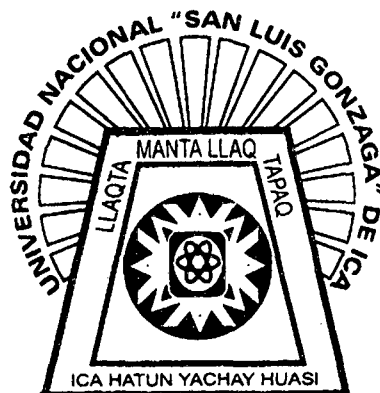


**UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**"CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
HOJAS Y FLORES DE *Chuiraga spinosa* Less  
"huamanpinta"**

**TESIS:**

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. Sánchez Llamosa Miguel Jesús  
Bach. Anicama Pariona Nataly Esther**

**ASESOR:**

**Mg. Juan José A. Palomino Jhòng**

**Co-ASESOR:**

**Mg. Oscar Herrera Calderon**

**ICA - PERÚ**

**2015**

## **Dedicatoria:**

A Dios por darnos el conocimiento y estar pendiente de nosotros.

A nuestros padres y hermanos quienes con su amor, apoyo y comprensión incondicional estuvieron siempre a lo largo de nuestra vida estudiantil; a ellos que siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y que han sido incentivos de nuestras vidas.

A nuestros asesores quienes confiaron en cada una de nosotros para poder llevar a cabo el desarrollo de la presente, brindándonos sus conocimientos y apoyo incondicional en esta ardua labor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestro más amplio agradecimiento a los docentes que con su paciencia nos supieron orientar hacia el camino de la superación y el éxito.

A nuestros asesores que gracias a su apoyo y dedicación no hubiese sido posible la culminación de la presente investigación

Al Jefe del Departamento de Ciencias Químicas por permitirnos usar las instalaciones del laboratorio de Química General Aplicada de la FF.BB – UNICA, para la realización del presente trabajo de tesis.

A nuestros profesores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por todo el conocimiento brindado en estos cinco años de estudios.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	7
<b>ABSTRACT</b>	8
<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
<b>CAPÍTULO I. ASPECTOS GENERALES</b>	12
1.1 BASES TEÓRICAS	12
1.1.1 Chuquiraga spinosa Less “huamanpinta”	12
1.1.2 Clasificación Sistemática de la Especie	13
1.1.3 Ubicación Geográfica y Hábitat	14
1.1.4 Composición química y usos tradicionales	14
1.2 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN	14
1.3 SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	16
1.4 FLAVONOIDES	18
1.5 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	21
1.5.1 Reacciones SET y reacciones HAT	22
1.5.2 Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)	24
1.5.3 Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3- etilbenztiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)	26
1.5.4 Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH)	28

1.5.5 Trolox.	29
<b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
2.1 MATERIAL	31
2.1.1 Material biológico:	31
2.1.2 Material Farmacológico:	31
2.1.3 Material en General:	31
2.1.4 Sales químicas y reactivas:	32
2.1.5 Equipos	33
2.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA	33
2.2.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO.	33
2.2.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	35
2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO	42
2.3.1. Método de inhibición del radical DPPH	42
2.3.2 Método reacción con el radical (ABTS)	47
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
3.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO	50
3.1.1 Clasificación taxonómica.	50
3.1.2 Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico seco de la obtención del extracto etanólico	50
3.1.3 Análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico	51
3.2 Cuantificación de polifenoles totales	52

3.3	Evaluación de la actividad antioxidante frente al radical DPPH	55
3.4	Evaluación de la actividad antioxidante frente al radical ABTS	58
3.5	Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC-ABTS)	59
	DISCUSIÓN	61
	CONCLUSIONES	66
	RECOMENDACIONES	67
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXOS	74

## RESUMEN

**Objetivos:** Determinar el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de las hojas y flores de *Chuquiraga spinosa* Less "huamanpinta". **Diseño:** Estudio experimental. **Lugar:** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica-Perú. **Material Biológico:** Se utilizó hojas y flores de huamanpinta los cuales se maceraron en etanol al 96 %, durante 7 días, para obtener el extracto etanólico seco de ambas partes de la planta por separado, se determinó los principales metabolitos secundarios en ambos extractos y el contenido de polifenoles totales según el método de Folin Ciocalteu, la actividad antioxidante *in vitro* frente a los radical DPPH y ABTS. Se utilizó la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión lineal para determinar estos valores. **Resultados:** Se determinó la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos y alcaloides. El contenido de polifenoles totales en hojas y flores fue:  $51,8 \pm 1,27$  mgEAG/g de extracto y  $354,2 \pm 1,9$  mgEAG/g de extracto respectivamente. La actividad antioxidante frente al radical DPPH mostró;  $CI_{50}$  en flores =  $5,69 \mu\text{g/mL}$  y  $CI_{50}$  en hojas =  $14,98 \mu\text{g/mL}$ ; mientras que el TEAC-ABTS fue:  $TEAC_{hojas} = 22,52 \pm 0,19 \mu\text{mol/g}$  de extracto y  $TEAC-ABTS_{flores} = 39,15 \pm 0,31 \mu\text{mol/g}$  de extracto. **Conclusión:** El extracto con mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH Y ABTS fue el extracto etanólico de flores de *Chuquiraga spinosa* Less "huamanpinta".

**Palabras clave:** *Chuquiraga spinosa*, huamanpinta, antioxidante, compuestos fenólicos, DPPH, ABTS

## ABSTRACT

**Objectives:** To determine the content of total polyphenols and the antioxidant activity *in vitro* of the ethanolic extract of *Chuquiraga spinosa* Less "*huamanpinta*" of the sheets and flowers. Design: Experimental study. Place: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica Peru. Biological material: Which used sheets and flowers of huamanpinta, dry of both parts of the plant macerated in ethanol to obtain the ethanolic extract separately, it determined the main secondary metabolites in both abstracts itself and the content of total polyphenols according to the Folin's method Ciocalteu, the antioxidant activity *in vitro* in radical DPPH, ABTS stops next determining the antioxidant equivalent capacity of trolox (TEAC-ABTS). The equation of the straight line and the linear regression coefficient to determine these values were used. Results: The content of total polyphenols in sheets and flowers were:  $51,8 \pm 1,27$  mgEAG/g y  $354,2 \pm 1,9$  mgEAG/g. Antioxidant activity of DPPH was:  $Cl_{50}$  flowers:  $5,69 \mu\text{g/mL}$  y  $Cl_{50}$  sheets:  $14,98 \mu\text{g/mL}$ ; TEAC ABTS was for TEAC sheets:  $22,52 \pm 0,19 \mu\text{mol/g}$  de extract y TEAC flowers:  $39,15 \pm 0,31 \mu\text{mol/g}$ ; respectively. Ethanolic extract of flowers of *Chuquiraga spinosa* "*huamanpinta*" has higher content of polyphenols and antioxidant activity against ABTS, DPPH radical.

**Key words:** *Chuquiraga spinosa*, *huamanpinta*, antioxidant, phenolic compounds, DPPH, ABTS,

## INTRODUCCIÓN

En un sistema biológico, un antioxidante es capaz de reaccionar con radicales libres siendo entonces un terminador de cadena oxidativa. La capacidad antioxidante de una sustancia o molécula se define como la habilidad para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, lipoperoxidación). La capacidad antioxidante está determinada a su vez por: a) reactividad química del antioxidante asociada a la actividad antirradicalaria o estabilizadora de radicales libres; b) capacidad para acceder al sitio de reacción y; c) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres <sup>1</sup>.

Ante un incesante daño que ejercen los radicales libres en los sistemas vivos la naturaleza ha brindado diferentes fuentes de protección que permiten mediar este daño. Los compuestos fenólicos son moléculas de importancia demostrada de actividad antioxidante, presentan un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza y son componentes importantes en la dieta humana <sup>2</sup>.

El consumo promedio de fenoles en los países europeos se estima en 23 mg/día. Existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su efecto contra algunas enfermedades como

ciertos cánceres y desordenes cardíacos derivados de su poderosa actividad antioxidante<sup>3</sup>.

La medicina alternativa complementaria se está volviendo cada vez más popular en muchos países desarrollados y es a menudo el único tratamiento accesible y asequible disponible. La medicina natural a base de extractos de plantas medicinales es utilizada con el propósito de solucionar diferentes enfermedades; los metabolitos secundarios presentes son responsables de algunas “propiedades curativas” y constituyen un gran potencial de reserva inexplorada de inmensa utilidad<sup>4</sup>.

La *Chuquiraga spinosa* Less “huamanpinta” es una especie con uso terapéutico de la familia de las Asteraceae, crece en los andes del Perú sobre los 3500 msnm, y es utilizado como antiinflamatorio, analgésico, diurético, anti prostático, cáncer genitourinario, etc<sup>5</sup>.

Sin embargo, no hay evidencia de estudios científicos realizados a la especie sobre su acción antioxidante en hojas y flores bajo la forma de extracto etanólico, razón por la cual se realizó el presente trabajo de investigación. Considerando el uso tradicional que se le atribuye, nos planteamos el siguiente problema de investigación: ¿El contenido de polifenoles totales presentes en el extracto etanólico de hojas y flores de *Chuquiraga spinosa* Less. “huamanpinta” estará

asociado a su actividad antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH Y ABTS?

Para ello nos planteamos el siguiente objetivo general y los específicos correspondientes:

#### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de hojas y flores de ***Chuquiraga spinosa Less.*** “huamanpinta”.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios del extracto etanólico de hojas y flores de ***Chuquiraga spinosa Less.*** “***huamanpinta***”, mediante el tamizaje fitoquímico preliminar,
2. Determinar el contenido de polifenoles totales presentes en el extracto etanólico de hojas y flores de ***Chuquiraga spinosa Less*** mediante la técnica de Folin Ciocalteu,
3. Medir el efecto antioxidante *in vitro* mediante la técnica de captación del radical 1,2 difenil-picril-hidracil (DPPH) y el 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS) del extracto etanólico de hojas y flores de ***Chuquiraga spinosa Less.*** “huamanpinta”.
4. Relacionar el contenido de polifenoles totales presentes en cada uno de los extractos de hojas y flores de “huamanpinta” con la capacidad antioxidante *in vitro*.

