"AÑO DE LA DIVERSIFICACIÓN PRODUCTIVA Y DEL FORTALECIMIENTO DE LA EDUCACIÓN"

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

"Nivel de actividad antioxidante de los extractos etanólico y acetato de etilo ontenidos de las hojas de *Cissus gongylodes (baker) burch. explanch* "suelda suelda"

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

BACH. CAHUANA CANCHAYA, CINTHYA PILAR

BACH. LLLANCARI MATEO, GUEYBY JENNYFER

ASESORES:

DRA. HAYDEÉ CHAVEZ ORELLANA

DR. FELIPE SURCO LAOS

MG. MANUEL VALLE CAMPOS

ICA - PERÚ

2015

DEDICATORIA

A DIOS por habernos permitido el milagro de la vida, por ser nuestra luz, fuerza, verdad y por ser nuestra fuente de inspiración en momentos de angustia, en nuestros aciertos, alegrías y tristezas.

A nuestros padres, por todo el apoyo brindado, especialmente por sus sabios consejos, por estar a nuestro lado en los momentos más difíciles y por enseñarnos a luchar por alcanzar nuestros sueños.

A nuestros hermanos y hermanas por acompañarnos en silencio y creer siempre en nosotros.

ÍNDICE

	Página
I. SUMMARY.	**1**
II. RESUMEN.	**2**
III. INTRODUCCIÓN.	**3**
IV. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.	**4**
V. MARCO TEÓRICO.	**5**
5.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	**5**
5.1.1 Radicales libres.	**5**
5.1.2 Estrés oxidativo.	**6**
5.1.3 Antioxidantes.	**7**
5.1.4 Compuestos fenólicos	**11**
5.1.5 Flavonoides	**12**
5. 2. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	**12**
5.2.1. Métodos basados en reacciones HAT.	**13**
5.2.2. Métodos basados en reacciones SET.	**14**
5. 2.3. Métodos basados en ambas reacciones HAT y SET.	**15**
5.3. PLANTAS MEDICINALES	**16**
5.3.1. Género CISSUS	**16**
5. 3.2. Etiología y sinonimia de la especie *Cissus gongylodes*	**16**
5.3.3. Características Morfológicas.	**17**
5.3.4. Hábitat	**17**
5.3.5. Usos populares	**17**
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.	**18**
6.1. MATERIALES.	**18**
6.1.1. Material botánico.	**18**

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por permitirnos alcanzar una meta más en nuestra vida.

A nuestra familia por su apoyo incondicional y por alentarnos a seguir nuestros sueños.

A todos los profesores que hicieron de nosotras unas buenas QuímicasFarmacéuticas y mejores personas.

Agradecemos en especial a la Dra. Haydeé Chávez Orellana, por su invalorable apoyo, enseñanzas ypor la asesoría brindada en la realización del presente trabajo.

Por su gran ayuda, paciencia y dedicación al Dr. Felipe Surco Laos y al Mg. Manuel Valle campos por sus conocimientos aportados.

A todos nuestros compañeros y amigos aquellos que estuvieron siempre con nosotras, acompañándonos en nuestros mejores momentos, por recordarnos que somos capaces de alcanzar nuestras metas.

Son muchas las personas a las que les debemos agradecer desde el fondo de nuestros corazones, porque de una u otra manera nos acompañaron y ayudaron durante este camino.

A todos ustedes, muchas gracias

6.1.2. Materiales de laboratorio. 18

6.1.3. Reactivos y disolventes. 19

6.1.4. Equipos. 19

6.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA. 20

6.2.1. Estudio fitoquímico. 20

6.2.1.1. Recolección, selección y secado de la muestra en estudio. 20

6.2.1.2. Clasificación Taxonómica de la especie vegetal. 20

6.2.1.3. Obtención del extracto etanólico. 21

6.2.1.4. Screening Fitoquímico. 21

6.2.1.4.1. Obtención de Fracciones. 21

6.2.1.5. Obtención del extracto de acetato de etilo 22

6.2.2. Evaluación de los fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu 23

6.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante. 24

6.2.3.1. Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP) 26

6.2.3.2. Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio) (ABTS). 26

6.2.3.3. Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). 28

VII. RESULTADOS. 30

1. ESTUDIO FITOQUÍMICO 30

2. EVALUACIÓN DE LOS FENOLES TOTALES MEDIANTE El REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU 32

3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 34

2.1. Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP). 34

2.2. Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio) (ABTS). 37

2.3. Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). 40

VIII. DISCUSIÓN. 41

IX. CONCLUSIONES. 45

X. RECOMENDACIONES. 46

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 47

XII. ANEXOS. 52

ABSTRACT

In an effort to contribute to the search for natural antioxidants gongylodes Cissus species native "welded welded" department of Junin, Chanchamayo province, district Pichanaki located 525 meters.

In relation to the uses of the Genus Cissus, bibliographic record indicates that the leaves of the species have antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial, which prompted us to investigate the level of antioxidant activity in ethanol and ethyl acetate extracts obtained from leaves gongylodes cissus "welded welded" and thus expand scientific information on this species.

Extracts were obtained and identified total phenols by Folin-Ciocalteu reagent, in order to determine the presence of phenolic compounds related to antioxidant activity. Was found containing polyphenolic compounds flavonoid structures type especially, the most active extract with ethyl acetate AG 36mg / g extract.

The level of antioxidant activity was evaluated using the reaction methods (ABTS) (FRAP) and (DPPH), both extracts had similar antiradical activity and reducing power by the FRAP method. As the ethyl acetate extract of the ethanolic extract unlike who presented higher level of antioxidant activity against ABTS methods at a concentration of 0.0937mg / mL (0.505 mM Trolox); DPPH and at a concentration of 10ug / mL (68.22%).

KEYWORDS: Antioxidant activity, Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS, FRAP, flavonoids, Cissus gongylodes

RESUMEN

En el afán de contribuir a la búsqueda de antioxidantes naturales se seleccionó a la especie *Cissus gongylodes* "suelda suelda" oriunda del departamento de Junín, provincia de Chanchamayo, distrito de Pichanaki ubicada 525 msnm.

En relación a los usos del Género Cissus los antecedentes bibliográficos indican que las hojas de las especies presentan efectos antioxidantes, antiinflamatorios, analgésicos y antimicrobianos, lo que nos motivó a investigar el nivel de la actividad antioxidante en los extractos etanólico y acetato de etilo obtenidos a partir de las hojas de esta especie.

Se obtuvieron los extractos, identificándose los fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, con el propósito de determinar la presencia de compuestos fenólicos relacionados con la actividad antioxidante. Se comprobó que contienen compuestos de estructuras polifenólicas en especial de tipo flavonoide, siendo el más activo el extracto de acetato de etilo con 36mg AG/g de extracto.

El nivel de actividad antioxidante se evaluó mediante los métodos de reacción (ABTS), (FRAP) y (DPPH), ambos extractos presentaron similar actividad antirradical y poder reductor mediante el método de FRAP. Siendo el extracto acetato de etilo a diferencia del extracto etanólico quien presentó mayor nivel de actividad antioxidante frente a los métodos de ABTS a una concentración de 0.0937mg/mL (0,505 mM de trolox); y DPPH a una concentración de 10ug/mL (68.22%).

PALABRAS CLAVES: Actividad antioxidante, Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS, FRAP, flavonoides, Cissus *gongylodes*

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales tradicionales, también conocidas como hierbas medicinales o fitomedicinas, se refieren a productos naturales procedentes de las distintas partes de las plantas y que se pueden utilizar para promover la salud general y tratamiento de enfermedades. Los productos naturales representan una fuente importante de compuestos biológicamente activos como flavonoides, alcaloides, vitaminas, con una amplia gama de efectos biológicos como actividades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, vasodilatadoras, antioxidantes, entre otras.[1]

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser usados en las diferentes industrias: alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos y de salud para prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres en nuestro organismo.[2]

Es por ello que la aplicación de la medicina tradicional está aumentando progresivamente como una alternativa rentable o complementaria a la medicina convencional.

Actualmente diversas patologías como la aterosclerosis, cáncer, procesos inflamatorios y enfermedades neurodegenerativas e incluso procesos naturales como el envejecimiento se relacionan al estrés oxidativo con formación de radicales libres, tóxicos al organismo. Por lo tanto, los antioxidantes que pueden neutralizar a los radicales libres, pueden ser de vital importancia en la prevención de estas enfermedades. Entre los más conocidos figuran los tocoferoles, el ácido ascórbico, los flavonoides, antocianinas, carotenoides, ácidos fenólicos. [1, 3]

En la flora natural del Perú existen muchas especies con actividad antioxidante y dentro de ellas encontramos a la especie *Cissus gongylodes* comúnmente llamada "suelda suelda", una planta arbustiva oriunda del distrito de Pichanaki, departamento de Junín, de la cual las hojas de esta planta se utilizan tradicionalmente en forma de emplasto e infusión para tratar afecciones inflamatorias, fracturas y cicatrices.[4]

Existen antecedentes del género de esta especie donde se identificaron flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenos y esteroides[5].

La importancia de la presente investigación radica en brindar un aporte a la comunidad que justifique el estudio farmacológico de la especie vegetal a la que se atribuyen tradicionalmente muchas propiedades medicinales que aún no han sido estudiadas siendo una de ellas la actividad antioxidante.

Para lo cual nos planteamos los siguientes objetivos:

IV. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Objetivo General

"Evaluar el nivel de actividad antioxidante de los extractos etanólico y acetato de etilo obtenidos de las hojas de *Cissus gongylodes (Baker) Burch. Ex Planch* "suelda suelda".

4.2. Objetivos Específicos:

- Obtener el extracto etanólico a partir de las hojas de la especie *Cissus gongylodes* "suelda suelda" y realizar el tamizaje fitoquímico.
- Obtener el extracto de acetato de etilo por fraccionamiento del extracto etanólico usando solventes de diferente polaridad: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico y acetato de etilo mediante reacciones de coloración y precipitación.
- Cuantificar los fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu.

- Evaluar el nivel de la Actividad Antioxidante en los extractos etanólico y acetato de etilo por los métodos: Método de reacción con el radical (2,2′-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), Método del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) y Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

V. MARCO TEORICO:

5.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.1.1. RADICALES LIBRES

Los radicales libres son especies químicas (átomos, iones, moléculas) cargadas o no, que en su estructura química presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalizado por el punto situado a la derecha del símbolo. Son muy reactivos y no pueden ser aislados pero están presentes como intermediarios en numerosas reacciones de gran relevancia biológica.[6]

Los reactantes más importantes en la bioquímica de los radicales libres en las células aeróbicas son el oxígeno y sus radicales derivados, los que son conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROS). Entre estos tenemos al superóxido (O^{2-}), hidroxilo (HO.), peroxilo (RO^{2-}), alcoxilo ($RO^{\cdot}$) y el óxido nítrico ($NO^{\cdot}$); además de especies no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) y oxígeno singulete (O_2).

Muchas de estas especies radicalarias cumplen funciones fisiológicas normales, pero si se generan en exceso pueden resultar muy tóxicos dañando al ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos.

