estabilidad y ventaja económica. Sin embargo, estudios toxicológicos han demostrado que los antioxidantes sintéticos presentan efectos tóxicos y son promotores de algunos tipos de cáncer, entre otros efectos fisiológicos.

Por otro lado, los antioxidantes naturales procedentes de plantas han sido frecuentemente utilizados en diferentes sectores de la industria farmacéutica como preservantes en alimentos y en medicina tales como α -tocoferol y β -caroteno, quercetina, entre otros, que presentan una actividad equiparable con los antioxidantes sintéticos de mayor uso como 2-terbutil-hidroxianisol (BHA) y 2-terbutil-hidroxitolueno (BHT); los cuales, sin

embargo, a pesar de sus propiedades antioxidantes presentan el inconveniente de ser tóxicos.

La atención por los antioxidantes naturales se ha acrecentado dramáticamente, a causa de tres principales razones: la eficacia antioxidante de una diversidad de agentes fitoquímicos, la baja seguridad que brinda el consumo de los antioxidantes sintéticos y la idea generalizada que el consumo de ciertos agentes fitoquímicos puede afectar de manera positiva la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento. Complementario a ello, la presunción de que los compuestos naturales son innatamente más seguros que los compuestos sintéticos y, en consecuencia, comercialmente más aceptados ya sea como reguladores, conservantes, inhibidores enzimáticos, entre otros (Figuroa Díaz y Mollinedo Moncada, 2017)⁷. Es por ello, que el presente trabajo de investigación se enfoca en el estudio de un compuesto natural como la especie en estudio que presente actividad antioxidante.

Por lo expuesto anteriormente nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

1.2. Formulación del Problema.

a) Problema General:

¿Presenta el extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" actividad antioxidante?

b) Problemas Específicos:

- ¿Cuál es el rendimiento del extracto etanólico y cuáles son los metabolitos secundarios que presentará el extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa”?
- ¿Presenta actividad antioxidante por el método de poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) y el método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH) el extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa”?

1.3. Justificación e importancia.

La investigación sobre el estudio fitoquímico y la actividad antioxidante del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa” permitirá identificar los principales metabolitos en las hojas de esta planta; y contar con un recurso natural alternativo, como fuente de antioxidante en la prevención y tratamiento de patologías relacionadas al envejecimiento celular; mejorando así la calidad de vida de las personas que aquejan dichos problemas.

Además, al ser una planta medicinal; se pretende ofrecer una alternativa que ocasione menos reacciones adversas en comparación con antioxidantes sintéticos; más accesibles a la población gracias a su

disponibilidad en la naturaleza y por ende un bajo costo para los fines pertinentes.

El presente trabajo de investigación es importante porque proporcionará evidencias sobre algunas de las propiedades atribuidas a esta especie, que de comprobarse puedan promover la producción de fitofármacos a largo plazo como un beneficio a la sociedad.

1.4. Objetivos de la Investigación.

a) Objetivo General

- Estudiar aspectos fitoquímicos y evaluar la actividad antioxidante del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa".

b) Objetivos Específicos

- Determinar el rendimiento del extracto y establecer la presencia de metabolitos secundarios en el extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la planta *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa".
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" frente al método de reducción ion férrico (FRAP).
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" frente al 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

1.5. Hipótesis y Variables

1.5.1 Hipótesis

a) General:

H₀: El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" no presenta actividad antioxidante.

H₁: El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" presenta actividad antioxidante.

b) Específicas:

- El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" presenta metabolitos secundarios de tipo: flavonoides, leucoantocianidinas y esteroides/triterpenoides principalmente.
- El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" presenta actividad antioxidante por el método DPPH.
- El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" presenta actividad antioxidante por el método FRAP.

1.5.2 Variables:

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA VALORATIVA
VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto etanólico de hojas de <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kujit "Pupa"	Conceptual: El extracto etanólico es un concentrado obtenido de la maceración de hojas secas, seguido de un proceso de filtrado y reflujo.	-	-
	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 es la capacidad que tiene un compuesto de neutralizar los radicales libres.	-	-
	Operacional: Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP).	Generación de una coloración azul	mM equivalentes Trolox/mL muestra.
	Operacional: Inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).	Decoloración de la solución de DPPH	Concentración inhibitoria media IC 50

CAPÍTULO II

BASES TEÓRICAS

2.1. ANTECEDENTES.

- **Sanhueza Sola, (2000):** El objetivo principal de este trabajo fue investigar los posibles efectos antioxidantes de *Tristerix tetrandus*, una lorantácea chilena. Para ello se utilizó los bioensayos de decoloración del difenil picrilhidrazilo (DPPH), e inhibición de la enzima Xantina Oxidasa.

Se ensayaron cuatro fracciones las cuales fueron obtenidas del crudo de *Tristerix tetrandus* por partición con solventes de distintas polaridades: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Se observó en la fracción metanólica un alto porcentaje de inhibición, 60,4%, por lo que se puede considerar como un extracto con una posible acción protectora a nivel renal ya que actuaría como un análogo del Alopurinol. En el ensayo de la capacidad atrapadora de radicales libres se observó que las fracciones más importantes corresponden a acetato de etilo y metanol cuyos valores a una concentración de 100 µg/mL son de 69% y 88% de decoloración respectivamente, indicando que en estas fracciones se encuentran compuestos con una marcada actividad antioxidante.

- **Carhuayo y Col., (2004):** En el trabajo realizado se determinó que el extracto etanólico de *Tristerix chodatianus* (pupa) mostró actividad diurética y además se identificaron metabolitos secundarios como flavonoides, esteroides y/o triterpenoides, taninos, leucoantocianidinas y compuestos fenólicos.
- **Cabezas y Col., (2009):** En su trabajo aisló el alcaloide isoquinolínico (+)-glaucina de *Tristerix verticillatus* en *Berberis montana* pero no del huésped. La biotransformación de alcaloides en el hemiparásito trasladados desde el huésped se consideraría muy poco probable debido a las enzimas responsables de la biosíntesis de alcaloides isoquinolínicos, las cuales son altamente específicos y restringidos a familias de plantas que contienen estos compuestos. (+)-glaucina se ha encontrado en otras especies de *Berberis*. El desplazamiento de metabolitos secundarios a partir de huéspedes a hemiparásitas ha sido bien documentado para alcaloides quinolizidínicos.
- **Albites Quispe et al., (2009):** Evaluaron la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus*; además se identificó la presencia de: Leucoantocianidinas, Catequinas, Esteroides, Triterpenoides, Flavonoides, Taninos, compuestos fenólicos libres y aminoácidos.

En cuanto a la actividad antioxidante los resultados indicaron que el extracto que obtuvo mejores resultados fue el Acetato de Etilo tanto a concentraciones de 10 µg/mL como de 50 µg/mL; del cual se pudo evidenciar su Concentración Efectiva Media.

A nivel antimicrobiano el extracto de acetato de etilo fue el más activo presentando halos de Inhibición de 21 mm para *Staphylococcus aureus*, 20 mm para *Candida albicans*, 13 mm para *Pseudomona aeruginosa*, 12 mm para *Salmonella spp* y 8 mm para *Escherichia coli*. Por los resultados obtenidos se pudo indicar que el extracto etanólico posee ambas actividades, siendo el más activo el extracto de acetato de etilo.

- **Medrano Alvites et al., (2017):** En el trabajo de investigación se aisló y se determinó la estructura química de los metabolitos secundarios con actividad antioxidante obtenidos a partir del extracto de acetato de etilo de las hojas de *Tristerix chodatianus* (Pastochovsky) pupa. A partir del extracto de acetato de etilo, se obtuvo una serie de metabolitos secundarios, los productos mayoritarios aislados se identificaron como flavonoides Quercitrina, Quercetina, Rutina (3-D-ramnoglucósido del 3', 4', 5', 7-tetrahidroxiflavona), y un compuesto flavonoide de diferente Rf que la Quercetina y la Rutina, asimismo, a los flavonoides aislados se le identificaron su actividad antioxidante frente al DPPH en TLC, siendo más activo el flavonoide quercetina.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Descripción:

La especie *Tristerix chodatianus* es un arbusto el cual es una hemiparásita que coloniza principalmente especies de *Polylepis* (Rosaceae) en los Andes de Perú. *Polylepis incana* Kunth es una de las hospederas de *T. chodatianus*. Presenta inflorescencia y hojas de punta esclerótica (Tropicos.org., 2019)⁹.

2.2.2. Clasificación botánica

La muestra fue identificada en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (N°127-USM-2018) según el sistema de clasificación de Cronquist (1988). *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt tiene la siguiente posición taxonómica:

Reino: PLANTAE

División: MAGNOLYOPHITA

Clase: MAGNOLIOPSIDA

Sub-Clase: ROSIDAE

Orden: SANTALALES

Familia: LORANTHACEAE

Género: *Tristerix*

Especie: *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt

Nombre vulgar: Pupa, Popa

2.2.3. Hábitat

Tristerix chodatianus es una especie endémica que se distribuye a lo largo de la cordilla de los Andes; en el Perú se localiza entre los departamentos de Huancavelica, Ayacucho y Lima; crece en las cuestas rocosas a 3500-4500 m.s.n.m (Medrano Alvites y Huamaní García, 2017)².

2.2.4. Usos tradicionales

Los datos de los usos medicinales fueron obtenidos por parte de los pobladores de Tambo Quemado, distrito de Leoncio Prado, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho – Perú, quienes usan las hojas de esta especie vegetal en infusiones para aliviar infecciones genitourinarias.

2.2.5. Término Antioxidante

El término antioxidante antiguamente hacía referencia a la capacidad de un producto para reducir el consumo del oxígeno. Posteriormente a finales del siglo XIX y a principios de siglo XX, se demostró las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales gracias a los diversos estudios dedicados, por ejemplo: la prevención de la corrosión del metal (Patricio Miranda y Sifuentes Herrera, 2019)¹⁰.

2.2.6. Oxidación

Es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Esta reacción puede provocar la producción de radicales libres los cuales pueden ocasionar daño

a las células. Dos tipos de especies reactivas pueden iniciar la reacción de oxidación: los radicales libres, y las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) (Patricio Miranda y Sifuentes Herrera, 2019)¹⁰.

- **Radicales libres**

Un radical libre es una especie química que posee en su estructura uno o más electrones desapareados, transformándolo en un compuesto altamente inestable y fugaz, con una gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena.

Los radicales son capaces de dañar, de forma reversible o irreversible, todo tipo de compuestos bioquímicos, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos libres, lípidos, carbohidratos y macromoléculas. Los ácidos grasos poli-insaturados son altamente sensibles al ataque de los radicales libres; éstos radicales pueden alterar la actividad celular, tanto a nivel de membranas como del metabolismo y expresión génica. Las formas en las que actúa un radical en un sistema biológico, son por medio de los procesos oxidativos, considerando que oxidación de moléculas biológicas no siempre es un proceso dañino (Bohorquez, 2016)¹¹.