# CAPÍTULO I

## ASPECTOS GENERALES

### 1.1 BASES TEÓRICAS

#### 1.1.1 *Chuquiraga spinosa* Less “*huamanpinta*”

Es una planta semileñosa de 1 a 1,5 metros de alto. El tallo muy ramificado, densamente folioso. Las hojas de disposición uniformemente alternas simples enteras de pecíolo corto de forma redondeada con borde entero con una longitud de 1.5 mm de diámetro de color verde intenso y brillante, con espinas axilares. Flores de color amarillo-anaranjado, con anteras sagitadas, corolas bilabiadas, pero una de sus características más sobresalientes es por la partidura del disco del capítulo. Inflorescencia en cabezuela o capítulos rodeada de tres hileras de brácteas involucrales con numerosas flores, sésiles, dispuestas en las axilas de las hojas <sup>5</sup>.

Los capítulos femeninos con involucro cilíndrico y con brácteas dispuestas más o menos en cinco series, las externas en forma redondeadas y las internas angostamente redondas. Receptáculo cónico, alveolado. Flores en escaso número con la corola algo filiforme. Aquenios glabros con un disco anular en la parte superior y lateralmente. Pappus de color algo amarillento. Capítulos masculinos con involucro cilíndrico con brácteas dispuestas en tres series, las externas e internas elípticas 5 estambres con los filamentos libres y soldados por las anteras (sinanterio), receptáculo cónico alveolado de 1,5 mm de diámetro <sup>6</sup>.

### **1.1.2. Clasificación Sistemática de la Especie**

- ❖ DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA
- ❖ CLASE: MAGNOLIOPSIDA
- ❖ SUBCLASE: ASTERIDAE
- ❖ ORDEN: ASTERALES
- ❖ FAMILIA: ASTERACEAE
- ❖ GENERO: Chuquiraga
- ❖ ESPECIE *Chuquiraga spinosa Less*
- ❖ Nombre vulgar: "huamanpinta",

### **1.1.3. Ubicación Geográfica y Hábitat**

La especie de la planta se ha encontrado en diferentes localidades de Ayacucho como Quinua, Chiara, Vinchos; en la provincia de Cangallo en el distrito de Totos, por encima de los 3,000 metros sobre el nivel del mar. Habita en zonas escarpadas y pedregosas, se relaciona con algunas especies arbustivas como el Gynoxis, Baccharis, etc. Su zona de vida es, el bosque húmedo montano subtropical, también se le encuentra entre el límite de la zona de vida ya mencionada y el páramo muy húmedo subandino Subtropical.

#### **1.1.4. Composición química y usos tradicionales.**

La composición química de las hojas de *Chuquiraga spinosa* Less "huamanpinta" contiene: alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, taninos, sesquiterpeno lactonas, aminoácidos y resinas. Tiene además potasio, calcio, fósforo, azufre y silicio. En el uso popular se coloca 15 g de las hojas para un litro de agua, hervir por 3 a 5 minutos y se toma una taza tres veces al día y se emplea como: Antiinflamatorio de las vías urinarias, antiinflamatorio prostático, cicatrizante, antiséptico vaginal <sup>6</sup>.

## **1.2 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN**

R. Casado et al. (2011)<sup>7</sup>, demostró que el extracto acuoso y metanólico al 50% de las partes aéreas de *Chuquiraga spinosa* presentó una alta actividad antioxidante sin correlación entre la actividad antioxidante y el total de compuestos polifenólicos. Así mismo el extracto metanólico al 50% administrado por vía oral redujo significativamente (52,5%) el edema subplantar inducido en la pata trasera en ratas. Este extracto, por administración tópica, produjo una reducción de 88,07% del edema inducido por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-Acetato (TPA) en orejas de los ratones. El extracto acuoso y metanólico al 50% fueron activos contra *Cándida albicans* (MIC: 2,5 y 6,25 g, respectivamente) y el extracto acuoso mostró actividad antifúngica contra *Cándida cucumerinum* (MIC: 2,5 g).

H. Chávez et al. (2011)<sup>8</sup> estudiaron los metabolitos secundarios bioactivos de *Chuquiraga spinosa Lessing subsp. Huamanpinta Ezcurra*, reportan que el extracto de acetato de etilo contenía los flavonoides: 5,5'-dihidroxi-7,3'- dimetoxi-flavanona y 5-hidroxi- 7,4'-dimetoxiflavona, el flavonoide quercetina y kampferol y del extracto etanólico se aisló el flavonoide rutina y los flavonoides de tipo glicósido como quercetina 3-O-rutinosido, kampferol 3-O- rutinosido y kampferol 3-O-glucosido. Los flavonoides aislados del extracto de acetato de etilo y etanólico de *Chuquiraga spinosa lessing subsp "huamanpinta"* son los responsables de la actividad antiinflamatoria y analgésica reportadas previamente por los autores.

M. Torres (2004)<sup>9</sup>, demostró la actividad antiinflamatoria del extracto atomizado de la especie *Chuquiraga spinosa lessing "qarisirwi"* en *Canis familiaris*, indicando que los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad serían los triterpenos y esteroides.

C. Contreras (2003)<sup>10</sup>, reportó que los extractos de *Chuquiraga spinosa Lessing*, tienen actividad antiinflamatoria, el extracto acuoso demostró mayor eficiencia farmacológica y que este extracto a la dosis de 200 mg/Kg, reporta mayor eficiencia antiinflamatoria.

J. Arenas (2000)<sup>11</sup>, demostró la actividad diurética de la *Chuquiraga spinosa* y concluyó que probablemente los responsables de dicha actividad serían los flavonoides en acción sinérgica con las saponinas, fenoles y taninos.

C. Sotelo (1998)<sup>12</sup>, estudió la "actividad antiinflamatoria de la *Chuquiraga spinosa* "huamanpinta" en ratas y camundongos, empleando el modelo experimental de inflamación producida por carragenina, demostró una buena actividad antiinflamatoria e indica que es un mecanismo dosis dependiente, de igual forma concluye que la fracción acuosa tiene mejor actividad antiinflamatoria que la fracción etanólica y describe que ambas fracciones poseen actividad antiedematogénica. La administración del Extracto Bruto Hidroalcohólico (EBH) de huamanpinta (2000 mg/kg SC) produjo lesiones de la mucosa gástrica similares a los producidos por la indometacina, lo que sugiere un mecanismo de acción antiinflamatoria mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

### **1.3 SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

En un sistema biológico, un antioxidante es capaz de reaccionar con radicales libres siendo entonces un terminador de cadena oxidativa. La capacidad antioxidante de una sustancia o molécula se define como la habilidad para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, lipoperoxidación). La capacidad antioxidante está determinada a su vez por:

a) reactividad química del antioxidante asociada a la actividad

antirradicalaria o estabilizadora de radicales libres; b) capacidad para acceder al sitio de reacción y; c) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres <sup>13</sup>.

Ante un incesante daño que ejercen los radicales libres en los sistemas vivos la naturaleza ha brindado diferentes fuentes de protección que permiten mediar este daño.

Estos sistemas, de acuerdo a su origen, pueden clasificarse como endógenos y exógenos (**Ver figura 01**). Los sistemas de defensa antioxidante endógeno consisten en una serie de elementos biológicos que brindan protección ante la producción continua de radicales libres generados por funciones celulares como la respiración y síntesis de ATP a nivel mitocondrial; el sistema antioxidante endógeno, a su vez, se divide en enzimático y no enzimático. El primero lo constituyen las enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación peroxidasa, glutación reductasa, glutación S-transferasa, entre las más importantes. El segundo lo integran el glutación, la coenzima Q y el ácido tioctico o lipoico. El sistema de defensa antioxidante exógeno se forma por todos los elementos provistos del medio ambiente (alimentos, plantas, etc.) que han sido sometidos a estudios científicos y se les ha identificado actividad antioxidante. Entre los más estudiados se encuentran la vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -carotenos y Polifenoles (flavonoides y taninos) <sup>14</sup>.

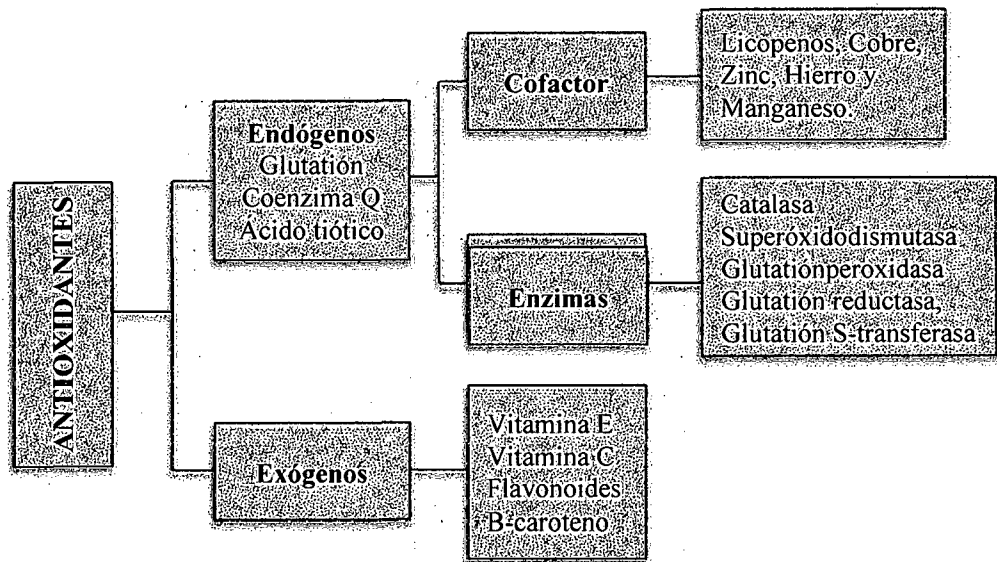


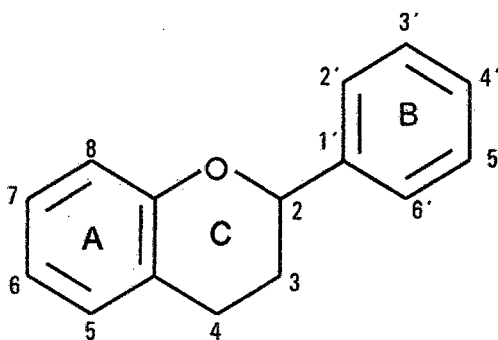
Figura 01. Clasificación de los antioxidantes

#### 1.4. FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos naturales fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo; y sólo algunos se han detectado en hongos y algas <sup>15</sup>. Se les encuentra en forma libre también llamados agliconas flavonoides, pero la mayoría de veces se les encuentra como glicósidos, como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. Los glicósidos pueden ser de dos clases con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos

ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos; los O-glicósidos son los hallados comúnmente. Las antocianinas se encuentran como sales en flores, frutos con coloraciones que van del color rojo hasta violeta y el azul. <sup>(20)</sup>Los flavonoides pueden ser desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30 000 Da <sup>16</sup>.

