



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



AT 2024-FFBB-013

CONSTANCIA

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

Determinación de la actividad antioxidante de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. "chincaillo"

Presentado por:

DE LA CRUZ FERNANDEZ, JAVIER FRANCISCO

Bachiller del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es **6%** por el cual se otorga el calificativo de:

APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Con Código de Matricula: 20140866

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

Ica, 3 de Octubre de 2024

.....
Dra. JOSEFA BERTHA PARI OLARTE
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACION FACULTAD DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”

VICERRECTORADO DE INVESTIGACION

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Determinación de la actividad antioxidante de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “chincaillo”

**Línea de Investigación:
Salud Pública y Conservación del Medio Ambiente**

AUTOR

BACH. De La Cruz Fernández Javier Francisco

ICA-PERU

2024

DEDICATORIA

A mis padres, por inculcarme valores y la fuerza necesaria para salir adelante.

A mi abuela Nora, por enseñarme el valor de la vida, demostrándome con su amor que todo esfuerzo tiene su recompensa.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ayudarme a cumplir uno de mis sueños, el ser Químico Farmacéutico.

A mi Asesor, Dr. Jorge García Ceccarelli, al Dr. Felipe Surco Laos, a la Dra. Haydee Chávez Orellana, por ser mis mejores referentes en mi etapa universitaria.

Índice

Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. Introducción	9
II. Estrategia metodológica	25
2.1.1 Tipo de Investigación	25
2.1.2 Nivel de Investigación	25
2.1.3. Diseño de Investigación	25
2.2 Lugar de Investigación	25
2.3 Materiales de Trabajo	26
2.4. Hipótesis y variables	28
2.4.1. Hipótesis	28
2.4.2. Variables	28
2.5. Población, muestra y muestreo	30
2.6. Métodos, Técnicas y procedimiento de recolección de muestras	30
2.7. Técnicas y procesamiento de información	37
2.8. Técnicas de procesamiento, análisis e interpretación	38
2.9. Aspectos éticos	38
III. Resultados	39
IV. Discusión	47
V. Conclusiones	50
VI. Recomendaciones	51
VII. Referencias bibliográficas	52
VIII. Anexos	56

Índice de tablas

Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	21
Tabla 2. Tipos de antioxidantes	22
Tabla 3. Métodos químicos para la determinación de la actividad antioxidante	27
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos de caracterización el extracto etanólico de las flores de la especie <i>Grindelia tarapacana</i> Phil. “chincaillo”.	39
Tabla 5. Metabolitos secundarios del extracto etanólico de las flores de la especie <i>Grindelia tarapacana</i> Phil. “chincaillo”.	40
Tabla 6. Lecturas de las disoluciones del trolox como patrón por el método de DPPH	41
Tabla 7. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie <i>Grindelia tarapacana</i> Phil. “Chincaillo” por el método DPPH	42
Tabla 8. Valores de las absorbancias de las diluciones del patrón de trolox por el método FRAP	43
Tabla 9. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las flores de la especie <i>Grindelia tarapacana</i> Phil. “chincaillo”. por el método FRAP	44
Tabla 10. Lectura de absorbancia de las disoluciones de trolox por el método de ABTS.	45
Tabla 11. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las flores de la especie <i>Grindelia tarapacana</i> Phil. “chincaillo” por el método ABTS	46

Índice de figuras

Figura 1. Flor de la especie <i>Grindelia tarapacana</i> Phil. “chincaillo”.	16
Figura 2. Hojas y unidades floridas de <i>Grindelia tarapacana</i> Phil. “chincaillo”.	17
Figura 3. Zona de distribución de la especie a nivel Sudamérica	17
Figura 4. Redox homeostasis: the role of oxidants/antioxidants	20
Figura 5. Antioxidantes presentes en alimentos	23
Figura 6. Acción de antioxidantes endógenos frente a radicales libres	24
Figura 7. Principales mecanismos de acción de antioxidantes	25
Figura 8. Zona de recolección de la especie vegetal	30
Figura 9. Correlación entre las concentraciones de trolox en mM y % de inhibición del radical DPPH	41
Figura 10. Correlación entre las concentraciones de extracto en mg/mL y % de inhibición del radical DPPH	42
Figura 11. Curva de calibración del patrón para determinar la actividad antioxidante por el método FRAP	43
Figura 12. Curva entre concentración del extracto etanólico de flores de la especie <i>Grindelia tarapacana</i> Phil. “Chincaillo” y TEAC (mM)	44
Figura 13. Curva de cuantificación de trolox para la actividad antioxidante por el método ABTS	45
Figura 14. Curva entre concentración de extracto etanólico de flores de la especie <i>Grindelia tarapacana</i> y capacidad antioxidante equivalente a trolox como mM.	46
Figura 15. Especie en estado natural	56
Figura 16. Recolectando la especie	56
Figura 17. Selección y secado de las flores de la especie	57
Figura 18. Pesando la muestra para maceración	57
Figura 19. Macerando las flores de la especie	58
Figura 20. Extracto seco de la especie	58
Figura 21. Fraccionamiento durante para el screening	59
Figura 22. Realizando diluciones en la determinación de la actividad antioxidante	59
Figura 23. Preparando para la lectura al espectrofotómetro	60
Figura 24. Pruebas de caracterización del extracto	6

RESUMEN

El uso de especies vegetales en la medicina tradicional está nuevamente tomando auge, lo que se evidencia en estudios de validez científica que respaldan o descartan las propiedades terapéuticas atribuidas según el conocimiento popular. Una de las propiedades más atribuidas a las especies vegetales que relaciona con el estrés oxidativo presente en una serie de enfermedades degenerativas, es la propiedad antioxidante, razón por la cual el presente estudio tuvo como objetivo determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de las flores de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. “chincaillo” que es utilizada para diversas aplicaciones en la zona de Carhuacucho en distrito de Llauta, en el departamento de Ayacucho. La maceración de las flores se efectuó empleando como solvente etanol de 96° y el extracto seco obtenido fue caracterizado mediante los parámetros de humedad, sólidos solubles, pH y cenizas AOAC; mientras que la actividad antioxidante se efectuó con los métodos DPPH, FRAP y ABTS. Se obtuvo un extracto color verde claro de consistencia pastosa con una humedad media de $10,94 \pm 0,43$ g/100g y un pH promedio de $3,25 \pm 0,17$; con una presencia predominante de compuestos flavonoides en todas las fracciones del screening fitoquímico aplicado; asimismo taninos, ácidos fenólicos y triterpenos. La actividad antioxidante equivalente mg por mM de trolox por el método DPPH fue de 18,4 por el método FRAP de 9,22 y por el método ABTS de 19,26 respectivamente; siendo la actividad antioxidante más activa por el método FRAP; concluyendo que el extracto presenta una relativa capacidad antioxidante.

Palabras clave: *Grindelia tarapacana*, flores, actividad antioxidante, DPPH, FRAP, ABTS.

ABSTRACT

The use of plant species in traditional medicine is once again gaining momentum, which is evidenced by studies of scientific validity that support or discard the therapeutic properties attributed according to popular knowledge. One of the properties most attributed to plant species that is related to the oxidative stress present in a series of degenerative diseases is the antioxidant property, which is why the present study aimed to determine the antioxidant activity of the ethanolic extract of the flowers of the species *Grindelia tarapacana* Phil. “chincaillo” that is used for various applications in the Carhuacucho area in the Llauta district, in the department of Ayacucho. The maceration of the flowers was carried out using 96° ethanol as a solvent and the dry extract obtained was characterized by the parameters of humidity, soluble solids, pH and AOAC ashes; while the antioxidant activity was carried out with the DPPH, FRAP and ABTS methods. A light green extract with a pasty consistency was obtained with an average humidity of 10.94 ± 0.43 g/100g and an average pH of 3.25 ± 0.17 ; with a predominant presence of flavonoid compounds in all fractions of the applied phytochemical screening; also tannins, phenolic acids and triterpenes. The antioxidant activity by mg equivalent a mM by Trolox for the DPPH method was 18.4, by the FRAP method it was 9.22 and by the ABTS method it was 19.26 mg ET/mg respectively; being the most active antioxidant activity by the FRAP method; concluding that the extract has a relative antioxidant capacity.

Keywords: *Grindelia tarapacana*, flowers, antioxidant activity, DPPH, FRAP, ABTS.

I. INTRODUCCION

La utilidad de las plantas medicinales y su empleo para el tratamiento de diversas enfermedades parece contribuir a incrementar el valor de la medicina tradicional, la cual en el tiempo viene adquiriendo mayor aceptación en la población. En la actualidad se ha convertido en el eje principal para la prestación de los servicios de salud en muchos países en desarrollo; es así, que 170 países han comunicado que hacen uso de la medicina tradicional especialmente como una asistencia para las poblaciones de exiguos recursos económicos (1). Nuestro país posee con una gran biodiversidad de plantas medicinales, en reportes de difusión internacional se informa que tenemos el 10% de la flora mundial y de esta, solo una pequeña cantidad o grupo de estas especies han sido investigadas biológica y farmacológicamente. De las 25000 especies de plantas, 1400 son medicinales; las mismas que se encuentran ubicadas en los distintos pisos ecológicos (2,3).

En la actualidad los efectos causados por los radicales libres, en diversas dolencias como el envejecimiento celular y las enfermedades degenerativas están tomando cada día mayor importancia, por lo que muchos investigadores han reorientado su mirada y sus investigaciones a este campo. Los radicales libres son definidos como un grupo de moléculas muy reactivas, relacionadas directamente con diversas patologías que vienen ocasionando en una gran cantidad de personas diferentes enfermedades como las degenerativas, cardiovasculares, así como diversos tipos de cáncer (4). Como consecuencia del efecto de los radicales libres en las moléculas dianas del organismo, se ha tomado gran interés en el estudio de diversos antioxidantes en el campo de la investigación. Los antioxidantes son un grupo de moléculas presentes en diversas especies vegetales y especialmente en frutas, teniendo como principal función inhibir y prevenir el estrés oxidativo; lo cual se presume puede contribuir considerablemente en la prevención de algunas enfermedades (5). Si bien es cierto que muchas especies vegetales se emplean como fuentes de productos antioxidantes, debemos tener en cuenta que muchas veces con el mismo nombre común se hace referentes a diversas especies o que una misma especie se conozca con diferentes nombres de acuerdo con la región donde crece, es el caso de la especie en estudio, que crece en una vasta región con diferencias agroclimáticas diversas y que es usada por diversas poblaciones para múltiples enfermedades. El presente estudio tuvo como objetivo principal determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. conocida popularmente como “Chincaillo”; con el fin de contribuir y potenciar el conocimiento de la medicina popular, buscando que efectuar un aporte o respaldo científico a los usos de esta especie vegetal, así como una alternativa terapéutica natural para la prevención de enfermedades.

1.1 Descripción de la realidad problemática.

Los diversos perjuicios fisiológicos generados por el estrés oxidativo son de gran interés en la actualidad, lo que está motivando o generando una gran cantidad de investigaciones con la finalidad de hallar alternativas que favorezcan la mejora de diversas enfermedades, de esta manera los antioxidantes naturales procedentes de las diversas especies vegetales o plantas tienen mucha importancia para los investigadores.

Una gran parte de la población peruana hace uso de plantas medicinales para tratar diversas enfermedades, conocimiento que viene siendo transmitido a través de generaciones. Existe múltiples estudios sobre las especies del género *Grindelia*, en la cual se reconoce 27 subcategorías o especies (6) muchas de las cuales se les atribuyen múltiples propiedades; sin embargo, la gran mayoría hace referencia principalmente a extractos obtenidos desde sus hojas y tallos, lamentablemente la especie vegetal o planta que estudiamos *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” cuenta con escasas bases científicas o estudios adecuados que permitan confirmar sus acciones farmacológicas atribuidas, muchas de las cuales están relacionadas con la actividad antioxidante; aunque las flores en la medicina tradicional peruana tienen un uso frecuente, estudios de usos exclusivos de las flores que referencien sus propiedades como base científica son escasos, también desconocemos la cantidad o dosis a ingerir; si esta puede ser tóxica o la dosis a la cual podría causar daños a las personas que la ingieran o consuman, por lo que consideramos que esta fue una primera aproximación de todas estas inquietudes desde una base científica - técnica.

Formulación del Problema

Problema General

- ¿Cuál es la capacidad antioxidante del extracto de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”?

Problemas Específicos.

- ¿Qué grupos de componentes químicos presenta el extracto de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”?
- ¿Cuál de los métodos empleados para la determinación de la actividad antioxidante es el más sensible frente al extracto de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”?