Existen reconocidas fuentes endógenas y exógenas de radicales libres:

Fuentes endógenas:

- Mitocondria: Constituye la fuente principal de radicales libres. Cada una produce alrededor de 10^7 millones de radicales libres al día. Ocurre a nivel de la cadena de transporte de electrones, cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP. En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones. Un resultado directo de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Sin embargo, variaciones dentro de la cadena de transporte de electrones pueden aumentar estos niveles en la mitocondria. En medio de este proceso de transferencia de electrones la coenzima Q es oxidada formando la ubisemiquinona, la cual es un radical intermediario que al entrar en contacto con el oxígeno produce radicales superóxidos (Estrada Pablos e Iglesias González, 2017)¹².
- Peroxisomas: Estos organelos poseen enzimas que producen H_2O_2 . Convierten al H_2O_2 en H_2O y O_2 , aunque en aquellos casos en donde el peróxido de hidrógeno no es dismutado por el sistema peroxisomal se produce inevitablemente daño celular (Corrales y Muñoz; 2012)¹³

- Citocromo P-450: se encuentra en el retículo endoplasmático y su función consiste en catalizar las reacciones que generan O_2 , mediante mecanismos dependientes de NADPH. Este sistema ofrece las condiciones adecuadas para que se produzcan radicales libres, en vista que cuentan con la presencia de iones de metal de transición, oxígeno y además se realiza la transferencia de electrones (Corrales y Muñoz; 2012)¹³
- Fagocitosis: La descarga respiratoria de los fagocitos activados no llena una necesidad energética, sino que está dirigida a la generación de metabolitos de oxígeno, algunos de ellos verdaderos radicales, encaminados a destruir a las bacterias invasoras fagocitadas, gracias a su potente actividad oxidante. Una defensa tan eficiente debe tener un precio, ya que las mismas moléculas bactericidas O_2^- , H_2O_2 , $OH\cdot$, OCl^- y $^1O_2^*$ pueden producir daño en el mismo ambiente en que los fagocitos actúa (Huberman, s.f)¹⁴
- Xantina deshidrogenasa: se encuentra predominando en los endotelios y depura a las xantinas. Al combinarse su actividad con la de la xantina oxidasa, se generan O_2 y H_2O_2 .

Fuentes exógenas:

- Exposición a rayos X, al tabaco, al ozono, a contaminantes del aire y productos químicos industriales, además de

medicamentos como acetaminofeno, halotano, adriamicina, menadiona, ozono, cloranfenicol, aminoglucósidos, nitrofurantoína, tetraciclina y digitálicos (Estrada Pablos e Iglesias González, 2017)¹².

- **Especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS)**

El término ROS se refiere a un grupo de moléculas conteniendo oxígeno con diferente reactividad química. Se les considera como metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos que poseen una fuerte capacidad oxidante, aunque dicha capacidad varía entre las diferentes especies (Carvajal Carvajal, 2019)¹⁵.

Como la mayoría de los radicales de interés biológico derivan del oxígeno o del nitrógeno, a éstos se los conoce habitualmente como ROS o especies reactivas de oxígeno. Los principales ROS son el anión superóxido (O_2^-) y sus derivados el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot) (Vaquero-Raya y Molero-Richard, 2005)¹⁶.



Figura 1. Especies reactivas de oxígeno (ROS). Fuente: Autor

La primera reducción del oxígeno da lugar al anión superóxido, una molécula relativamente inestable, con una vida media de milisegundos y un sobrio radio de difusión dado su limitado paso a través de los lípidos. El

O_2^- es prontamente transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) espontáneamente o por acción de la enzima superóxido dismutasa. A pesar de no ser estrictamente un radical libre de oxígeno por carecer de electrones no pareados, el H_2O_2 puede ejercer como potente oxidante en presencia de metales de transición. Su extensa vida media y su elevada capacidad de difusión lipídica y convierten al H_2O_2 en un mediador esencial en la señalización celular. El H_2O_2 es convertido en agua por la catalasa en los peroxisomas o por la glutatión peroxidasa en el citoplasma. Alternativamente, en presencia de metales de transición reducidos (Fe^{2+} o Cu^+), el H_2O_2 puede reaccionar con el O_2^- y generar radicales hidroxilos (HO^\cdot) a través de la reacción de Fenton o Haber-Weiss, los cuales son extremadamente reactivos, poseen una vida media muy corta y la capacidad de reaccionar con cualquier molécula que hallen a su paso (Vaquero-Raya y Molero-Richard, 2005)¹⁶.

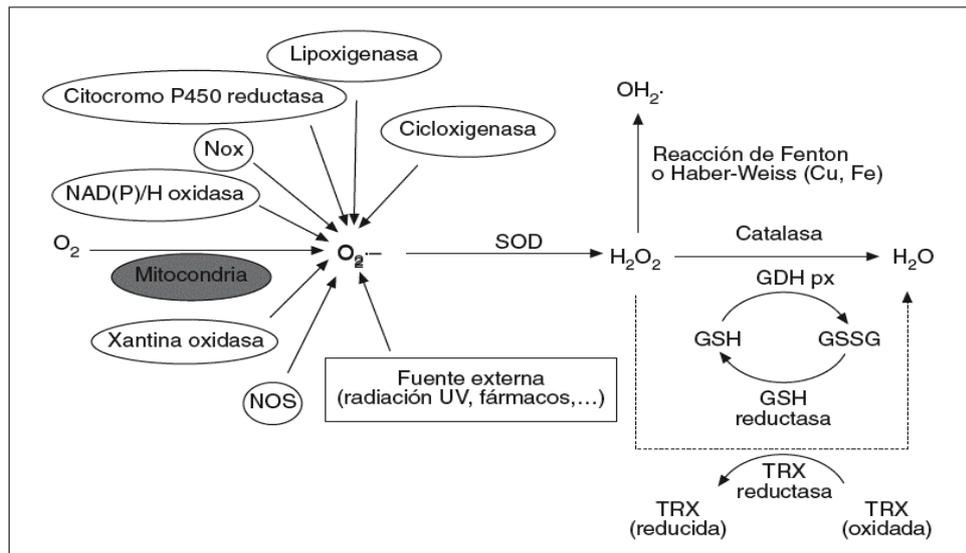


Figura 2. Formación y metabolización celular de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Fuente: Vaquero-Raya, E; Molero-Richard, X¹⁶

2.2.7. Antioxidantes

Son nutrientes capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, sin perder su estabilidad electroquímica. Actúan donando electrones y evitando que los radicales libres los capten de las células (Peiró Sánchez, 2015)¹⁷.

Los antioxidantes imposibilitan que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente – membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular.

La acción del antioxidante es de inmolación, pues cambia su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas como proteínas, lípidos, ADN, etc (Peiró Sánchez, 2015)¹⁷.

En los organismos aerobios, se cuenta con el sistema de defensa antioxidante, como enzimas, moléculas (como antioxidantes preventivos), antioxidantes nutricionales. Estos van a reaccionar con sustancias llamadas radicales libres, los que serán capaz de finalizar la cadena de propagación de este radical libre; por lo tanto, se puede mencionar que habrá menos daño a órganos que pueden sufrir lesiones o modificaciones celulares (Aliaga Palomares y Muñoz Suarez, 2018)¹⁸.

La capacidad antioxidante está determinada a su vez por:

- a) Reactividad química del antioxidante asociada a la actividad antirradicalaria o estabilizadora de radicales libres.
- b) Capacidad para acceder al sitio de reacción
- c) Estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres¹⁸.

2.2.8. Tipos de antioxidantes

Existen diferentes grupos de antioxidantes que tienen una función principal en las células, protegiéndolas en el exterior (protección extracelular) como en el interior (protección intracelular).

Pueden ser solubles en agua y solubles en grasas, por lo que es importante asegurar que ingerimos antioxidantes de los dos tipos, para garantizar una mejor protección. Por ejemplo: si una persona sana ingiere únicamente antioxidantes solubles en agua provenientes de la vitamina C, vitamina A, de frutas como la uva, cereza, kiwi o fibra, las membranas de estas células seguirán siendo

indefensas a los radicales libres, protegiendo solo el interior de esta, pero dejándola indefensa en el exterior (Figuroa Díaz y Mollinedo Moncada, 2017)⁷.

Existen diversas formas para clasificar a los antioxidantes, como su origen y presencia en el organismo, permitiendo diferenciar entre aquellos antioxidantes que son normalmente bio-sintetizados por el organismo, y aquellos que ingresan a través de la dieta.

Con respecto a los biosintetizados por el organismo, podemos diferenciar a los antioxidantes enzimáticos y los no enzimáticos.

- **Los antioxidantes enzimáticos:** superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas y sulfoxi-metionina-reductasas.

- **Los antioxidantes no-enzimáticos:** glutatión, ácido úrico, ácido dihidro-lipóico, metalotioneína, ubiquinol (o Co-enzima Q) y melatonina. Dichos aportes al organismo no son muy significativos debido a que con el tiempo pueden generar problemas gastro intestinales (Patricio Miranda y Sifuentes Herrera, 2019)¹⁰.

Respecto a los antioxidantes que ingresan al organismo solo a través de la dieta, estos se clasifican, esencialmente, en:

- Vitaminas-antioxidantes, como ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta caroteno (o pro-vitamina A).

- Carotenoides (como luteína, zeaxantina y licopeno).

- Polifenoles, en sus categorías de flavonoides y no-flavonoides.

- Compuestos que no están en las tres categorías anteriores, como algunos glucosinolatos (ej. isotiocianatos) y ciertos compuestos organoazufrados (ej. dialil-disulfido) (Patricio Miranda y Sifuentes Herrera, 2019)¹⁰.

Por otro lado, los antioxidantes también pueden clasificarse en dos grandes grupos, dependiendo de cómo actúan químicamente, en antioxidantes primarios o tipo I y antioxidantes secundarios o tipo II.

2.2.9. Antioxidantes primarios o tipo I

Los llamados antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas ERO. Esto se logra convirtiendo las ERO en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su generación a partir de otras moléculas. Son conocidos en inglés como “free radical scavengers”, o sea “atrapadores de radicales libres” (Figuroa Díaz y Mollinedo Moncada, 2017)⁷ (Galano, 2017)¹⁹.

En este grupo se destacan las siguientes enzimas:

- El glutatión peroxidasa (GPx): Es una enzima dependiente de selenio, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a lipoperóxido. Se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citosol. La GPx fosfolípido hidroperóxido, tiene como función principal proteger al organismo contra la peroxidación lipídica a nivel de membranas y de las lipoproteínas de baja densidad (Mora Agüero, Zeledón Aguilera, Vargas Rubio, 2019)²⁰

- Coenzimas superóxido: Tienen como cofactores el cobre, zinc, hierro y manganeso. Estas enzimas dismutan el oxígeno y su principal función es la protección contra el anión superóxido (Mora Agüero, Zeledón Aguilera, Vargas Rubio, 2019)²⁰
- La catalasa: Presenta dos funciones importantes: catalítica y peroxidativa, y forma parte del sistema catalasa/superóxido dismutasa, el cual actúa cuando existen altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Mora Agüero, Zeledón Aguilera, Vargas Rubio, 2019)²⁰

Podemos mencionar además a:

- Ácido úrico: El ácido úrico posee un potencial redox estandarizado intermedio entre los diferentes agentes antioxidantes y las especies reactivas derivadas del oxígeno. De esta forma, por sus mayores concentraciones plasmáticas pudiera ceder electrones (o equivalentes de reducción) y reducir la capacidad oxidante de especies muy reactivas como el propio radical hidroxilo o sus derivados (Díaz Arce y Cabada Pérez, 2010)²¹.