Existen fuentes endógenas de especies reactivas como las mitocondrias, los peroxisomas, las células fagocíticas y citocromo P450 y entre las fuentes exógenas

tenemos la contaminación ambiental, radiación ionizante, luz ultravioleta, ciertas drogas, reactivos y solventes industriales.[6, 7]

En 1954 la Doctora Rebeca Gerschman sugirió por primera vez que las especies reactivas o radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de patologías, estableciendo tres postulados básicos:

1. Los radicales libres constituyen un mecanismo molecular de daño común cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales ionizantes.
2. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes producían los efectos tóxicos.
3. La producción de radicales libres es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis. Actualmente estos postulados se mantienen vigentes y son la base para múltiples investigaciones.[8]

5.1.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El aumento de la concentración de radicales libres, provoca un desequilibrio entre la velocidad de formación y su neutralización por el sistema antioxidante endógeno en el organismo, dando lugar a lo que se conoce como estrés oxidativo, capaz de producir severos daños celulares.

Harman desde 1954 planteaba que la expectativa de vida aumentaba al disminuir el grado de fenómenos oxidativos. Esto se lograría mejorando los hábitos higiénico-dietéticos y aumentando las defensas antioxidantes.[8, 9]

El estrés oxidativo es responsable de la degeneración celular, debido a que los radicales libres pueden reaccionar químicamente con proteínas, lípidos y DNA, produciendo en milisegundos un daño celular irreversible que puede llegar a dañar el tejido y eventualmente a la muerte celular.[6]

Se reconoce que los radicales libres oxidan a los aminoácidos, que constituyen las proteínas, produciendo diversas medicaciones tales como: la formación de grupos

carbonilo, asociación de fragmentos proteicos por entrecruzamiento de enlaces disulfuro, rompimiento de enlaces peptídicos, perdida de la afinidad por los metales, incremento en la hidrofobicidad, ocasionando que las proteínas sufran cambios en su estructura, actividad y funcionalidad y provocando que las proteínas que sufren el daño oxidativo presente un deterioro en la actividad hormonal y enzimática. Así como el transporte de iones, además de una mayor sensibilidad a la degradación proteolítica.[10]

El deterioro celular producido por el estrés oxidativo es responsable de diversas enfermedades crónicas degenerativas, en donde hay una asociación directa o indirecta con la exposición a los radicales libres. Ejemplos de estas patologías son: Alzheimer, Parkinson, lesión cerebral hipertensiva, distrofia muscular, esclerosis múltiple, cáncer, degeneración de la retina, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, infarto, anemia, hepatitis, envejecimiento prematuro, aparición de arrugas prematuras, resequedad de la piel, disfunción endotelial, entre otras.

5.1.3. ANTIOXIDANTE:

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen radicales libres. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los radicales libres. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre.[11]

Bajo condiciones fisiológicas, el organismo puede prevenir el daño producido por las especies oxidantes, a través de mecanismos de protección que incluye elevar los niveles intracelulares de defensas antioxidantes.

Los principales procesos relacionados con la formación de radicales libres en el organismo, se resume en la Fig.1 indicándose también los puntos en los que es posible la interferencia mediante el empleo de agentes antioxidantes

Así tenemos dentro de los agentes antioxidantes:

A.- Antioxidantes preventivos, como los agentes quelantes, los que actúan atrapando a los cationes metálicos que intervienen en la descomposición del peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo; evitando así la formación de estos últimos. En este grupo están la penicilamina, el EDTA y el profármaco dexrazoxano. También están incluidas las enzimas antioxidantes, las que actúan degradando al peróxido de hidrógeno como la glutatión peroxidasa, catalasa y fármacos que las mimetizan constituidos por ciertos complejos metálicos como los derivados del manganeso y seleniuros.[12, 13]

B. Antioxidantes que interrumpen la fase de propagación de procesos radicalarios, tenemos a los agentes captadores de radicales (radical "scavenger") como los fenoles, cuya estructura en general debe poseer dos características importantes, la presencia de sustituyentes voluminosos en las dos posiciones vecinas al hidroxilo y en la posición *"para"* la presencia de algún grupo que contribuya a la deslocalización del electrón desapareado. Por ejemplo los tocoferoles, fenoles sintéticos como BHA (butilhidroxianisol), fenoles naturales como flavonoides, cumarinas, lignanos, ácido cafeico, resveratrol ; además otros captadores de electrones no fenólicos como ácido ascórbico y derivados, tioles y polienos como carotenoides.[13]

C.- Antioxidantes que actúan por estabilización de membrana como los lazaroides, un grupo de esteroides con sustituyentes muy básicos en la posición 21 siendo el Tirilazad (U-74006F) el representante más conocido. El modo de acción es complejo y todavía no está aclarado. Los efectos de estos contribuyen a cambiar las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares dificultando la extensión del proceso de peroxidación.[13]

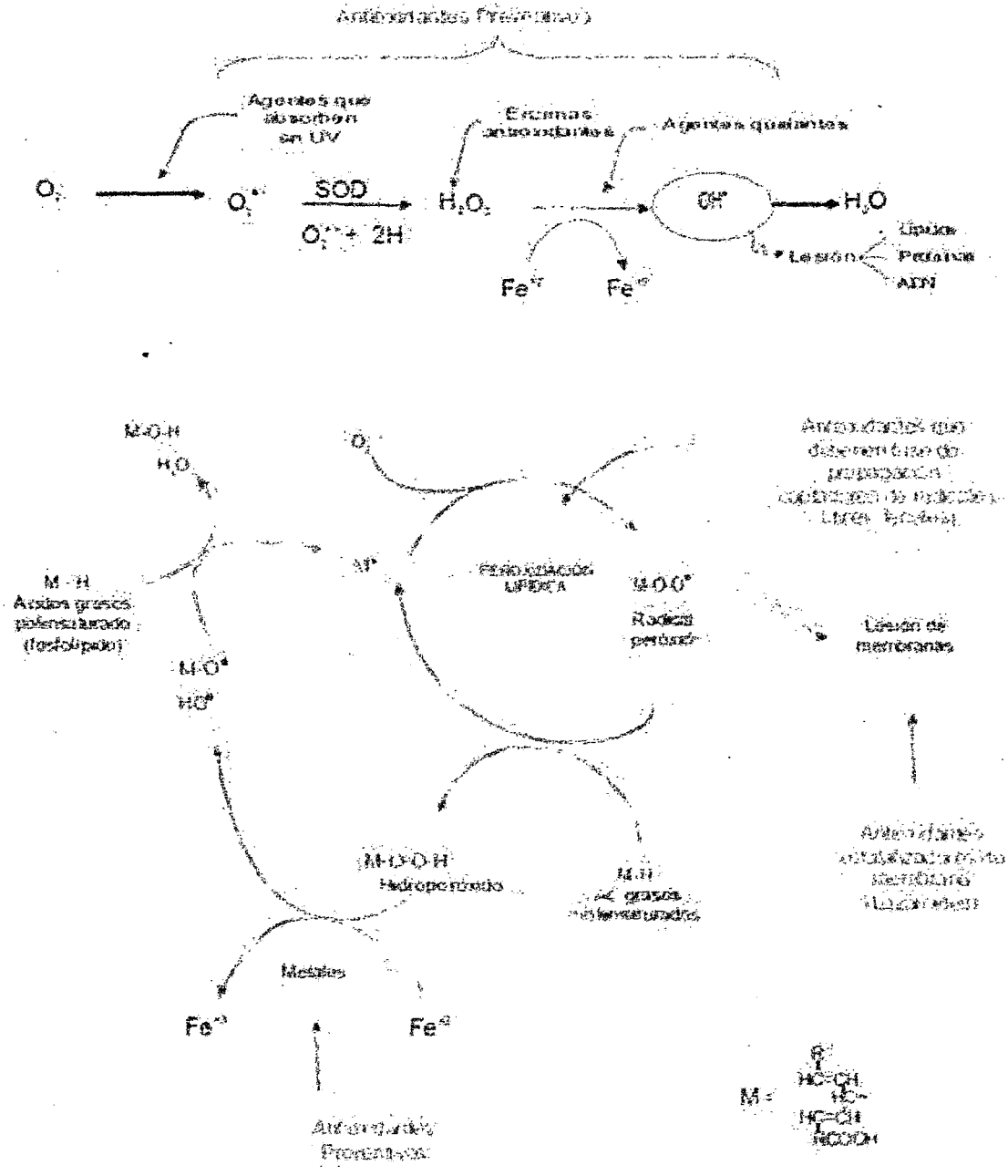
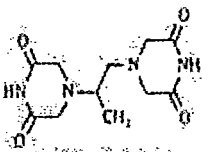
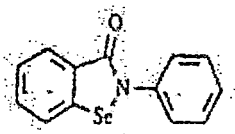


Figura Nº 1.Agentes antioxidantes

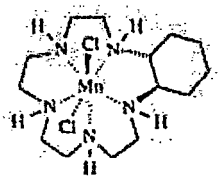
Agentes preventivos



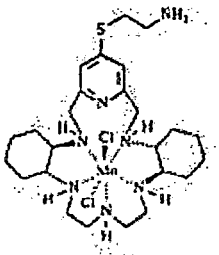
Dexrazoxano



Ebselen

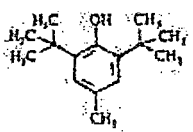


SC 55858

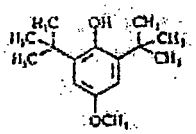


M 40470

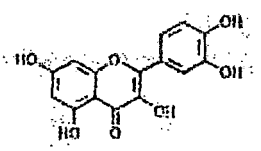
Agentes "scavengers"



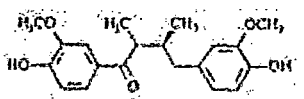
BHT



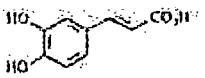
BHA



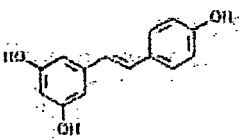
Flavonoide



Lignano: Cinamofilina

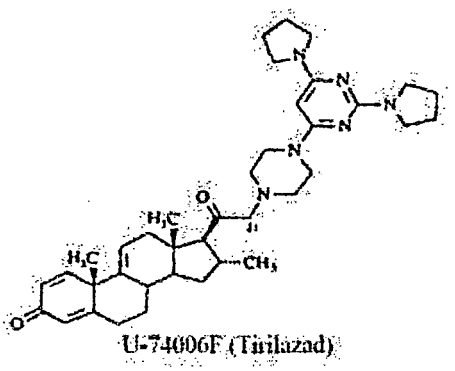


Ácido cafeico



Resveratrol

Agentes estabilizadores de membranas



U-74006F (Tirilazad)

Figura N° 2. Algunos agentes antioxidantes

5.1.4. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes por su estructura química (donador de H+ o electrones).Constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de los vegetales.[12]

5.1.5. FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos polifenólicos con un esqueleto de 15 átomos de carbono con un anillo bencénico fusionado a un anillo cromano (C) que está unido a su vez a un segundo anillo aromático (B) que puede estar en la posición 2, 3 ó 4.

La presencia de grupos o-dihidroxi en el anillo B, de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 junto con un 4-oxo en el anillo C, y de grupos hidroxilo en los carbonos 3 y 5 junto con el 4-oxo en los anillos A y C se han asociado con actividad antioxidante. Parece que los ácidos fenólicos como el caféico, clorogénico, ferúlico, sinápico y p-cumárico son antioxidantes más activos que los derivados hidroxilados del ácido benzóico como el p-hidroxibenzóico, vaníllico y siríngico. Muchos de los flavonoides presentan una gama de efectos biológicos como actividades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadoras. La actividad antioxidante es una propiedad importante para la vida. Muchas de las funciones biológicas como la antimutagenicidad, anticarcinogenicidad y retraso del envejecimiento derivan de la capacidad antioxidante.[12]

5.2. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente por los efectos del antioxidante controlando la extensión de la oxidación. Los métodos muestran enorme diversidad. Algunos métodos involucran una etapa clara de la oxidación y luego la medición del resultado como por ejemplo, oxidación del ácido linoleico seguido por la determinación del dieno de conjugación. En otras instancias no existe clara distinción entre las varias etapas en el procedimiento.