1.2 Antecedentes de la Investigación

En la búsqueda y revisión bibliográfica realizada sobre el género *Grindelia*, diversas investigaciones están relacionadas al empleo de extractos de hojas y tallos; sin embargo, no encontramos estudios donde se emplea las flores de la planta:

Internacionales

- Poudel et al (2023), examinaron la composición del aceite esencial de *G. squarrosa* del sur de Idaho empleando métodos de cromatografía de gases, los cuales revelaron que el aceite esencial de *Grindelia squarrosa* var. *serrulata* es rica en monoterpenoides, α -pineno (21,9%), limoneno (17,1%), terpinoleno (10,6%) y borneol (6,5%). La composición del aceite esencial de *G. squarrosa* de Idaho es similar a la reportada previamente a partir de especímenes recolectados en Montana y confirma la fitoquímica volátil de las plantas que crecen en América del Norte. Analizaron la actividad antimicrobiana de los principales componentes del aceite esencial contra patógenos respiratorios y dérmicos. El (-)- β -pineno mostró una fuerte actividad antibacteriana contra *Streptococcus pneumoniae* (CMI 39,1 $\mu\text{g/ml}$) y el (-)-borneol mostró una apreciable actividad contra *Staphylococcus aureus* (CIM 78,1 $\mu\text{g/ml}$) (7).
- Schepetkin et al (2022) en su estudio sobre la actividad inmunomoduladora de los aceites esenciales de la *Grindelia squarrosa* (Pursh) aislaron los aceites esenciales de las flores y hojas, evaluaron la composición química y la actividad inmunomoduladora innata de estos aceites esenciales. El análisis de composición de estos aceites esenciales reveló que los componentes principales eran α -pineno, limoneno, borneol, p-cimen-8-ol, β -pineno, acetato de bornilo, trans-pinocarveol, espatulanol, mirtenol y terpinoleno. Los aceites esenciales de *Grindelia* activaron los neutrófilos humanos, lo que resultó en un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (EC₅₀ = 22,3 $\mu\text{g/mL}$ para GEOFl y 19,4 $\mu\text{g/mL}$ para GEOLv). Dado que estos tratamientos activaron los neutrófilos, también evaluaron si eran capaces de regular negativamente las respuestas de los neutrófilos a la posterior activación del agonista y descubrieron que el tratamiento con aceites esenciales de *Grindelia* inhibía la activación de estas células por el agonista del receptor 1 del péptido N-formilo (FPR1) fMLF y el agonista de FPR2 WKYMVM. Por lo tanto, identificaron el (-)-borneol como un nuevo modulador de la función de los neutrófilos humanos (8).
- Albani et. al. (2022), realizaron un estudio con el objetivo de evaluar *in vitro* la eficacia antiparasitaria de extractos de cuatro especies de Astaraceae, entre ellas *Grindelia chiloensis* y *Grindelia pulchella* a 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre *Echinococcus granulosus* ss, estos

causaron una disminución en la viabilidad de los protoscolecés, que producen la equinococosis quística, la cual es una enfermedad zoonótica que tiene una distribución mundial y que causa infecciones de larga duración en animales y humanos (9).

- Murguis et. al. (2021), en su trabajo “Remedios naturales para la tos aguda posviral en niños”, demostraron que son escasos los estudios, que efectuaron una adecuada investigación de la efectividad real y la seguridad de los productos elaborados a partir de especies naturales para el tratamiento de la tos aguda. Existen algunas pruebas, basadas en ensayos controlados aleatorios pediátricos, sobre efecto de la miel, de un producto multicomponente (que contiene *Grindelia robusta*, *Plantago lanceolata*, *Helichrysum italicum* y miel) y un producto a base de *Pelargonium sidoides*. En este trabajo concluyeron que urge la realización de estudios rigurosos para confirmar la eficacia y seguridad de los productos naturales que se emplean para el alivio de la tos aguda posviral; padecimiento frecuente en la infancia y la adolescencia. Además, demostraron que existía un creciente interés por el uso de productos naturales para la tos posviral a base de hierbas que podrían utilizarse satisfactoriamente para este problema (10).
- Gierlikowska B y et. al (2021) estudiaron la capacidad del extracto de *Grindelia squarrosa* y el ácido grindélico en la modulación de las funciones proinflamatorias del epitelio respiratorio y de los macrófagos humanos, concluyendo que los resultados de su investigación apoyan el uso tradicional de los preparados que se hacen en base a *Grindelia squarrosa* para el tratamiento de la sintomatología de enfermedades asociadas al resfrío; revelando que los efectos biológicos atribuidos al extracto sería el resultado de la interacción sinérgica de todas las sustancias que se encuentran presentes en el extracto (11).
- Gierlikowska B et al. (2020) efectuaron un estudio para determinar los compuestos presentes en “*Inula helenium* y *Grindelia squarrosa* con actividad antiinflamatoria en neutrófilos humanos y epitelio respiratorio humano cultivado, llegando a la conclusión que las especies *Inula helenium* y *Grindelia squarrosa*, empleadas por la medicina tradicional en Europa como plantas medicinales, son una fuente valiosa de compuestos activos con capacidad antiinflamatoria. Los autores manifestaron que los resultados de sus estudios respaldan científicamente el uso tradicional de estas dos especies para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en las vías respiratorias superiores (12).

- Veres Katalin et al. (2014) determinaron la composición química de los aceites esenciales de *Grindelia squarrosa* y *Grindelia. hirsutula*”, la identificación de los constituyentes de los aceites se realizó por cromatografía de gases mediante sus índices de retención y la comparación en las bases de datos informáticas de espectrofotometría de masas (MS) de la literatura y sus resultados obtenidos. Se identificaron cincuenta y seis constituyentes que representan el 72,1 - 81,3% de los aceites. Encontraron que los aceites contenían a-pineno, beta-pineno, acetato de bornilo limoneno, borneol, y germacreno D como componentes principales. Los aceites de las dos especies mostraron en la composición química pequeñas diferencias. Se detectaron mentol, mentona y pulegona solo en el aceite esencial de *G. hirsutula* (13).
- Nowak y Rychlinska (2012). Aplicaron los métodos de cromatografía en capa fina bidimensional y cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa para determinar cualitativamente los ácidos fenólicos libres y los liberados por hidrólisis ácida y alcalina en las flores y hojas de *Grindelia robusta* y *Grindelia squarrosa*. Se determinaron la presencia de once ácidos fenólicos, a saber: cafeico, clorogénico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico, ferúlico, gálico, protocatequico, vainílico, salicílico, p-hidroxifenilacético y elágico. La estimación cuantitativa de los ácidos fenólicos totales, expresados como ácido cafeico, se analizó mediante el método descrito en la Farmacopea Polaca VIII. El contenido de ácidos fenólicos en *G. robusta* alcanzó 7,33 mg/g y 6,23 mg/g para flores y hojas, respectivamente. Las flores y hojas de *G. squarrosa* se caracterizaron por niveles similares de ácidos fenólicos, concretamente 6,81 mg/g y 6,59 mg/g, respectivamente (14).

Nacional

- Jayo P . (2015). estudio los efectos antitumorales de las raíces de la especie *Grindelia Tarapacana* proveniente de la zona andina de Huaytará, obtuvo extractos de raíz con etanol a 96°, identificando metabolitos secundarios como: grupos fenólicos libres, flavonoides, esteroides y/o triterpenoides, alcaloides y catequinas. La actividad citotóxica se comprobó sobre *Artemia salina* y en embriones de erizo de mar; y la citostática por el ensayo de inhibición de germinación de semillas de lechuga y tomate. El extracto etanólico de raíz mostró una CL50 de 112.1 o ppm (fracción D) en el bioensayo de *Artemia salina* en el bioensayo de inhibición de germinación en semillas de tomate y lechuga con 25% y 36% de inhibición (fracción A), respectivamente. En el bioensayo de citotoxicidad frente a embriones de erizo de mar las 5 fracciones resultaron

activas. Por tanto, concluye que el extracto etanólico de raíz de *Grindelia tarapacana* posee actividad citotóxica y citostática (15).

- Choque YD. (2020). evaluó el efecto de un relave minero al 10% con distintas interacciones de lombricompost-rizobacterias-EDTA en el proceso de la fitoextracción de metales pesados y la correspondencia con el crecimiento, concentración de metales pesados y el contenido de pigmentos fotosintéticos en los órganos de *Grindelia tarapacana* Phil. Los valores obtenidos reflejaron que la aplicación de las diferentes interacciones lombricompost-rizobacterias-EDTA establecieron que la especie *G. tarapacana* es fitoestabilizadora para Cd, Cr, Cu, Ni, y Pb, y fitoextractora para Zn (16).

1.3 Justificación e Importancia.

En las diferentes bases de datos hemos encontrado que a muchas especies del género *Grindelia* (*Grindelia robusta* Nutt.; *Grindelia squarrosa* Duna; *Grindelia humilis* Hook. et Arn.; *Grindelia camporum* Greene) se les atribuyen múltiples propiedades como antibacterianas, fúngicas, antiinflamatorias entre otras con cierta evidencia científica que respalda el uso tradicional; asimismo, el uso de las flores para indicaciones terapéuticas como tos productiva, catarro del tracto respiratorio superior (13,14) pero sobre las propiedades terapéuticas que se les atribuyen a las partes aéreas de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”; la información científica-técnica encontrada fue nula, y considerando que los metabolitos secundarios son sintetizados selectivamente por ciertos géneros y especies, despertó el interés de investigar la presencia de los grupos de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante del extracto etanólico de las flores de esta especie vegetal (que en la zona de recolección se le emplea males respiratorios, cicatrizante y anticancerígena), como base que ayude a respaldar el uso de esta especie vegetal en la medicina tradicional, fortaleciendo las bases científicas que justifiquen su uso.

En la actualidad se difunde los grandes beneficios que los antioxidantes de origen natural brindan a las personas, existe una cuantiosa variedad de estudios a través de los cuales se afirma que los alimentos con un alto contenido de antioxidantes son considerados alimentos funcionales ya que ayudan a controlar los radicales libres o el estrés oxidativo de las células de los organismos, y como la presencia de estos radicales están asociados a múltiples enfermedades, lo que nos motivó a la presente investigación (14).

La importancia está respaldada desde el punto científico, por el conocimiento de la actividad antioxidante obtenida a través diversos métodos que se empleó en la presente investigación considerando los mecanismos que rigen dicha actividad, y desde el punto de vista geográfico y agronómico nos permite acceder a la composición de los metabolitos de esta especie que

crece en una zona árida alto andina de la cual no se tiene referencia alguna.

1.4 Objetivos de la Investigación.

Objetivo General

- Evaluar la capacidad antioxidante en el extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”.

Objetivo Específico

- Determinar los posibles grupos de componentes químicos presentes en el extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil “Chincaillo” por los métodos de ABTS, DPPH y FRAP.
- Identificar el método antioxidante que presenta mayor actividad en el extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil “Chincaillo”.

1.5 Marco Teórico

1.5.1 Genero Grindelia.

Grindelia se encuentra entre los grupos de especies compuestas por aproximadamente 75 especies de arbustos, hierbas anuales, bienales y perennes, más desafiantes desde el punto de vista taxonómico. El género en su conjunto tiene una distribución anfitropical, con aproximadamente la mitad de las especies nativas de América del Norte y México y el resto nativa de América del Sur, el género no ocurre en Centro América . *Grindelia* en su conjunto está bien sustentada y está compuesta por dos clados hermanos, uno nativo de América del Sur y el otro nativo de América del Norte, incluido México. Los taxones sudamericanos tienen hábitos mucho más diversos que los taxones norteamericanos. Los taxones de América del Norte constituyen dos clados que se encuentran en gran medida en lados diferentes de la División Continental; la mayoría de las especies están bien adaptadas a regiones donde las precipitaciones anuales son de 25cm o menos (17).

Grindelia tarapacana Phil. “Chincaillo”.

Es una especie de la familia Asteraceae, nativa de Perú y norte Chile, fue descrita por primera vez en el año 1891, en los anales del Museo Nacional de Santiago de Chile (18).

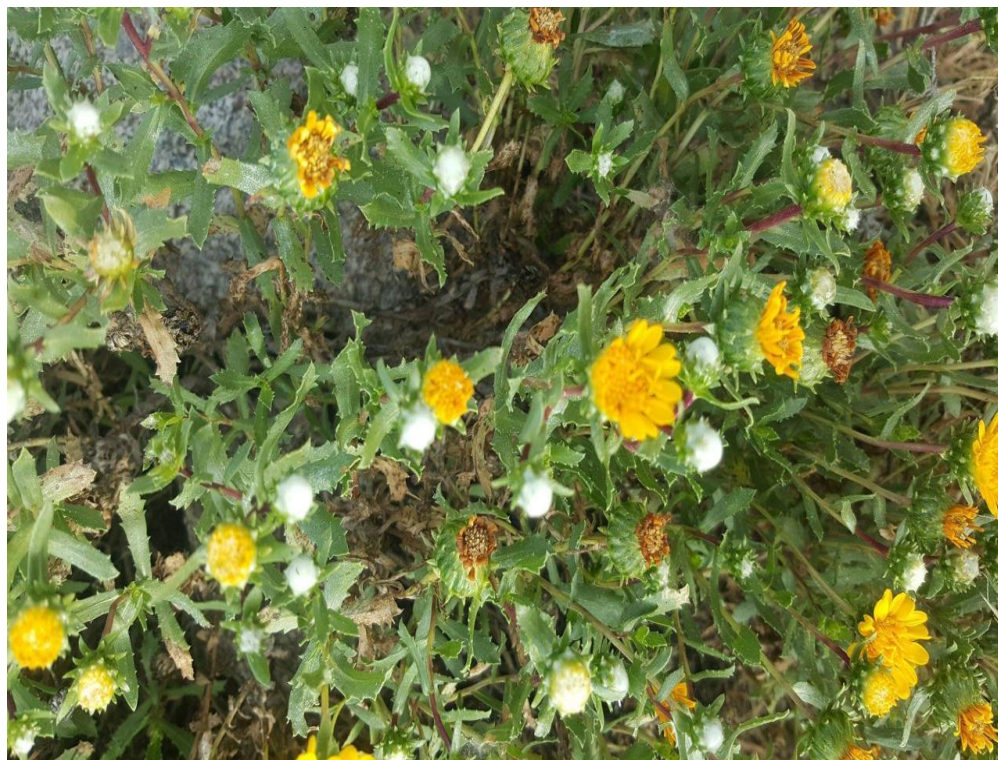


Figura 1. Flor de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. "Chincaillo".

Descripción de *Grindelia tarapacana* Phil. "Chincaillo".

Es una especie de característica arbusto resinoso, perenne, bajo que crece hasta 0.5 m de altura, ramas glabras, tallos pegajosos y brillantes, de hojas de hasta 3 cm de largo, aovadas, crespas, de margen aserrados, glabulosas, coriáceas, de flores centrales tubulosas y las exteriores liguladas de color amarillo intenso, con capítulos radiados, solitarios y menores a 2,5 cm, filarias externas lineales, ensanchadas en la base, reflexas y recubiertas por glándulas sésiles, el fruto es aquenios prismáticos (19,20).