Mecanismo de Acción

Se da a través de la interacción directa con las especies reactivas; el cual; es a su vez el mecanismo más importante y más conocido de los antioxidantes. Se refiere a la capacidad que tienen muchos

antioxidantes para actuar como “estabilizadores o apagadores de diversas especies reactivas”.

En el caso de los radicales libres, tal acción implica su estabilización a través de la cesión de un electrón a dichas especies reactivas. Tal mecanismo, definido como “SET” (single electron transfer), permite que el radical libre pierda su condición por “pareamiento” de su electrón desapareado (Patricio Miranda y Sifuentes Herrera, 2019)¹⁰.

Mecanismo SET



Figura.3 Mecanismo SET. Fuente: Autor

Junto al mecanismo SET, muchos antioxidantes pueden estabilizar radicales libres a través de un mecanismo que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno (esto es un electrón con su protón). Este mecanismo es definido como “HAT” (hydrogen atom transfer). En este último caso, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente (Patricio Miranda y Sifuentes Herrera, 2019)¹⁰.

Mecanismo HAT



Figura.4 Mecanismo HAT. Fuente: Autor

2.2.10. Antioxidantes secundarios o tipo II

Los antioxidantes secundarios capturan los radicales y evitan las reacciones en cadena. Retardan la oxidación por vías de acciones indirectas incluyendo quelación de metales, reparación de antioxidantes primarios donándoles átomos de H o electrones, descomposición de H_2O_2 en especies no radicalarias, absorción de luz ultravioleta, etcétera (Patricio Miranda y Sifuentes Herrera, 2019)¹⁰ (Galano, 2017)¹⁹.

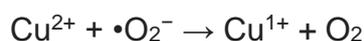
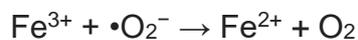
Ejemplos de ellos son el β -caroteno, la vitamina E y C, y sustancias endógenas con capacidad antioxidante, entre las cuales se encuentran bilirrubina, glutatión urato y ubiquinona (Patricio Miranda y Sifuentes Herrera, 2019)¹⁰.

En el caso de los antioxidantes tipo II, la variedad de rutas químicas a través de las que ejercen su efecto protector es aún mayor. En esta oportunidad vamos a enfocarnos solamente en aquellas que son relevantes cuando su acción involucra la quelación de iones metálicos. Esta acción es importante ya que dichos iones frecuentemente participan en la producción del radical hidroxilo que, como se mencionó anteriormente es particularmente dañino. Cabe mencionar que las fuentes intracelulares más importantes de este radical son las reacciones tipo Fenton y de recombinación de Haber-Weiss (Galano, 2017)¹⁹. Cuando éstas involucran a hierro o cobre pueden escribirse como:

Reacciones Tipo Fenton:



Primer paso de las reacciones tipo Haber-Weiss:



Y el segundo paso de estas últimas corresponde a las reacciones tipo Fenton.

Es importante destacar que las formas más estables y abundantes de hierro y cobre son Fe (III) y Cu (II). Por lo tanto, para que se produzca el radical $\bullet\text{OH}$ en sistemas biológicos el paso clave es la reducción de estos iones a Fe (II) y Cu (I), que son los involucrados en las reacciones tipo Fenton. Por lo tanto, si se logra inhibir el primer paso de la recombinación de Haber-Weiss no habría los iones necesarios para la producción de $\bullet\text{OH}$. Entonces esta sería una buena forma de inhibir la formación de este radical (Galano, 2017)¹⁹.

Los antioxidantes tipo II pueden actuar como ligantes inhibidores de $\bullet\text{OH}$ en sistemas biológicos. A los antioxidantes con este efecto se les conoce como antioxidantes OIL, por sus siglas en inglés (OH inactivating ligands). Esta acción puede ocurrir de dos formas:

-OIL-1: Secuestrando a los iones metálicos de los reductores. a través de la formación de complejos en los que la reducción del ión metálico ya no es posible.

-OIL-2: Desactivando a los radicales hidroxilos tan pronto se forman por la reacción de Fenton. En este caso los ligantes son el marco molecular más cercano al sitio de formación del \bullet OH, ya que están unidos al centro metálico involucrado en la reacción tipo Fenton. De modo que una vez formado el radical, este reacciona con los ligandos (por ser los más cercanos) quedando desactivado antes de poder dañar blancos biológicos (que se encuentran más lejanos) (Galano, 2017)¹⁹.

2.2.11. Tipos de antioxidantes

Existen distintos tipos de antioxidantes y, de acuerdo a su origen, ellos se pueden clasificar como naturales o sintéticos.

Los antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son aplicados con frecuencia a productos farmacéuticos, cosméticos y alimentarios. Los más ampliamente usados son el Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA), Terbutilhidroquinona (TBHQ) y Galato de Propilo (PG) (Toro Vega, 2016)²².

Los antioxidantes naturales

Los más estudiados son los procedentes de las plantas superiores. La mayoría de ellos son compuestos fenólicos, productos del metabolismo secundario. Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo, y éstos desempeñan diversas funciones fisiológicas y

contribuyen a las características organolépticas de los alimentos de origen vegetal, intervienen en el color natural y en el sabor. Los más utilizados son los tocoferoles; también conocidos como vitamina E (Toro Vega, 2016)²².

2.2.12. Metabolitos responsables de la actividad

Los metabolitos más reconocidos por su actividad antioxidante son los de naturaleza fenólica: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, quinonas, cumarinas, lignanos y estilbenos (Toro Vega, 2016)²².

2.3. MARCO CONCEPTUAL

2.3.1. Screening fitoquímico: El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Selvafarma.webnode.es., 2011)²³.

2.3.2. Metabolitos secundarios: Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. La ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, algunas veces, de manera grave (es.Scribd.com, 2013)²⁴.

2.3.3. Planta hemiparásita: Se denomina hemiparásita a la planta que en condiciones naturales es parcialmente parásita. Consigue

alguna o todas las sustancias nutritivas que necesita para su desarrollo, como agua y sales minerales, desde otra planta, en lugar de captarlas del suelo. Es decir que para subsistir depende completa o parcialmente de otros organismos (cienciamx.com., s.f.)²⁵.

2.3.4. Radical libre: Un radical libre se define como una especie química con capacidad de existencia independiente que posee un orbital con un electrón desapareado, lo que le otorga una especial reactividad (Terrado Quevedo, Barthelemy Vidaillet, Valls Alvarez y Armand Lorié, s.f.)²⁶.

2.3.5. Especies Reactivas de oxígeno (ERO): Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O₂) por reducción química parcial. En este grupo se incluyen a los peróxidos de hidrógeno (H₂O₂), producidos cuando el O₂ es reducido con 2 electrones, y las formas reactivas del oxígeno, que abarcan a los superóxidos y al radical hidroxilo (HO) (Carrillo Esper et al., 2016)²⁷.

Las ERO tienen un papel indiscutible en los procesos fisiológicos habituales, sin embargo, pueden ejercer a su vez efectos tóxicos. Las ERO son generadas como resultado del metabolismo y son esenciales para la producción de energía, la síntesis de compuestos biológicamente esenciales y la fagocitosis, un proceso crítico para el sistema inmunológico. Éstas también juegan un papel importante en la transducción de

señales, que es importante para la comunicación y función de las células. Por otro lado, en los últimos 20 años se ha incrementado la evidencia que demuestra que las ERO pueden ser las causantes de distintos padecimientos, incluyendo el cáncer, enfermedades coronarias y el envejecimiento. La reacción del radical hidroxilo con lípidos insaturados es la cascada más conocida de daño inducido por radicales (ADN) (Carrillo Esper et al., 2016)²⁷.

2.3.6. Antioxidante: Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes, retardan e inhiben la oxidación de sustratos susceptibles al ataque de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Eugenia Sánchez, 2019)²⁸.

2.3.7. Estrés oxidativo:

El daño o estrés oxidativo es el resultado de reacciones metabólicas que utilizan O₂ y representa una alteración en el equilibrio pro-oxidante/antioxidante en los sistemas vivos con capacidad de oxidar biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN) e inhibir su estructura y función normal. Es importante mencionar que el equilibrio entre los efectos benéficos y perjudiciales de los radicales libres es un aspecto vital para los organismos vivos, el cual se alcanza mediante mecanismos de “regulación redox” que protegen a los organismos vivos del estrés oxidativo; en los que intervienen los antioxidantes y atrapadores de radicales libres (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013)²⁹

El establecimiento del estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno impactan a una extensa variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico-degenerativas con impacto epidemiológico (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013)²⁹

Se ha encontrado amplia relación entre la presencia de estrés oxidativo y el desarrollo de las siguientes patologías:

Cáncer: El cáncer básicamente afecta el mecanismo de control que rige la diferenciación y proliferación de las células. En el proceso de peroxidación lipídica de estas estructuras, se producen en diferentes tejidos, sustancias mutágenas y factores cancerígenos derivados de ciertos ácidos grasos, que como productos de degradación originan hidroperóxidos, endoperóxidos, radicales alcoxil, enoles y aldehídos que actúan como agentes proneoplásicos con acción directa sobre el ADN nuclear y mitocondrial (Viada, Gómez y Campaña, 2017)³⁰

Enfermedad cardiovascular: Se caracteriza por una etiología multifactorial: hipercolesteronemia, hipertensión, diabetes, sedentarismo, fumado, dieta desbalanceada y estrés. Los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las lipoproteínas son vulnerables a la oxidación de radicales libres, por lo que favorece la aterogénesis. Debido a esto, el estrés oxidativo tiene un efecto directo y clave para el desarrollo de aterosclerosis (Mora Agüero et al., 2019)²⁰.

Enfermedades neurológicas: El estrés oxidativo se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades como Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple y depresión. El sistema nervioso central (incluyendo el cerebro, espinal dorsal y nervios periféricos), es alto en contenido de ácidos grasos insaturados e hierro, además, tiene una alta actividad aeróbica que lo hace susceptible al daño oxidativo (Mora Agüero et al, 2019) ²⁰.

Enfermedades respiratorias: Con respecto al humo del tabaco, cuando una persona no fumadora permanece media hora en una sala que contiene humo de tabaco, sus depósitos de antioxidantes descienden al mínimo. El RL paraoxona aportado por sendas fases del humo del tabaco inhalado disminuye los niveles de la enzima paraoxonasa, ocasionan daño severo de la túnica elástica del alvéolo, lo cual conduce a la bronquitis crónica, enfisema pulmonar y, en otros casos al carcinoma bronquial (Viada et al, 2017).³⁰

Artritis reumatoidea: Esta es una enfermedad inflamatoria crónica, que afecta las articulaciones y sus tejidos alrededor, se caracteriza por la presencia de macrófagos e infiltración de células T activadas. Los radicales libres influyen en esta patología en cuanto a la iniciación y progresión de la misma (Mora Agüero et al, 2019) ²⁰.

Enfermedades renales: La presencia de radicales libres induce el reclutamiento de células inflamatorias y la producción de citoquinas proinflamatorias. Cuando este estímulo actúa de manera persistente sobre el tejido renal, se genera inicialmente un estado de inflamación con posterior abundancia de tejido fibrótico que potencialmente conlleva a falla renal (Mora Agüero et al, 2019)²⁰.

2.3.8. Polifenoles: Metabolitos secundarios que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Villanueva Alayo, 2016)³¹.

Los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres (Villanueva Alayo, 2016)³¹.