Las características de una oxidación son un sustrato, un oxidante, un iniciador, intermediarios y productos finales y la medida de algunos de estos puede ser usada para determinar la actividad antioxidante.[14]

Existen diferentes clasificaciones de los métodos utilizados para la medida de la actividad antioxidante. Algunos pocos específicos, en función del tipo de muestra, alimentos o fluidos biológicos, o bien según el método de análisis utilizado, químicos, in vivo o ex vivo. Otra forma de clasificación los divide en dos grandes grupos, métodos basados en la determinación de la oxidación de una molécula diana del organismo (proteínas, ácidos nucleícos, lípidos) y métodos basados en la captación de radicales libres.[15]

En base a las reacciones químicas la capacidad antioxidante puede ser dividida en dos categorías:

1.- Determinación basada en reacción de Transferencia de átomo de Hidrogeno (HAT)

2.- Determinación basada en reacción de Transferencia de Electrón simple (SET).

La determinación Basada-SET involucra una reacción Redox con el oxidante (también como prueba para monitorizar la reacción) como un indicador del punto final de la reacción. La mayoría de determinaciones basadas-HAT, monitorea la reacción cinética competitiva y la cuantificación es derivada de la curva cinética.

Las determinaciones basadas en HAT y SET intentan medir la capacidad de Scavening radical, a su vez de la capacidad antioxidante preventiva de una muestra. Los principales factores que determinan el mecanismo y eficacia de un antioxidante son la energía de disociación de la unión (BDE) y el potencial de ionización (IP).

5.2.1. MÉTODOS BASADOS EN REACCIONES HAT

En esta clasificación existen diversos métodos que detectan acciones antioxidantes específicas o generales.

Los métodos principalesson:

5.2.1.1. Método de capacidad de captación de radicales oxigenados (ORAC)

Mide la inhibición de las oxidaciones inducidas por el radical peroxilo, por lo tanto refleja la actividad antioxidante en la cadena clásica de reacciones radicalarias. Se basa en reacción del radical peroxilo con una proteína fluorescente (B-ficoeritrina) para formar un producto no fluorescente.

El cálculo del efecto protector del antioxidante se obtiene mediante el área bajo la curva de disminución de fluorescencia, teniendo en cuenta la fase de retardo, la velocidad inicial y el porcentaje de inhibición.

El método ORAC se emerge actualmente como la determinación de elección para cuantificar la capacidad de Scavenging del radical peroxilo.[10]

5.2.1.2. Método parámetro antioxidante de captación de radicales libre (TRAP)

Es ampliamente usado para determinar la actividad antioxidante total basado en la medida del consumo de oxigeno durante una controlada reacción de oxidación lipídica inducida por descomposición térmica de AAPH.

Los resultados TRAP se expresan como el número de µmoles de radicales peroxilos atrapados por 1 litro de plasma.

5.2.1.3. Método oxidación ex vivo de lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Es un método muy utilizado y adaptado a la evaluación de la capacidad antioxidante en sistemas fisiológicos.

Las LDL son aisladas de muestras sanguíneas y la oxidación es inducida por Cu (II) o AAPH (2,2-azobis-(2-amidinopropano)) y la peroxidación lipídica es seguida por la detección a 234 nm de los dienos conjugados generados en la etapa de propagación.

Utilizando AAPH como fuente de radicales, este método tiene una relevancia ya que estas reacciones oxidativas podrían ocurrir in vivo.

5.2.2. MÉTODOS BASADOS EN REACCIONES SET

Estas determinaciones incluyen quizás el más popular, pero frecuentemente menos conocido por su nombre determinación de fenoles totales mediante el reactivo de Follin-Ciocalteu (FCR). También agrupa en esta categoría determinación del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP), determinación de la capacidad de reducción de Cu (II) y determinación del N, N-dimetil-p-fenilenediamina (DMPD).

5.2.2.1. Método de Fenoles Totales por reactivo de FolinCiocalteu

Fue inicialmente usado para el análisis de proteínas, teniendo la ventaja de la actividad del reactivo hacia el residuo de proteína tirosina (contiene el grupo fenol).

Algunos años después Singleton y colaboradores extienden este ensayo para el análisis de fenoles totales en vinos; luego la determinación fue encontrando muchas aplicaciones.

Descartando la naturaleza química no definida del FCR, la determinación de fenoles totales por FCR es conveniente, simple y reproducible.[10, 12]

5.2.2.2. Método del poder antioxidante de reducción férrica (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-striazina (TPTZ) a un producto coloreado que se determina espectrofotométricamente a 593 nm.

Las modificaciones de este método han sido utilizadas para medir la actividad de flavonoides puro, principalmente flavonoles y flavonas y establecer relaciones estructura-actividad.[10]

5.2.2.3. Método Potencial de Antioxidante Total usando Cu (II) como oxidante

Existe poca información publicada sobre este método. El método está basado en la reducción de Cu (II) a Cu (I) por reductores (antioxidantes) presentes en la muestra. Como estándar se utiliza una curva de ácido úrico, expresando los resultados como equivalentes de ácido úrico.

5.2.3. MÉTODOS BASADOS EN AMBAS REACCIONES HAT Y SET

5.2.3.1. Método de reacción con el radical (2,2´-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)

Fue diseñado por Rice Evans y Miller (1994), el cual se basa en la capacidad de captación del radical $ABTS^{*+}$ (2,2´-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) por parte de un antioxidante. Este radical tiene un espectro de absorción característico con máximos a 414, 645,734 y 815nm posee una coloración verdeazulada. Químicamente muy estable y es soluble en medio acuoso y etanólico. Los resultados se expresan con relación a la actividad antioxidante del trolox.[14]

5.2.3.2. Método de inhibición frente al radical libre 2,2- difenil-1-picrilhidrazil (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 517 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 20 a 30 minutos de reacción.[12,15,16,17]

5.3. PLANTAS MEDICINALES

El uso de plantas medicinales se ha convertido en una acción terapéutica alternativa ampliamente aceptada por la población, ya que se utilizan plantas cuyas actividades farmacológicas han sido investigados científicamente demostrando su eficacia y seguridad. La familia Vitaceae comprende 14 géneros y unas 850 especies, distribuido principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, en menor número se hallan en regiones templadas. [4, 5]

5.3.1. GÉNERO CISSUS: Es el más grande de la familia Vitaceae con cerca de 350 especies de amplia distribución en la región tropical. El Género Cissus muestra una diversidad morfológica extraordinaria y distribución geográfica compleja con mayor diversidad se encuentra en América del Sur y África.[18]

5.3.2. ETIOLOGÍA Y SINONIMIA DE LA ESPCIE *Cissus gongylodes*

Cissus gongylodes pertenece a la familia de las Vitaceae y al género *Cissus* que deriva del griego *kissos*que significa "hiedra".El nombre común *"suelda suelda"*como es conocido en el departamento de Junín; lo comparte con diversas plantas empleadas tradicionalmente por sus efectos antiinflamatorios, en esguinces, fisuras y fracturas.[5, 18]

Presenta como sinonimia: *Cissus pterophora, Vitis gongylodes, Vitis pterophora* llamado también *"Nudo Nudo", "Cupá" y "Sapohuasca"* en regiones como Ucayali, Cuzco, Loreto.[19]

5.3.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS:

Esta especie se caracteriza por presentar tallos aéreos alados con entrenudos basales que trepan por los troncos de altos árboles. Hojas con estípulas persistentes, generalmente presenta zarcillos opuestos a las hojas, las inflorescencias son cimosas o paniculada, terminal, axilar o enfrente de las hojas; las flores son unisexuales o actinomorfas, diclamídeas que contiene glándulas de néctar aislados o presentes; la copa es generalmente muy pequeña, tetra o pentámero, gamosépalo con válvula o estivación abierta; la corola es tetra o pentámera; estambres con anteras.[18, 20,21]

5.3.4. HÁBITAT:

Cissus gongylodes "*suelda suelda*" es característica de las zonas tropicales húmedas y cálidas, nativas de los bosques de Brasil, Bolivia, Paraguay, Perú y norte de Argentina.[20, 22]

En nuestro país lo encontramos en distintas regiones como Cuzco, Madre de Dios y en Junín en el distrito de Pichanaki, provincia de Chanchamayo ubicado a unos 525 m.s.n.m.

5.3.5. USOS POPULARES:

En el distrito de Pichanaki los pobladores utilizan esta especie vegetal en forma de emplasto e infusión para tratar afecciones inflamatorias, esguinces, fisuras, fracturas y cicatrices.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIALES.

6.1.1. MATERIAL BOTÁNICO

-Hojas de *Cissus gongylodes (Baker) burch. Ex Planch* "Suélda suelda"

6.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Peras de bromo
- Fiolas
- Micropipetas de 50, 100,500 y 1000 µL
- Viales
- Matraces erlenmeyer
- Balones
- Pipetas volumétricas
- Pipetas pasteur
- Probetas
- Agitadores de vidrio
- Vasos de precipitado
- Tubos de ensayo
- Pinzas para tubos de ensayo
- Gradillas
- Pinzas de metal
- Espátulas de metal
- Embudos
- Luna de reloj
- Papel de filtro
- Papel de aluminio

- Soporte universal
- Aro de soporte
- Pinzas clamps

6.1.3. REACTIVOS Y DISOLVENTES

- Merck: Etanol, Éter de petróleo, Diclorometano, Acetato de etilo, metanol, Fosfato ácido de sódio, Fosfato básico de sódio, ácido acético.
- Reactivos para realizar la marcha fitoquímica.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Sigma Aldrich: Trolox, 2,4,6 tripitiridyl-S-triazina (TPTZ); 2,2´-azino-bis (3 etilbenzotiazolin-6-sulfonico (ABTS); 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)
- WWR Prolado: Ácido acético, ácido clorhídrico
- Mercantil: Cinta de magnesio
- Persulfato de potássio
- Tricloruro férrico
- Solución de hipoclorito de sódio 6-14% Cl activo.

6.1.4. EQUIPOS

- Balanza analítica
- Estufa Bender
- Cocina eléctrica
- Rotavaporesbuchi R-124, con baño de aguatermostatizable B-480 y bombas de vacío B-270
- Balanza analítica
- Molino manual
- Espectrofotómetro UV-Visible UNICO-2001

6.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

6.2.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

6.2.1.1. Recolección y tratamiento de la muestra vegetal [18]

El material vegetal fue recolectado por las autoras en forma manual, en horas de la mañana en el distrito de Pichanaki, provincia de Chanchamayo, departamento de Junín en los meses de marzo y noviembre del 2012.Previamente se prepararon unas bolsas de papel craft para poder trasladar el material vegetal a la ciudad de Ica.

Se procedió a una selección previa al secado, con el fin de evitar partículas extrañas que puedan interferir en la investigación. El secado se realizó a temperatura ambiente bajo sombra para que se ventile y elimine el agua por un periodo de ocho días. Después del secado fue almacenado en bolsas de papel craft para luego derivarlos al laboratorio de productos naturales, ahí fueron molidas utilizando un molino de martillos.