Figura 2. Hojas y unidades floridas de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”.

Fuente: <https://ecuador.inaturalist.org/photos/195833808>

Distribución de la especie

El género *Grindelia*, es propio del continente americano, se encuentra distribuida desde el norte hasta el sur; en países como los Estados Unidos, México, Perú, Bolivia, Chile y Argentina, tiene 161 especies descritas y de estas solo 61 son aceptadas (8). La especie *Grindelia tarapacana* es endémica del Perú y el desierto septentrional chileno, habita hasta los 2500 y 3500 msnm, es característica de zonas templadas y templado cálidas de América.



Figura 3. Zona de distribución de la especie a nivel de Sudamérica

Fuente: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:113638-2>

Taxonomía:

Según diversas, fuentes revisadas declaran la siguiente taxonomía:

Reino: Plantae

Phylum: Streptophyta

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Grindelia* Willd.

Especie: *Grindelia tarapacana* Phil.

Variedad: *Grindelia tarapacana* var. *tarapacana*

Nombre común. En Perú: chiri-chiri, escobita, Chincaillo. En Chile Keñakeña, chinchillawa, bailahuén.

Para el presente estudio una especie completa fue enviada al Museo de Historia Natural de la Universidad Mayor de San Marcos en la ciudad de Lima (ver anexo).

Usos de la especie

Gracias a la sabiduría y conocimientos ancestrales que se han transferidos de generaciones se conoce que varias especies del género *Grindelia* son usadas dentro de la medicina tradicional. En medicina tradicional se emplea en casos de asma, bronquitis, tos, catarros y en general en afecciones de vías respiratorias superiores; también como antiinflamatoria, diurética y por vía tópica en afecciones de la piel como irritaciones y quemaduras. Los pobladores nativos americanos utilizaban algunas especies en problemas respiratorios y de la piel, entre otras cosas para la alergia ocasionada por la llamada hiedra venenosa (*Toxicodendron radicans*) (21).

La experimentación *in vitro*, algunos *in vivo* ha permitido demostrar su efecto antibacteriano y antifúngico; así como, antioxidante, antiinflamatorio y antiespasmódico. Aunque no se ha encontrado prácticamente ningún ensayo clínico (21).

1.5.2 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad de una enzima o un compuesto para disminuir la producción de oxidantes o especies reactivas. Los biomarcadores de OS y su posible generación cuantitativa son herramientas importantes en la estimación tanto del estado de la enfermedad como de los efectos de los antioxidantes en la salud de los seres humanos. Durante la última década, se han desarrollado varios métodos cuantitativos para medir el exceso de oxidantes y la señalización redox. Se han propuesto varios biomarcadores de OS como estándar. Además, se debe tener en cuenta que no existe un método generalmente aceptado para cuantificar las moléculas antioxidantes en presencia de otros compuestos que interfieren, y este posible inconveniente limita la eficacia de los ensayos de antioxidantes (8). Desafortunadamente, ninguno de los biomarcadores de OS refleja los productos de oxidación de todas las moléculas biológicas (p. ej., lípidos, proteínas y ácidos nucleicos).

Homeostasis redox.- Existen evidencias que destaca que la homeostasis redox es inherente del metabolismo celular y, para todo el cuerpo: la variación puede alterar prácticamente todos los procesos biológicos (metabolismo, proliferación celular, diferenciación, senescencia celular y autofagia). Varios procesos metabólicos en humanos (p. ej., respiración, digestión, metabolismo xenobiótico y biosíntesis hormonal) pueden producir oxidantes a través de señales redox (22). Es importante recalcar que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son una expresión genérica para una gran familia de oxidantes procedentes del oxígeno molecular. Esta producción funcional de oxidantes es inactivada normalmente por las defensas antioxidantes, compensando así la homeostasis redox y protegiendo contra daños (22). Si estas defensas antioxidantes son insuficientes o la señalización redox se altera, entonces los oxidantes pueden dañar el organismo; por ejemplo, los oxidantes pueden destruir la membrana celular y bloquear la acción de las principales enzimas y procesos, un fenómeno también conocido como malestar. Si bien esta situación parece paradójica, es importante comprender que los oxidantes implicados como mensajeros fisiológicos en la señalización redox (p. ej., peróxido de hidrógeno (H_2O_2)) y los oxidantes responsables de la oxidación perjudicial de biomoléculas (p. ej., el radical hidroxilo ($\bullet OH$)) no son lo mismo (22).

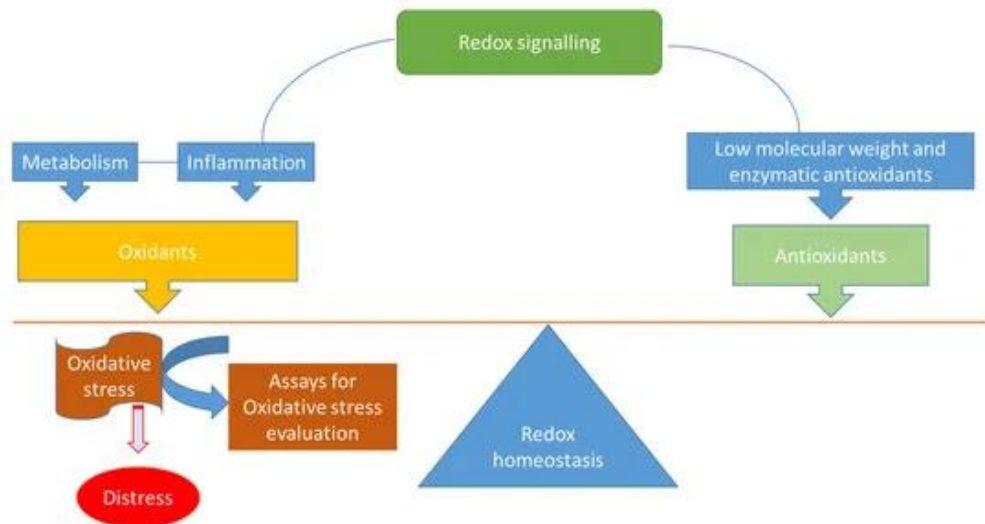


Figure 4. Redox homeostasis: the role of oxidants/antioxidants

Fuente: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/13/10978>

1.5.3 Radicales libres (oxidantes)

Son compuestos reactivos que contienen oxígeno que pueden desempeñar varias funciones beneficiosas o perjudiciales en un organismo. Los principales compuestos oxidantes son el radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el radical oxidrilo ($\bullet\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), todos los cuales se originan de la reducción del oxígeno molecular. Por lo que, estas moléculas se forman constantemente como subproductos metabólicos en los sistemas biológicos.

Los radicales libres se forman discretamente durante la actividad física moderada y se aumentan durante la actividad física vigorosa (10-12). La fructosa es un hidrato de carbono que se metaboliza especialmente en el hígado y, debido a que carece de un conveniente proceso de regulación metabólica, despliega una elevada presión de electrones a nivel mitocondrial, incrementando la generación de radicales libres. Este efecto se halla estrechamente vinculado con ciertas patologías como: obesidad, diabetes mellitus, hipertensión arterial, etc. (23)

Debemos indicar que se requieren bajas concentraciones de oxidantes para una gran diversidad de procesos celulares, incluyendo la homeostasis, la señalización celular, la apoptosis y la defensa contra patógenos, entre otros. Este tipo de estrés celular, que mantiene la homeostasis protegiendo contra daños, se conoce como eustrés. Los oxidantes intracelulares ambientales (como, H_2O_2) pueden normar varias vías de transducción de señales oxidando reversiblemente restos de cisteína en diversas proteínas, armonizando así sus actividades. Estas proteínas, denominadas "interruptores redox", incluyen quinasas, proteínas fosfatasa y factores de transcripción que ayudan a regular diversas

vías metabólicas (13, 14). Además, en condiciones fisiológicas, la defensa contra los efectos nocivos de los oxidantes se consigue manteniendo un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Por tanto, los mecanismos de defensa que mantienen la homeostasis redox pueden compensar el daño inducido por oxidantes (14). Exceder la ingesta de antioxidantes puede desarrollar un aumento del “estrés antioxidante”, ya que disminuye los radicales con un papel fisiológico beneficioso (14).

Tabla 1.

PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXÍGENO (ROS) Y DEL NITRÓGENO (RNS)			
RADICALES LIBRES		ESPECIES REACTIVAS NO-RADICALES	
SUPERÓXIDO	$O_2^{\cdot-}$	PERÓXIDO HIDRÓGENO	H_2O_2
HIDROXILO	HO^{\cdot}	HIDROPERÓXIDOS	$ROOH$
ALCOXI	RO^{\cdot}	HIPOCLORITO	$ClO^{\cdot-}$
PEROXI	ROO^{\cdot}	OXÍGENO SINGLETE	1O_2
CARBONATO	$CO_3^{\cdot-}$	OZONO	O_3
OXIDO NÍTRICO	NO^{\cdot}	PEROXINITRITO	$ONOO^{\cdot-}$
DIOXIDO NÍTRICO	NO_2^{\cdot}		NO^{\cdot} $O_2^{\cdot-}$

Fuente: <https://portalantioxidantes.com/antioxidantes/>

1.5.4 Sistema antioxidante

El ser humano dispone de un sistema antioxidante constituido por sustancias que sintetiza y por los compuestos antioxidantes que ingiere con su dieta (Figura 4); en este sentido, podríamos denominar antioxidante endógeno a aquellos compuestos que son sintetizados por la célula y antioxidante exógeno a aquellas sustancias que se incorporan con la alimentación.

Antioxidante.- Un antioxidante puede ser definido, como cualquier sustancia o molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (mediante pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas o sustratos biológicos entendiendo como sustratos a lípidos, proteínas,

hidratos de carbono o ácidos nucleicos. La oxidación de tales sustratos puede ser iniciada por dos tipos de especies reactivas:

- 1) los radicales libres,
 - 2) aquellas especies que sin ser radicales libres, denominadas pro-oxidantes, son adecuadamente reactivas para provocar la oxidación de los sustratos antes mencionados.
- De forma general, los radicales libres y los pro-oxidantes constituyen lo que ordinariamente llamamos ROS. En un escenario biológico, la definición de antioxidante se refiere a una molécula capaz de reaccionar con los radicales libres inactivándolos o bloqueándolos, saneando y evitando el deterioro ocasionado por la oxidación acumulada (16).

Tabla 2. Tipos de antioxidantes

Antioxidantes enzimáticos	Ubicación celular	Propiedades antioxidantes
Mn superóxido dismutasa	Mitocondria	Dismuta radicales peróxido
Cu-Zn superóxido dismutasa	Citosol	Dismuta radicales superóxido
GSH peroxidasa	Citosol y mitocondria	Remueve H ₂ O ₂ y hidroperóxidos orgánicos
Catalasa	Citosol y mitocondria	Remueve H ₂ O ₂
Antioxidantes no enzimáticos		
Vitamina E	Compuestos fenólicos solubles en lípidos; localizada en membranas.	Principal antioxidante que disrumpe la cadena de peroxidación lipídica.
Vitamina C (ácido ascórbico)	Soluble en agua; localizada en citosol.	Neutraliza una amplia variedad de ROS en fase acuosa; regenera vitamina E.
GSH	Citosol y mitocondria.	
Acido lipoico	Tiol endógeno; localizado tanto en la fase acuosa como en la lipídica	Interviene en el reciclado de vitamina C; puede ser buen sustituto de GSH.
Ubiquinonas	Derivados de quinona soluble en lípidos; localizadas en membrana.	Las formas reducidas son antioxidantes eficientes.
Carotenoides	Soluble en lípidos; localizados principalmente en membranas.	Antioxidantes; reducen la peroxidación lipídica.

Fuente: <https://www.efdeportes.com/efd66/oxid.htm>

Antioxidantes exógenos.- Este grupo se consideran a los compuestos polifenoles, carotenoides, algunas vitaminas, elementos traza, etc. Los polifenoles son sustancias orgánicas caracterizadas por presentar anillos aromáticos con uno o varios grupos fenólicos, y se les encuentra de forma natural en las especies vegetales; su consumo en la dieta está estrechamente relacionado con la prevención de algunas enfermedades crónicas no transmisibles como: cáncer, aterosclerosis, diabetes mellitus, obesidad, hipertensión arterial, psoriasis, entre otras. Se han identificado más de ocho mil compuestos polifenoles, pudiéndose diferenciar químicamente en este grupo a moléculas simples como los ácidos fenólicos, grupo derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico; así mismo, diferenciar

polifenoles con estructuras ligeramente diferentes como los estilbenos, lignanos y flavonoides (26).



Figura 5. Antioxidantes presentes en alimentos

Fuentes: <https://www.botanical-online.com/dietas/antioxidantes-naturales-propiedades-tipos>

Antioxidantes end3genos.- Para neutralizar el efecto perjudicial de los radicales libres, los organismos aerobios poseen sistemas de defensa antioxidante, que est3n constituidos por mol3culas, enzimas y secuestradores qu3micos que previenen el deterioro oxidativo. Las enzimas antioxidantes constituyen la primera l3nea de defensa a nivel celular frente al da3o oxidativo, las cuales descartan el O_2^- y el H_2O_2 . Asociado a 3stas, coexiste una segunda l3nea de defensa constituidas por mol3culas no enzim3ticas que intervienen sobre los radicales libres (24).