2.3.9. Flavonoides: Constituyen el grupo más importante dentro de los compuestos fenólicos, siendo los polifenoles más distribuidos en las plantas. Tienen bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos: dos anillos benceno unidos a

través de un anillo pirona o pirán heterocíclico (García Vargas, 2008)³².

La estructura base de los flavonoides tiene el esqueleto de una chalcona y la acción de la enzima isomerasa la convierte en una flavanona (García Vargas, 2008)³².

Dentro de los flavonoides, se reconocen 6 y quizás 7 clases principales, según los grupos funcionales que posean: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, los taninos condensados, y algunos autores consideran también a las auronas, que otros integran a las chalconas. Ellos son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales en la oviposición, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos; además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante (Cartaya y Reynaldo, 2001)³³.

2.3.10. Antocianinas: Las antocianinas, son un grupo de pigmentos de color rojo hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Químicamente, son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, llamada aglicona a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. El uso como colorantes alimenticios, mejoran la apariencia total, puesto que son muy benéficas para

la salud. Por ello, varios estudios muestran evidencia científica que los extractos abundantes en estos compuestos pueden mejorar la agudeza visual, mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales y actuar como agentes quimioprotectores. Es conocido también que las antocianinas juegan un papel importante en las propiedades antidiabéticas como control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores (Oyola Aquino, 2016)³⁴.

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1 TIPO, NIVEL Y DISEÑO DE LA INVESTIGACION

3.1.1 Tipo de investigación: Aplicada

La investigación aplicada se caracteriza por resolver un determinado problema o planteamiento específico, enfocándose en la búsqueda y consolidación del conocimiento para una posterior aplicación que enriquecerá el desarrollo cultural y científico.

3.1.2 Nivel de investigación: Descriptivo- Explicativo

Descriptivo: Consiste en llegar a conocer las situaciones, costumbres y actitudes predominantes a través de la descripción exacta de las actividades. Es examinar características del problema escogido.

Explicativo: Se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto. Pues establecemos la posible relación entre la presencia del tipo de metabolitos secundarios hallados y la actividad antioxidante que presenta el extracto etanólico de las hojas de la especie en estudio.

3.1.3 Diseño de la investigación: Analítica

Se emplea este diseño porque se obtiene suficiente información de la situación en estudio, lo cual nos permite probar hipótesis en el proyecto planteado. Incluyen un grupo de comparación en el

caso de la actividad antioxidante de un patrón. Por lo tanto estamos hablando también de un diseño cuantitativo y transversal.

3.2 MATERIALES DE TRABAJO

3.2.1 Materiales de laboratorio

- Balones
- Fiolas
- Probetas
- Matraces Erlenmeyer
- Agitadores de vidrio
- Vasos de precipitado
- Tubos de ensayo
- Embudos
- Vasos de vidrio
- Espátulas de metal
- Pinzas metálicas
- Luna de reloj
- Soporte universal
- Aro de soporte
- Pipetas de 1mL, 5mL y 10mL
- Peras de bromo
- Propipetas
- Baguetas
- Micropipetas 100uL

- Micropipetas 1000uL

3.2.2 Material biológico

Hojas de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa"

3.2.3 Equipos

- Balanza analítica (BOECO)
- Evaporador rotatorio marca HEIDOLPH modelo LABOROTA 4000.
- Espectrofotómetro UV/Vis 2100 (UNICO 2100)
- Baño ultrasonido (UC-10)
- Estufa/incubadora Binder B-28

Reactivos

- Agua destilada
- Etanol 96°
- Alcohol 70°
- Diclorometano Q.P
- Metanol Q.P
- Hidróxido de Amonio 25%
- Ácido clorhídrico Q.P
- Acetato de Sodio Q.P
- Tricloruro férrico Q.P
- Ácido clorhídrico Q.P
- Ácido acético glacial Q.P
- 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH). Sigma -Aldrich
- Reactivo 2,4,6, tripiridyl-s-triazina (TPTZ).

- Trolox Hoffmann – La Roche

3.2.4 Otros

- Papel de filtro
- Papel de aluminio
- Guantes
- Guantes estériles
- Mascarillas
- Gafas protectoras
- Papel tissú
- Papel toalla
- Viales
- Micropipetas automáticas y tips para micropipetas

3.3 Población y Muestra

Muestra vegetal: Hojas de la especie *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa".

3.4 Métodos, técnicas y procedimientos de recolección de datos

3.4.1 Métodos y Técnicas

3.4.1.1 Recolección y clasificación de la Muestra Vegetal:

La especie vegetal fue recolectada en el pueblo de Tambo Quemado, Distrito de Leoncio Prado, provincia de Lucanas, Departamento de Ayacucho ubicada de 3500 a 4500 m.s.n.m. en abril del 2018 para su clasificación taxonómica, en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor

de San Marcos (N°127-USM-2018) según el sistema de Cronquist (1988).

Para el presente estudio una segunda colecta en diciembre del 2019.

3.4.1.2 Tratamiento de la muestra vegetal

Una vez hecha la recolección, se seleccionaron las hojas en buen estado, las mismas que se secaron en un ambiente ventilado bajo sombra durante un periodo de 15 días.

Al cabo del tiempo, se estabilizaron en una estufa a 35°C, hasta peso constante.

Posterior a ello, la muestra fue fraccionada manualmente hasta un tamaño adecuado.

3.4.1.3 Obtención del extracto etanólico

Se utilizó 1 kg de hojas secas y molidas, la extracción se realizó mediante el método de maceración durante 15 días, utilizando como solvente etanol 96°.

Posteriormente se filtró y el marco obtenido se sometió a reflujo por 4 horas; usando como solvente etanol 96°.

Los filtrados obtenidos fueron concentrados en un evaporador rotatorio a presión reducida a 45 °C hasta sequedad.

3.4.1.4 Screening fitoquímico:

Con el fin de identificar los grupos de metabolitos secundarios se realizó una marcha fitoquímica al extracto obtenido, la cual se basó en la extracción por solventes de diferente polaridad, en el que se obtuvieron 5 fracciones denominadas A, B, C, D, E y F; las mismas que fueron sometidas a reacciones de coloración y/o precipitación para la identificación de grupos de metabolitos secundarios (Albites Quispe y Cabezudo Sayritupac, 2009)³⁵ (Lock, 2016)³⁶

Obtención de Fracciones:

Se usó 100 g. del material seco y molido, se maceró por 20 horas con etanol y posteriormente se sometió a reflujo por 4 horas. Se filtró en caliente y se separó 2 mL al que se le llamó **Fracción A**. El resto se concentró a sequedad y presión reducida en un evaporador rotatorio a una temperatura de 45 °C.

Luego se realizó una extracción con HCl al 1% (2x100mL), se filtró y se obtuvo dos partes:

Insoluble: Se lavó hasta pH neutro con agua destilada, seguidamente se disolvió con 5mL de diclorometano, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y este filtrado constituyó la **Fracción B**.

Solución Ácida: Se filtró y alcalinizó con hidróxido de amonio, se extrajo con diclorometano (2x100mL); se obtuvieron dos fases:

- *Fase Diclorometánica*: Se lavó con 10 mL de agua destilada, luego la fase diclorometánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró obteniéndose la **Fracción C**.

- *Fase Acuosa*: Se saturó con 5g de sulfato de sodio anhidro y se extrajo con diclorometano: etanol (3:2) (2x100mL). Se obtuvieron dos fases:

*Fase Orgánica: (Diclorometánica-etanólica). Se lavó con solución de sulfato de sodio anhidro (10 mL) reuniendo las fases acuosas. Seguidamente la fase orgánica se deshidrató con 1g de sulfato de sodio anhidro. Se filtró y esto constituyó la **Fracción D**.

*Fase Acuosa: A esta se adicionó los residuos acuosos obtenidos del lavado de la fase orgánica; constituyendo la **Fracción E**.

Por otro lado, se mezcló 1g de droga seca con 20mL de agua y se agitó. Se hirvió durante 15 minutos. Luego se procedió a filtrar en caliente y completar a volumen (10 mL) a través del filtro, se dejó enfriar a temperatura ambiente constituyendo la **Fracción F**.

Posteriormente se realizaron ensayos para determinar la presencia de metabolitos secundarios.

Reacciones sobre las fracciones:

FRACCIÓN A

Detección de Taninos:

- Reacción de Gelatina- sal: Se vierte 0.5 mL de extracto sobre 5 mL de solución de NaCl 5%, gelatina 1% y gelatina-sal la precipitación con este último reactivo o con ambos el 1º y 2º es indicativo de la presencia de taninos, si solamente ocurre con el 1º, podría ser un falso positivo.
- Reacción de Cloruro Férrico: En un tubo de ensayo se coloca 0.5 mL. de la Fracción A y se le agregó una gota de solución acuosa de FeCl₃ 1%.

La reacción es positiva cuando aparecen colores azul-negro, verde o azul verdoso.

Detección de Aminoácidos:

- Reacción de Ninhidrina: Sobre tiras de papel de filtro se coloca con una pipeta capilar:
 - a) Una gota de Fracción A + una gota del reactivo Ninhidrina al 2%.
 - b) Blanco: Solución etanólica de ninhidrina al 2%.
 - c) Testigo: una gota de solución de metionina 5%.

Luego del secado a temperatura ambiente las tiras de papel se colocan en la estufa a 110 -120°C hasta la aparición de un color en el blanco. Se compara con la mancha azul violácea de la solución testigo. La reacción es

positiva si el papel de la muestra presenta un color azul violáceo.

Detección de Flavonoides:

- Reacción de Shinoda: En una placa se vierten 3 gotas, de la Fracción A, 5 limaduras de Mg., y 2gotas de HCl concentrado. La reacción es positiva cuando aparecen tonos de color rojo, anaranjado y violeta.

FRACCIÓN B

Detección de Triterpenoides y/o Esteroides:

- Reacción de Liebermann Burchard: Sobre 1 mL de la Fracción se adiciona 5 gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético/ácido sulfúrico (50:1).

La reacción es positiva si aparecen colores verdes, azul verdoso (vías rojo o azul).

Detección de Antraquinonas:

- Reacción de Bornträger: Sobre el resto de la Fracción B, disuelta en diclorometano, se agregan 5 mL de NaOH 5% y se agita suavemente. La reacción es positiva si la fase acuosa toma un color rojo.

FRACCIÓN C

Detección de Esteroides y/o Triterpenoides: Reacción de Liebermann Burchard.

Detección de Alcaloides:

El resto de la Fracción C se evapora a sequedad y luego se agrega 2 mL de HCl 1%, filtrar. Se realizan las reacciones de precipitación, de Dragendorff, Mayer, Hager, Wagner.

La reacción es positiva si aparece un precipitado.

FRACCIÓN D

Se evaporó a sequedad y luego se agregó 2,5 mL de etanol, efectuándose las siguientes reacciones:

Detección de Flavonoides: Reacción de Shinoda.

Detección de Leucoantocianidinas y catequinas:

- Reacción de Rosenheim: A 0,2 mL de la Fracción D se adiciona 0,1 mL de HCl concentrado, se calienta durante 10 minutos a 100°C. Enfriar, luego se adiciona 2 mL de agua y 0,4 mL de alcohol amílico, agitar y observar el color en la fase amílica. La reacción se considera positiva si aparece un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro.