Los flavonoides tienen una estructura química definida, son moléculas que tienen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, y cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, se denominan como compuestos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (difetilpropano) derivado del ácido shiquímico y de 3 restos de acetato (**Figura 02**).



**Figura. 02. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.**

Los flavonoides se han clasificado en varias clases de acuerdo a las variantes estructurales que presenta la cadena central C<sub>3</sub>. Tienen 13 subclases de flavonoides con un total de 5000 compuestos y están agrupados en: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides,

pterocarpanos, rotenoides, etc. Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antialérgicas, antiasmáticas, antitumorales, etc. Siendo la de mayor importancia la propiedad antioxidante<sup>17</sup>.

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL). También se debe a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO); así se evita la generación de especies reactivas derivados del oxígeno (EROs) *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos.

Los flavonoides inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2), al mismo tiempo se estimulan otras enzimas con propiedades antioxidantes como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD); así los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de RL y en la formación del radical en sí<sup>18</sup>.

Los flavonoides aumentan la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes; al mismo tiempo que son capaces de inhibir enzimas involucradas en la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs)<sup>19</sup>.

## 1.5 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*.

Se han desarrollado un gran número de métodos hasta la actualidad para determinar la posible actividad antioxidante de diversos extractos o muestras. Siendo difícil determinar la capacidad antioxidante de una muestra por medio de un solo método, por tal razón es necesario combinar varios. Esto se debe a que los antioxidantes tienen diferentes mecanismos de acción; pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, pueden capturar radicales libres, formar complejos, quelar metales, reducir algunos compuestos, activar sistemas biológicos antioxidantes. Ya que en un mismo extracto puede haber mezclas de antioxidantes con diferentes mecanismos de acción, se pueden establecer reacciones sinérgicas siendo necesario el análisis de los posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes en la muestra. Se deben considerar otros aspectos al determinar la capacidad antioxidante de los extractos vegetales, tales como las propiedades coloidales del sustrato, el estado de oxidación, la localización del antioxidante en las distintas fases, el tipo de sustrato oxidable, las interacciones con otros compuestos, la composición del sistema, la naturaleza heterogénea y heterofásica del sistema<sup>20</sup>.

Por las razones ya descritas los autores tienen la necesidad de combinar más de un método para determinar la capacidad antioxidante *in vitro*<sup>21</sup>.

Los ensayos *in vitro* sobre la capacidad antioxidante de extractos de plantas, se deben completar con ensayos *in vivo*, así como con estudios sobre el

posible efecto pro oxidante de estos compuestos a dosis elevadas, ya que en estos compuestos existe un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y pro oxidante.

Se debe de considerar en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*, las modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes; la comparación entre resultados se debe realizar con precaución aún si se ha realizado el mismo método de medida ya que puede haber sufrido cambios en la manipulación, en la temperatura de la muestra o en el procesamiento, en la metodología empleada en la extracción, etc. También se debe tener cuenta que los resultados para un mismo método se expresan de múltiples maneras, dificultándose su comparación <sup>22</sup>.

### **1.5.1 Reacciones SET y reacciones HAT**

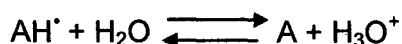
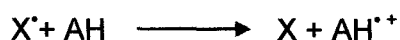
Aunque, como se ha explicado, existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes reaccionan con los radicales libres, como en el caso de los polifenoles, que detienen el proceso en cadena de oxidación lipídica (chain-breaking), esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET), aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar un método de medida de capacidad antioxidante, por lo que, a continuación, se explicará brevemente en qué consiste cada uno de estos dos mecanismos.

En las reacciones HAT, la reacción sería de este tipo, siendo X<sup>•</sup> el radical libre y AH el antioxidante:



El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial.

Por el contrario, en las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, y serían reacciones de este tipo, siendo de nuevo X<sup>•</sup> el radical libre y AH el antioxidante:



Estas reacciones son también dependientes del pH. Son métodos muy sensibles al ácido ascórbico y al ácido úrico, que juegan un papel importante en el mantenimiento del status redox del plasma. Algunos elementos traza y contaminantes (sobre todo metales) pueden interferir con estos métodos, resultando en una alta variabilidad y una baja reproducibilidad y consistencia de los resultados <sup>23</sup>.

Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que un compuesto que tuviera baja entalpía facilitaría la abstracción del átomo de H. Así mismo, se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación

de un radical estable. Por el contrario, las reacciones SET dependen del potencial de ionización.

A continuación, se describen tres de los métodos utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante, indicando el tipo de reacción que se lleva a cabo en aquellos<sup>24</sup>.

### 1.5.2 Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP).

Se trata de una reacción SET, que se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido. Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 593 nm durante 4 minutos, según el método original, aunque este tiempo fue posteriormente ampliado hasta 30 minutos, ya que a los 4 minutos muchos compuestos todavía no habían acabado de reaccionar. Los resultados se expresan en equivalente Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/L}$ ), tras elaborar una curva de calibración de este compuesto, un análogo hidrosoluble de la vitamina E muy utilizado en la expresión de resultados de capacidad antioxidante.

La **Figura 03** muestra la reacción que tiene lugar en este método de medida de capacidad antioxidante.

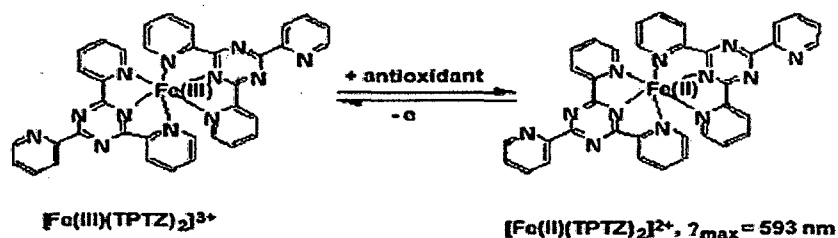


Figura 03. Mecanismo de reacción en el método FRAP

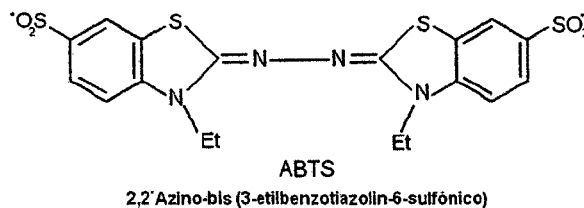
Se han planteado diversas críticas a este método:

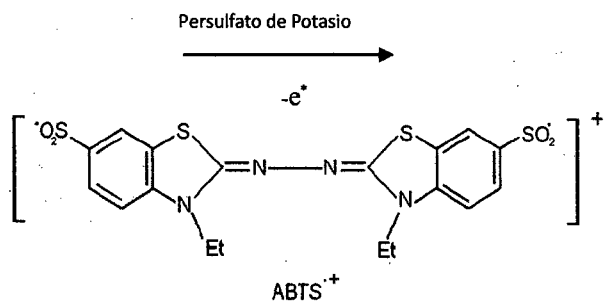
- ✓ Se lleva a cabo a un pH no fisiológico.
- ✓ Como el potencial de reducción del Fe (III) a Fe (II) es de 0,77 V, cualquier compuesto con un potencial redox inferior, podría reducir al Fe (III), sobreestimando el valor de FRAP.
- ✓ A 593 nm pueden absorber otros compuestos, como la bilirrubina oxidada, que produce biliverdina, aumentando el valor de FRAP.
- ✓ Hay compuestos como el ácido ascórbico que, además de reducir el ion férrico a ferroso, pueden reaccionar con éste último para generar nuevos radicales libres. Por ejemplo, en fluidos biológicos, el Fe (II) puede interaccionar con agua oxigenada para producir radical hidroxilo.
- ✓ El FRAP no implica a ningún prooxidante ni a ningún sustrato oxidable. Igual que no todos los reductores que transforman el ion ferroso en férrico no son antioxidantes, hay antioxidantes que no son capaces de llevar a cabo esta reacción, como es el caso del glutatión, un importante antioxidante natural que da resultados negativos en el FRAP <sup>25</sup>.

### **1.5.3 Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS).**

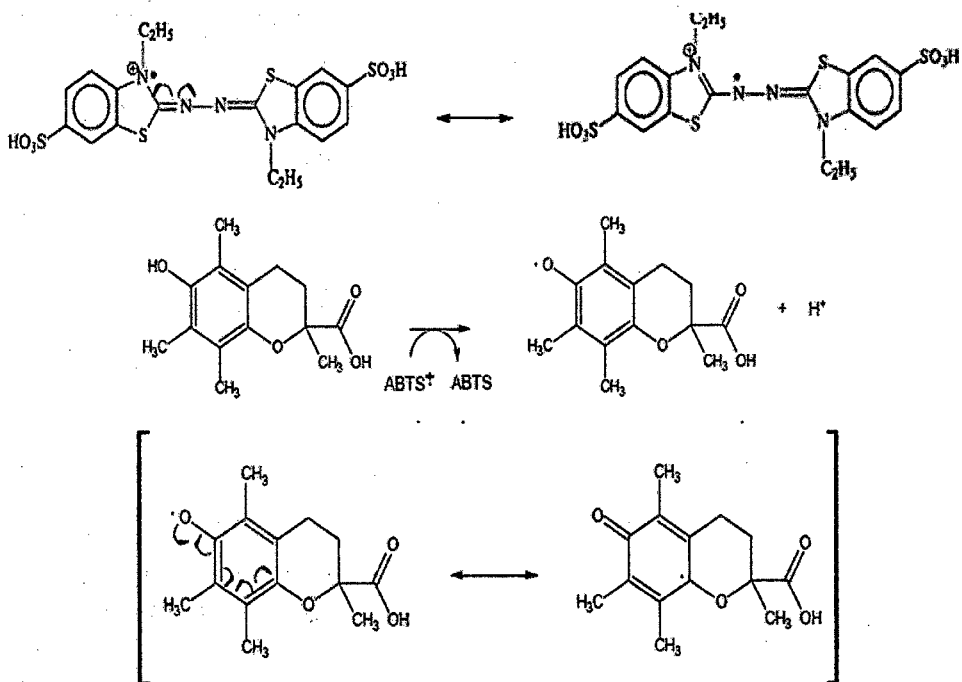
Se trata de una reacción SET y HAT, en el método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) el radical tiene que ser generado

tras una reacción que puede ser química (persulfato potasio), enzimática (peroxidasa, mioglobulina) (ver figura 04 y 05), o también electroquímica. Con este método, se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica. El cromóforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a  $\lambda$  342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical  $ABTS^{•+}$  una vez generado por medio de enzimas o químicamente pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a  $\lambda$  (414, 645, 734 y 815 nm), pero se mide a una longitud de onda  $\lambda$  734 nm. Una de las principales ventajas del uso de este radical es que tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y en medios orgánicos. El radical  $ABTS^{•+}$  es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los compuestos fenólicos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja ( $\lambda$  734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria<sup>26</sup>.