6.2.1.2. Clasificación taxonómica de la especie vegetal

La certificación de la especie y clasificación botánica fueron realizados por el Mg. Hamilton Beltrán S. constatado por la jefa del herbario San Marcos Haydeé Montoya Terreros, según el sistema de clasificación de Cronquist (1988):

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Sub clase : Rosidae

Orden : Rhamnales

Familia : Vitaceae

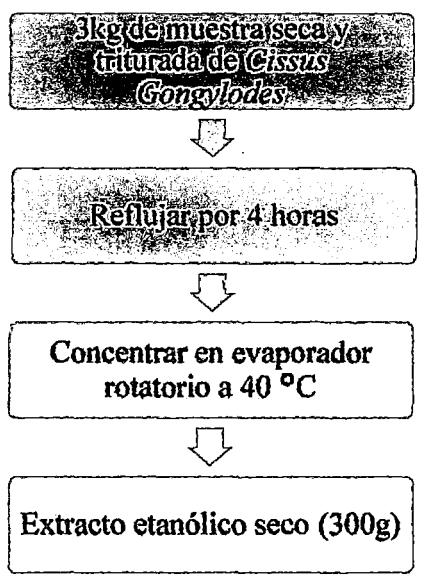
Género : Cissus

Especie : *Cissus gongylodes (Baker) Burch. Ex Planch*

Nombre vulgar : *"Suelda Suelda"*

6.2.1.3. Obtención del extracto etanólico

Se tomaron 3kg de la parte aérea de la especie seca y molida, colocándose en un matraz de 2 Litros, se sometió a extracción mediante reflujo durante 4 horas utilizando como solvente etanol de97°. Se filtró a través de un papel de filtro rápido, para luego ser concentrado en el evaporador rotatorio a presión reducida, obteniéndose 300g de extracto etanólico seco de color verde oscuro.



Fluxograma N° 1. Obtención del extracto etanólico total

6.2.1.4. Screening fitoquímico[23, 24]

6.2.1.4.1. Obtención de fracciones

Se tomaron 50g de hojas secas y molidas de la especie *Cissus gongylodes* "suelda suelda", con 200 mL de etanol 97% macerar por 20 horas a temperatura ambiente, reflujar 4 horas, filtrar en caliente, lavar con etanol y llevar a 50mL.

Se separó una parte correspondiente a la fracción "A", el residuo se trató con solución diluida de HCl al 1% (2x20mL), luego se filtró obteniéndose dos partes; la solución ácida, parte soluble, y la parte insoluble que fue lavada con agua destilada hasta pH

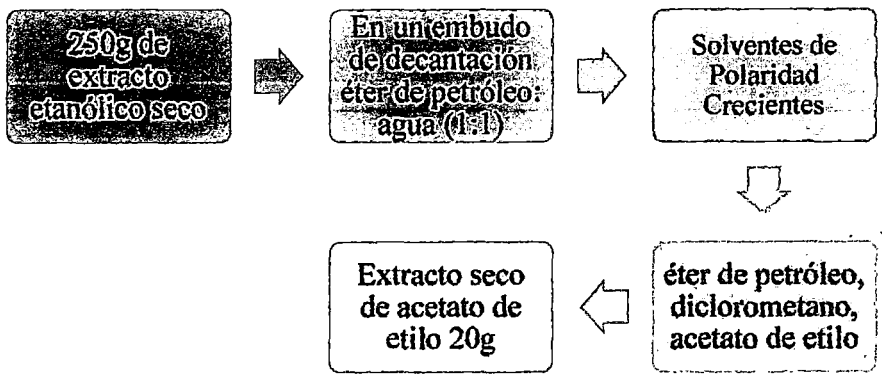
neutro, ésta constituyó la fracción "B". La solución ácida fue colocada en una pera de bromo siendo neutralizada con hidróxido de amonio y extraída con diclorometano (2x25mL), obteniéndose dos fases orgánica o diclorometánica que se filtró y constituyó la fracción "C" y la fase acuosa se quedó en la pera; esta se saturó con sulfato de sodio anhidro y se extrajo con mezcla diclorometano-etanol (3:2) (2x25mL) obteniéndose también dos fases: la fase orgánica (diclorometánica– etanólica) la cual se filtró para ser separada de la fase acuosa y es denominada fracción "D" y por último la fase acuosa remanente constituirá la fracción "E".

Finalmente todas las fracciones que se obtuvieron fueron secadas para que se les realizara las reacciones de identificación de los metabolitos secundarios, haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación.

6.2.1.5. Obtención de extracto de acetato de etilo por fraccionamiento con solventes de diferente polaridad.

Se tomaron 250g del extracto etanólico seco el cual fue sometido a una partición con éter de petróleo: agua (1:1) en un embudo de decantación, este procedimiento se realizó hasta que el solvente orgánico quede incoloro, repitiéndose con solventes de polaridad creciente en el orden: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo obteniéndose los siguientes extractos: Éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y residuo acuoso.

De esta manera se obtuvo 20 g del extracto de acetato de etilo, al que también se le efectuó las reacciones de identificación de los metabolitos secundarios, haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación.



Fluxograma N° 2. Obtención del extracto de acetato de etilo

6.2.2EVALUACIÓN DE LOS FENOLES TOTALES MEDIANTE EL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU [25, 26, 27, 28, 29,30]

La concentración de fenoles totales en extractos fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Preparación de la curva de calibración. Se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 0 µL a 160 µL en intervalos de 20 µL y se completó el volumen de cada uno a 500 µL con agua destilada.

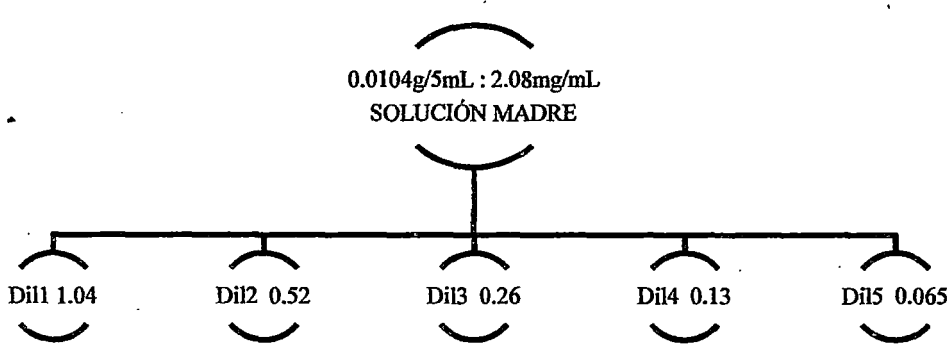
Determinación de fenoles en los extractos: Se pesaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de agua destilada. Se diluyo 1:10 en agua destilada y de ésta solución se tomaron 100 µL para después completarse a 500 µL con agua destilada.

A cada uno de los estándares y muestras previamente preparados se le adicionaron 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y se sónico por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 1250 µL de Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar por 2 horas. La absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg AG/g extracto).

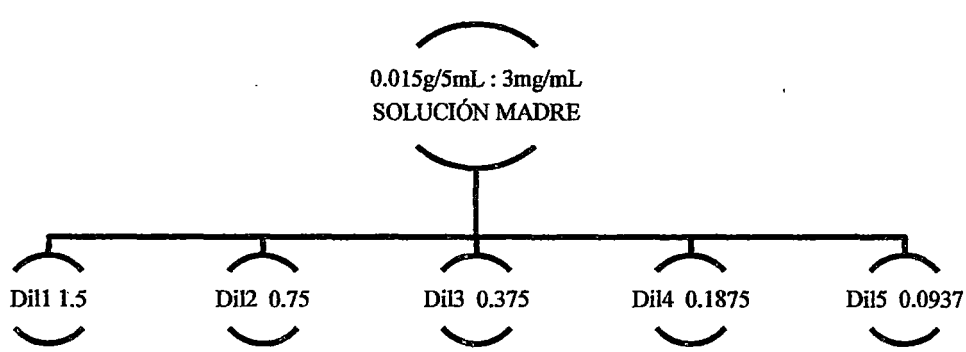
6.2.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE [25, 31]

Se emplearon tres métodos espectrofotométricos para evaluar la capacidad reductora de las muestras al actuar sobre los radicales libres. En todas las técnicas cada muestra se evaluó por triplicado.

Se pesó 0.0104g del extracto etanólico y 0.015g del extracto de acetato de etilo los cuales se diluyeron en 5ml de agua destilada cada uno. Luego se realizaron diluciones detalladas en los fluxogramas con sus correspondientes concentraciones para la determinación de su capacidad antioxidante para los métodos de FRAP Y ABTS.

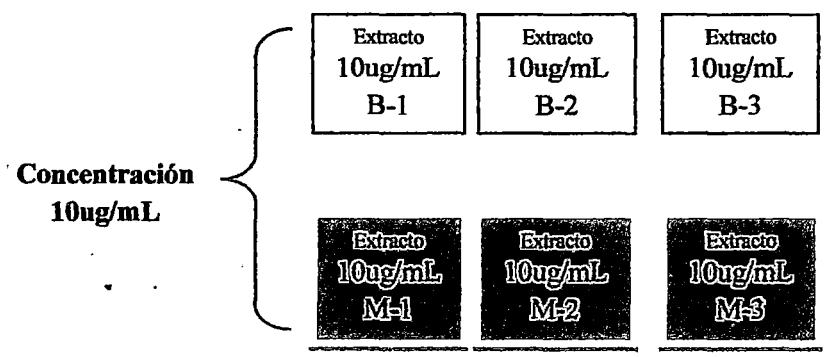


Fluxograma N° 3.Concentraciones de las diluciones del extracto etanólico

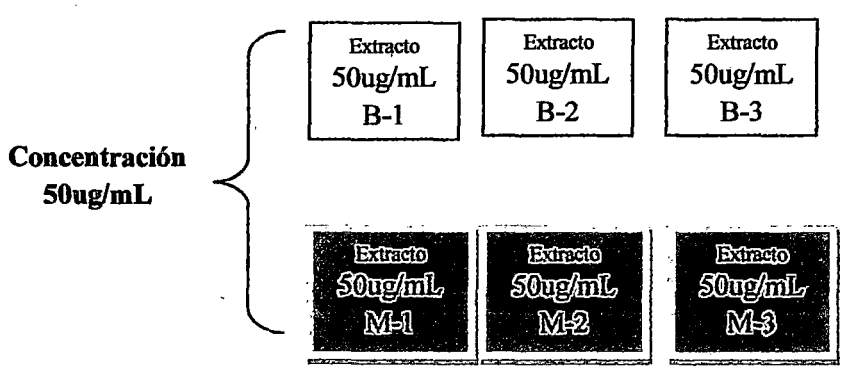


Fluxograma N° 4 Concentraciones de las diluciones del extracto de acetato de etilo

Se pesó 1mg de extracto etanólico y acetato de etilo en una balanza analítica. A cada vial que contiene el 1mg de cada extracto, se le añadió 10mL de metanol absoluto. Paralelamente se prepara la solución de DPPH a una concentración de 1.18mg/10mL y su absorbancia fue leída en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517nm.Luego se realizaron diluciones detalladas en los fluxogramas con sus correspondientes concentraciones para la determinar el porcentaje de inhibición frente al radical libre DPPH.