Los antioxidantes se pueden clasificar seg3n su naturaleza qu3mica y su modo de acci3n:

- Enzimas. Intervienen espec3ficamente sobre las especies reactivas de ox3geno, transform3ndolas a mol3culas menos da3inas a trav3s de mecanismos bioqu3micos espec3ficos. El proceso se inicia con la dismutaci3n del O_2^- hacia H_2O_2 por acci3n de la enzima super3xido dismutasa (SOD); subsiguientemente, la enzima catalasa (CAT) y la glutati3n peroxidasa (GPx) accionan convirtiendo el H_2O_2 hasta H_2O . La acci3n de estas enzimas debe mantenerse en equilibrio para conservar el equilibrio REDOX intracelular.
- Antioxidantes preventivos. Son mol3culas destinadas a secuestrar a los iniciadores del proceso oxidativo, como Fe y Cu, los cuales activan la formaci3n de especies reactivas de ox3geno. Como ejemplos tenemos las glicoprote3nas que se acoplan al Fe transport3ndolo

en el torrente sanguíneo mediante la transferrina y lactoferrina, para su acumulación intracelularmente por la ferritina. Así mismo, la ceruloplasmina se une a los iones de Cu^+ frenando la formación de radicales libres a partir de peróxidos. En el plasma el Cu^+ no enlazado a la ceruloplasmina está unido a la albúmina, aunque ésta no impide su interacción con H_2O_2 para constituir el radical hidroxilo (26,27).

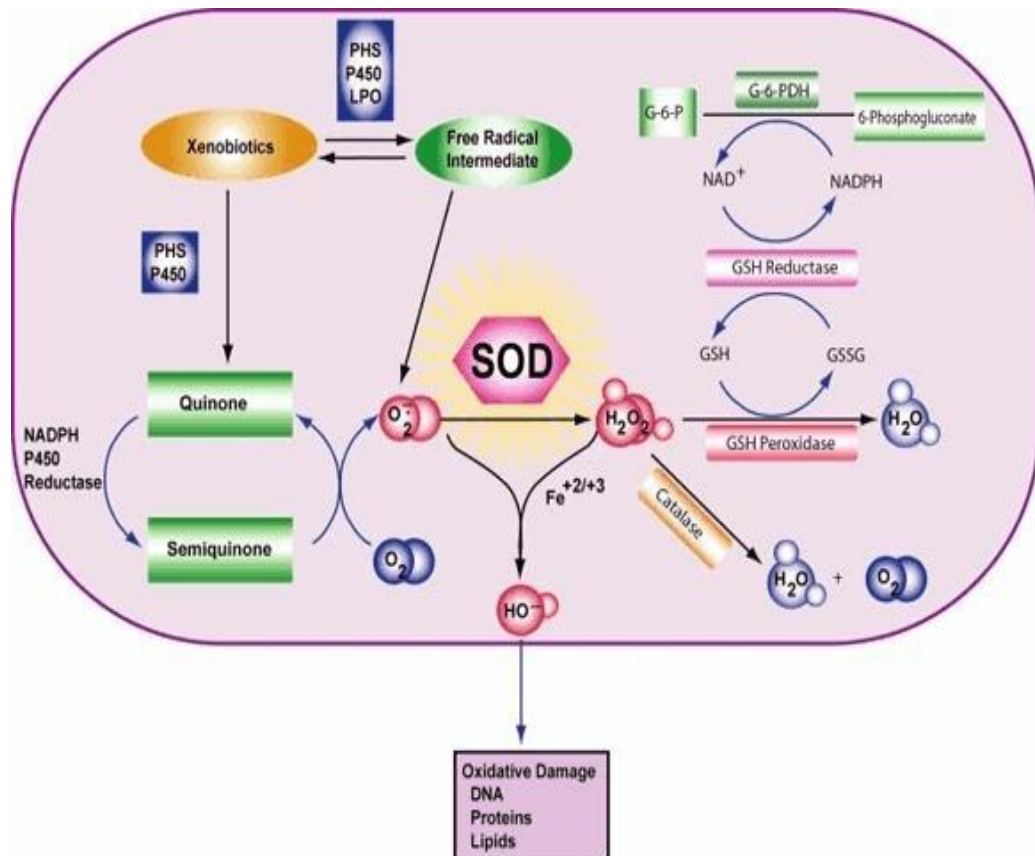


Figura 6. Acción de antioxidantes endógenos frente a radicales libres

Fuente: <https://www.clinicabetancourt.es/come-para-vivir-100-anos/>

Mecanismos de acción de los antioxidantes

Un compuesto que reduce los radicales in vitro no necesariamente se comporta como un antioxidante en un sistema in vivo. Esto se debe a que los radicales libres se difunden y propagan fácilmente. Algunos tienen vidas extremadamente cortas, del orden de nanosegundos, por lo que es difícil que el antioxidante esté presente en el momento y lugar donde se está generando el daño oxidativo. Además, las reacciones entre los antioxidantes y los radicales libres son reacciones de segundo orden. Por tanto, no sólo dependen de la concentración de antioxidantes y radicales libres, sino que también dependen de factores relacionados con la estructura química de ambos reactivos, el medio y las condiciones de reacción (28).

Los compuestos antioxidantes actúan a través de varios mecanismos químicos: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), transferencia de un electrón simple (SET) y la capacidad de quelar metales de transición. La importancia de los mecanismos antioxidantes radica en comprender el significado biológico de los antioxidantes, sus posibles usos, su producción por síntesis orgánica o métodos biotecnológicos, o para la estandarización de la determinación de la actividad antioxidante. En general, las moléculas antioxidantes pueden reaccionar mediante múltiples mecanismos o mediante un mecanismo predominante. La estructura química de la sustancia antioxidante permite comprender el mecanismo de reacción antioxidante. (28).

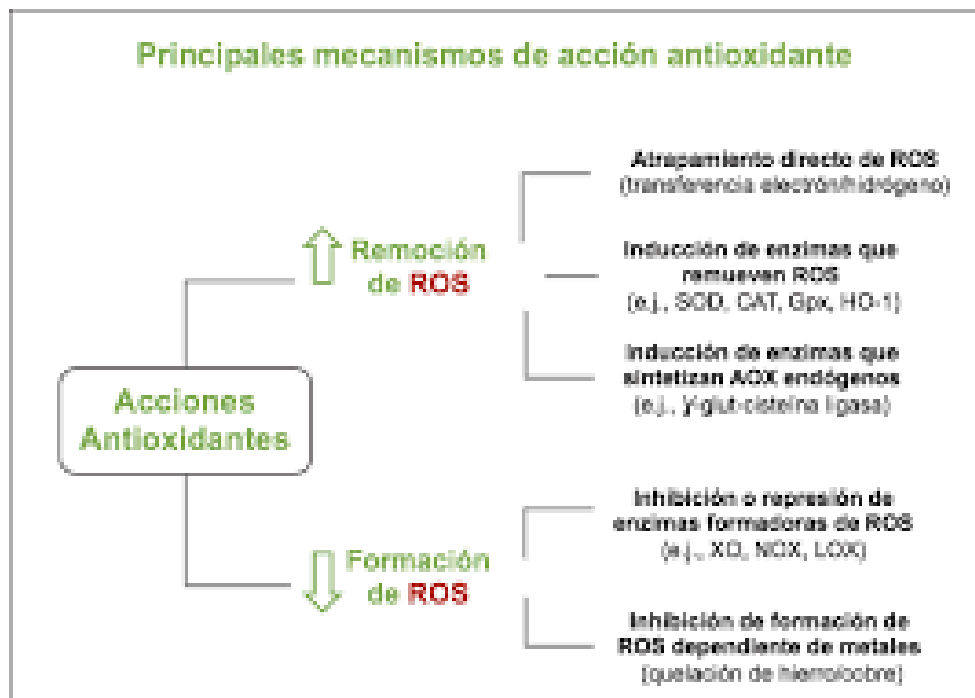


Figura 7. Principales mecanismos de acción de antioxidantes

Fuente: <https://portalantioxidantes.com/antioxidantes/>

Métodos de Determinación de actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de un compuesto se puede evaluar in vitro o in vivo mediante experimentos sencillos, y al mismo tiempo se puede evaluar el posible efecto prooxidante sobre diferentes moléculas. La actividad antioxidante no se puede medir directamente, sino que está determinada por los efectos del antioxidante para controlar el grado de oxidación. Existe una variedad de métodos para evaluar la actividad antioxidante. Algunos métodos implican un paso de oxidación diferente seguido de la medición de la respuesta, que depende del método utilizado para evaluar la actividad (29).

Hasta el momento no existe un método mundialmente aceptado para la determinación de la capacidad antioxidante por la complejidad que implican los sistemas, multiplicidad de las matrices y circunstancias diversas en las cuales se desarrollan las metodologías aplicadas. Existen métodos directos e indirectos para establecer la capacidad antioxidante de una sustancia o compuesto, aunque también se pueden clasificar por el mecanismo mediante el cual acontece el proceso antioxidante. Los métodos indirectos experimentan la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre, asimismo se considera que estos métodos pueden medir la capacidad de donación de hidrógenos. Por otro lado, los métodos directos se establecen en el efecto del antioxidante sobre inhibición de una etapa del proceso de degradación oxidativa de un sistema (26, 27).

En la medición de las propiedades antioxidantes en extractos derivados de plantas se debería emplear métodos adecuados que aborden el mecanismo y la cinética de las reacciones que comprenden a los antioxidantes, más adelante mencionamos una selección de métodos de pruebas químicas que se emplean para investigar tanto moléculas puras como extractos crudos. También se aborda la influencia del medio de reacción en el rendimiento de los antioxidantes.

Así pues, los antioxidantes pueden desactivar los radicales libres utilizando de preferencia dos mecanismos, uno va basado en la transferencia de átomos de hidrogeno (HAT), los cuales calculan la capacidad para estabilizar un radical libre, aquí se ubica el método DPPH; el otro es el mecanismo basado en la transferencia de electrones simples (SET), aquí se ubican los métodos FRAP y ABTS (ABTS involucra ambos mecanismo pero priorizando el SET), estos métodos establecen la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto (30).

Tabla 3. Métodos químicos para la determinación de la actividad antioxidante

Bioassay	Reagents Involved in the Reaction	Detection	Method
DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay	Free radical (DPPH [•])	Decrease of Abs. at 515 nm	Spectrophotometric or colorimetric
ORAC Assay (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	2,2'-azobis(2-amidopropane) dihydrochloride (AAPH) to produce free radical β-phycoerythrin or Fluorescein or Pyrogallol red	Decrease of fluorescence	Fluorescence spectroscopy
TRAP assay (total peroxyl radical trapping antioxidant parameter)	2,2'-azobis(2-amidopropane) hydrochloride (ABAP) to produce free radical Luminol	Decrease of luminescence	Chemiluminescence
FCT (ferric thiocyanate) assay	Ferrous chloride, formation of red ferric thiocyanate	Increase of Abs. at 500 nm	Spectrophotometric
FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay	FeCl ₃ ·6H ₂ O, formation of blue ferrous complexes	Increase of Abs. at 593 nm	Colorimetric
CUPRAC, Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity	Cupric neocuproine, formation of Cu(I)-neocuproine	Increase of Abs. at 550 nm	Spectrophotometric
ABTS [2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diamonium salt] assay	Free radical (ABTS ^{•+})	Decrease of Abs. at 415 nm	Colorimetric
Methods of inhibited autoxidation	Lipid molecules, azoinitiator	O ₂ consumption/hydroperoxide formation	Oxygen electrode, pressure gauge, detection of conjugated dienes

Note: Abs, absorbance.

Fuente: Tena et al 2020 (31)

II. ESTRATEGIA METODOLOGICA

2.1 Tipo, Nivel y Diseño de la Investigación

2.1.1 Tipo de Investigación:

Una investigación del tipo básica que ha permitido adquirir información sobre la presencia de los metabolitos secundarios y actividad antioxidante del extracto etanólico obtenido por maceración de esta parte concreta de esta especie vegetal.

2.1.2 Nivel de Investigación:

Investigación descriptiva – transversal considerando que se intenta describir y explicar la relación existente entre los metabolitos secundarios determinados en el screening con los resultados de la actividad antioxidante determinada .

2.1.3 Diseño de Investigación:

Analítico-experimental. fundamentado en la recopilación de datos obtenidos de una serie de reacciones químicas de naturaleza analítica para determinar la presencia de ciertos metabolitos secundarios y la experimentación analítica cuantitativa que permitió la determinación de la actividad antioxidante por diversos métodos.

2.2 Lugar de Investigación:

Laboratorio de química general y laboratorio de análisis instrumental del departamento de Ciencias Químicas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

2.3 Materiales de Trabajo

2.3.1 Materiales de Laboratorio:

- Matraces
- Fiola
- Probetas
- Beaker

- Espátulas
- varillas agitadoras
- Embudo de decantación
- embudos
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Porta embudo
- Vasos de vidrio
- Soporte universal
- Pinzas metálicas
- Luna de reloj
- Micropipetas
- Pipetas volumétricas 5 ml y 10 ml
- Propipetas
- Viales
- frasco goteros
- Soporte Universal
- Aro de Soporte

2.3.2 Equipos de Laboratorio:

- Estufa
- Mufla
- Balanza Analítica
- Potenciómetro
- Evaporador rotatorio
- Ventilador
- Baño ultrasonido
- Espectrofotómetro UV-Visible

- Agitador magnético

2.3.3 Reactivos

- Agua destilada
- Alcohol 96°
- Alcohol 70°
- Metanol
- Cloroformo
- Diclorometano
- Ácido sulfúrico
- Ácido Clorhídrico
- Ácido acético glacial
- Hidróxido de Amonio 25%
- Tricloruro férrico
- Acetato de sodio
- Ácido nítrico
- 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH)
- 2,4,6- tripiridyl-s-triazida (TPTZ)
- Buffer fosfato
- ABTS
- Trolox
- Persulfato de sodio
- Nihindrina

- Limadura de magnesio
- Reactivo Drangedorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo Wagner
- Anhídrido acético

2.3.4 Otros

- Papel toalla
- Papel aluminio
- Papel de filtro
- Guantes
- Mascarilla
- Papel tisú
- Paños yes
- Plumón marcador

2.4 Hipótesis y Variables.

2.4.1 Hipótesis

a. General:

El extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” presenta una apreciable capacidad antioxidante.

b. Especificas

- Uno de los principales grupos de componentes químicos presente en el extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” son de naturaleza flavonoides.