**Figura 04. Formación del radical ABTS**



**Figura 05. Mecanismo de estabilización del catión radical ABTS<sup>•+</sup> (arriba), reacción del catión radical ABTS<sup>•+</sup> con el trolox (centro) y mecanismo de estabilización del radical formado en el trolox (abajo)**

#### 1.5.4 Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH)

El método del DPPH se basa en la reducción del radical DPPH' por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes (ver figura 06). La decoloración del radical se determina a una  $\lambda$  de 515 nm hasta alcanzar el equilibrio. Entre las ventajas de usar este método, se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido, sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH <sup>27</sup>.

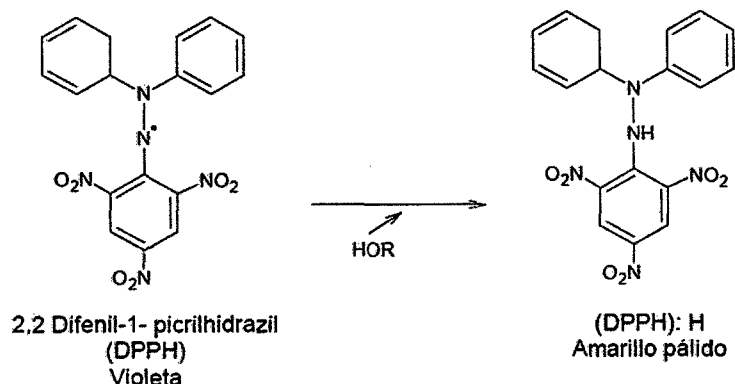


Figura 06. Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidraizil (Brands &Williams, 1995)

### 1.5.5 Trolox.

Es un antioxidante como la vitamina E y se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo o daño celular.

El compuesto ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico, Trolox (**ver figura 07**), es un análogo soluble en agua de la vitamina E, que se puede comparar con varios antioxidantes comerciales.

Las reacciones entre el Trolox y varios radicales libres oxidantes incluyendo los radicales peroxi y varios radicales hidroxilo se examinaron mediante el uso de la técnica de pulso-radiólisis, demostrando que el Trolox puede someterse a reacciones rápidas de transferencia de electrones, así como los procesos de transferencia de hidrógeno; el radical fenoxilo resultante demuestra ser relativamente estable, en común con el radical fenoxi derivado de la vitamina E. Las reacciones entre el Trolox (radical fenoxilo) y una variedad de compuestos reductores biológicamente pertinentes se examinaron mediante el uso de radiolisis pulsos. Los resultados evidencian que el Trolox (radical fenoxilo) se repara fácilmente por el ascorbato y ciertos tioles, pero no por urato, NADH o galato de propilo. Las pruebas evidencian que el Trolox repara proteínas que se han oxidado por radicales libres<sup>28</sup>.

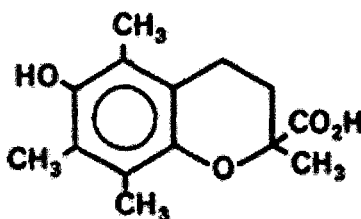


Figura 07. Fórmula estructural del trolox

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 MATERIALES**

##### **2.1.1 Material biológico:**

- La planta entera de “huamanpinta”( *Chuquiraga spinosa* Less)

##### **2.1.2 Material Químico botánico:**

- Extracto etanólico seco de hojas y flores de *Chuquiraga spinosa* Less.

##### **2.1.3 Material en General:**

- Material de vidrio
- Pipetas volumétricas AS de 1, 3, 5, 10 mL
- Pipetas graduadas de 1, 3, 5, 10 mL
- Matraz volumétrico de 10, 25, 50, 100 mL
- Matraz de Erlenmeyer 100, 250, 1000 mL.
- Micropipetas calibradas de 10, 100, 1000  $\mu$ L
- Tubos de ensayo de 20 mL.
- Fiola de 100 mL
- Gradillas
- Frascos de vidrio color ámbar
- Jeringas

#### **2.1.4 Sales químicas y reactivos:**

- 1, 1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) (Sigma®)
- 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS).  
Reactivo ABTS (Sigma ®)
- Persulfato de potasio (Sigma® )
- Trolox ®
- Reactivo de Folin Ciocalteu
- Reactivo de Liebermann-Burchard
- Cloruro férrico (Merck®)
- Reactivo de Shinoda
- Hidróxido de sodio (Merck®)
- Ácido clorhídrico (Merck®)
- Hidróxido de amonio (Merck®)
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Metanol (Fisher®)
- Etanol (Fisher®)
- Cloroformo (Merck®)
- Silicagel G60 (Merck®)
- Tricloruro Férrico ( JT Baker ®)

#### **2.1.5 Equipos**

- Rotaevaporador (Büchi ®)

- Estufa (Mettler®)
- Horno de aire circulante (Binder ®)
- Centrifuga (internacional Equipment Co®)
- Balanzas analíticas sensibles a 1 g (Mettler Toledo ®); 0.1 y 0.00001 g (Bennet®)
- Espectrofotómetro UV-VIS (UNICO 2001 ®)
- Agitador Vortex (Scientific ®)

## **2.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA**

### **2.2.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO.**

#### **Recolección, selección, secado y conservación de la muestra**

La planta entera de *Chuquiraga spinosa* Less “huamanpinta” fue colectada en el distrito de Vinchos – Huamanga – Ayacucho a una altitud de 3900 msnm, en el mes de marzo del 2014. Posteriormente 500 g de hojas y 250 g de flores en buen estado fueron colocados en bolsas de papel craft y trasladados al laboratorio de Química General de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, para su desecación **(Anexo 2)**.

#### **Clasificación Taxonómica de la especie vegetal.**

La muestra vegetal fue determinada botánicamente en el Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú **(Anexo 1)**.

### **Obtención del extracto etanólico de hojas y flores de *Chuquiraga spinosa* Less “huamanpinta”**

500 g de hojas secas y 250 g de flores fueron molidas por separado en un molino de cuchillas, maceradas con 2,5 L de etanol al 96 % durante siete días con agitación diaria durante cinco minutos. El filtrado se concentró en una estufa controlada con aire circulante a 40 °C (para obtener los extractos etanólicos, en el que se realizó los ensayos fisicoquímicos (marcha fitoquímica), y químicos (antioxidante *in vitro*), así mismo el extracto se conservó en un frasco ámbar tapado herméticamente en refrigeración (Anexo 3 y 4).

### **Screening Fitoquímico del extracto etanólico (Trease E, Evans WC. 2002) <sup>29</sup>.**

Se pesaron 100 mg de extracto etanólico total de hojas y flores de “huamanpinta”, para luego disolverlas en el solvente adecuado dependiendo del tipo de identificación fitoquímica y se realizaron las reacciones de identificación de metabolitos secundarios, para reconocer los metabolitos secundarios presentes en el extracto mediante las siguientes reacciones: cambios de coloración o formación de precipitados.

La marcha Fitoquímica se realizó en el Laboratorio de Química General de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” de Ica - Perú.

## **1. Determinación de Saponinas:**

### **Prueba de la espuma:**

A una solución acuosa de la muestra, se le somete a una agitación vigorosa durante 30 segundos. La formación de una espuma estable durante 10 minutos confirma la presencia de saponinas.

## **2. Determinación de Flavonoides:**

### **Reacción de Shinoda:**

En un tubo de ensayo colocamos 5 mg de la muestra y le añadimos 3 gotas del ácido clorhídrico concentrado y limaduras de magnesio metálico. Si se observa un intenso burbujeo y coloración rojo o naranja, de color intenso luego de 10 minutos indica la presencia de flavonoides.

## **3. Determinación de Compuestos Fenólicos:**

### **Reacción con Cloruro Férrico ( $\text{FeCl}_3$ )**

A 5mg de muestra se le agrega 5 gotas del reactivo, instantáneamente la solución debe tomar un color verde oscuro casi negro, lo que indica la presencia de compuestos fenólicos.

#### **4. Determinación de Taninos**

##### **Reacción de la Gelatina**

A 5mg de la muestra se le agregó 5 gotas del reactivo de la gelatina al 0,1 %; en un principio si se observa una sustancia en forma de nube en la solución y luego queda en el fondo un precipitado color blanco, confirma la presencia de taninos.

#### **5. Determinación de Alcaloides**

##### **Reacción de Dragendorff**

A 5 mg de la muestra se le adicionó 5 gotas del reactivo a una solución acida alcaloide se observa la aparición de un precipitado que fue del color anaranjado, que confirma la presencia de alcaloides.

##### **Reacción de Mayer**

A 5 mg de la muestra se adicionó un exceso del reactivo, si se observa la aparición de un precipitado blanco, confirma la presencia de alcaloides.

##### **Reacción de Wagner**

A 5 mg de la muestra se adicionó 5 gotas del reactivo si se observa la formación de un precipitado marón, confirma la presencia de alcaloides.

## **6. Determinación de Quinonas**

### **Reacción de Bornträger**

A 5 mg de la muestra se le adicionó 5 gotas del reactivo si se observa la formación de un precipitado pardo negruzco, confirma la presencia del metabolito.

## **7. Determinación de triterpeno y/o esteroides**

### **Reacción de Lieberman-Burchard**

A 5 mg de la muestra se adicionó 5 gotas del reactivo si se observa que la muestra se torna de un color azul, se confirma la presencia del metabolito.

## **8. Determinación de los grupos Aminos Libres**

### **Reacción de la Ninhidrina**

A 5 mg de la muestra se adicionó 5 gotas del reactivo si se observa que la muestra se torna de un color azul, este indica la presencia del metabolito.