Fluxograma N° 5 Concentraciones de las diluciones de los extractos a 10ug/mL



Fluxograma N° 6 Concentraciones de las diluciones de los extractos a 50ug/mL

6.2.3.1. Método del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) [14,31, 32,34]

Se basa en la capacidad que presentan los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ión férrico a ion ferroso en medio acuoso ácido.

El procedimiento ha sido descrito por Benzie y Strain (1994) con ligeras modificaciones. Se prepara el reactivo de trabajo, que consistió en una mezcla de tampón acetato 300 mM (pH =3.6), TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y tricloruro férrico ($FeCl_3.6\ H_2O$) 20 mM en una proporción 10:1:1 (V: V: V), una vez preparado, se añadieron 3mL de este reactivo en una cubeta y se mide absorbancia (blanco) a 593nm. Posteriormente se agregó 100µL de las soluciones de los extractos, agitándose en un vórtex durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó la lectura de absorbancia nuevamente a 593 nm, a la que se restó el valor del blanco. Cada muestra fue ensayada en varias concentraciones realizando al menos 4 diluciones de cada una. Todas las muestras se ensayaron por triplicado.

Los resultados se expresaron en relación al Trolox. Para ello se realizó una curva de calibración con un intervalo de concentraciones de 1.00 a 0.03 mM y se procedió igual que las muestras. Todos los puntos de la curva se realizaron por triplicado. 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.

Una muestra cuya lectura se encuentre dentro de la curva se medirá a diferentes tiempos para determinar la cinética del método para la muestra.

6.2.3.2Método de reacción con el radical (2,2′-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) [14, 31, 34]

Se basa en la capacidad de captación del radical ABTS (2,2′-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) por parte de un antioxidante.

En este método, la generación del radical ABTS se produce por medio químico mediante la adición de persulfato de potasio antes de la adición de la muestra, lo que evita que los componentes de la misma puedan reaccionar con el reactivo, otra ventaja es que se trabaja a pH fisiológico (pH= 7.1), a una temperatura de 37 ^{0}C simulando las condiciones fisiológicas.

Es necesario preparar el reactivo de trabajo el cual debe tener una concentración de ABTS de 30 µm el cual se procedió de la siguiente manera:

Se pesa 0.0504 g de sal amónica cristalizada de ABTS y se disuelve en 5mL de agua ultrapura, se toma 6.7mg de persulfato de potasio y se adiciona a la solución anterior y se deja agitando por espacio de media hora envuelta en papel aluminio protegido a la luz. Pasado ese tiempo se transfiere a un matraz volumétrico de 10mL y se enrasa con agua ultrapura y se deja en reposo protegido de la luz de 12 a 18 horas.

Se toma una alícuota de 1 mL y se adiciona 70 mL de un tampón fosfato de pH 7.1 (6.8 ± 0.2.); se mide la absorbancia a 734nm.

Para la medida de la actividad antioxidante se tomaron 2 mL del radical ABTS en una cubeta y se midió su absorbancia a 734nm con el equipo termostatizado a 37 ^{0}C, posteriormente se añadió 50µL de la muestra problema (la cual debe haber estado en baño maría a 37 ^{0}C), se mezcló durante 10 segundos en vórtex, después de 4 minutos de incubación se medió la absorbancia a 734nm.

Cada muestra se realizó en un intervalo de concentración realizando al menos 5 diluciones de la misma con el objetivo de ver la respuesta del método frente a la concentración. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Para poder expresar los resultados se define el valor TEAC como la concentración de la muestra que tiene la misma actividad antioxidante que una concentración de 1 mM de Trolox. Para ello es necesario realizar una curva de calibración con diferentes

concentraciones de Trolox frente a las correspondientes variaciones de absorbancia del radical. Se hicieron diluciones a partir de una solución madre en un intervalo de 0.5 a 0.03 mM y se analizaron de las mismas formas que las muestras.

Una muestra cuya lectura se encuentre dentro de la curva se midió la absorbancia a diferentes tiempos de reacción, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25,30 minutos para determinar la cinética del método para la muestra.

6.2.3.3. Método de inhibición frente al radical libre 2 ,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)[2, 12, 14, 31, 32,35]

El radical libre y estable 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) es un indicador para medir capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. Su mecanismo de reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (ej. compuesto fenólico) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazine y una especie radical (ej. radical fenoxil).

Se pesó1mgde cada extracto en una balanza analítica. A cada vial que contiene el miligramo de cada extracto, se le añadió 10mL de metanol absoluto. Paralelamente se preparó la solución de DPPH, la misma que se encontró a una concentración de 1.18mg/10mL; y una vez leída su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm, debe resultar un valor no menor a 0.9 ni mayor a 1.1. La lectura se debe realizar por triplicado y promediarse. Este valor se denominará Abs. C o absorbancia del control. Se prepararon las diluciones de acuerdo al método mencionado, a concentraciones de 10 µg/mL y 50µg/mL, el ensayo se realizará por triplicado.

Cada ensayo consistió en evaluar tanto el blanco y la muestra, que conjuntamente con el valor del control se plasmaron en la fórmula para determinar el porcentaje de inhibición frente al radical libre DPPH. Cada vial contenía en total un volumen de 2500µl, en diferente proporción de extracto, disolvente y/o DPPH.

La inhibición de los radicales libres DPPH fue determinado por la decoloración de la solución de violeta a amarillo. A medida que hay un mayor secuestro de los radicales libres por un antioxidante, la absorbancia disminuirá.

La disminución de la absorbancia entre la solución de DPPH y el compuesto experimental es directamente proporcional a la concentración del antioxidante y el tiempo de reacción.

El porcentaje de inhibición se calculará mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje (\%) de inhibición} = 100 - \frac{(\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}})}{\text{Absorbancia}_{\text{control}}} \times 100$$

VII. RESULTADOS

1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

Cuadro N°1.Identificación y determinación de metabolitos secundarios en las hojas de *Cissus gongylodes* (Baker) Burch. exPlanch "sŭelda suelda" según la marcha fitoquímica preliminar de Olga Lock

FRACCIONES	REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN	RESULTADOS
FRACCIÓN A	Taninos	-
	Compuestos fenólicos	++
	Aminoácidos	+
	Flavonoides	++
FRACCIÓN B	Triterpenoides y/o esteroides	+
	Antraquinonas	-
FRACCIÓN C	Triterpenoides y/o esteroides	-
	Alcaloides	-
FRACCIÓN D	Flavonoides	++
	Leucoantocianidinas y catequinas	-
	Esteroides y triterpenoides	-
	Alcaloides	-
FRACCIÓN E	Flavonoides	+++
	Leucoantocianidinas	+
FRACCIÓN F	Saponinas	-

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Química de Productos Naturales -2014.

Leyenda:

+++: Abundante precipitado y/o color intenso
++: Regular precipitado y/o color
+: Mínimo precipitado y/o color
- : No hay presencia de precipitado

Cuadro N°2. Identificación y determinación de metabolitos secundarios en el extracto etanólico y acetato de etilo.

Reacciones de identificación	Extractos		Metabolitos Secundarios
	Etanólico	Acetato de etilo	
Reacción de $FeCl_3$	+	++	Flavonoides, compuestos Fenólicos
Reacción de Shinoda	++	+++	

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Química de Productos Naturales -2014.

Leyenda:

+++: Intensa Coloración

++: Regular coloración

+: Mínimo coloración

Se debe tomar en cuenta que la fracción obtenida en la marcha o Screening fitoquímico efectuado no es exclusivamente para compuestos flavonoides pues según la referencia podrían haber otros compuestos de diferentes naturaleza como : antraquinonas, taninos y saponinas, siendo nuestro objetivo la verificación de flavonoides, se procedió a realizar las pruebas indicadas en el cuadro N° 2 permitiéndonos confirmar en ambos extractos la presencia de compuestos fenólicos con la reacción del $FeCl_3$ y en especial flavonoides con la reacción positiva de shinoda.

2. EVALUACIÓN DE LOS FENOLES TOTALES MEDIANTE EL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU

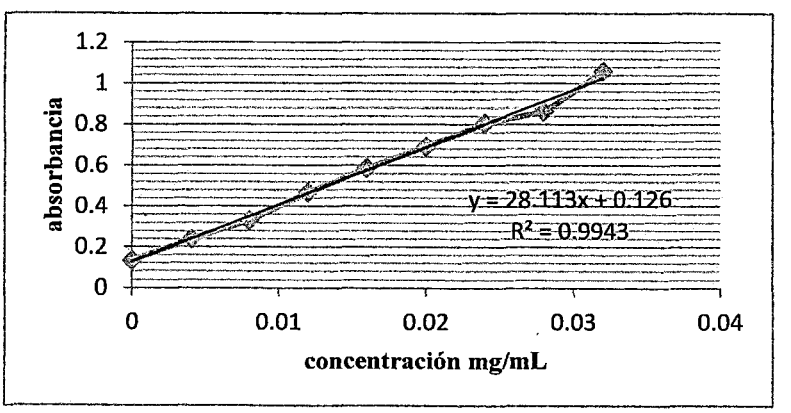
Después del proceso de secado de los extractos de la especie *Cissus gongylodes*, se evaluó el contenido de los fenoles. La Tabla N° 1 muestra las concentraciones de ácido gálico con sus respectivas absorbancias.

Tabla N° 1. Evaluación de fenoles totales de ácido gálico (AG)

Concentración de Acido gálico (mg/mL)	Absorbancia 760nm
0	0.134
0.004	0.24
0.008	0.331
0.012	0.468
0.016	0.587
0.02	0.694
0.024	0.805
0.028	0.863
0.032	1.06

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

En el siguiente gráfico se muestra la absorbancia vs concentración y la ecuación de la curva de calibración del ácido gálico.



GráficoN°1. Curva de calibración del ácido gálico

Tabla N°2. Evaluación de fenoles totales en el extracto etanólico

El contenido de fenoles totales se obtiene usando la ecuación de la curva del ácido gálico.

CC Dilución (mg/mL)	Absorbancia 760nm	Contenido de fenoles totales ácido gálico (AG)
0.0925	0.4885	12.9 mg AG / g de muestra
0.0485	0.3445	7.8 mg AG / g de muestra
0.0248	0.2255	3.5 mg AG / g de muestra

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

En el gráfico N°1 se observa que para el extracto etanólico el contenido de fenoles totales es 3.5; 7.8 y 12.9 mg AG / g de muestra.

Tabla N° 3. Evaluación de fenoles totales en el extracto acetato de etilo

La evaluación de fenoles totales se obtiene usando la ecuación de la curva del ácido gálico.

CC Dilución (mg/mL)	Absorbancia 760nm	Contenido de fenoles totales de ácido gálico (AG)
0.0913	1.14	36 mg AG / g de muestra
0.0478	0.6895	20 mg AG / g de muestra
0.0245	0.4035	9.8 mg AG / g de muestra

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

En el gráfico N°1, se observa que para el extracto de acetato de etilo el contenido de fenoles totales es 9.8; 20 y 36 mg AG / g de muestra.

De las muestras evaluadas el que presentó un mayor contenido de fenoles totales fue el extracto de acetato de etilo.