Si es rojo indica presencia de antocianidinas. Si es marrón indica presencia de catequinas.

Detección de Cardenólidos: Reacción de kedde.

Detección de Esteroides y/o Triterpenoides: Reacción de Liebermann Burchard.

Detección de Alcaloides: Reacción de Mayer, Dragendorff, Hager y Wagner.

FRACCIÓN E

Detección de Flavonoides: Reacción de Shinoda.

Detección de Leucoantocianidinas: Reacción de Rosenheim.

FRACCIÓN F

Detección de Saponinas:

Prueba de espuma: En dos tubos de ensayo se agitan 2.5 mL de extracto por un minuto. Dejar reposar 15 minutos y observar la formación de espuma. Se considera negativa la reacción si la altura de la espuma es menor de 5 mm.

3.4.1.5 Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP).

FUNDAMENTO DEL MÉTODO FRAP:

Se basa en la capacidad que presentan los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ión férrico a ferroso en medio acuoso ácido. La reacción mide la reducción del 2,4,6,-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a un producto coloreado que se determina espectrofotométricamente a 593 nm. La reacción detecta compuestos con potenciales de reducción < 0,7 V, tal que este método es útil para un screening de la capacidad para mantener el status redox en células y tejido. Este método ha sido aplicado a muestras biológicas, principalmente plasma y suero, para conocer la influencia de la ingestión de bebidas como el vino en el estado oxidativo,

así como en frutas y verduras. Asimismo, modificaciones de este método han sido utilizadas para medir la actividad de flavonoides puro, principalmente flavonoles y flavonas y establecer relaciones estructura-actividad. La desventaja de este método es que solo mide la capacidad de reducción del ión férrico, lo cual no es relevante desde el punto de vista fisiológico. La absorción (593 nm) en el método original se realiza a los 4 minutos, sin embargo, esta no se detiene, incrementándose suavemente incluso después de varias horas en algunos polifenoles (Valenzuela Bustamante, 2019)³⁷.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO FRAP:

Primero se preparó el reactivo de trabajo, el cual es una mezcla de tampón acetato 300 mM (pH = 3.6), TPTZ 10 mM en HCL 40 mM, y tricloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM en una proporción 10:1:1 (v: v: v), una vez preparado, se añadió 3 mL de este reactivo en una cubeta, y se midió la absorbancia (blanco) a 593 nm.

Luego se agregaron 100 μL de las soluciones de los extractos y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó la lectura de absorbancia nuevamente a 593 nm; al resultado se le restó el valor del blanco.

La muestra se ensayó en varias concentraciones realizando 5 diluciones. Todas las diluciones se ensayaron por triplicado. Los resultados se expresaron en relación al trolox. Para ello se realizó diariamente una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 1.00 a 0.03 mM y se procedió igual que la muestras. Todos los puntos de la curva se realizaron por duplicado. Para la comparación de los resultados se extrapolaron los valores de la muestra en la curva estándar para expresar la actividad antioxidante en relación a los milimoles de trolox (Alarcón Arias, Salcedo Páucar y Sosaya Salazar,2018)⁵.

3.4.1.6 MÉTODO DPPH:

FUNDAMENTO DEL MÉTODO DPPH

El método que se empleó en este trabajo es el propuesto por Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Dicho radical tiene un electrón desapareado y presenta un color violeta el cual cambia a amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante, se midió esta reacción en un espectrofotómetro (Sánchez Chagua y Ramos Aparcana, 2013)³⁸.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DPPH

El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante.

La solución del reactivo de DPPH es de color violeta y presenta una absorbancia a 518 nm. La reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuesto puro o extracto) por el radical libre DPPH, desarrollando un cambio del color violeta a amarillo a medida que disminuye la concentración del radical libre; el que se lee en el espectrofotómetro después de veinte a treinta minutos de reacción. La reacción entre la sustancia a evaluar y el DPPH.

Preparación del DPPH: se preparó pesando 3,9 mg de DPPH en un matraz aforado previamente tarado y se disolvió en 100 mL de metanol. La solución se colocó en un sonicador para asegurar la buena disolución y luego comprobar que la absorbancia a 517 nm esté ente 0,9 y 1,1.

Ensayo con muestras: Se hicieron las diluciones correspondientes en etanol. De estas soluciones, se tomó 0,1 mL al que se le adicionó 2,9 mL de la solución de DPPH, se agitó vigorosamente y se dejaron reposar en la oscuridad. Pasado 30 minutos las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro de UV/VIS a 517 nm. El blanco fue metanol en lugar de la solución antioxidante. El ensayo se realizó por triplicado.

Los resultados experimentales se expresaron como el valor IC₅₀, es decir, la concentración de la muestra problema que

produce una inhibición del 50% del radical libre DPPH (Alarcón Arias, Salcedo Páucar y Sosaya Salazar,2018)⁵.

3.4.2 Lugar de la investigación

Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Química Farmacéutica, Departamento de Ciencias Químicas.

3.4.3 Técnicas de procesamiento de la información

3.4.3.1 Recolección de datos analíticos

Se realizó en los cuadernos de trabajos donde se registraron los resultados obtenidos de las aplicaciones de las técnicas analíticas empleadas en cada caso.

3.4.3.2 Procesamiento de datos

Los datos fueron procesados en el Programa Microsoft Excel 2013 y se expresan como promedios a partir de los cuales se elaboraron los gráficos respectivos.

3.4.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos durante los procesos de análisis de la determinación de la actividad antioxidante serán sometidos a técnicas de análisis paramétricas como: determinación del promedio y la desviación estándar, y técnicas no paramétricas como el coeficiente de correlación para poder hallar IC₅₀ o el TEAC de acuerdo al método aplicado.

3.4.5 Contrastación de hipótesis

En el presente estudio se realizó la contrastación de las hipótesis específicas mediante la aplicación de la estadística, haciendo uso del programa SPSS versión 25, teniendo en cuenta un nivel de significancia de 0,05.

Considerando:

HIPÓTESIS ESPECÍFICA 1

H₀: El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" no presenta actividad antioxidante por el método DPPH.

H₁: El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa" presenta actividad antioxidante por el método DPPH.

Como el nivel de significancia bilateral (0,001) es menor que 0,05; trabajando con un nivel de confianza del 95%, se rechaza la hipótesis nula (H₀), aceptándose por ende la hipótesis alterna (H₁).

HIPÓTESIS ESPECÍFICA 2

H₀: El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa” no presenta actividad antioxidante por el método FRAP.

H₁: El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa” presenta actividad antioxidante por el método FRAP.

Como el nivel de significancia bilateral (0,000) es menor que 0,05; trabajando con un nivel de confianza del 95%, se rechaza la hipótesis nula (H₀), aceptándose por ende la hipótesis alterna (H₁).

Por lo tanto, se acepta la **hipótesis alterna general**.

H₁: El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa” presenta actividad antioxidante.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS:

Clasificación taxonómica

Como resultado de la Clasificación Taxonómica según la Clasificación de Cronquist (1988) y determinado por el Blgo. Severo Baldeón Malpartida.

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: MAGNOLYOPHITA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: SANTANALES

FAMILIA: LORANTHACEAE

GÉNERO: *Tristerix*

ESPECIE: *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt

Nombre vulgar: Pupa, Popa

Cálculo del rendimiento del extracto etanólico

1000 g de hojas secas y molidas ----- 100 %

400 g de extracto etanólico ----- x

$$x = \frac{400 \text{ g extracto etanólico}}{1000 \text{ g hojas secas y molidas}} * 100 = 40 \%$$

Tabla 1. Resultado de la marcha fitoquímica del extracto etanólico de hojas de la especie *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa”.

Fracciones	Reacción	Metabolitos	Resultados
A	Shinoda	Flavonoides	+
	Tricloruro férrico	Grupos fenólicos	+
	Gelatina	Taninos	-
	Ninhidrina	Aminoácidos	+
B	Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+
	Borntragen	Naftoquinonas y/o antraquinonas	-
C	Dragendorff, Mayer y Wagner	Alcaloides	-
	Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+
D	Dragendorff, Mayer y Wagner	Alcaloides	-
	Shinoda	Flavonoides	+
	Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+
	Rosenheim	Leucoantocianidinas	+
E	Shinoda	Flavonoides	+
	Rosenheim	Leucoantocianidinas	+
F	Espuma	Saponinas	+

Fuente: El autor; signo + indica presencia, signo – indica ausencia

Tabla 2. Valores de la curva de calibración de Trolox por el método FRAP.

Concentración de trolox (mM)	Absorbancia inicial	Absorbancia final	Absorbancia corregida
0,5	0,162	0,764	0,602
0,25	0,162	0,520	0,358
0,125	0,162	0,387	0,225
0,0625	0,162	0,302	0,140
0,03125	0,162	0,245	0,083

Fuente: El autor
La absorbancia final es el promedio de dos lecturas.

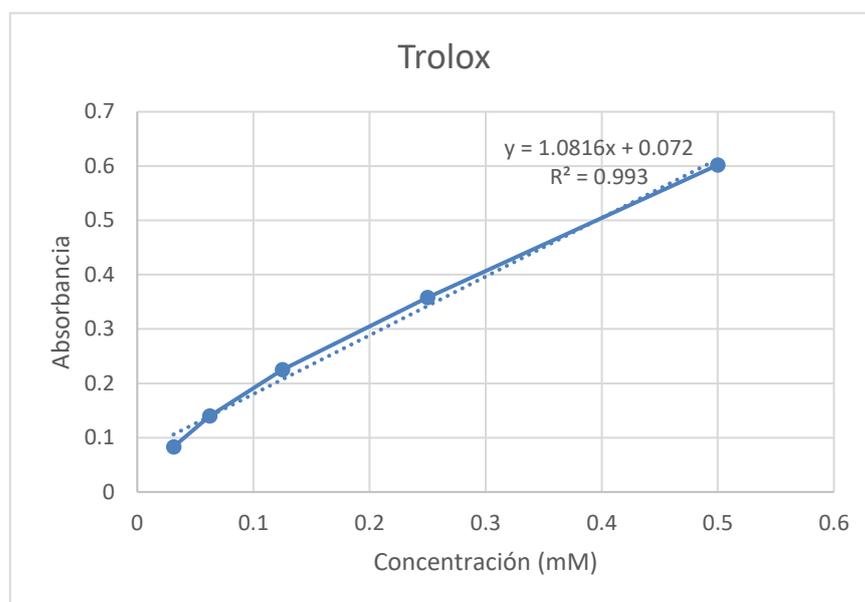


Figura 5. Curva de calibración de trolox para la actividad antioxidante por el método FRAP.

Tabla 3. Actividad antioxidante por el método de FRAP del extracto etanólico de hojas de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt "Pupa".