### **2.2.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS <sup>30</sup>**

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por García et al. (2012), para la determinación de Compuestos Fenólicos presentes en el extracto etanólico de hojas y flores.

El Reactivo Folin-Ciocalteu el cual es una mezcla de ácido fosfotúngstico  $H_3PW_{12}O_{10}$  y ácido fosfomolibdico  $H_3PMo_{12}O_{14}$ . Se

produce una reacción óxido-reducción entre el reactivo de Folin-Ciocalteu (se reduce) y los polifenoles (se oxidan).

Estos compuestos se reducen al interactuar con los compuestos fenólicos dando origen a óxidos de coloración azul (óxidos de wolframio y molibdeno), los cuales exhiben una amplia absorción de luz, con un máximo a 760 nm.

Se utilizó también carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20% y una solución stock de ácido gálico 400 ug/mL.

#### **a) Preparación de los reactivos:**

**Reactivo de Folin Ciocalteu (FC):** Diluir 1/3 en agua para la reacción.

**Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20%:** Se tomó 4g de carbonato de sodio y se diluyó en 20 mL de agua destilada.

**Solución stock de ácido gálico (AG) 400 ug/mL:** Se tomó 4mg de ácido gálico y se diluyó en 10mL de agua destilada.

#### **b) Preparación del estándar de polifenoles: ácido gálico 100 ug/mL**

Se tomó 2mL de la solución de **ácido gálico (400 ug/mL)** y se diluyó en 8mL de agua destilada, para obtener la concentración de **ácido gálico de 100ug/mL**. Luego se procedió a seguir los pasos de la tabla 1.

**Tabla 01.- Preparación del estándar de polifenoles.**

<b>Tubo</b>	<b>Acido gálico (100 ug/mL) uL</b>	<b>Agua destilada uL</b>	<b>Volumen final uL</b>	<b>CC (ug/mL)</b>
1	100	900	1000	10
2	300	700	1000	30
3	500	500	1000	50
4	750	250	1000	75

**Fuente: Datos de los autores.**

### **c) Reacciones**

#### **Reacción para el Ácido gálico:**

- Se tomó 300  $\mu$ L de cada uno de los tubos de ensayo que contenían el estándar de ácido gálico obtenido en el paso anterior, con la ayuda de la micropipeta se colocó de forma ordenada en 4 tubos de ensayo rotulados.
- Luego a los 4 tubos que contenían los 300uL del estándar se adicionó 450 uL del reactivo de Foiln diluido y se dejó reposar en oscuridad por 5 minutos.
- Se le adicionó 450uL de carbonato de sodio a cada uno de los 4 tubos de ensayo y finalmente se le adicionó 1800 uL de agua destilada y se llevó a reposar en un ambiente oscuro por 30 minutos, para después de ese tiempo ser llevado al espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

Tabla 02. Batería de reacción final del estándar de polifenoles.

Tubo	Ácido gálico (100 ug/mL) $\mu$ L	Reactivo de Folin ( $\mu$ L)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 20% ( $\mu$ L)	Agua destilada ( $\mu$ L)	VF (mL)	CF (ug/mL)
0	-	450	450	2100	3	0
1	300	450	450	1800	3	1
2	300	450	450	1800	3	3
3	300	450	450	1800	3	5
4	300	450	450	1800	3	7,5

VF: volumen final, CF: concentración final.

Fuente: Datos de los autores.

#### d) Preparación de la muestra:

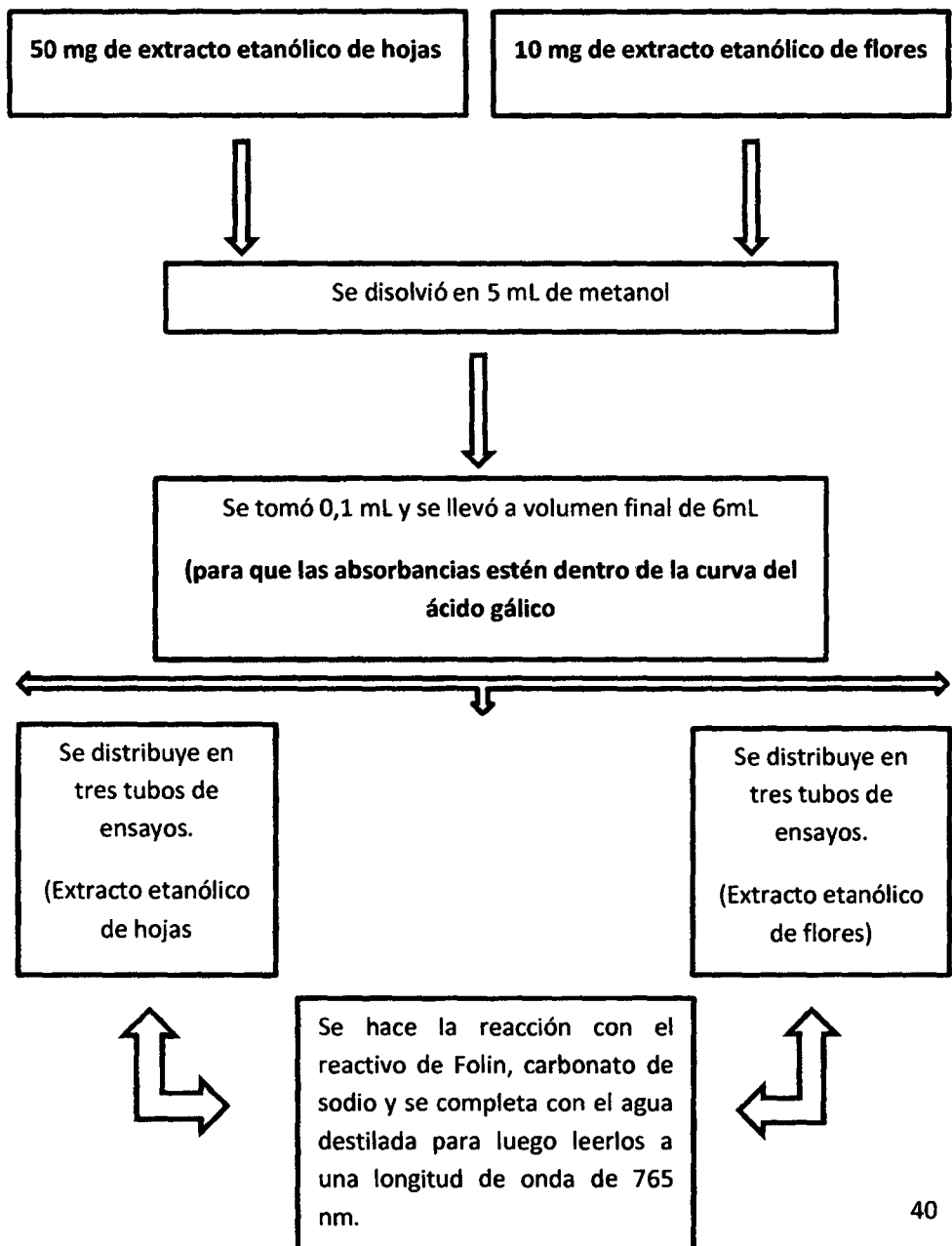
**Solución madre del extracto etanólico de hojas y flores:** Se pesó 50,0 mg del extracto seco de hojas y 10,0 mg del extracto etanólico de flores de *Chuquiraga spinosa* "huamanpinta. Se diluyó en 5 mL de metanol.

**Dilución de la muestra madre del extracto etanólico de hojas y flores:** Se tomó 0,1 mL de la solución madre diluida en metanol y se le agregó 5,9 ml de agua destilada.

Luego se procedió a realizar las reacciones:

- Se tomó 300uL de la muestra diluida y se colocó en 3 tubos de ensayo respectivamente.
- Luego se adicionó 450uL del reactivo de Folin a cada uno de los tubos de ensayo, se dejó reposar en oscuridad por 5 minutos.

- Luego se adicionó 450uL del reactivo de Folin a cada uno de los tubos de ensayo, se dejó reposar en oscuridad por 5 minutos.
- Se adicionó 450 uL de carbonato de sodio a cada tubo de ensayo, y finalmente se le adicionó 1800 uL de agua destilada.
- Se dejó reposar 30 minutos en oscuridad, para ser llevado al espectrofotómetro para leerlo a una longitud de onda de 760 nm.



## **2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO.**

### **2.3.1. Método de inhibición frente al radical libre 1,1-Difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) con modificaciones<sup>31</sup>.**

El método empleado en este trabajo es el propuesto por Brand-Williams *et al*, 1995; con algunas modificaciones. Dicho radical tiene un electrón desapareado y presenta un color violeta el cual cambia a amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante, por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH, ésta reacción se midió con la ayuda de un espectrofotómetro UV/VIS.

Se encuentra expresado como IC<sub>50</sub> (µg de extracto etanólico /mL). Este valor corresponde a la concentración del extracto que reduce en un 50% la absorbancia de una solución metanólica de DPPH a 517 nm con una absorbancia inicial de 0,600.

Se usó como estándar el reactivo TROLOX (6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetramethylchroman-2carboxylic acid) para obtener la capacidad antioxidante equivalente a TROLOX.

#### **Preparación de las soluciones:**

##### **a) Preparación del radical DPPH:**

Se preparó una solución a 0,1 mM de DPPH, pesando 2,2 mg de DPPH, en un matraz aforado previamente tarado y se disolvió en 100 mL de etanol, luego se llevó a comprobar que la absorbancia a 517

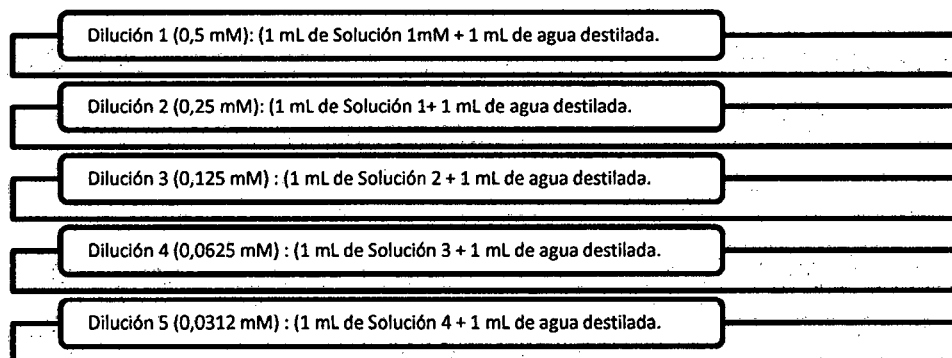
nm esté entre 0,6 y 0.7. El matraz aforado se cubrió con papel de aluminio para la protección frente a la luz.