3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE:

3.1 MÉTODO DEL PODER ANTIOXIDANTE DE REDUCCIÓN FÉRRICA (FRAP)

Tabla N° 4. Valores de lecturas de las soluciones estándares de trolox

Concentración trolox	ABS inicial	ABS final	ABS corregida	Promedio
0.5mM	0.163	0.797	0.634	0.602
	0.201	0.824	0.623	
	0.211	0.759	0.548	
0.25mM	0.267	0.606	0.339	0.357
	0.098	0.521	0.423	
	0.156	0.465	0.309	
0.125mM	0.146	0.293	0.147	0.164
	0.091	0.257	0.166	
	0.122	0.301	0.179	
0.0625mM	0.145	0.226	0.081	0.085
	0.078	0.167	0.089	
	0.192	0.278	0.086	
0.03125mM	0.13	0.175	0.045	0.044
	0.095	0.139	0.044	
	0.081	0.125	0.044	
0.015625mM	0.071	0.09	0.019	0.024
	0.063	0.087	0.024	
	0.098	0.126	0.028	

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

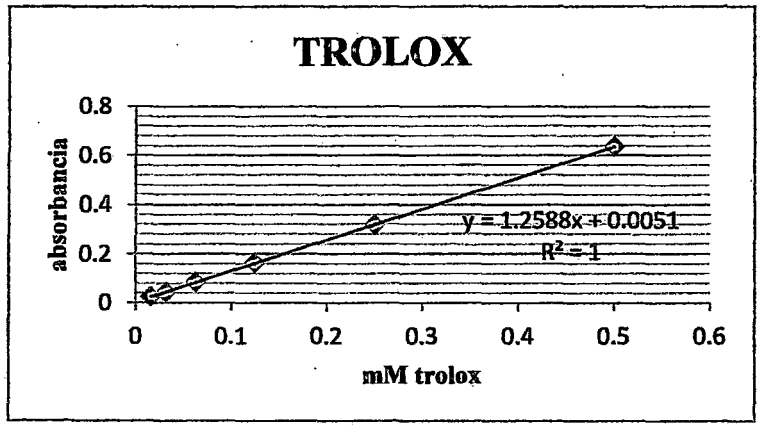


Gráfico N° 2. Curva de calibración del trolox: Método FRAP

Tabla N° 5. Actividad antioxidante mediante el método de FRAP para las diluciones del extracto etanólico

CC Dilución (mg/mL)	ABS inicial	ABS final	ABS corregida	Promedio	TEAC mM
1.04	0.234	1.008	0.774	0.803	0.633*
	0.201	0.964	0.763		
	0.279	1.152	0.873		
0.52	0.243	0.865	0.622	0.622	0.49
	0.245	0.869	0.624		
	0.246	0.867	0.621		
0.26	0.236	0.638	0.402	0.409	0.32
	0.276	0.688	0.412		
	0.272	0.685	0.413		
0.13	0.27	0.461	0.191	0.193	0.149
	0.222	0.412	0.19		
	0.252	0.451	0.199		
0.065	0.228	0.237	0.009	0.047	0.033
	0.198	0.275	0.077		
	0.196	0.252	0.056		

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

La actividad se obtiene aplicando la ecuación de la curva de calibración del trolox al promedio del triplicado de las mediciones.

Se determinó la actividad antioxidante en 5 diluciones a diferentes concentraciones, para observar el comportamiento con respecto a la concentración, hubo un incremento proporcional hasta la concentración 0.52mg/mL del extracto observándose que a mayores concentraciones salen de la curva de calibración y parecen saturar la actividad.

Tabla N° 6. Actividad antioxidante mediante el método de FRAP para las diluciones del extracto de acetato de etilo

CC Dilución (mg/mL)	ABS inicial	ABS final	ABS corregida	Promedio	TEAC mM
1.5	0.231	1.204	0.973	0.988	0.78*
	0.216	1.193	0.977		
	0.206	1.221	1.015		
0.75	0.231	0.908	0.677	0.691	0.544*
	0.216	0.921	0.705		
	0.206	0.896	0.69		
0.375	0.201	0.799	0.598	0.579	0.455
	0.217	0.794	0.577		
	0.202	0.765	0.563		
0.1875	0.225	0.511	0.286	0.284	0.221
	0.239	0.529	0.29		
	0.265	0.541	0.276		
0.0937	0.218	0.352	0.134	0.145	0.111
	0.231	0.378	0.147		
	0.223	0.376	0.153		

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

Las concentraciones* de 0.75 y 1.5mg/ml dan lecturas fuera de la curva y parecen saturar la actividad del reactivo.

Se encontró que a concentraciones de 0.375mg/ml presenta una actividad antioxidante de 0.455mM equivalente de trolox.

3.2. MÉTODO REACCIÓN CON EL RADICAL (2,2´-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)

Tabla N° 7. Valores de lectura de las soluciones estándares de trolox

Concentración trolox	ABS inicial	ABS final	ABS corregida	Promedio
1mM	0.665	0.148	0.517	0.524
	0.771	0.253	0.518	
	0.711	0.173	0.538	
0.5mM	0.738	0.451	0.287	0.278
	0.764	0.495	0.269	
	0.797	0.520	0.277	
0.25mM	0.804	0.649	0.155	0.153
	0.747	0.602	0.145	
	0.785	0.626	0.159	
0.125mM	0.775	0.678	0.097	0.092
	0.762	0.676	0.086	
	0.748	0.656	0.092	
0.0625mM	0.736	0.672	0.064	0.062
	0.718	0.654	0.064	
	0.731	0.673	0.058	
0.03125mM	0.817	0.765	0.052	0.053
	0.746	0.676	0.070	
	0.801	0.763	0.038	
0.01562mM	0.682	0.652	0.030	0.029
	0.760	0.731	0.029	
	0.773	0.744	0.029	

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

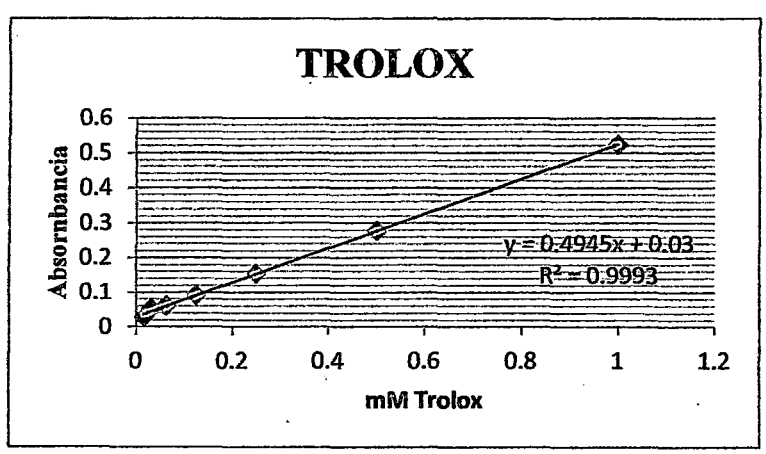


Gráfico N° 3. Curva de Calibración del Trolox: Método ABTS

Tabla N° 8. Actividad antioxidante mediante el método de ABTS para las diluciones del extracto etanólico

CC Dilución (mg/mL)	ABS inicial	ABS final	ABS corregida	Promedio	TEAC mM
1.04	0.697	0.144	0.553	0.624	1.201*
	0.765	0.118	0.647		
	0.778	0.107	0.671		
0.52	0.734	0.216	0.584	0.508	0.966
	0.633	0.150	0.483		
	0.678	0.220	0.458		
0.26	0.677	0.301	0.376	0.382	0.712
	0.686	0.299	0.387		
	0.685	0.301	0.384		
0.13	0.666	0.363	0.303	0.289	0.524
	0.643	0.365	0.278		
	0.651	0.364	0.287		
0.065	0.657	0.448	0.209	0.218	0.381
	0.655	0.427	0.228		
	0.671	0.455	0.216		

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

Todas las diluciones se analizaron por triplicado y el promedio de éstas se lleva a la ecuación de la curva de calibración para hallar la actividad equivalente de trolox de cada extracto.

Se observó que hubo un incremento proporcional hasta la concentración 0.52mg/mL del extracto etanólico, observándose que a mayores concentraciones* salen de la curva de calibración y parecen saturar la actividad.

Tabla N° 9. Actividad antioxidante por el método de ABTS de las diluciones del extracto acetato de etilo

CC Dilución (mg/mL)	ABS inicial	ABS final	ABS corregida	Promedio	TEAC mM
1:5	0.777	0.104	0.673	0.683	1.320*
	0.789	0.101	0.688		
	0.794	0.107	0.687		
0.75	0.714	0.115	0.599	0.583	1.118*
	0.697	0.129	0.568		
	0.706	0.123	0.583		
0.375	0.677	0.201	0.476	0.523	1.00
	0.745	0.168	0.577		
	0.695	0.179	0.516		
0.1875	0.734	0.316	0.418	0.378	0.703
	0.699	0.317	0.382		
	0.678	0.344	0.334		
0.0937	0.666	0.371	0.295	0.280	0.505
	0.643	0.365	0.278		
	0.651	0.384	0.267		

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

Se observa que a una concentración de 0,375 mg/mL el extracto de acetato de etilo presenta una actividad antioxidante de 1mM equivalentes de trolox.

Se observó que a mayores concentraciones* salen de la curva de calibración y parecen saturar la actividad.

3.3. MÉTODO DE INHIBICIÓN FRENTE AL RADICAL LIBRE 2 ,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

La actividad antioxidante se obtiene aplicando la ecuación del % de inhibición.

Se determinó que a concentraciones de 10µg/mL y 50µg/mL presenta un porcentaje de inhibición 68.22 % y 94.03 % respectivamente, superando al control rutina.

Tabla N° 10.Actividad antioxidante mediante el método de DPPH para los extractos Etanólico y acetato de etilo

N°	Extractos	10µg/mL				50µg/mL			
		Absorbancia			% de Inh.	Absorbancia			% de Inh.
		Blco	Mta	Control		Blco	Mta	Control	
1	Etanólico	0.0063	0.798	1.022	22.53	0.038	0.411	1.022	63.50
2	Acetato	0.0033	0.337	1.05	68.22	0.0073	0.07	1.05	94.03
3	Rutina	0.014	0.4103	0.99	59.97	0.013	0.1066	0.99	90.55

Fuente: Cahuana CP y Llancari GJ. Laboratorio de Análisis instrumental-2014.

En el gráfico N°4, se observa el porcentaje de inhibición de los extractos frente al patrón rutina.

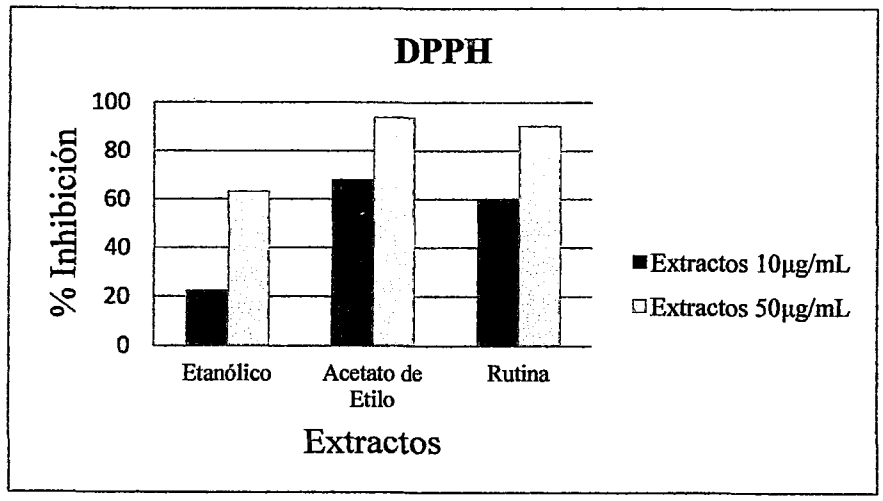


Gráfico N° 4. Porcentaje de inhibición de DPPH

VII DISCUSIÓN:

A escala mundial los preparados fitoterapéuticos obtenidos a partir de drogas de origen vegetal, ocupan un lugar muy importante dentro del comercio de medicamentos, debido a ello, se ha enfatizado en la necesidad de investigar los constituyentes químicos de las drogas vegetales, y sus posibles acciones terapéuticas [13, 36, 37.]