Extracto (mg/mL)	Absorbancia inicial	Absorbancia final	Absorbancia corregida	mM de trolox
0,0625	0,162	0,352	0,190	0,109
0,1250	0,162	0,474	0,312	0,222
0,2500	0,162	0,680	0,518	0,412
0,3125	0,162	0,784	0,622	0,509
0,3750	0,162	0,862	0,700	0,581

Fuente: El autor

La absorbancia final es el promedio de tres lecturas

La equivalencia a mM de trolox se obtiene a partir de la ecuación de la curva de calibración de la Fig. 5

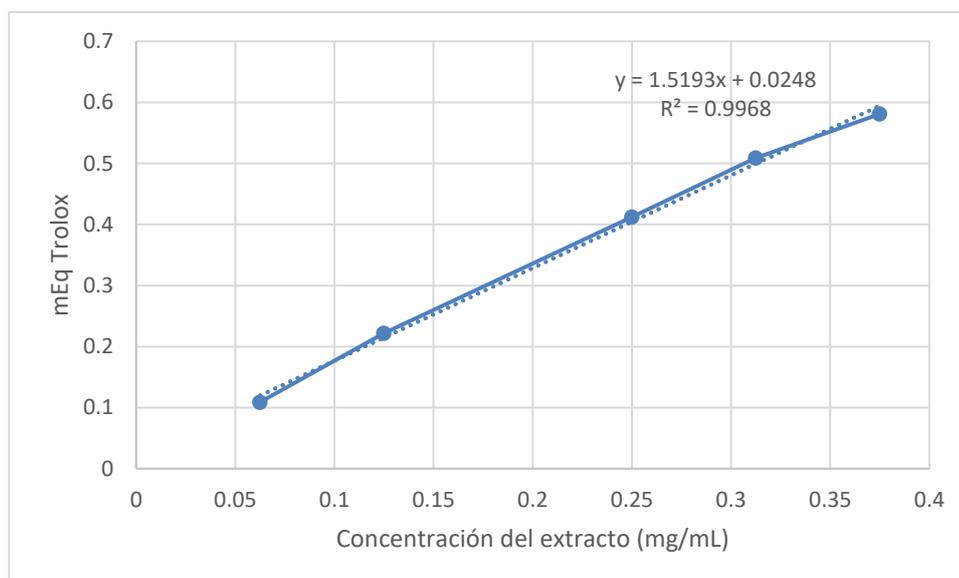


Figura 6. Correlación entre concentraciones del extracto y mM equivalentes de trolox.

$$\text{TEAC} = 0,642 \text{ mg/mL de extracto} \Leftrightarrow 1 \text{ mM de trolox}$$

Nota: se obtiene de la ecuación de la figura 6

Tabla 4. Actividad antioxidante por el método DPPH del extracto etanólico de hojas de *Tristerix chodatianus* (*Patschovsky*) *Kuijt* "Pupa".

Concentración del extracto (mg/mL)	Absorbancia promedio	Porcentaje de inhibición DPPH	IC ₅₀ (mg/mL) extracto
0,0625	0,817	13,09	0,2420
0,1250	0,737	21,60	
0,2500	0,505	46,28	
0,3125	0,321	65,85	
0,3750	0,151	83,94	
Blanco	0,940	-	

Fuente: El autor

La Absorbancia es promedio de 2 lecturas de cada concentración

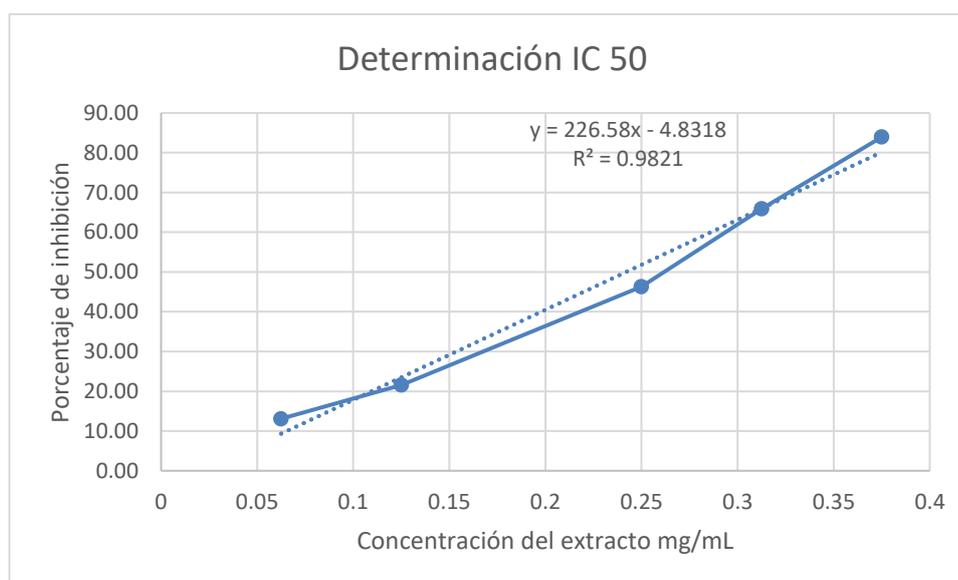


Fig. 7 Correlación de concentración del extracto etanólico de hojas de *Tristerix chodatianus* (*Patschovsky*) *Kuijt* "Pupa" vs porcentaje de inhibición del radical DPPH.

IC₅₀ se obtiene mediante la curva de la figura 7.

4.2. Discusión

En el presente trabajo de investigación, se determinaron los fitoconstituyentes del extracto etanólico de hojas de la especie *Tristerix chodatianus* (*Patschovsky*) *Kujit* "Pupa" y capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2, 4, 6-tri (2-piridil)-S-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), (FRAP), así como su capacidad antioxidante frente al 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); con el propósito de contribuir con evidencias a comprobar algunas de las propiedades atribuidas por la medicina popular en la prevención y tratamiento de patologías relacionadas al estrés oxidativo.

Se realizó un screening, tamizaje o marcha fitoquímica, que permitió determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos de la planta, a partir del cual, puede orientarse las extracciones y/o el fraccionamiento de los extractos eligiendo los grupos de mayor interés para el investigador. En el presente trabajo de investigación los grupos de mayor interés estaban constituidos por las fracciones A, D y E puesto que las pruebas ejecutadas sobre ellas permitieron determinar la presencia de metabolitos con actividad antioxidante teniendo en cuenta las referencias bibliográficas (Cabanillas Vargas y Chávez Alcántara, 2018)³⁹.

En la tabla 1 se muestra los metabolitos secundarios identificados en la marcha fitoquímica del extracto etanólico de hojas de la especie

Tristerix chodatianus (Patschovsky) Kuijt “Pupa”; siendo estos grupos fenólicos libres, flavonoides, grupos aminos libres, esteroides y/o terpenoides, leucoantocianidinas, catequinas y saponinas.

Los metabolitos secundarios mencionados son similares a los encontrados en el trabajo realizado por Albites et al. (2009).

La presencia de grupos fenólicos libres se determinó al realizar la prueba de tricloruro férrico; la cual evidenció un color azul verdoso al final de la reacción, caracterizándola como positiva. La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos (Cabanillas Vargas y Chávez Alcántara, 2018)³⁹.

La presencia de flavonoides se manifestó al realizar la prueba de Shinoda; la cual evidenció un color rojo magenta al final de la reacción; caracterizándola como positiva. La reacción de Shinoda permite distinguir algunos tipos de flavonoides: coloración naranja con las flavonas, rojo cereza con los flavonoles y violeta con las flavanonas; por lo que la coloración obtenida en nuestro caso sugiere la presencia de flavonoles; presencia que se pudo confirmar teniendo en cuenta los flavonoides aislados en el trabajo realizado por Medrano et al (2017) como Quercitrina, Quercetina, Rutina. En esta reacción, el magnesio

metálico es oxidado por el HCl concentrado, dando como productos al hidrógeno molecular, que es eliminado en forma de gas y el cloruro de magnesio, que es el que forma complejos con flavonoides dando coloraciones características (Sánchez Llaro y Vega Vásquez, 2012)⁴⁰.

La presencia de grupos aminos libres se determinó al realizar la prueba de Ninhidrina; la cual fue positiva al observar que el papel de la muestra presentó un color azul violáceo; color que en su mayoría se forma en contacto con aminoácidos cuyo grupo amino es primario.

Asimismo, la presencia de esteroides y/o terpenoides se manifestó al realizar la prueba de Liebermann- Burchard; la cual fue positiva al observarse un color verde. Los triterpenos de origen vegetal, cuya abundancia es reconocida, han sido reportados como compuestos con diversas propiedades dependientes de la dosis, entre las que resaltan el efecto anticancerígeno, función hepática, biliar y propiedades antiinflamatorias y antihipertensivas (Cely Veloza, Matulevich Javier y Castrillón William, 2014)⁴².

La presencia de leucoantocianidinas y/o catequinas se determinó al realizar la prueba de Rosenheim; la cual se consideró positiva al observar un color carmesí oscuro. Es necesario mencionar que las leucoantocianinas son precursores de las antocianinas, catequinas y taninos.

Las antocianinas se caracterizan por tener una deficiencia de electrones debido a su particular estructura química, que las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo. Por

consiguiente, pueden ser potentes antioxidantes naturales (Cabanillas Vargas y Chávez Alcántara, 2018)³⁹ (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila y Bravo, 2014)⁴³.

Debido a su capacidad antioxidante, las antocianinas (glucósidos de antocianidinas) y antocianidinas se asocian como compuestos beneficiosos para la salud. Por ejemplo, su consumo se ha asociado con la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como la enfermedad cardíaca coronaria y el cáncer (Peñarrieta et al., 2014)⁴³.

Por otro lado, las catequinas se consideran compuestos bioactivos. Por ejemplo, el consumo de catequina de los alimentos se asocia con la inhibición de la trombosis arterial, la actividad antiinflamatoria, la reducción del colesterol total y lipoproteína de baja densidad en vivo como parte de su capacidad antioxidante (Peñarrieta et al., 2014)⁴³.

Para la identificación de saponinas, la formación de espuma por más de 15 minutos y con una altura mayor a 5 mm indicó su presencia.

Las saponinas son glicósidos hidrosolubles, con propiedades tensoactivas y hemolíticas, ambas atribuidas a sus características estructurales de naturaleza anfifílica. Estos metabolitos también pueden ejercer una amplia actividad biológica y farmacológica, destacándose su efecto piscida, insecticida, anti-protozoos, antiinflamatorio, leishmanicida, anti-trichomonas, antiagregante plaquetario, broncolítico, hipocolesterolémico así como su actividad citotóxica frente a varias neoplasias (Mena Valdéz, Tamargo Santos,

Salas Olivet, Plaza Paredes, Blanco Hernández, Otero González y Sierra González, 2015)⁴⁴.

Con respecto a la determinación de la actividad antioxidante por ambos métodos, es necesario considerar que el ajuste lineal realizado a cada experimento no genera la ecuación real de la curva; por lo que, al momento de aplicar la fórmula, los resultados obtenidos presentan ligeras variaciones con respecto a la curva real a la que se denomina error típico.

En la tabla 2 observamos los valores de la concentración de las diluciones preparadas del Trolox (mM) y sus correspondientes absorbancias corregidas; las que se calcularon a través de la diferencia de la absorbancia final y la absorbancia inicial; valores que servirán para generar la curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP.

En la Figura 5 observamos la curva de calibración de Trolox, al cual se le realizó un ajuste lineal que generó la siguiente ecuación:

$y = 1,0816x + 0,072$; con una pendiente de 1,0816 y un intercepto de 0,072; teniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,993, que representa que el 99.3% de los datos se encuentran cercanos a la recta y no presenta alta varianza, lo que indica una buena linealidad.

En la Tabla 3, podemos observar los valores de las concentraciones preparadas del extracto etanólico (mg/mL), sus correspondientes absorbancias corregidas y su respectiva actividad antioxidante

expresada como mM equivalentes de Trolox, los cuales fueron calculados a partir de la ecuación en la Figura N°5.