**b) Preparación del Trolox:**

Se preparó una solución stock 1 mM, para ello se pesó 2.4 mg ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97% (Trolox), se disolvió en 1000uL de etanol y se le agregó 9000 uL de agua destilada.

**c) Reacción del Trolox para establecer la curva de calibración:**

De la solución preparada de Trolox se prepararon 5 diluciones en tubos de ensayo por triplicado según el diagrama1, respectivamente por cada uno de las concentraciones, para ello se hizo reaccionar 300 uL de trolox y 2700 uL de DPPH. Se mantuvo en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, para después realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.



**Diagrama 1. Dilución del estándar de trolox.**

**Tabla 03. Concentraciones finales del estándar de trolox en la reacción**

TUBO	CC de trolox (mM)	Volumen de trolox uL	Volumen de DPPH uL	CF (mM)	CF ( $\mu$ M)
1	0.5	300	2700	0.05	50
2	0.25	300	2700	0.025	25
3	0.125	300	2700	0.0125	12.5
4	0.0625	300	2700	0.00625	6.25
5	0.03125	300	2700	0.003125	3.125

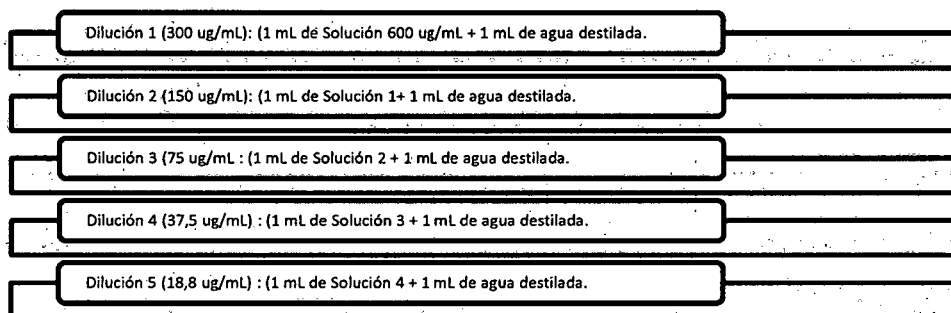
VF: volumen final, CF: concentración final.

Fuente: Datos de los autores.

**a) Reacción de la muestra:**

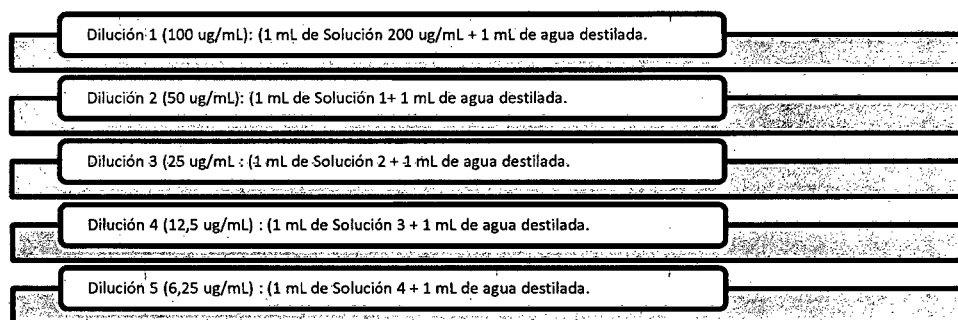
**Determinación de la CI50:**

- ❖ **Extracto etanólico de hojas:** Se pesó 6 mg de extracto etanólico seco de hojas *Chuquiraga spinosa* "huamanpinta" y se diluyó en 10 mL de metanol (600 ug/mL)



**Diagrama 2. Dilución del extracto etanólico de hojas.**

- ❖ **Extracto etanólico de flores:** Se pesó 2 mg de extracto etanólico seco de flores de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” y se diluyó en 10 mL de metanol (200 ug/mL)



**Diagrama 3. Dilución del extracto etanólico de flores.**

Se tomó 300 uL de muestra de cada uno de los diferentes extractos y se hizo reaccionar con 2700 uL de DPPH.

Se mantuvo en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, para después realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

**Tabla 04. Batería de reacción del extracto etanólico de hojas de huamanpinta**

TUBO	Muestra uL	DPPH uL	VF mL	CC de muestra ug/mL	CF en tubo ug/mL
1	300	2700	3	300	30
2	300	2700	3	150	15
3	300	2700	3	75	7.5
4	300	2700	3	37.5	3.75
5	300	2700	3	18.75	1.875
6	300	2700	3	0	0

VF: volumen final, CF: concentración final.

Fuente: Datos de los autores.

**Tabla 05. Batería de reacción del extracto etanólico de flores de huamanpinta.**

TUBO	Muestra uL	DPPH uL	VF mL	CC de muestra ug/mL	CF en tubo ug/mL
1	300	2700	3	100	10
2	300	2700	3	50	5
3	300	2700	3	25	2.5
4	300	2700	3	12.5	1.25
5	300	2700	3	6.25	0.625
6	300	2700	3	0	0

VF: volumen final, CF: concentración final.

Fuente: Datos de los autores.

### **2.3.2 Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS) <sup>32</sup>.**

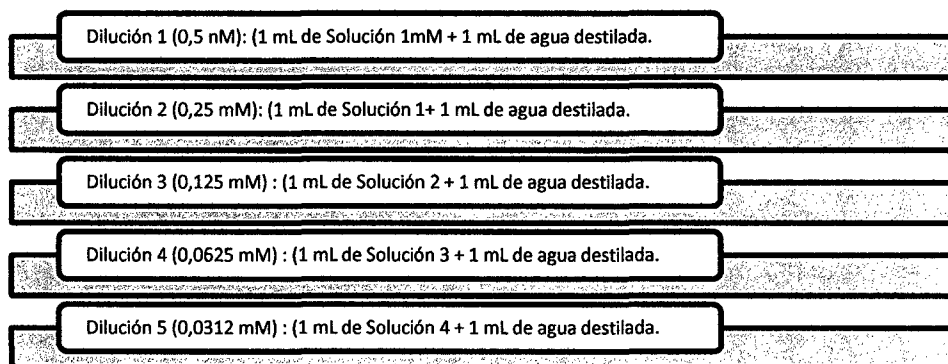
En este método, la generación del radical ABTS• se produce por medio químico mediante la adición de persulfato de potasio antes de la adición de la muestra, lo que evita que los componentes de la misma pueda reaccionar con el reactivo, otra ventaja es que se trabaja a pH fisiológico (pH = 7,1), a una temperatura de 37 °C simulando las condiciones fisiológicas.

Para comenzar el análisis es necesario preparar el reactivo de trabajo el cual debe tener una concentración de ABTS• de 7 mM y se procede de la siguiente manera:

Se pesan 0,0154 g de la sal amónica cristalizada de ABTS y se disuelve en 4 mL de agua ultra pura, luego se adiciona 0,0027 g de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) y se deja agitando por espacio de media hora envuelta en papel aluminio protegido de la luz, durante 12 a 18 horas. Transcurrido el tiempo correspondiente se toma una alícuota de 1 mL y se adiciona 70 mL de agua destilada y se mide la absorbancia a 734 nm la absorbancia el cual debe estar entre  $0,7 \pm 0,02$ .

#### **Reacciones:**

**A) Reacción del estándar trolox con el radical ABTS:** De la solución preparada de Trolox 1 mM se preparó en tubos de ensayo una serie de diluciones según se detalla a continuación:



**Diagrama 4. Dilución del estándar de trolox para el ensayo ABTS.**

**Tabla 06. Batería de reacción del trolox frente al radical ABTS**

TUBO	CC de trolox (mM)	TROLOX (uL)	ABTS (uL)	VF uL	CF en tubo (mM)	CF en tubo (uM)
1	0.5	100	1900	2000	0.025	25
2	0.25	100	1900	2000	0.0125	12.5
3	0.125	100	1900	2000	0.00625	6.25
4	0.0625	100	1900	2000	0.003125	3.12
5	0.03125	100	1900	2000	0.001563	1.5
6	0	100	1900	2000	0	0

**VF: volumen final, CF: concentración final.**

**Fuente: Datos de los autores.**

**B) Reacción de la muestra:** El extracto etanólico de hojas y flores fueron diluidas en metanol y se procedió a realizar la reacción por triplicado, leyendo a una longitud de onda de 734 nm y se determinó la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC-ABTS)

**Tabla 07. Batería de reacción del extracto etanólico de hojas y flores frente al radical ABTS**

Batería de reacción del extracto etanólico de hojas y flores de huamanpinta			
TUBO	Muestra uL	ABTS uL	Volumen final mL
1	300	2700	3
2	300	2700	3
3	300	2700	3

**VF: volumen final, CF: concentración final.**

**Fuente: Datos de los autores.**

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO

##### 3.1.2 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO DE LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

El porcentaje de rendimiento del extracto etanólico seco de hojas (%EES) fue de 10%. Este resultado fue obtenido con la siguiente expresión:

$$\%EES = \frac{\text{Peso final del extracto seco}}{\text{Peso inicial de la muestra seca}} \times 100$$

$$\%EES = \frac{50\text{g}}{500\text{g}} \times 100$$

$$\%EES_{\text{hojas}} = 10\%$$

El porcentaje de rendimiento del extracto etanólico seco de flores (%EES) fue de 8,8%. Este resultado fue obtenido con la siguiente expresión:

$$\%EES = \frac{\text{Peso final del extracto seco}}{\text{Peso inicial de la muestra seca}} \times 100$$

$$\%EES = \frac{22 \text{ g}}{250 \text{ g}} \times 100$$

$$\%EES_{\text{flores}} = 8,8 \%$$

### 3.1.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Tabla 08. Prueba preliminar cualitativa de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de hojas *Chuquiraga spinosa* Less. "huamanpinta"

Prueba de caracterización	Resultado	Metabolito secundario
Reacción de la NINHIDRINA	(+)	Grupos aminos libres
Reacción de la GELATINA	(+)	Taninos
Reacción con CLORURO FÉRICO (FeCl <sub>3</sub> )	(+)	Compuestos Fenólicos
Reacción de DRAGENDÖRFF	(+)	Alcaloides
Reacción de WAGNER	(+)	Alcaloides
Reacción MAYER	(+)	Alcaloides
Reacción de SHINODA	(+)	Flavonoides
Reacción de BORNTRAGER	(-)	Quinonas
Reacción de LIEBERMAN-BURCHARD	(+)	Triterpeno y/o esteroides
Prueba de la ESPUMA	(-)	Saponinas

(-) = Ausencia; (+) = Presencia

Fuente: Datos de los autores.