Como resultado del Screening fitoquímico en las hojas de C*issus gongylodes* se identificó la presencia de aminoácidos, flavonoides, grupos fenólicos libres, leucoantocianidinas, triterpenos y/o esteroides. Siendo nuestro objetivo la identificación de metabolitos secundarios como flavonoides, se realizaron las pruebas de identificación y determinación en los extractos etanólico y acetato de etilo permitiéndonos confirmar en ambos extractos la presencia de grupos fenólicos libres y flavonoides siendo el extracto de acetato de etilo en el que se identificó mayor presencia de estos metabolitos.

La presencia de flavonoides y grupos fenólicos libres identificados están relacionados con el alto contenido de fenoles totales obtenidos mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu en el extracto acetato de etilo, resaltando que la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides están relacionados con la actividad antioxidante.[12]

Estudios realizados por Manuel Gracia N. en la Universidad de Querétaro en diversos extractos naturales, los resultados mostraron una gran cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides en la mayoría de sus extractos, los cuales podían estar estrechamente relacionados con las propiedades farmacológicas y medicinales de las plantas, lo cual justifica lo reportado por el extracto de acetato de etilo 36 mg AG/g de extracto de la especie *Cissus gongylodes;* por lo tanto, la concentración de compuestos fenólicos está relacionada íntimamente con la actividad antioxidante.[28]

En el desarrollo de la actividad antioxidante existen diferentes métodos para evaluarlo, ya sea in vitro o in vivo, debido a que los antioxidantes pueden actuar por mecanismos diferentes, dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria. Para detectar el nivel de actividad antioxidante de los extractos fue necesario elegir métodos que permitan facilidad de aplicación a una variedad de extractos, que sea relativamente económico, fácilmente reproducible y sensible.

Se eligieron los métodos FRAP, ABTS Y DPPH permitiéndonos detectar el nivel de neutralización o captación de radicales libres en los extractos etanólico y acetato de etilo. Estos métodos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones aunque también muestran diferencias considerando que actúan por mecanismos diferentes.

Al ser analizados ambos extractos observamos que presentan una actividad antioxidante relativamente similar por el método de FRAP cuyo mecanismo de acción está basado en la reacción de transferencia de electrones simples (SET).

El extracto de acetato de etilo presentó mayor actividad antioxidante frente al extracto etanólico al ser analizado por el método de ABTS, cuyo efecto está basado en dos mecanismos de acción: Transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) y transferencia de electrones simples (SET).[14]

Estudios realizados por Kuskoski EM (2005), concluyó que entre los métodos químicos utilizados para determinar la capacidad antioxidante en la pulpa de frutos, el radical ABTS es uno de los más rápidos, originando resultados reproducibles y coherentes, muestra varios máximos de absorción y una buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica. Lo que justifica que para una misma concentración de extracto, usando el mismo patrón (trolox) se obtiene valores de actividad antioxidante mayores por el método ABTS, esto nos permite confirmar que

los compuestos que poseen dicha actividad actúan principalmente por los mecanismos SET y HAT. [13, 31, 33,34]

El método DPPH es un modelo ampliamente usado para evaluar la rapidez de un antioxidante para atrapar radicales libres. Al determinar la actividad observamos que el extracto de acetato de etilo presentó una gran capacidad antioxidante con68.22% a una concentración de 10µg/ml superando al patrón rutina con 59.97 %.Podemos decir que a una pequeña concentración de extracto se obtiene un mayor nivel de actividad antioxidante.

Estos resultados son coincidentes con lo reportado por Chacaltana P, Suarez A. (Ica-2011) que evaluaron la actividad antioxidante de los flavonoides presentes en las hojas de *Polimnia lehmanii* "Llareta" concluyendo que el extracto de acetato de etilo y el extracto Etanólico, fueron los que mostraron mayor actividad antioxidante con un 40.05% y 60.49% respectivamente, a una concentración de 50ug/mL, frente al radical libre DPPH; lo cual justifica la efectividad de la especie *Cissus gongylodes* "suelda suelda" que al utilizar el mismo método de DPPH a una menor concentración 10ug/ml se obtiene un mayor nivel de actividad antioxidante.[4,12]

Existe una excelente correlación entre concentración de los extractos y la actividad antioxidante en los 3 métodos. En el método de FRAP ambos extractos presentaron una similar actividad antioxidante, a diferencia de los métodos de ABTS y DPPH el extracto acetato de etilo presentó mayor actividad.[2, 15,38]

Se observa una correlación entre la determinación de fenoles totales (FT) y la actividad antioxidante para los métodos ABTS y DPPH. Se presenció que el extracto de acetato de etilo presentó mayor actividad antioxidante por ambos métodos, esto se debe particularmente a la mayor presencia de grupos fenólicos libres principalmente

flavonoides obtenidos por el método de fenoles totales mediante el reactivo de Folin Ciocalteu.[39,40]

IX. CONCLUSIONES:

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio de la especie *Cissus gongylodes,* podemos llegar a las siguientes conclusiones.

1. Se obtuvo el extracto etanólico a partir de las hojas de la especie *Cissus gongylodes* "suelda suelda" y al realizar el tamizaje fitoquímico se halló la presencia de grupos fenólicos, aminoácidos, flavonoides, leucoantocianidinas, triterpenos y esteroides.
2. Al realizar las reacciones de identificación y determinación los extractos etanólico y acetato de etilo presentaron flavonoides y grupos fenólicos libres. Resaltando que en el extracto de acetato de etilo se halló mayor presencia de estos metabolitos secundarios.
3. Al evaluar los fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, el extracto de acetato de etilo reportó mayor presencia de grupos fenólicos a 36mg AG/g de extracto; por lo tanto, la concentración de compuestos fenólicos está relacionada íntimamente con la actividad antioxidante.
4. Ambos extractos presentanactividad antioxidante relativamente similar cuando son analizados mediante el método de poder antioxidante de reducción férrica (FRAP), cuyo mecanismo de acción es transferencia de electrones simples (SET).
5. El extracto de acetato de etilo a diferencia del extracto etanólico presentó mayor nivel de actividad antioxidante frente a los métodos de ABTS a una concentración de 0.0937mg/mL (0,505 mM de trolox); y DPPH a una concentración de 10ug/mL (68.22%).

X. RECOMENDACIONES

Después del siguiente estudio se puede realizar las siguientes recomendaciones:

1. Continuar el estudio de esta y otras especies del Género Cissùs utilizadas por su actividad antioxidante y su posible mecanismo de acción.
2. Realizar la toxicidad aguda a la especie, con la finalidad de brindar un aporte a la comunidad.
3. Complementar el presente estudio con el aislamiento y elucidación de las estructuras de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antioxidante.
4. Un mayor apoyo e incentivos de las autoridades universitarias para la realización de trabajos de investigación que tengan trascendencia en bien de la comunidad.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brack EGG, A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú, Cuzco: Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas; 1999.
2. Castillo P. Estudio químico y actividad antioxidante en *LepechiniaMeyenii* (walp), Tesis para grado de magister en Química. Escuela de Post Grado, Pontificia Universidad Católica del Perú. Perú - Lima 2004.
3. Avello,M.; Swalsky M. Radicales libres, estrés oxidativo y defensa antioxidante celular; 2005.
4. Castañeda C, Ramos Ll, Ibañez V. evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Rev Horizonte Med; 2008. [citado el 25 octubre 2014]; 8(1):56-72.Disponible en : http://usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2008_I/Art4_Vol8_N1.pdf
5. Lionel GermosénRobineau (ed.) Martinique. Farmacopea Vegetal Caribeña. Rev Cubana PlantMed; 2005. [citado el 12 de noviembre del 2012]; 3(2):89-104.Disponible en : http://issuu.com/scduag/docs/farmacopea1/137
6. Cheeseman, K. &Slater, T. 1993. Free Radicals in Medicine. British Medical Bulletin Vol 49 (3), pp. 481 – 491.Churchill, Livingstone.
7. Sang, KL. Zakaria, H.; Mbwambo, H.; Gomez, E.; Mehta, R.; Douglas, A. and Pezzuto, J. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. Combinatorial Chemistry & High throughput Screening; 1998. p. 1, 35-46
8. Rosa MO. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. Rev. Inst. Med. Trop; 2010. [citado el 25 octubre 2014]; 5(2):23-29 Disponible en: http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf

9. Reyes JS; Escobar YN; Álvarez PN. Mortalidad con infarto agudo de miocardio en una unidad de cuidados intermedios. Revista Cubana de Medicina; 1997; 36: 112-16.

10. Schlesier K, Harwat M, Böhm V, BitschR. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. freeradical research. 2002; 36: 177–187.

11. Chavez R, Plaza A, Lock O. Antioxidantes de origen vegetal. Revista de Química, X. 1996; (1), 71 – 101.

12. Chacaltana P, Suarez A. Evaluación de la actividad antioxidante de los flavonoides presentes en las hojas de*Polimnia lehmanii* "Llareta", Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica.Universidad San Luis Gonzaga. Ica- Perú 2011.

13. Avendaño C. Introducción a la química farmacéutica. 2da ed. Edit. McGraw-Hill. Madrid, España; 2001:575 – 598, 850.

14. Roginsky V, Lissi E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chem. 2005; 92, 235-254.

15. Mensor L, Menezes F, Leitao G, Reis A. Dos Santos T, Coube C, LeitaoS. Screening of brazilian plants extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotheraphy Res. 2001;15, 127-130.

16. Fukumoto L, MazzaG. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J. Agric. FoodChem. 2000; 48, 3597-3604.

17. Nenadis N, Tsimidov M.Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compound using rapid 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. (DPPH) Test. Jaocs, 2002; 79 (12), 1191 - 1195.

18. Flores, F. *Cissus gongylodes*: Caracterização farmacognóstica e investigação de aspectos preliminares da seguridade da utilização de extratos aquosos das folhas de caules.Informe de tesis. Universidad de Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

19. Brako L &ZaruchiJ. Catalogue of the flowering plants angymnosperms of Peru. Monographs in Systematic, Missouri Botanical Garden.1996; 45: I–XL:1–1286.

20. Clavo P, Zoyla M, Seijas C, Zully P, Alegre O. Plantas medicinales: usadas por mujeres nativas y mestizas en la región Ucayali. Pucallpa-Perú. 2003; 124.

21. Vasconcelos THC, Modesto-Filho J, Diniz MFFM, Santos HB, Aguiar FB, Moreira PVL. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). RevBrasFarmacogn. 2007; 17: 583-591

22. Shanley P, Rosa NA. Eroding knowledge: An ethnobotanical inventory in eastern amazonia's logging frontier. Economic Botany 2004, 58:135-160.

23. Lock O. Investigación fitoquímica, método en el estudio de productos naturales, Lima, Perú. Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo editorial; 1994

24. Sharapin, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, Programa iberoamericano de Ciencia y tecnología para el Desarrollo. Sub programa X. Química Fina; 2000.