- El extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” presenta actividad antioxidante por los tres métodos analizados.
- El método ABTS presentará mayor actividad antioxidante en el extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”.

2.4.2 Variables

V. Independiente		
Variable	Indicador	Índice
Extracto etanólico de las flores de <i>Grindelia tarapacana</i> Phil. “Chincaillo”.	Metabolitos secundarios.	Reacciones de coloración y precipitación.
	Parámetros fisicoquímicos.	Sólidos totales, sólidos solubles, pH, cenizas.
V. Dependiente		
Variable	Indicador	Índice
Actividad Antioxidante.	Método DPPH	IC ₅₀
	Método FRAP	TEAC
	Método ABTS	TEAC

2.5 Población y Muestra

2.5.1 Población:

Las flores de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” de la zona de Carhuacucho, distrito de Llauta, provincia de Lucanas en el departamento de Ayacucho

2.5.2 Muestra:

Extracto etanólico obtenido de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”

2.6 Métodos, técnicas y procedimientos para la recolección de datos

2.6.1 Recolección y clasificación de la muestra vegetal

Las flores de *Grindelia tarapacana* fueron recolectadas en la comunidad campesina de Carhuacucho, Distrito de LLauta, Provincia de Lucanas, Región Ayacucho. La recolección se realizó en las primeras horas de la mañana, utilizando una tijera de podar y bolsas de papel Kraft, para posteriormente ser transportadas al laboratorio de química general de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”.

Una porción de planta entera con flores fueron enviada al Museo de Historia Natural de la UNMSM para que se efectuara su clasificación taxonómica.



Figura 8. Zona de recolección de la especie vegetal

2.6.2 Tratamiento de la muestra vegetal

Selección: Después de efectuada la recolección, se procedió a seleccionar de manera general las flores que se encontraban en buen estado, estas se colocaron en bolsas de papel Kraft con la finalidad de evitar el proceso de descomposición.

Limpieza: Se continuo con la limpieza de las flores más detallada, con la finalidad de que no se produzcan interferencias o se provoquen alteraciones posteriores, para esto nos avocamos a eliminar partículas extrañas, residuos de tierra, suciedad u otras materias extrañas.

Secado: El secado se realizó bajo sombra, para que no se produzca ninguna alteración en su composición, se distribuyeron las flores sobre hojas de papel Kraft en las mesas del

laboratorio por un tiempo aproximado de 15 días; dando o efectuando movimientos periódicos para un secado. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a fragmentar y/o cortar las flores.

Conservación: Se almacenaron las flores fragmentadas en bolsas confeccionadas de papel Kraft hasta que se inició el estudio correspondiente.

2.6.3 Obtención del extracto etanólico

Las flores secas y fragmentadas de la especie se utilizaron para el proceso de obtención de un extracto mediante maceración con etanol 96°, tomando 800g y en un envase de vidrio de boca ancha y adicción de 3,5 L de alcohol a 96°, a este macerado se le realizaba una agitación habitualmente entre días por un espacio de 15 días. Por filtración se efectuó la separación del sobrenadante del marco y posterior concentración en un evaporador rotatorio, al marco se le volvió a realizar el mismo proceso, para finalmente unir los filtrados y ser secado en una estufa a una temperatura menor a los cuarenta grados.

2.6.4 Screening Fitoquímico:

En las plantas los metabolitos secundarios están comprendido dentro de los denominados compuestos bioactivos, que son grupos de sustancias de estructuras químicas relacionadas y complejas, cuya distribución está restringida y es característica de fuentes botánicas específicas. En el estudio de muestras vegetales, el screening fitoquímico es la fase inicial o el tamizaje de la investigación fitoquímica, que nos conlleva a la identificación cualitativa de los compuestos o grupos de sustancias químicos principales que se encuentran presentes en los extractos derivados de las plantas o en ellas mismas, lo que nos llevara a una la extracción y/o fraccionamiento específico, para el posterior obtener el compuesto de interés aislado (24, 25).

Obtención de Fracciones

Se efectuó el fraccionamiento respectivo a partir del extracto crudo con solventes de diferentes polaridades. La **fracción A** esta constituida por una pequeña porción del extracto crudo.

La extracción de una porción del extracto crudo con solución de HCl al 1% (2 x 20 mL), y posterior filtración permitió obtener dos fracciones:

Insoluble: la cual se lavó, con agua destilada hasta la neutralidad, disolviéndose posteriormente con 5mL de diclorometano, y eliminando los residuos de agua con sulfato de sodio anhidro, se filtró y este filtrado constituyo **la Fracción B** (25).

Soluble (ácida): este filtrado y se alcalinizo con amoniaco diluido y extrajo con dos porciones de diclorometano (100mL) obteniéndose dos fases:

- **Fase Diclorometánica:** la cual inicialmente se lavó con agua destilada (10 mL), seguidamente se eliminó los residuos de agua con sulfato de sodio anhidro, se filtró obteniéndose **la Fracción C.**
- **Fase Acuosa:** la cual fue saturada con 5g sulfato de sodio anhidro y posteriormente extraída con 100 mL de la mezcla diclorometano-etanol (3:2) en 2 raciones. Obteniéndose dos fases:

Fase Orgánica: (Diclorometano-etanol). A 10 mL de solución se trata con sulfato de sodio anhidro y se lava, reuniendo las porciones acuosas, la fase dicloroetanolica se deshidrato con 1g de sulfato de sodio anhidro. Se filtro constituyendo **la Fracción D.**

Fase Acuosa: todos los residuos acuosos derivados de los lavados de las fases orgánicas se reunieron constituyendo **la Fracción E.**

Por otra parte aisladamente, se mezcló 1g de especie seca y molida con 20 mL de agua destilada se agitó, e hirvió por 15 minutos. Luego fue filtrada en caliente a través de papel filtro y se restituyo a un volumen de 10 mL, se enfrió a temperatura ambiente, constituyendo la **Fracción F.**

En las fracciones aislada se procedió a efectuar las reacciones de coloración o precipitación para identificar los grupos funcionales y/o grupos de metabolitos presentes en el extracto etanólico de la muestra.

Reacciones sobre las fracciones:

FRACCION A

Detección de Taninos:

1. **Reacción de gelatina-Sal.-** En tres tubos de ensayo independientemente se le adiciona 0.5 mL de extracto crudo. Al tubo uno se adiciono 1 mL de NaCl 5%, al segundo tubo se adiciono una solución de gelatina 1% y al tercer tubo una mezcla de las soluciones gelatina – sal, la observación de precipitado en el tubo 3º; y en ambos tubos uno y dos indico la presencia de taninos.
2. **Reacción de Cloruro Férrico.-** Se depositó 0,5 mL de la solución de la fracción A y se agregó unas gotas de la solución acuosa de FeCl₃ 1% . La reacción positiva resulto a la aparición colores azul verdoso intenso.

Detección de Flavonoides

1. **Reacción de Shinoda.-** Se colocó dos gotas de la Fracción A en los pozos de una placa de reacción, adicionando una pequeña porción de limaduras de magnesio y unas 3 gotas de HCl concentrado. El cambio de color indicó que la reacción fue positiva resultando tonos entre color rojo, anaranjado en las diferentes fracciones.

Detección de Aminoácidos

1. **Reacción de Ninhidrina.-** Se prepararon tiras de papel filtro y con una pipeta capilar se pusieron:
 1. Una gota de Fracción A, y una gota de solución de ninhidrina al 2% en acetona.
 2. Blanco: solo solución de ninhidrina al 2%.

Se secaron las tiras a temperatura ambiente, inmediatamente se colocaron en una estufa hasta la aparición de un color marrón en el blanco.

La reacción resultó negativa, pues en el papel de la muestra no presentó un color azul violáceo característico.

FRACCION B

Detección de Triterpenoides y/o Esteroides:

1. **Reacción de Liebermann Burchard:** En un volumen de 1 mL de la fracción se agregó unas 5 gotas de ácido acético, en seguida adiciono 3 mL de la mezcla de los reactivos anhídrido acético/ácido sulfúrico (50:1).
La reacción fue positiva por la aparición del color verde en la fracciones B y C.

Detección de Antraquinonas:

1. **Reacción de Bornträger:** una porción de la fracción B fue diluida en diclorometano, adicionándose 5 mL de NaOH 5% , removiendo suavemente. La no aparición en la fase acuosa de un color rojo fue indicativa de una reacción negativa.

FRACCION C

Detección de Triterpenoides y/o Esteroides:

Se efectuó como lo antes indicado en la fracción B.

Detección de Alcaloides

En 4 tubos de ensayo independientes se colocó 2 mL de Fracción C y 1 mL de HCl 1% e inmediatamente se adiciono lo siguiente:

- ✓ **Blanco:** se toma 2 ml de la fracción como referencia
- ✓ **Dragendorff:** Se añadió 2-4 gotas del reactivo, no observándose la formación de precipitado anaranjado.
- ✓ **Mayer:** Se adiciono 2-4 gotas del reactivo y no se observo la aparición de precipitado blanco característico.
- ✓ **Hager:** Se agrego 2-4 gotas del reactivo, no observándose la aparición de precipitado amarillo.

FRACCION D

Se procedió a secar y luego se agregó 2,5 mL de etanol, se efectuando las siguientes reacciones:

Detección de Flavonoides:

Reacción de Shinoda, de la manera antes indicada

Detección de Leucoantocianidinas y catequinas:

1. **Reacción de Rosenheim:** A 0,2 mL de la fracción D, se agregó 0,1 mL de HCl concentrado, seguidamente se calentó a 100°C, por 10 minutos. Se enfrió, y agregó 2 mL de agua y 0,4 mL de alcohol amílico, agitando suavemente. .

La aparición de color en la fase amílica mostro reacción positiva, la tonalidad de la coloración vario desde el rosado débil hasta carmesí oscuro. Rojo presencia de antocianidinas, marrón presencia de catequinas.

Detección de Cardenólidos:

Se efectúo la reacción de kedde

Detección de Esteroides y/o Triterpenoides:

De acuerdo con la reacción de Liebermann Burchard antes mencionada.

Detección de Alcaloides:

Según las reacciones de Dragendorff, Mayer, Hager antes indicadas .

FRACCIÓN E

Detección de Flavonoides:

De acuerdo con la reacción de Shinoda = positiva.

Detección de Leucoantocianidinas:

Según la reacción de Rosenheim con resultado negativo

FRACCION F

Detección de Saponinas

- 1. Prueba de Espuma.-** En dos tubos de ensayo se colocó 2,5 mL del extracto y se sacudió vigorosamente por espacio un minuto. Se dejó en reposo por 15 minutos, la formación de espuma mayor a 5 mm y duradera por 30 minutos, es indicativo de reacción positiva.

2.6.5 Caracterización Físicoquímica del extracto

Sólidos totales.- AOAC 925.03B

Se pesó en una placa Petri 2 g del extracto con exactitud, la cual se había previamente secado a 130° en la estufa y llevado al desecador para finalmente ser pesada cuando consiguió la temperatura ambiente. La placa con la muestra se colocó en la estufa a 130°C por una hora, seguidamente se enfrió y peso, el residuo se obtuvo como porcentaje de sólidos totales (32).

Sólidos solubles: AOAC 932.12.

Se determinó mediante la preparación de una solución al 10% la que se filtró y unas gotas de esta fue colocada en el prisma del refractómetro midiendo los grados Brix o sólidos solubles directamente en la escala. El equipo, fue previamente calibrado (32).

Cenizas: AOAC 923.03

En un crisol previamente incinerado a la temperatura de tratamiento (550°) y enfriado en un desecador se pesó una cantidad entre 1 a 3 gramos del extracto, luego fue carbonizado en una cocinilla eléctrica y llevado a incineración en la mufla a 550° por un periodo de 6 horas (cenizas grises). Se transfirió a un desecador cuando alcanzó la temperatura ambiente fue pesado. El residuo se reportó como porcentaje de cenizas totales (32).

pH: AOAC 981.12

Se disolvió 1g del extracto en 10 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 25 ml; luego se introdujo el electrodo del equipo se procedió a leer el resultado cuando se estabilizó la lectura. Previamente se calibró el potenciómetro con las soluciones buffers pH 7 y pH 4; (32).

2.6.6 Determinación de la actividad antioxidante

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

La capacidad antioxidante del extracto etanólico se efectuó mediante el método descrito por Brand-Williams et al., con ciertas modificaciones.

Preparación del radical DPPH:

Se preparó el reactivo DPPH, pesando 3,1 mg y disolviéndose en 100 mL de etanol

96 v/v, para garantizar la completa disolución se llevó a baño ultrasonido por 5 minutos y luego se probó a una longitud de onda de 517 nm que la absorbancia estuviera entre 0,9 y 1,

Preparación de la muestra:

A partir de un peso en miligramo del extracto seco se adiciono 5 mL de etanol trasladando al baño ultrasonido hasta completa disolución; a partir de esta, se preparó una serie de diluciones por duplicado. en el rango de concentraciones entre 0,54 a 17,4 mg/mL

Determinación.- En viales numerados se tomó un volumen de 2,9 mL de la solución de DPPH, y se añadió 0,1 mL de cada una de las diluciones elaboradas, se agito y dejo reposar en oscuridad por 30 min. Transcurrido este tiempo, se leyeron las absorbancias de las muestras a 517mM, en el espectrofotómetro de UV/VIS, utilizando como blanco el etanol.