Tabla 09. Prueba preliminar cualitativa de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de flores de *Chuquiraga spinosa* Less "humanpinta".

Prueba de caracterización	Resultado	Metabolito secundario
Reacción de la NINHIDRINA	(+)	Grupos aminos libres
Reacción de la GELATINA	(+)	Taninos
Reacción con CLORURO FÉRICO (FeCl <sub>3</sub> )	(+)	Compuestos Fenólicos
Reacción de DRAGENDORFF	(+)	Alcaloides
Reacción de WAGNER	(+)	Alcaloides
Reacción MAYER	(+)	Alcaloides
Reacción de SHINODA	(+)	Flavonoides
Reacción de BORNTRAGER	(-)	Quinonas
Reacción de LIEBERMAN-BURCHARD	(+)	Triterpeno y/o esteroides
Prueba de la ESPUMA	(-)	Saponinas

(-) = Ausencia; (+) = Presencia

Fuente: Datos de los autores.

### 3.2 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES PRESENTES EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS Y FLORES *Chuquiraga spinosa* Less "humanpinta".

Desarrollo de la curva de calibración con el ácido gálico:

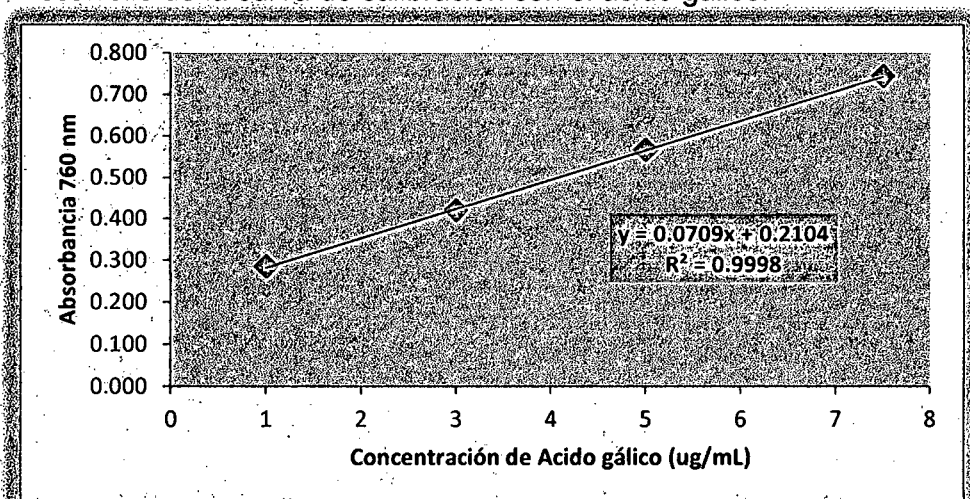


Figura 08. Curva de calibración del ácido gálico (AG)

Tabla 10. Determinación del contenido de polifenoles totales en el extracto etanólico de hojas de *Chuquiraga spinosa* Less. "huamanpinta".

Ecuación de la recta del estándar ácido gálico: $y = 0,0709X + 0,2104$			
Peso de muestra	50 mg		
Absorbancia de la muestra	0,510	0,525	0,515
Factor de dilución (FD)	60	60	60
ug EAG	4,22	4,43	4,30
ug EAG X FD	253,2	265,8	258,0
(ug EAG X FD)/1000	0,2532	0,2658	0,258
mg de extracto /mL	5 mg/mL	5mg/mL	5 mg/mL
mgEAG /g extracto	50,64	53,16	51,60
mgEAG/g extracto	51,8 ±1,27		

Fórmula:  $[[[ABS - 0,2104 / 0,0709] \times FD] / 1000] / 5mg/mL \times 1000$

mgEAG/g de extracto: miligramos equivalentes al ácido gálico por gramo de extracto.

Fuente: Datos de los autores.

**Tabla 11. Determinación del contenido de polifenoles totales en el extracto etanólico de flores de *Chuquiraga spinosa* Less.**

<b>Ecuación de la recta del estándar ácido gálico: <math>y = 0.0709X + 0.2104</math></b>			
<b>Peso de muestra</b>	10 mg		
<b>Absorbancia de la muestra</b>	0,710	0,715	0,715
<b>Factor de dilución (FD)</b>	60	60	60
<b>ug EAG</b>	7,04	7,11	7,11
<b>ug EAG X FD</b>	704	711	711
<b>(ug EAG X FD)/1000</b>	0,704	0,711	0,711
<b>mg de extracto /mL</b>	2 mg/mL	2 mg/mL	2 mg/mL
<b>mgEAG /g extracto</b>	352	355,5	355,0
<b>mgEAG/g extracto</b>	354,2 ± 1,9		

**Fórmula:  $\left[ \frac{[\text{ABS} - 0,2104 / 0,0709] \times \text{FD}}{1000} \right] / 2\text{mg/mL} \times 1000$**

**mgEAG/g:** miligramos equivalentes al ácido gálico por gramo de extracto.

**Fuente:** Datos de los autores.

### 3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* FRENTE AL RADICAL DPPH DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chuquiraga spinosa* Less “Huamanpinta”.

El extracto etanólico de hojas y flores de *Chuquiraga spinosa* Less “huamanpinta” se determinó mediante el ensayo de captación del radical DPPH según Brand y Williams.

Tabla 12. Absorbancias promedio del trolox frente al radical DPPH				
TUBO	CC de trolox	CF en tubo	CC (μM)	PROM ABS
1	0.5	0.05	50	0.075
2	0.25	0.025	25	0.32
3	0.125	0.0125	12.5	0.45
4	0.0625	0.00625	6.25	0.51
5	0.03125	0.003125	3.125	0.585
6	0	0	0	0.62

V

VF: volumen final, CF: concentración final.

Fuente: Datos de los autores.

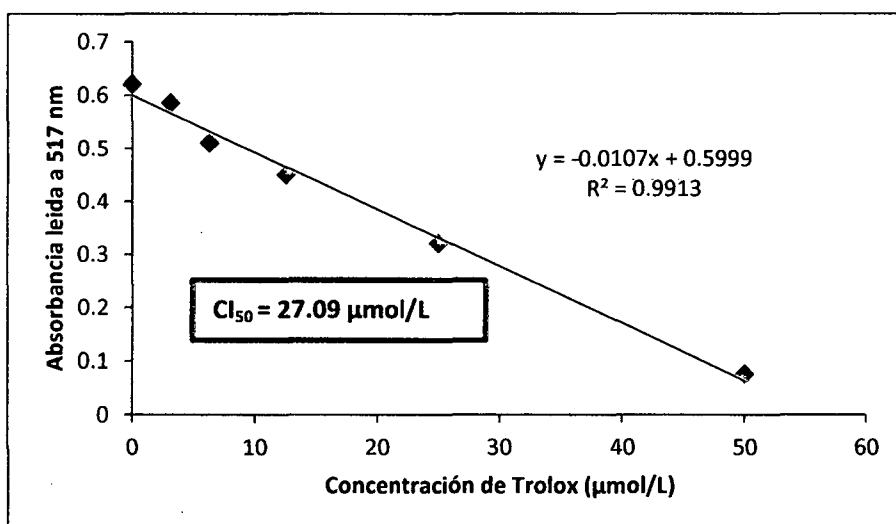
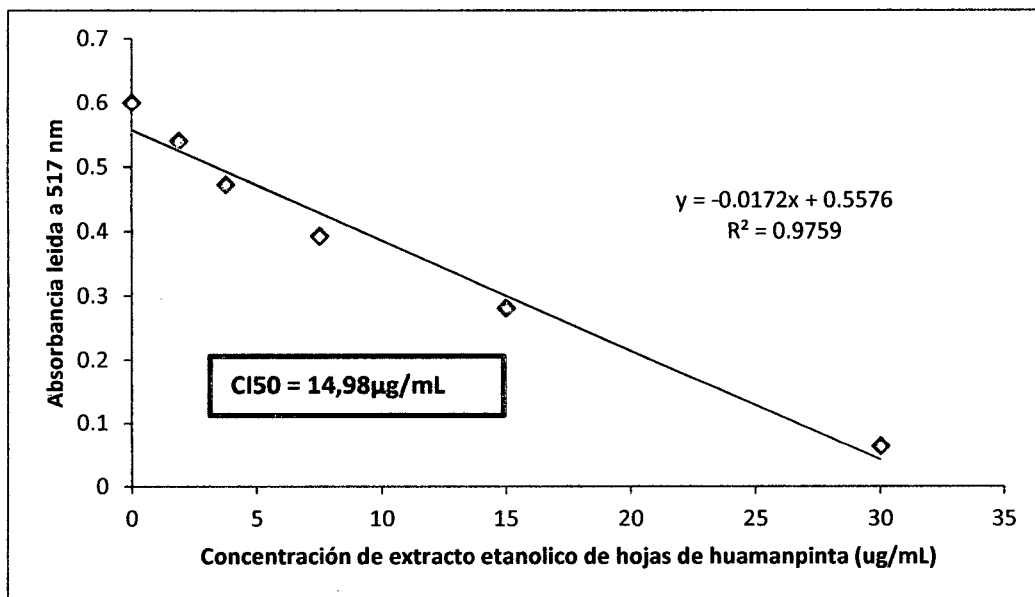


Figura 09. Determinación de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) del Trolox

<b>Tabla 13. Absorbancias promedio del extracto etanólico de hojas de huamanpinta frente al radical DPPH</b>			
<b>TUBO</b>	<b>CF de muestra (µg/mL)</b>	<b>CF en tubo (µg/mL)</b>	<b>PROM ABS</b>
1	300	30	0.063
2	150	15	0.28
3	75	7.5	0.392
4	37.5	3.75	0.472
5	18.75	1.875	0.54
6	0	0	0.6

VF: volumen final, CF: concentración final.

Fuente: Datos de los autores.