25. Martínez J. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *heliocarpusterebinthinaceus*, Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos en la Universidad Tecnológica de la Mixteca. 2007

26. Rossi JA, and Singleton VL. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticulture; 1965. 16: 144-158.

27. Barbosa L, Knodler M, Queiroz J, Ribeiro S, Schieber A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of brazilian mango (*Mangiferaindica L.)* varieties. Food Chem. 2008; 110: 620–626.

28. Gracia MA, Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Primer Verano de Introducción a la Investigación de la Universidad autónoma de Querétaro; 2007. [citado el 25 octubre 2014]; Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf

29. Stratil P, Klejdus B, Kubán V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables. Evaluation of spectrophotometric methods. Journal of Agriculture and Food Chemistry; 2006. 54: 607-616.

30. Al-Duais M, Muller L, Bohm V, Jetschke G. Antioxidant capacity and total phenolics of cyphostemmadigitatum before and after processing: use of different assays. EurFood Res Technol; 2009. 228:813-2.

31. Kuskoski EM. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, Ciencia Tecnología. Alimentos. Campinas, 25(4): 726-732, out.- dez. 2005.

32. Rojano BA. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, ISSSN 0121-4004. Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. 15 (1), 173-181. 2008.

33. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analitical Biochemistry. 1996; 239: 70-76.

34. Re, R.; Pellegrini N, Proteggente A, Pannala, A.; Yang, M. y Rice- Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical catióndecoloration assays. Free Radical Biology and Medicine; 1999. 26: 1231-1237.

35. Albites J, Cabezudo M. Estudio dela actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal *tristerixchodatianus*. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica.Universidad San Luis Gonzaga. Ica- Perú 2009

36. Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1era ed. Edit. Félix Varela. La Habana, Cuba; 2001:147-170

37. Kuklinski C. Farmacognosia. 1ra. ed. Edit. Omega.España. 2000:3-39

38. Prior RL, WU X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of agriculture andfoodchemistry. 2005; 53: 4290-4302.

39. Rojano A, Gaviria CA, Ochoa CI, Sánchez N, Medina C, Lobo M. Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vacciniummeridionale Swartz*). Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño en la zona altoandina de Colombia. Bogotá, Colombia: Gente Nueva Editorial; 2009. p. 95-112.

40. Andrés T, Huayanca NH, Llancari GJ, Ramos KF, Vicuña R: Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria a partir de los extractos obtenidos de las hojas de *Cissus gongylodes* (baker) burch. ex planch "suelda suelda". presentado en el XXI Congreso Científico Peruano de Farmacia y Bioquímica - Universidad Privada "Antonio Guillermo Urello / 2011.

XII. ANEXOS

GLOSARIO

ROS = Especies reactivas de oxígeno

RNS = Especies reactivas de nitrógeno

ORAC = Capacidad de captación de radicales oxigenados.

TRAP = Parámetro antioxidante de captación de radicales.

FCR = Reactivo de follinciocalteu.

DPPH = Radical libre 2 ,2-Difenil-1-picrilhidrazil

TPTZ = 2, 4,6 – tripiridil - S - triazina

ABTS = Radical 2,2´-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

HAT = Transferencia de átomos de hidrógeno.

SET = Transferencia de electrones simples.

TEAC = Capacidad antioxidante equivalente al trolox.

FRAP = Poder antioxidante de reducción del ión férrico.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

CONSTANCIA Nº 074- USM-2011

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

La muestra vegetal (tallos y hojas), recibida de **KAREN FABIOLA RAMOS APARCANA,** estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad San Luis Gonzaga. Ica; ha sido estudiada y clasificada como: ***Cissus gongylodes* (Baker)** Burch. ex Planch tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: RHAMNALES

FAMILIA: VITACEAE

GENERO: *Cissus*

ESPECIE: *Cissus gongylodes* (Baker) Burch. ex Planch

Nombre vulgar: "sueldasuelda"
Determinada por: Mg. Hamilton Beltrán S.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 04 de mayo de 2011

Dra. Haydeé Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS
(USM)

DDB

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú
Telfs.: (511) 471-0117, 470-4471,
470-7918, 619-7000 anexo 5303
Fax: (511) 265-6819
e-mail: museohn@unmsm.edu.pe
http://museohn.unmsm.edu.pe

Fig. 11.1 Hojas de la especie Cisus Gongylodes "suelda suela"

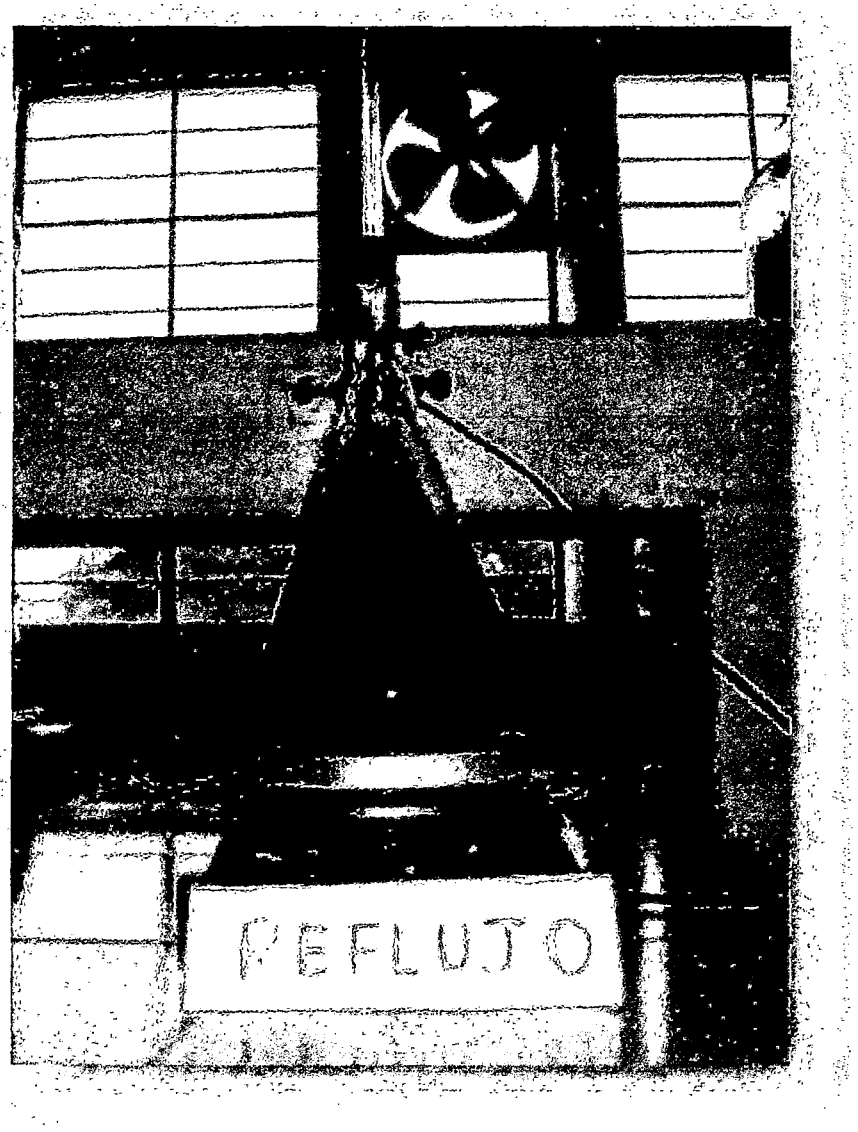


Fig. 11.2 Extracción por reflujo

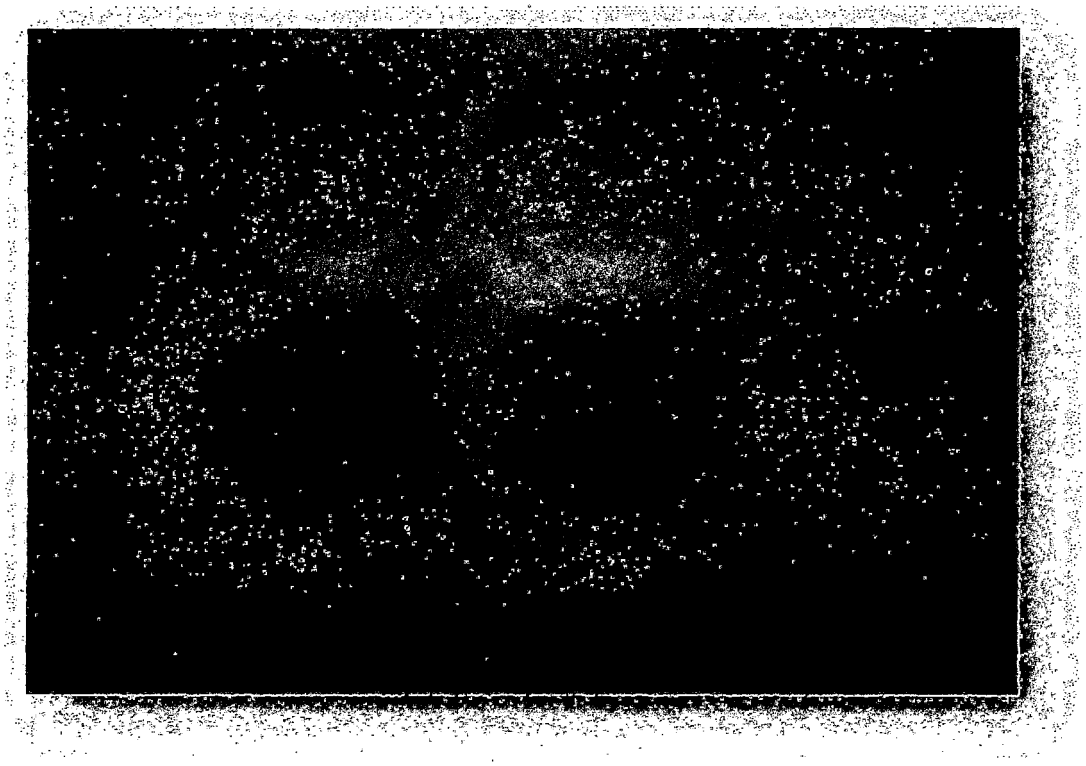


Fig. 11.3 Reacción de Identificación de Shinoda

Fig. 11.4Cuantificación de Polifenoles Totales

Fig. 11.5Realizando el secado de hojas y extractos

Dra. Haydee Chávez Orellana, Profesora Principal de la Cátedra de Química Orgánica del Departamento Académico de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; ***Dr. Felipe Surco Laos y Mg. Manuel Valle Campos.*** Profesores Principales de la Cátedra de Análisis instrumental del Departamento Académico de Análisis instrumental de la Facultad de Farmacia Y Bioquímica como Asesores de la presente Tesis.

CERTIFICAN:

Que las Bachilleres: Cahuana Canchaya, Cinthya Pilar y Llancari Mateo, Gueyby Jennyfer han realizado bajo nuestra dirección, el trabajo titulado **"NIVEL DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANOLICO Y ACETATO DE ETILO OBTENIDOS DE LAS HOJAS DE *Cissus gongylodes (Baker) burch. Ex planch "suelda suelda"*** para optar el título de Químico Farmacéutico y considerándola finalizada y reuniendo los requisitos de calidad necesarios, autorizan su presentación para que sea juzgada por el jurado correspondiente.

Ica, 27 de Febrero del 2015

Dra . Haydee Chávez Orellana

Dr. Felipe Surco Laos

Mg. Manuel Valle Campos