Los resultados se expresaron porcentaje de inhibición de la absorbancia del radical DPPH, que luego nos permitió mediante una curva de correlación determinar el valor IC₅₀, (33, 34).

$$\% \text{ inh.} = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs de la muestra}}{\text{Abs blanco}} \times 100$$

2.6.6.2 Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)

Según lo descrito por Benzie y col, este método se funda en la capacidad antioxidante de compuesto, mediante la reducción del ion férrico (Fe⁺³) dentro del complejo formado por 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) al estado ferroso (Fe⁺²), leído a una longitud de onda de 593nm (27).

El reactivo FRAP se preparó combinando el buffer acetato 300 mM (pH = 3.6), el reactivo TPTZ 10 mM en solución de HCl 40 mM y la solución de tricloruro férrico (FeCl₃ · 6H₂O) 20 mM en agua, en la proporción siguiente 10:1:1 (v:v:v). Para la determinación se tomó 3 mL de este reactivo en una celda y se mide la absorbancia a 593 nm (absorbancia inicial). Luego se agregó 100 µL de cada una de las diluciones preparada del extracto, se mezcló y dejo en reposo por 30 minuto, después de lo cual se vuelve hacer la lectura de absorbancia a 593 nm (absorbancia final), Para obtener la absorbancia residual se restó la absorbancia del blanco o inicial de la absorbancia final.

Los resultados se expresaron en relación al trolox empleado como patrón. Se efectuó una curva de calibración con el patrón en concentraciones de 1.00 - 0.03 mM. Las determinaciones se realizaron por duplicado, para expresar la actividad

antioxidante los resultados se extrapolaron en la curva patrón mediante la ecuación expresando la actividad antioxidante en mili moles de trolox (33, 34).

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

Según el método publicado de Re y col , que se fundamenta en la decoloración del radical $ABTS^{\bullet+}$, al interaccionar con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical, catiónico $ABTS^{\bullet+}$ es colorante que absorbe energía radiante a diversas longitudes de ondas, siendo elegida la de 734 nm. Este radical es formado por oxidación química con persulfato de potasio.

El reactivo fue preparado a una concentración 30 μM , pesando 0.0504g de la sal amónica del reactivo ABTS que se disolvió en 5 ml de agua ultrapura, luego se añadió 6.7 mg de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), se disolvió dejando en agitación un promedio de media hora protegido de la luz directa del sol, luego se enraso a un matraz volumétrico de 10 ml con agua grado HPLC y se dejó incubando protegido de la luz durante 12 a 18 horas. Inmediatamente se preparó la solución de trabajo utilizando 1 ml del radical formado y con aproximadamente 70 ml alcohol, se homogenizo y midió la absorbancia a 734 nm, la cual estuvo en el rango establecido (0.680 ± 0.2).

La determinación se llevó a cabo tomando 2 ml de la solución del radical $ABTS^*$ en una celda, se midió la absorbancia inicial a 734 nm, se agregó 50 μl de cada una de las diluciones independientemente, se agito por 10 segundos en un vortex y se dejó reaccionar por 30 minutos en la oscuridad, para luego medir la absorbancia final. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Se preparo una curva de calibración con el patrón para expresar los resultados como equivalente a este. En este caso el patrón usado fue el trolox (33, 34).

2.7 Técnicas de procesamiento de la información

➤ Recolección de datos analíticos

Se elaboró en los cuadernos de trabajos donde se registraron los resultados obtenidos de las determinaciones de los diversos procesos analíticas empleados en cada caso.

➤ Procesamiento de datos

Se empleo el Programa Microsoft Excel 2013 para procesar los datos obtenidos y se enuncian como resultados de una estadística paramétrica como los promedios y

su desviaciones estándar; así como, transformaciones a los gráficos respectivos.

2.8 Técnicas de Análisis e interpretación de la información

Los datos obtenidos en los diversos procesos de análisis de la determinación de la actividad antioxidante fueron procesados mediante técnicas de análisis paramétricas como: promedio y desviación estándar de cada determinación, y técnicas no paramétricas: coeficiente de correlación que nos permitió hallar IC_{50} o el TEAC según el método aplicado.

2.9 Aspectos éticos

En el presente estudio se ha cuidado los todos principios éticos relevantes que comprenden un trabajo de investigación universitario como un instrumento del saber científico que consigue un avance de la sociedad, previniendo el manejo de todos aquellos aspectos que consiguieran someterse a interés particulares que falseen los objetivos del estudio. Razón por la cual se ha llevado lo más convenientemente posible la referenciación de todos aquellos artículos en los cuales nos hemos apoyado, respetando los correspondientes derechos autor, consciente de ellos asumimos las responsabilidades que de ello provenga.

III. RESULTADOS

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos de caracterización el extracto etanólico de las flores de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”.

Parámetros	Resultados	Unidades
Sólidos totales	89,06 ± 1,38	g/100g
Humedad	10,94 ± 0,43	g/100g
Sólidos solubles	4,2 ± 0,63	° Brix
pH	3,25 ± 0,17	--
Cenizas	1,52 ± 0,23	g/100g
Color	Verde claro	--
Olor	Suigéneris	--
Aspecto	Pasta densa	--

Los valores son promedios de tres repeticiones

Tabla 5. Metabolitos secundarios del extracto etanólico de las flores de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”.

Fracción	Metabolitos	Reacción de Identificación	Resultado
A	Reacción Flavonoide	Shinoda	+
	Taninos	Gelatina	+
	Grupos fenólicos libres	Cloruro férrico	+
	Aminoácidos libres	Ninhidrina	-
	Reacción Esteroides/Triterpenos	Liebermann Burchard	+
B	Flavonoides	Shinoda	+
	Antraquinonas	Borntrager	-
	Reacción Triterpenos/esteroides	Liebermann Burchard	+
C	Lactonas sesquiterpenicas	Kedde	-
	Reacción Alcaloides	Hager	-
		M Mayer	-
		Dragendorff	-
	Reacción Alcaloides	Hager	-
		M Mayer	-
Dragendorff		-	
D	Reacción Flavonoides	Shinoda	+
	Reacción Leucoantocianidinas	Rosenheim	+
	Reacción Triterpenos/esteroides	Liebermann Burchard	+
	Reacción Flavonoides	Shinoda	+
	E	Reacción Saponinas	Espuma

Tabla 6. Lecturas de las disoluciones del trolox como patrón por el método de DPPH

trolox mM	Abs1	Abs2	Prom	% Inh
1	0.219	0,203	0.211	78,4
0,5	0,583	0,575	0,579	40,7
0,25	0,797	0,789	0,793	18,8
0,125	0,900	0,906	0,903	7,48
0,0625	0,950	0,946	0,948	2,87
0,0315	0,968	0,964	0,966	1,02
Blanco	0,976			

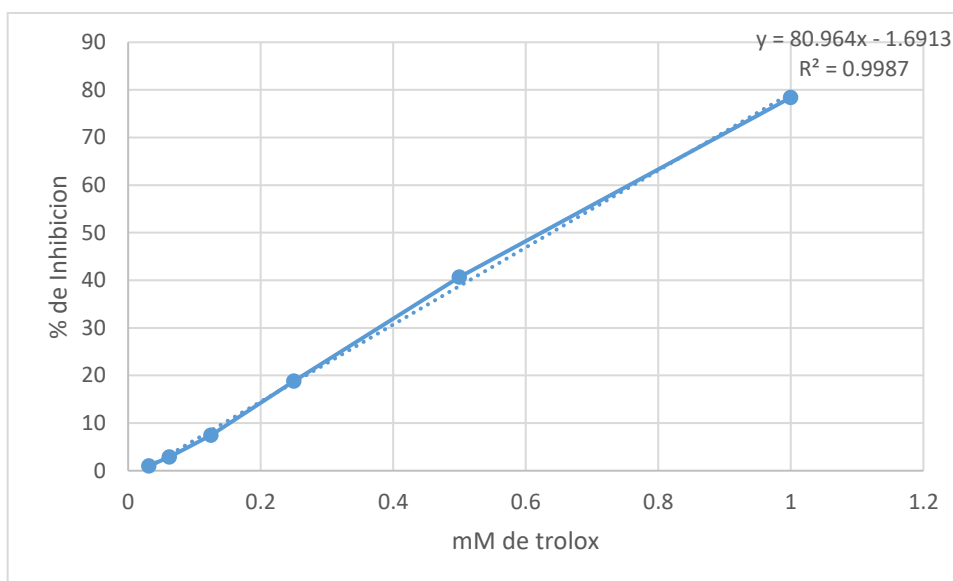


Figura 9. Correlación entre las concentraciones de trolox en mM y % de inhibición del radical DPPH

IC 50= 0,63 mM de trolox

Tabla 7. Determinación de la capacidad antioxidante de las diluciones del extracto etanólico de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” por el método DPPH.

Extracto mg/mL	Abs1	Abs2	Abs Prom	% Inh
17,4	0,261	0,265	0,263	73,1
8,71	0,588	0,576	0,582	40,4
4,36	0,776	0,788	0,782	19,9
2,18	0,875	0,869	0,872	10,7
1,09	0,910	0,930	0,920	5,74
0,54	0,952	0,955	0,954	2,25
Blanco	0,976			

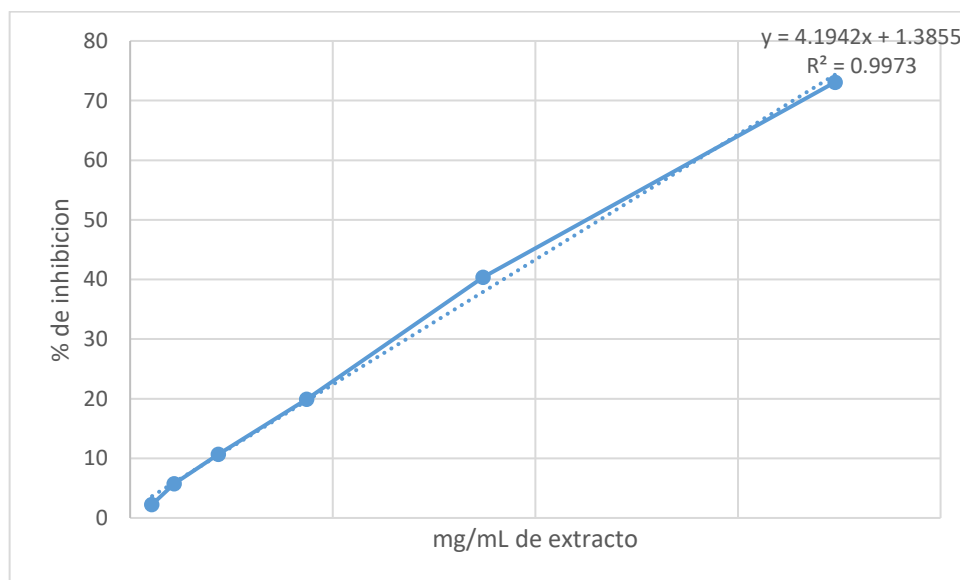


Figura 10. Correlación entre las concentraciones de extracto en mg/mL y % de inhibición del radical DPPH

IC50 = 11,59 mg

0,63 mM de trolox equivalente a 11,59 mg/mL de extracto

1mM de trolox es equivalente a 18,4mg/mL DPPH

Tabla 8. Valores de las absorbancias de las diluciones del patrón de trolox por el método FRAP

mM Trolox	Abs 1	Abs2	Promedio
0,0312	0,046	0,045	0,046
0,0625	0,095	0,087	0,091
0,125	0,205	0,201	0,203
0,25	0,415	0,403	0,409
0,5	0,764	0,762	0,763
1	1,388	1,364	1,376

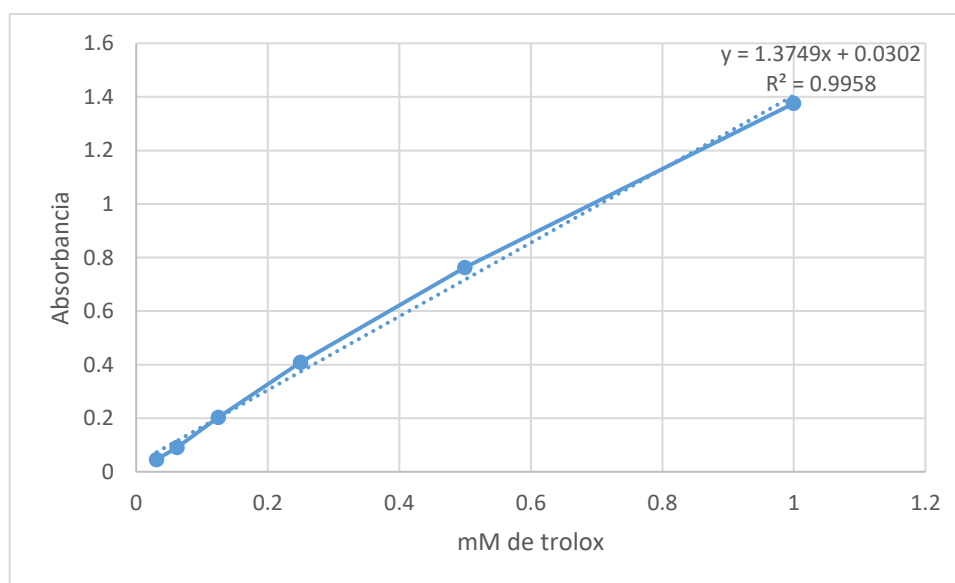


Figura 11. Curva de calibración del patrón para determinar la actividad antioxidante por el método FRAP

Tabla 9. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las flores de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo”, por el método FRAP.