En la figura N°6, se observa el gráfico que vincula la concentración de las muestras preparadas del extracto etanólico (mg/mL) con su actividad antioxidante expresadas en milimoles equivalentes al Trolox, al cual se le realizó un ajuste lineal, obteniendo la siguiente ecuación: $y = 1,5193x + 0,0248$; con una pendiente de 1,5193 y un intercepto de 0,0248; teniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9968; que refiere que el 99,68% de los datos se encuentran cercanos a la recta; por lo tanto, posee una buena linealidad.

La ecuación generada por el gráfico de la figura N°6, nos permitió calcular la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) del extracto etanólico de hojas de la especie *Tristerix chodatianus* (Patsch.) *Kuijt* "Pupa" cuyo valor fue de 0,642 +/- 0,008 mg/mL.

Con respecto a la determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico por el método DPPH, en la tabla N°4 podemos observar las concentraciones del extracto, sus absorbancias promedio, porcentajes de inhibición de DPPH y la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}), la que se calculó a partir de la ecuación generada por el gráfico de la figura N°7: $y = 226,58x - 4,8318$, con una pendiente de 226,58 y un intercepto de - 4,8318, teniendo un coeficiente de determinación de (R^2) de 0,9821, el cual refiere que el 98,21% de los datos se encuentran cercanos a la recta; por lo tanto, posee una buena

linealidad. En consecuencia, el valor del IC₅₀ fue de 0,2420 +/- 0,02 mg/mL.

CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de hojas de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) *Kuijt "Pupa"* tiene un rendimiento de 40% y los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de hojas de la especie fueron: grupos fenólicos libres, flavonoides, grupos aminos libres, esteroides y/o terpenoides, leucoantocianidinas, catequinas y saponinas.
2. El extracto etanólico de hojas de la especie *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) *Kuijt "Pupa"* presenta actividad antioxidante por el método FRAP, con una capacidad antioxidante equivalente al Trolox (mM) de **0,642** +/- 0,008 mg/mL.
3. El extracto etanólico de hojas de la especie *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) *Kuijt "Pupa"* presenta actividad antioxidante por el método DPPH; con una concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) de **0,242** +/- 0,02 mg/mL.

RECOMENDACIONES

1. A la comunidad académica interesada en el conocimiento de las propiedades medicinales de la biodiversidad de la flora del país; desarrollar más investigaciones sobre distintas especies, tanto conocidas como por conocer que permitan brindar un mejor panorama de las mismas para una futura aplicación terapéutica.
2. Continuar los estudios de investigación para el aislamiento y purificación de los fitoconstituyentes que permitan la posterior formulación de fitofármacos con actividad antioxidante.
3. Continuar con el estudio de la actividad antioxidante de *Tristerix chodatianus*; utilizando otros métodos para la evaluación de la misma.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Nayra E. Estudio fitoquímico preliminar y actividad antioxidante de las hojas de *Achyrocline alata* DC. (HUIRA-HUIRA) y su relación con su contenido de compuestos fenólicos totales. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2014.
2. Medrano J, Huamani E. Aislamiento y determinación de la estructura química de los metabolitos secundarios con actividad antioxidante obtenidos a partir del extracto de acetato de etilo de las hojas de *Tristerix chodatianus* (pastochovsky) "pupa". [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] Ica: Universidad "San Luis Gonzaga"; 2017.
3. Nickrentlab.siu.edu. [Internet]. D. L. Nickrent; 2009 [actualizado 24 Julio 2019, citado 30 de Julio 2019]. Disponible en: <https://nickrentlab.siu.edu/NickrentPDFs/FilogeniaTristerix.pdf>
4. Medel R., Botto-Mahan C., Smith-Ramírez C., Méndez M., Ossa C., Caputo L. et al. Historia natural cuantitativa de una relación parásito-hospedero: el sistema *Tristerix*-cactáceas en Chile semiárido. *Revista Chilena de Historia Natural* 2002; 75: 127-140.
5. Alarcón R., Salcedo Y. y Sosaya M. Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico de flores de *Cordia lutea* LAM. "Changuaro" [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Ica: Universidad Nacional "San Luis Gonzaga"; 2018.

6. 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
7. Figueroa SL, Mollinedo O. Actividad antioxidante del extracto etanólico del mesocarpio del fruto de *Hylocereus undatus* "pitahaya" e identificación de los fitoconstituyentes. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Norbert Wiener; 2017.
8. Pari R., Ramos H. Actividad antioxidante y antiinflamatoria del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora tripartita var. mollissima* (Kunth) "tumbo serrano". [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Norbert Wiener; 2019.
9. Tropicos.org. [Internet]. Missouri: Missouri Botanical Garden; 2019 [actualizado 24 Agosto 2019; acceso 30 Julio 2019]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/19101489>.
10. Patricio S., Sifuentes E. "Efecto de la técnica de secado y solvente en la determinación de polifenoles y actividad antioxidante de residuos de espárrago (*Asparagus officinalis*)". [Tesis para obtener el título de Ingeniero Industrial]. Nuevo Chimbote: Universidad Nacional Del Santa; 2019.
11. Bohorquez R. Determinación de actividad antioxidante de extractos de hojas de *Diplostephium phylloides* (Kunth) Wedd. Bogotá D.C.: Universidad El Bosque; 2016.

12. Estrada J., Iglesias M. Estrés Oxidativo y Oxigenación Hiperbárica. Invest Medicoquir.2017 (julio-diciembre); [Citado: 2019 julio 30]; 9(2):261-275. Disponible en:
<https://www.medigraphic.com/pdfs/invmed/cmq-2017/cmq172k.pdf>
13. Corrales L, Muñoz M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.2012; 10(18): 214-225.
14. Huberman A. La importancia médica de los radicales libres de oxígeno. Gac. Méd. s.f; 132 (2): 184-194.
15. Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. Medicina Legal de Costa Rica [Publicación periódica en línea] 2019, [citado: 2020 setiembre 28]; 36(1): 91-100. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es.
16. Vaquero-Raya EC, Molero-Richard X. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? Elsevier [Internet]. 2005 [citado: 2020 marzo 19]; 28(8): 473-484. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-especies-reactivas-oxigeno-enfermedades-inflamatorias-13078997>
17. Peiró S. Actividad antioxidante del té blanco y de los residuos de limón: optimización de la extracción y aplicaciones en carne y en envases activos [Tesis Doctoral]. Universidad de Barcelona, Facultad

de Farmacia Departamento de Microbiología y Parasitología sanitaria; 2015

18. Aliaga AM, Muñoz LS. Estudio del extracto etanólico de los rizomas de *Cúrcuma longa* L. "Cúrcuma" y su actividad antioxidante. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Norbert Wiener; 2018.
19. Galano Annia. Estrés oxidativo, radicales libres, antioxidantes y... ¿Química Computacional? BSQM. 2017; 11(3): 21-26.
20. Mora S, Zeledón AS; Vargas T. Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. Revista Médica Sinergia. 2019; 4(5): 89-100.
21. Díaz D, Cabada F. Ácido úrico: ¿Antioxidante o pro-oxidante? Su relación con la hipertensión arterial. *Panorama Cuba y Salud* [Publicación periódica en línea] 2010. [Citado: 2020 Setiembre 26]; (1):5-15. ISSN:1995-6797. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=4773/477348940002>
22. Toro V. Evaluación de la actividad analgésica aguda y crónica de *Phytolacca dioica*. [Internet]. Tesis.uchile.cl. 2016 [Acceso 03 Agosto 2019]. Disponible en: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-toro_v/pdfAmont/qf-toro_v.pdf.
23. Selvafarma.webnode.es. Metabolitos primarios y secundarios [Internet]. Chimbote: selvafarma.webnode.es; 2011. [Acceso 03 de agosto 2019] Disponible en:
http://files.selvafarma.webnode.es/2000001926def76ee8d/TEMA_04.pdf

24. es.Scribd.com. Metabolitos Secundarios [Internet]. es.Scribd.com; 2013 [Acceso 29 Octubre 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/159381861/METABOLITOSSECUNDARIOS#>
25. cienciamx.com. Planta hemiparásita [Internet]. México: cienciamx.com. [Acceso 25 febrero 2020]. Disponible en: <http://www.cienciamx.com/index.php/vocabulario/7594-planta-hemiparasita>
26. Terrado S., Barthelemy A., Valls M., Armand O. Radicales libres y defensas antioxidantes [Internet]. dialnet.unirioja.es; s.f [Acceso 05 de Agosto 2019]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6143751.pdf>.
27. 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.
28. Eugenia M. Antioxidantes. Consumo de Antioxidantes Naturales en Adultos Mayores de entre 65 y 75 años con Dislipidemia. [Tesis de pregrado] Buenos Aires: Universidad Abierta Interamericana, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud; 2019.
29. Sánchez V., Méndez-Sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Rev Invest Med Sur Mex. 2013; 20(3): 161-168.
30. Viada E., Gómez L. y Campaña I. Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico* [Publicación periódica en línea] 2017; [Citado 2020 setiembre 26] 21(1): 171-186. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014&lng=es&tlng=es

31. Villanueva J.B. Cuantificación de polifenoles totales en flor de *Senna reticulata* [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Chimbote: Universidad Católica Los Ángeles Chimbote. Facultad Ciencias de la Salud; 2016.
32. García M. Cuantificación de la actividad antioxidante en dos estadios de madurez de la carambola [Tesis para optar el título de Ingeniero de Alimentos]. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú. Facultad de ingeniería en industrias alimentarias; 2008.
33. Cartaya O., Reynaldo I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales [Internet]. 2001, 22(2), 5-14 [Acceso 17 de Agosto 2019]. ISSN. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>
34. Oyola LD. Composición fitoquímica y actividad antioxidante del fruto de *Melocactus peruvianus*. [Tesis para obtener el título de Licenciado en nutrición]. Trujillo: Universidad César Vallejo. Facultad de Ciencias Médicas; 2016.
35. Albites J, Cabezudo M. “Estudio de la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal *Tristerix chodatianus*”. [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico]. Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”; 2009.

36. Lock R. Investigación Fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales. 3° edición. Lima- Perú. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial; 2016.
37. Valenzuela P. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *Ugni molinae* Turcz. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Santiago: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular; 2019.
38. Sánchez W., Ramos K. Evaluación de la actividad antioxidante y efecto hepatoprotector de *Spilanthes leiocarpa* DC. en ratas con lesión hepática inducida por paracetamol [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Ica: Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2013.
39. Cabanillas Y., Chávez N. Determinación preliminar de fitoconstituyentes en rizomas de *Niphidium albopunctatissimum* Lessinger y su actividad frente al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2018
40. Sánchez M., Vega E. Estudio fitoquímico preliminar de las flores de *Cantua buxifolia* Juss. Ex Lam. “Flor Sagrada de los Incas” [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2012.

41. uco.es. [Internet]. Córdoba: uco.es. [Acceso 24 Abril 2020].
Disponibile en: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/26aminoacidos.pdf>
42. Cely W., Matulevich J.; Castrillón W. Triterpenos y Esteroles de *Salvia leucantha* (Lamiaceae) y evaluación de su capacidad antioxidante. *Revista de Facultad de Ciencias Básicas*. 2014; 10(1):68-79.
43. Peñarrieta J, Tejeda L, Mollinedo P, Vila JL, Bravo JA. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*. 2014; 31(2): 68-81.
44. Mena L.; Tamargo B.; Salas E.; Plaza L., Blanco Y., Otero A et al. Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo) [en línea]. 2015 [Citado:2019 agosto 28]; 20(1): 106-116.