Extracto mg/mL	Abs1	Abs2	Prom	TEAC
8,71	1,392	1,392	1,342	0,954
4,36	0,596	0,712	0,604	0,417
2,18	0,273	0,271	0,272	0,176
1,09	0,108	0,112	0,110	0,059
0,54	0,065	0,061	0,063	0,024

Nota: Abs = absorbancia Prom = promedio
 TEAC = Capacidad antioxidante equivalente al trolox

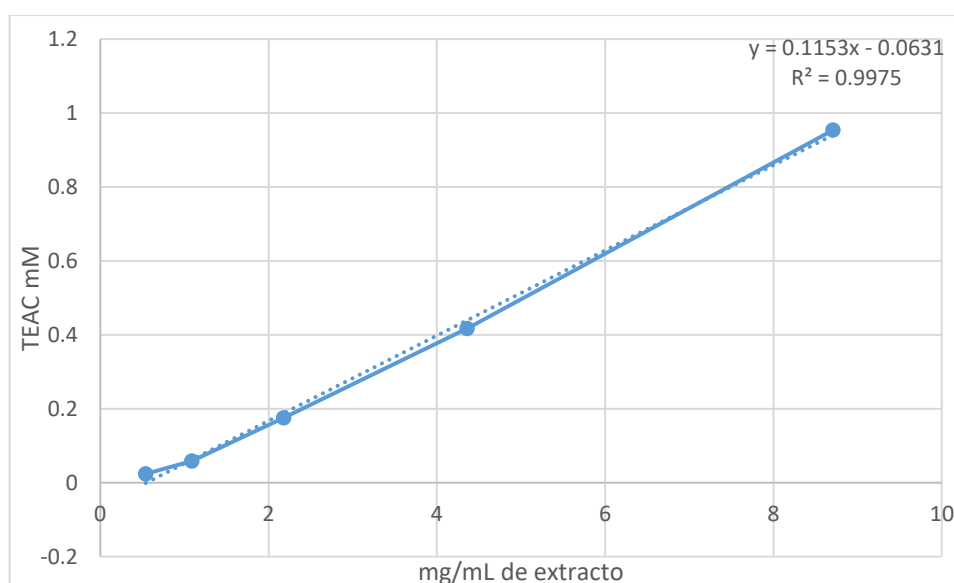


Figura 12. Curva entre concentración del extracto etanólico de flores de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” y TEAC (mM)

1mM de trolox equivale a 9,22 mg/mL de extracto

Por el método FRAP

Tabla 10. Lectura de absorbancia de las disoluciones de trolox por el método de ABTS.

mM trolox	Abs inicial	Abs1	Abs 2	Prom	Abs final
0,0152	0,683	0,543	0,657	0,650	0,033
0,0325	0,683	0,637	0,632	0,636	0,051
0,0625	0,683	0,611	0,606	0,609	0,074
0,125	0,683	0,542	0,543	0,543	0,140
0,25	0,683	0,465	0,463	0,464	0,219
0,5	0,683	0,250	0,234	0,242	0,441

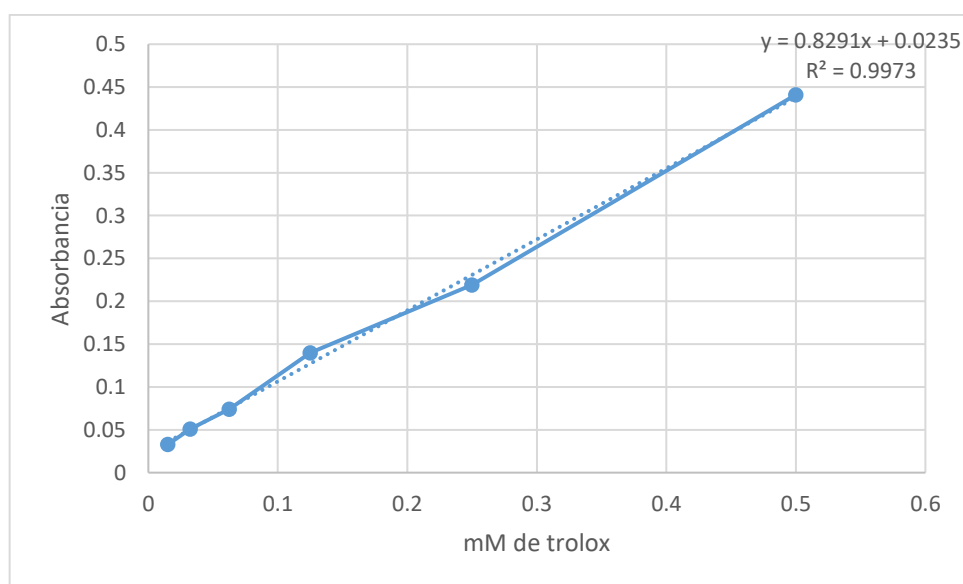


Figura 13. Curva de cuantificación de trolox para la actividad antioxidante por el método ABTS

Tabla 11. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las flores de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” por el método ABTS.

mg/mL de extracto	Abs 1	abs2	Abs- dif	TEAC
8,71	0,264	0,252	0,425	0,484
4,36	0,406	0,407	0,276	0,305
2,18	0,501	0,507	0,179	0,186
1,09	0,554	0,560	0,126	0,132
0,54	0,589	0,584	0,095	0,086

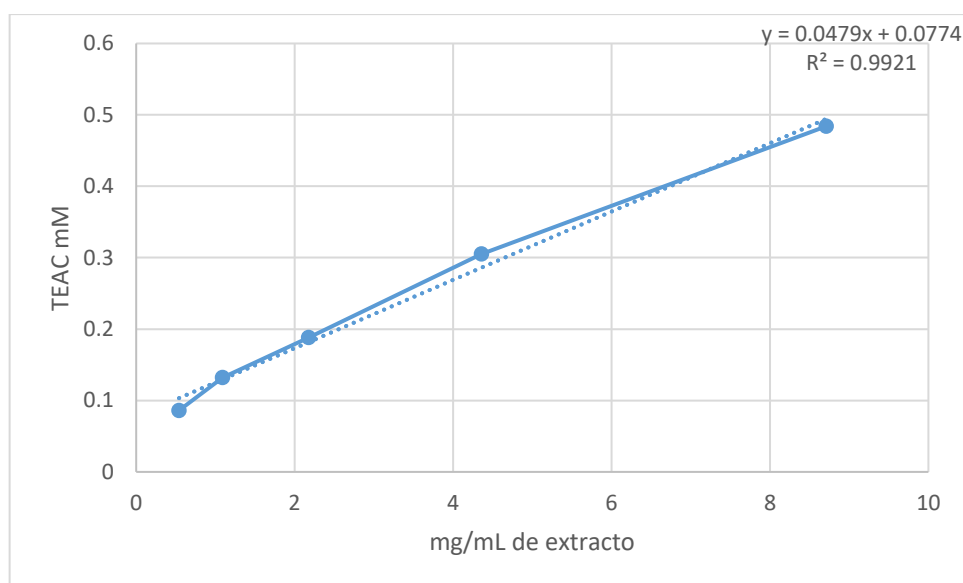


Figura 14. Curva entre concentración de extracto etanólico de flores de la especie *Grindelia tarapacana* y capacidad antioxidante equivalente a trolox como mM.

**1mM de trolox equivale a 19,26 mg/mL
el método ABTS**

IV. DISCUSION

La medicina tradicional está tomando un nuevo auge y en especial la basada en el uso de plantas medicinales, en la que nuestro país posee una gran biodiversidad; tan es así, que poseemos el 10% de la flora mundial, de las cuales solo una pequeña porción están estudiadas en el sentido de comprobar las propiedades que se les atribuyen.

La familia Asteraceae, dentro de las plantas con flores, es una de las más diversas, cuyos miembros se atribuye una serie de propiedades terapéuticas y con un amplio uso en la medicina tradicional, los efectos farmacológicos de estas plantas se pueden atribuir a la presencia de diversos compuestos fitoquímicos, entre ellos compuestos del tipo flavonoide, polifenoles, acetilenos y terpenoides (9), no siendo ajeno a esto la especie *Grindelia tarapacana* Phill “Chincaillo”; a la que se le atribuye propiedades cicatrizantes anticancerígena y para males respiratorios (1,15). Considerando que la especie presenta abundantes flores y no existiendo referencias del estudio exclusivo de estas; el presente estudio se basó en la obtención de un extracto etanólico por maceración con alcohol 96° de las flores, el cual se pudo caracterizar mediante los parámetros de sólidos totales, sólidos solubles, cenizas y pH entre otros (tabla 3). No se ha encontrado estudios de extractos similares; pero sí, un estudio sobre un extracto etanólico de todas las partes aéreas de esta especie procedente de la sierra norte de país, (Muchaypiña 2024) en cuya caracterización presenta diferencias notorias como en la humedad (8,15%), cenizas (4,52 %) y color (negro verdoso); frente a los valores obtenidos en el presente estudio, explicados por la procedencia de la especie, así como la parte usada.

En lo referente a los resultados del screening, si bien hemos mencionado una serie de metabolitos característicos de la familia, a la cual se hace referencia las propiedades terapéuticas atribuidas; en el presente estudio no fue ajeno ya que se determina la presencia de grupos de metabolitos secundarios (tabla 2) como: Flavonoides, taninos, grupos fenólicos libres, triterpenos/ esteroides y leucocianidinas, coincidiendo con diversos reportes para estudios de esta especie como los de Wollenweber 1993 (35), de igual manera Zhou en el 1994 (36), quienes reporta la presencia de compuestos triterpenicos y flavonoides para especies procedentes de Chile; asimismo Poudel et al 2023 (7), Schepetkin et al 2022 (8) y Veres et al 2014 (13) quienes estudiaron el aceite esencial de diferentes especies de *Grindelia* reportan la presencia de compuestos de naturaleza terpenica. Gierlikowska et al 2021 (11), reporta varios ácidos fenólicos y en especie el ácido grindelico en los aceites y extractos de la especie *Grindelia Squarrosa* También Jayo 2015 (15) reporta en los extractos de las raíces de la *Grindelia tarapacana* Phill compuestos como flavonoides, triterpenos,/esteroides, ácidos fenólicos y alcaloides.

Se determino la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las flores de la especie, considerando la zona de la cual procede la planta del presente estudio, se le emplea para el tratamiento de algunas dolencias que implican la generación de radicales libres como los procesos inflamatorios respiratorios o en la cicatrización de heridas y que según se mencionó anteriormente y contrastado en este trabajo, la familia y en especial la especie posee metabolitos que actúan neutralizando a los radicales libres. Se emplearon tres métodos como fueron DPPH, FRAP y ABTS, para la determinación de la actividad antioxidante y poder realizar una comparación entre los métodos antes indicados a pesar de actuar por mecanismo diferentes, en la valoración se tomó como referencia el trolox, que es el equivalente hidrosoluble de la vitamina E. El método de evaluación de la actividad antioxidante por captación del radical DPPH, se basa principalmente en el mecanismo de la transferencia de átomos de hidrogeno; podemos apreciar en la tabla 4 y la figura 7 que inicialmente se realizó una determinación del porcentaje de inhibición de las diversas soluciones del patrón trolox, obteniendo un IC50 de 0,63 mM equivalentes de trolox, posteriormente bajo las misma condiciones se procesó las diversas disoluciones del extracto, hallando un IC50 de 11,59 mg para el extracto (tabla 5 y figura); al realizar la correspondiente equivalencia obtuvimos que 11,59 mg de extracto, corresponde a una actividad antioxidante equivalente a 0,63 mM de trolox por el método DPPH. Estos resultados no se pudieron comparar directamente con los antecedentes referenciados, ya que en aquellos se indican la determinación de actividad antioxidante en aceites esenciales obtenidos del total de esta u otras especies de la familia de las Grindelias, como *Grindelia squarrosa* y *Grindelia. hirsutula*, siendo más activa esta última (13) .

En la tabla 8 observamos las distintas absorbancias de las soluciones de trolox de diferentes concentraciones utilizado como patrón para la evaluación de la actividad antioxidante por el método de FRAP; con los valores de la tabla de los patrones se estableció la curva de cuantificación (figura 11) para hallar el respectivo TEAC para cada una de las soluciones del extracto (tabla 9 y figura 12), la actividad antioxidante del extracto obtenida corresponde a 1mM de trolox equivalente a 9,22 mg de extracto; este método está basado en el mecanismo SET, parece resultar más activo que el anterior, de los antecedentes solo Jayo 2015 (15), hace referencia a actividad antioxidante con valores más activos (1mM~3,57mg), pero en un extracto etanólico de la raíz de esta especie.

En la tabla 10 y figura 13, se aprecia los resultados de las diferentes soluciones del trolox empleado como patrón en el método de captación del radical ABTS, en este caso el método responde tanto al mecanismo SET y HAT pero priorizando el SET, en la curva de calibración de trolox obtenemos la ecuación que nos permite hallar el TEAC por este método. En la tabla 11 y figura 14, se muestran los resultados de la determinación de la

actividad antioxidante para las diversas diluciones del extracto etanólico de las flores donde se obtuvo un valor de 19,26 mg/mL equivalente a 1mM de trolox, estos valores se pueden considerar semejantes con lo reportado por Muchaypiña 2024, con un valor de 20,53 mg/ml para el extracto etanólico de las partes aéreas (que incluyen hojas, tallos y flores) de la especie de la sierra norte.

Por lo tanto, al hacer una comparación de la actividad antioxidante de los métodos empleados para el extracto etanólico de las flores de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” podemos indicar que el método más activo es el FRAP, ya que con menor cantidad de extracto 9,22 mg/mL se obtiene una actividad equivalente a 1 mM de trolox.

V. CONCLUSION.

En el desarrollo del estudio titulado Actividad Antioxidante del Extracto Etanólico de las Partes Aéreas de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” concluimos:

- Los grupos de componentes químicos presentes en el extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” fueron principalmente flavonoides, taninos, ácidos fenoles y triterpenos.
- La actividad antioxidante del extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” por los métodos de ABTS, DPPH y FRAP, resulto relativamente moderada.
- El método antioxidante que presenta mayor sensibilidad y por ende mayor actividad en el extracto etanólico de las flores de *Grindelia tarapacana* Phil. “Chincaillo” es el método FRAP.