ANEXO N°01: MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE LA ESPECIE *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kuijt “Pupa”.

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	MARCO TEORICO	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLES	METODOLOGIA
¿Presenta el extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa” actividad antioxidante?	Estudiar aspectos fitoquímicos y evaluar la actividad antioxidante del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa”	<p>Descripción: La especie <i>Tristerix chodatianus</i> es un arbusto el cual es una hemiparásita que coloniza principalmente especies de <i>Polylepis</i> (Rosaceae) en los Andes de Perú. <i>Polylepis incana</i> Kunth es una de las hospederas de <i>T. chodatianus</i>. Presenta inflorescencia y hojas de punta esclerótica.</p> <p>Hábitat: <i>Tristerix chodatianus</i> es una especie endémica que se distribuye a lo largo de la cordilla de los Andes; en el Perú se encuentra entre los departamentos de Ayacucho, Huancavelica y Lima, crece en las cuevas rocosas a 3500-4500 m.s.n.m.</p> <p>Usos tradicionales: Los datos de los usos medicinales fueron obtenidos por parte de los pobladores de Tambo Quemado, distrito de Leoncio Prado, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho – Perú, quienes usan las hojas de esta especie vegetal en infusiones para aliviar infecciones genitourinarias.</p> <p>Oxidación: Es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Esta reacción puede provocar la producción de radicales libres lo cual ocasiona daño a las células.</p>	<p>H₀: El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa” no presenta alta actividad antioxidante.</p> <p>H₁: El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa” presenta alta actividad antioxidante.</p>	<p>INDEPENDIENTE Extracto etanólico de hojas de <i>Tristerix Chodatianus</i> “Pupa”.</p> <p>DIMENSIONES: Estudio fitoquímico: Reacciones de identificación de Metabolitos secundarios: Grupos fenólicos libres, flavonoides, grupos aminos libres, esteroides y/o terpenoides, leucoantocianidinas, etc.</p>	<p>▪ Tipo, nivel y diseño de la investigación</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tipo: Aplicada • Nivel: Descriptivo-Explicativo • Diseño: Analítico <p>▪ Muestra Muestra vegetal HOJAS DE LA ESPECIE <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa”.</p>
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<p>Determinar el rendimiento del extracto y establecer la presencia de metabolitos secundarios en el extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la planta <i>Tristerix Chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa”.</p> <p>Determinar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de <i>Tristerix Chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa”.</p> <p>Determinar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa” frente al 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).</p>	<p>Dos tipos de especies reactivas pueden iniciar la reacción de oxidación: los radicales libres, y las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS).</p> <p>Antioxidantes: Son nutrientes capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, sin perder su estabilidad electroquímica. Actúan donando electrones y evitando que los radicales libres los capturen de las células.</p> <p>Antioxidantes primarios o tipo I Los llamados antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas ERO. Esto se consigue convirtiendo las ERO en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas.</p> <p>Antioxidantes secundarios o tipo II Los antioxidantes secundarios capturan los radicales y evitan las reacciones en cadena. Retardan la oxidación por vías de acciones indirectas incluyendo quelación de metales, reparación de antioxidantes primarios donándoles átomos de H o electrones, descomposición de H₂O₂ en especies no radicalarias, absorción de luz ultravioleta, etcétera.</p>	<p>HIPOTESIS ESPECÍFICAS</p> <p>El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa” presenta metabolitos secundarios de tipo: flavonoides, alcaloides y esteroides/triterpenoides principalmente.</p> <p>El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa” presenta alta actividad antioxidante por el método DPPH.</p> <p>El extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie vegetal <i>Tristerix chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt “Pupa” presenta alta actividad antioxidante por el método FRAP.</p>	<p>DEPENDIENTE Actividad antioxidante</p> <p>DIMENSIONES: Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP). Inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).</p>

ANEXO N°02:

Tabla 5. Correlación de Pearson para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

Correlaciones

		cc del extracto (mg/mL)	Porcentaje de inhibición
cc del extracto (mg/mL)	Correlación de Pearson	1	,991**
	Sig. (bilateral)		,001
	N	5	5
Porcentaje de inhibición	Correlación de Pearson	,991**	1
	Sig. (bilateral)	,001	
	N	5	5

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 6. Correlación de Pearson para la determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP

Correlaciones

		cc de extracto etanólico (mg/mL)	mM TROLOX
cc de extracto etanólico (mg/mL)	Correlación de Pearson	1	,998**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	5	5
mM TROLOX	Correlación de Pearson	,998**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	5	5

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

ANEXO N°: 04



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 127-USM-2018

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

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Juan Diego ALARCON ACUÑA**, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; sido estudiada y clasificada como: ***Tristerix chodatianus*** (Patsch.) Kujjt ; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: SANTALES

FAMILIA: LORANTHACEAE

GENERO: *Tristerix*

ESPECIE: *Tristerix chodatianus* (Patsch.) Kujjt

Nombre vulgar: "Pupa
Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida

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

Lima, 17 de abril de 2018

ACE/ddb



Mag. ASUNCIÓN A. CAÑO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono:
619-7000 anexo 5701, 5703, 5704

E-mail: museohn@unmsm.edu.pe
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

Fig. 8 Constancia de Clasificación taxonómica de *Tristerix chodatianus* (Patschovsky) Kujjt "Pupa"

ANEXO N° 05



Fig. 9 Secado y selección del material vegetal

ANEXO N° 06

Maceración



Concentrado



Extracto seco



Fig. 10 Obtención del extracto etanólico por maceración

ANEXO N° 07

Reflujo



Concentrado



Extracto seco



Fig. 11 Obtención del extracto etanólico por reflujo

ANEXO N° 08

Materiales de laboratorio



Obtención de fracciones



Fig. 12 Obtención de fracciones

ANEXO N° 09



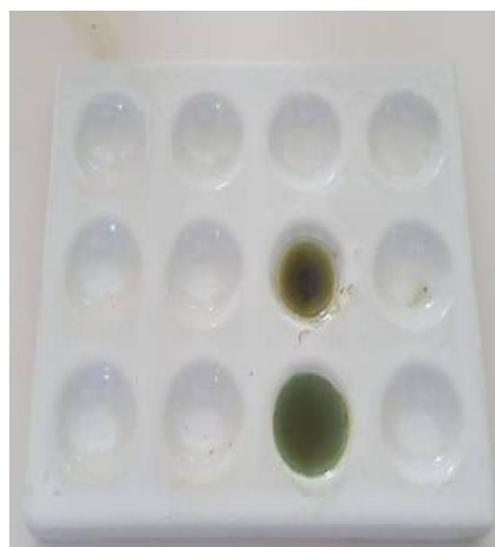
Detección de saponinas



Detección de
leucoantocianidinas/
catequinas



Detección de flavonoides



Detección de Triterpenoides
y/o esteroides

Fig. 13 Reacciones de identificación de metabolitos secundarios

ANEXO N° 10

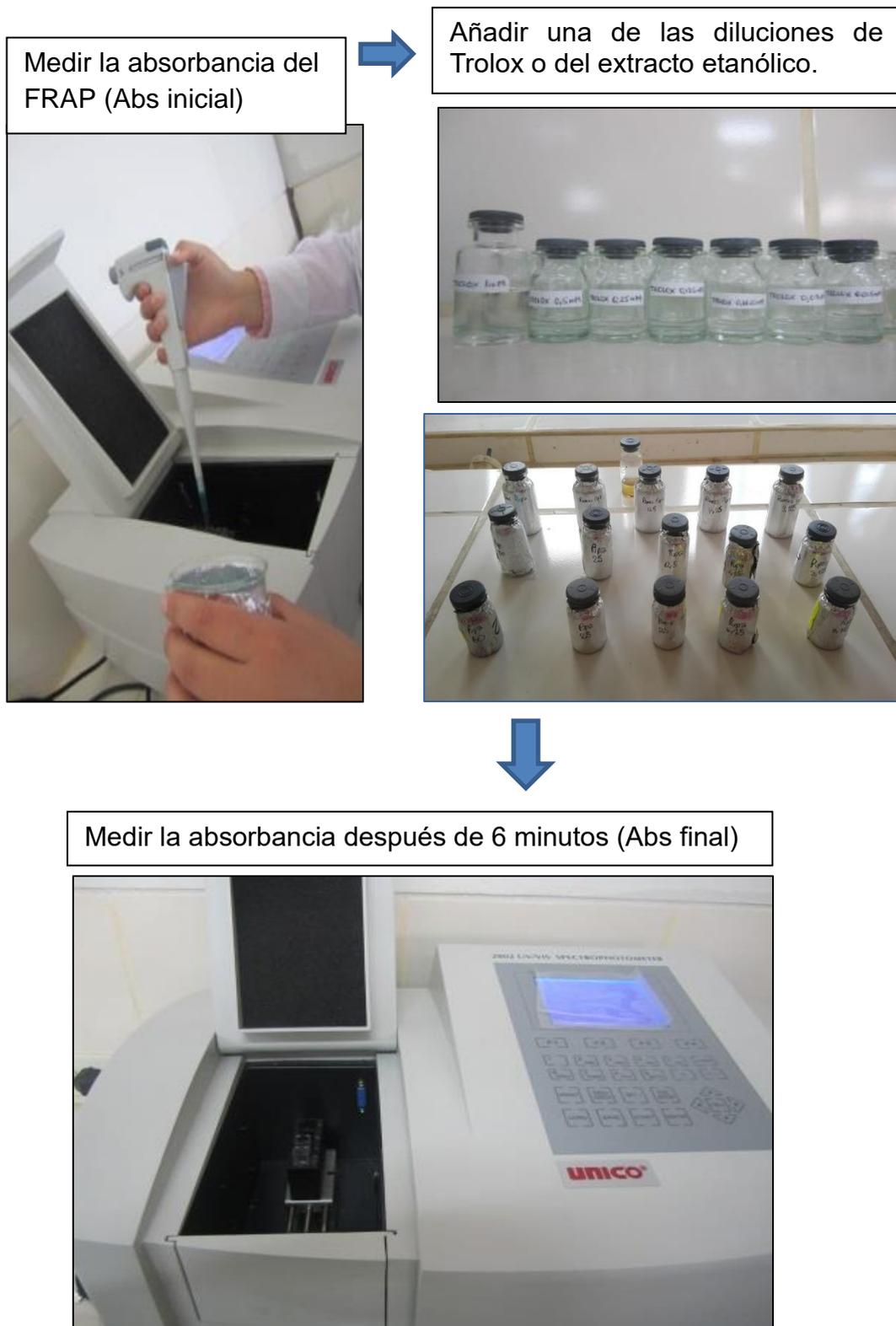


Fig. 14 Evaluación de la actividad antioxidante: Método del poder antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)

ANEXO N° 11



Medir la absorbancia del DPPH (Abs inicial)



Añadir una de las diluciones del extracto etanólico.



Medir la absorbancia después de 30 minutos (Abs final)

Fig. 15 Evaluación de la actividad antioxidante: Inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)