VI. RECOMENDACIONES.

Considerando que los resultados obtenidos de la especie y que los metabolitos secundarios pueden depender de diversos factores como la zona de origen se recomienda estudios complementarios como:

- Efectuar determinación de compuestos polifenólicos totales y compuestos flavonoides en extractos de diversos solventes con el fin de optimizar la extracción de los metabolitos secundarios .
- Comprobar si el efecto de la actividad antioxidante se reproduce in vivo, para permitir validar la actividad antioxidante.
- Continuar con los estudios de investigación con el fin de determinar diversas actividades terapéuticas atribuidas por la medicina tradicional afín de contrastar estas.
- Continuar con el estudio para determinar compuestos minerales macro o micronutrientes presentes en el extracto.

VII. FUENTES DE INFORMACION.

1. OMS. Medicina Tradicional 9 de agosto 2023. disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/traditional-medicine>
2. OPS/OMS (2018). Situacion de las plantas medicinales en el Perú.
3. Rainer W.Bussman,Douglas Sharon (2015) Plantas medicinales de los andes y la amazoni
4. Juan Diego Alarcon Acuña (2020) Estudio fitoquimico y evaluacion de la actividad antioxidante del extracto etanologico de las hojas de la especie *Tristerix chodatianus Kujit* "pupa"
5. María C. Ciappini, Fernando S. Stoppani, Roxana Martinet, María B. Álvarez (2013) Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa
6. SIB. Sistema de Información de Biodiversidad. Taxonomía para *Grindelia*. Administración de Parques Nacionales. Argentina. Disponible en: <https://sib.gob.ar/taxonomia/genero/grindelia>
7. Poudel A, Dosoky NS, Satyal P, Swor K, Setzer WN. Essential Oil Composition of *Grindelia squarrosa* from Southern Idaho. *Molecules*. 2023 May 2;28(9):3854. doi: 10.3390/molecules28093854. PMID: 37175263; PMCID: PMC10180262
8. Schepetkin, I.A.; Özek, G.; Özek, T.; Kirpotina, L.N.; Khlebnikov, A.I.; Quinn, M.T. Neutrophil Immunomodulatory Activity of (-)-Borneol, a Major Component of Essential Oils Extracted from *Grindelia squarrosa*. *Molecules* **2022**, *27*, 4897. <https://doi.org/10.3390/molecules27154897>
9. Albani, C. M., Borgo, J., Fabbri, J., Pensel, P., Paladini, A., Beer, M. F., Laurella, L., Elso, O., Farias, N., Elissondo, N., Gambino, G., Sulsen, V., & Elissondo, M. C. (2022). Antiparasitic Effects of Asteraceae Species Extracts on *Echinococcus granulosus s.s.* *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2022, 6371849. <https://doi.org/10.1155/2022/6371849>
10. Murguis, V., Ciprandi, G., Votto, M., De Filippo, M., Tosca, M. A., & Marseglia, G. L. (2021). Natural remedies for acute post-viral cough in children. *Allergologia et immunopathologia*, *49*(3), 173-184. <https://doi.org/10.15586/aei.v49i3.71>
11. Gierlikowska B y et. al (2021) , A. K. (2021). *Grindelia squarrosa* Extract and Grindelic Acid Modulate Pro-inflammatory Functions of respiratory Epithelium and Human Macrophages. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 534111. <https://doi/10.3389/fphar.2020.534111>
12. Gierlikowska, B., Gierlikowski, W., Bekier, K., Skalicka-Wozniak, K., Czerwinska, M. E., & Kiss, A. K. (2020). *Inula helenium* and *Grindelia squarrosa* as a source of compounds with

- anti-inflammatory activity in human neutrophils and cultured human respiratory epithelium. *Journal of ethnopharmacology*, 249, 112311. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112311>
13. Veres Katalin et al. (2014) Veres, K., Roza, O., Laczkó-Zold, E., & Hohmann, J. (2014). Chemical composition of essential oils of *Grindelia squarrosa* and *G. hirsutula*. *Natural product communications*, 9(4), 573-574.
 14. Nowak S and Rychlinska I. Phenolic acids in the flowers and leaves of *Grindelia robusta* Nutt. and *Grindelia squarrosa* Dun. (Asteraceae). *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 2012, Vol. 69 No. 4 pp. 693-698, Disponible en: chrome-extension://https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2012/4/693.pdf
 15. Jayo Pacheco J. Determinación de la actividad citotóxica y citostática del extracto etanólico obtenido de la raíz de *Grindelia tarapacana* Phil. "Escobita". Tesis Universidad Nacional San Luis Gonzaga 2015
 16. Choque YD. Influencia del relave minero en el crecimiento y respuesta fisiológica de *Grindelia Tarapacana* Phil. y su relación con la interacción de rizobacterias + EDTA, lombricompost + rizobacterias, lombricompost + EDTA y lombricompost + rizobacterias + EDTA en la bioacumulación de metales pesados. Tesis. Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. 2020.
 17. Moore AJ. Phylogenetic and Population Genetic Studies in *Grindelia* (Asteraceae: Astereae). Tesis Doctoral. Universidad de California. Berkeley. 2010. Disponible en: <https://escholarship.org/uc/item/6dx5f5n5>
 18. KEW. Royal Botanic Gardens. Plants of the World Online. *Grindelia tarapacana* Phil. Disponible en: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:113638-2>
 19. Fundación RA Philippi. *Grindelia tarapacana*. Disponible en: <https://fundacionphilippi.cl/catalogo/grindelia-tarapacana/>
 20. Granda A y col. 2000 Granda A, Bartoli A, Tortosa R. Una variedad de *Grindelia tarapacana* (Asteraceae, Astereae) de Perú. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 35 (1-2): 157-159. 2000
 21. Carretero ME, Ortega T. Plantas Medicinales con capacidad expectorantes: *Grindelia*. Disponible en: <https://botplusweb.farmaceuticos.com/documentos/2017/5/18/115315.pdf>
 22. Silvestrini, A.; Meucci, E.; Ricerca, B.M.; Mancini, A. Total Antioxidant Capacity: Biochemical Aspects and Clinical Significance. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10978. <https://doi.org/10.3390/ijms241310978>
 23. Guija-Guerra H; Guija-Poma E. Radicales libres y sistema antioxidante. *Horiz Med (Lima)* 2023; 23(2): e2158
 24. Magdalena Pisoschi Aurelia Pop, Aneta Cimpeanu Carmen and Predoi Gabriel. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Hindawi*

- Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2016, Article ID 9130976, 36 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9130976>.
25. Castañeda B, Ramos E, Ibañez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas”. Revista Horizonte Médico. 2008 Julio; 8(1): p. 56-72
 26. Sienes Bailo P, Llorente Martín E, Calmarza P, Montolio Brevia S, Bravo Gómez A, Pozo Giráldez A, Sánchez-Pascuala Callau JJ, Vaquer Santamaría JM, Dayaldasani Khialani A, Cerdá Micó C, Camps Andreu J, Sáez Tormo G, Fort Gallifa I. Implicación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas y posibles terapias antioxidantes. Adv Lab Med. 2022 Dec 22;3(4):351–60. Spanish. doi: 10.1515/almed-2022-0022. PMID: PMC10197511.
 27. Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Rev Invest Med Sur Mex, Julio-Septiembre 2013; 20 (3): 161-168
 28. Santos-Sánchez N, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C y Hernández-Carlos B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. FROM THE EDITED **Antioxidants** Edited by Emad Shalaby. 2019. DOI: 10.5772/intechopen.85270 Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/66259>
 29. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;53:1841-1856. DOI: 10.1021/jf030723c
 30. Tena N, Martin J, García A. State of the Art of Anthocyanins: Antioxidant Activity, Sources, Bioavailability, and Therapeutic Effect in Human Health. *Antioxidants* 9(5):451. DOI: [10.3390/antiox9050451](https://doi.org/10.3390/antiox9050451)
 31. Amorati R and Valgimigli L. Methods To Measure the Antioxidant Activity of Phytochemicals and Plant Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018 66 (13), 3324-3329. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b01079
 32. AOAC. Methoda Officials of Analysis 19 Ed. Filadelfia EEUU 2016
 33. Gruszycki Mabel Rosalía, Valenzuela Gabriela Malena, Báez Margarita, Leguiza Pedro Daniel, et al. Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de Portulaca oleracea L.Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., 2019: Vol. 48(2), 425-435. / <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n2.82720>
 34. Magdalena Pisoschi Aurelia, Pop Aneta, Cimpeanu Carmen and Predoi Gabriel. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2016, Article ID 9130976, 36 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9130976>.
 35. Castañeda B, Ramos E, Ibañez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas”. Revista Horizonte Médico. 2008 Julio; 8(1): p. 56-72

36. Wollenweber E, Timmermann B, Strand J, Fuentes E. Exudate Flavonoids from *Grindelia tarapacana* of Chile. *Z. Naturforsch.* 1993, 48c, 533-534. Disponible en: file:///C:/Users/Cecilia/Downloads/10.1515_znc-1993-5-623.pdf
37. Zho Lin. Bioactive agents from *Grindelia tarapacana* Phil. (Asteraceae). Editorial The University of Arizona. 1994
38. Sienes Bailo P, Llorente Martín E, Calmarza P, Montolio Brevia S, Bravo Gómez A, Pozo Giráldez A, Sánchez-Pascuala Callau JJ, Vaquer Santamaría JM, Dayaldasani Khialani A, Cerdá Micó C, Camps Andreu J, Sáez Tormo G, Fort Gallifa I. Implicación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas y posibles terapias antioxidantes. *Adv Lab Med.* 2022 Dec 22;3(4):351–60. Spanish. doi: 10.1515/almed-2022-0022. PMID: PMC10197511.

8.1 Fotos



Figura 15. Especie en estado natural



Figura 16, Recolectando la especie



Figura 17. Selección y secado de las flores de la especie



Figura 18. Pesado de la muestra para maceración

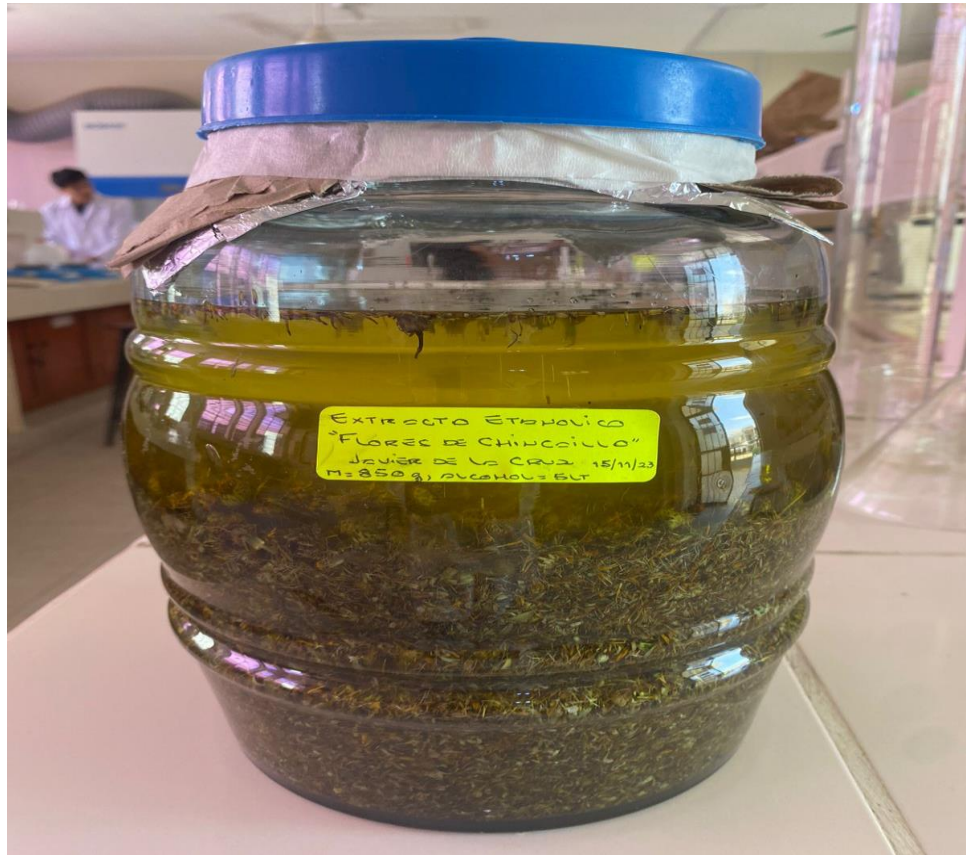


Figura 19. Macerando las flores de la especie



Figura 20. Extracto seco de la especie



Figura 21. Fraccionamiento durante para el screening



Figura 21. Realizando diluciones en la determinación de la actividad antioxidante



Figura 22. Preparando para la lectura al espectrofotómetro



Figura 23. Pruebas de caracterización del extracto



VICERRECTORADO DE
INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



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

CONSTANCIA N° 161-USM-MHN-2023

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

La muestra vegetal (resinas, flores amarillas) recibida de **Javier Francisco De La Cruz Fernandez**, estudiante de pregrado de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica ha sido estudiada y clasificada como: *Grindelia tarapacana* Phil. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

ORDEN : Asterales

FAMILIA : ASTERACEAE

GÉNERO : *Grindelia*

ESPECIE : *Grindelia tarapacana* Phil.

Nombre vulgar: “Chincaillo”

Procedencia: Carhuacucho , Llauta, Lucanas, Ayacucho

Determinado por: MSc. Hamilton Beltrán Santiago.

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

Lima, 18 de julio de 2023

Dra. Joaquina Alban Castillo

JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-034, Lima 14, Perú

Telfs. (511)471-0117, 470-4471
265-6819, 619-7000 anexo 5703

e-mail: herbariousm@unmsm.edu.pe
<https://museo hn.unmsm.edu.pe>