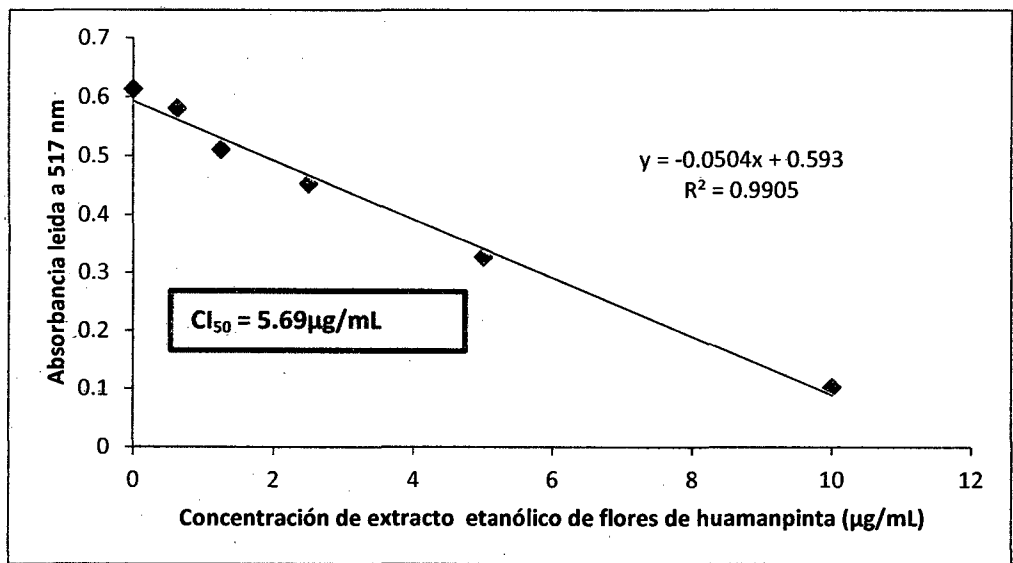


**Figura 10. Determinación de la  $CI_{50}$  del extracto etanólico de hojas de *Chuquiraga spinosa* Less**

**Tabla 14. Absorbancias promedio del extracto etanólico de flores de huampinta frente al radical DPPH**

TUBO	CC de muestra µg/mL	CF en tubo µg/mL	PROM ABS
1	100	10	0.102
2	50	5	0.326
3	25	2.5	0.452
4	12.5	1.25	0.51
5	6.25	0.625	0.58
6	0	0	0.612

VF: volumen final, CF: concentración final.  
Fuente: Datos de los autores.



**Figura 11. Determinación de la  $CI_{50}$  del extracto etanólico de flores Chuquiraga spinosa**

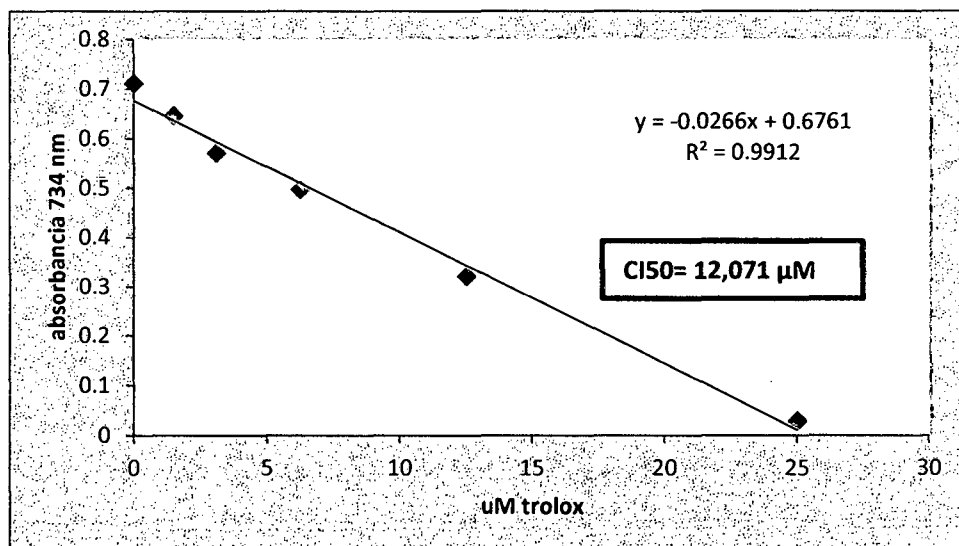
**3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO FRENTE AL RADICAL ABTS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chuquiraga spinosa* Less “Huamanpinta”.**

**Tabla 15. Curva de calibración del estándar trolox frente al radical ABTS**

TUBO	CF de trolox (mM)	CF (μM)	PROM ABS
1	0.025	25	0.028
2	0.0125	12.5	0.32
3	0.00625	6.25	0.496
4	0.003125	3.12	0.57
5	0.001563	1.5	0.645
6	0	0	0.71

VF: volumen final, CF: concentración final.

Fuente: Datos de los autores.



**Figura 12. Determinación de la  $CI_{50}$  del TROLOX frente al radical ABTS**

### 3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE A TROLOX (TEAC- ABTS)

Tabla 16. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC-ABTS) en el extracto etanólico de hojas de *Chuquiraga spinosa* Less.

Ecuación de la recta del estándar trolox: $y = -0,0266x + 0,6761$			
Peso de muestra	30 mg		
Absorbancia de la muestra	0,314	0,316	0,320
Factor de dilución (FD)	5	5	5
$\mu\text{mol/L}$ equivalente a trolox	13,61	13,53	13,38
$\mu\text{mol/L}$ equivalente a trolox X FD	68,06	67,69	66,93
mg de extracto /mL	3 mg/mL	3 mg/mL	3mg/mL
$\mu\text{mol trolox /g}$	22,69	22,56	22,31
$\mu\text{mol trolox /g extracto}$	22,52 $\pm$ 0,19		

Fórmula:  $[[[ABS-0,6761/0,0266] \times FD]] / 3 \text{ mg/mL}]$

Fuente: Datos de los autores.

**Tabla 14. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC-ABTS) en el extracto etanólico de flores de *Chuquiraga spinosa* Less.**

<b>Ecuación de la recta del estándar trolox: <math>y = 0,0266X + 0,6761</math></b>			
<b>Peso de muestra</b>	<b>20 mg</b>		
<b>Absorbancia de la muestra</b>	<b>0,154</b>	<b>0,152</b>	<b>0,160</b>
<b>Factor de dilución (FD)</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b><math>\mu\text{mol/L}</math> equivalente a trolox</b>	<b>19,63</b>	<b>19,70</b>	<b>19,40</b>
<b><math>\mu\text{mol/L}</math> equivalente a trolox X FD</b>	<b>196,28</b>	<b>197,03</b>	<b>194,02</b>
<b>mg de extracto /mL</b>	<b>5 mg/mL</b>	<b>5 mg/mL</b>	<b>5 mg/mL</b>
<b><math>\mu\text{mol trolox /g}</math></b>	<b>39,25</b>	<b>39,40</b>	<b>38,80</b>
<b><math>\mu\text{mol trolox /g de extracto}</math></b>	<b>39,15 <math>\pm</math> 0,31</b>		

**Fórmula:  $\frac{[(ABS - 0,6761) / 0,0266] \times FD}{5 \text{ mg/mL}}$**

**Fuente: Datos de los autores.**

## DISCUSIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se viene utilizando desde hace mucho tiempo. Durante largos períodos, los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales utilizadas para mitigar el dolor y curar enfermedades, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen. Es así que el uso medicinal de las plantas, la fitoterapia, nunca ha dejado de tener vigencia, muchas especies vegetales utilizadas por nuestros antepasados se siguen utilizando hoy en día.

La marcha fitoquímica demostró la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides, en ambos extractos de hojas y flores (**tabla 04 y 05**), varios de estos metabolitos también fueron reportados por Casado et al., (2011)<sup>7</sup> y Torres (2000)<sup>9</sup>, pero en extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa*. Los resultados muestran que son los flavonoides, los triterpenos y esteroides los más abundantes en este extracto y serían los responsables del efecto antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH y ABTS (**Tablas:07, 08, 09,10**).

En el estudio fitoquímico preliminar se ha identificado la presencia de metabolitos secundarios (**ver tabla 03**), tales como compuestos fenólicos y flavonoides principalmente. Se ha demostrado que la familia Asteraceae presenta una composición fenólica variada de acuerdo a las variedades y

procedencia de la especie. La complejidad estructural de los polifenoles varía desde simples moléculas fenólicas (como el ácido gálico) hasta complejos altamente polimerizados, como son los taninos. En nuestro estudio determinamos el contenido de polifenoles totales en hojas ( $51,8 \pm 1,27$  mg EAG/g extracto) y flores ( $354,2 \pm 1,9$  mg EAG/g extracto) y que los resultados obtenidos en el presente trabajo, superan a especies nativas reconocidas como la tara y el camu camu ( $29,5 \pm 0,11$ ;  $11,7 \pm 0,05$  mg EAG/g extracto), respectivamente, así como la *Uncaria tomentosa* (uña de gato), *Zea mays* (maíz morado), *Smallanthus sonchifolius* (yacón), *Lepidium meyenii* (maca), *Krameria triandra* (ratania) y *Physallis peruviana* (aguaymanto)<sup>33</sup>.

Los contenidos de flavonoides, polifenoles son mayores cuando se usa etanol en lugar de metanol como solvente en la extracción; una posible explicación se basa en la diferencia de polaridad de estos solventes.

Los compuestos extraídos por el etanol son ligeramente más polares que los extraídos con el metanol. Entonces se puede inferir que hay flavonoides, polifenoles más polares en flores que en las hojas, lo cual también explicaría una mayor actividad antioxidante en los extractos etanólicos de las flores frente a las hojas<sup>34</sup>.

Entre todas las propiedades biológicas atribuidas a los flavonoides la de mayor interés ha sido su actividad antioxidante. El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen un gran número de métodos para la determinación de extractos con actividad antioxidante. En la determinación de la capacidad antioxidante

del extracto etanólico de hojas y flores de *Chuquiraga spinosa* Less, utilizando el trolox como patrón de comparación se observa que la concentración inhibitoria media frente al radical DPPH es significativamente alta en los dos métodos de evaluación: DPPH ( $CI_{50}$  flores: 5,69 y  $CI_{50}$  hojas: 14,98) y la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC<sub>hojas</sub>:  $22,52 \pm 0,19$   $\mu$ mol trolox /g y TEAC<sub>flores</sub>:  $39,15 \pm 0,31$   $\mu$ mol trolox /g)

Al presente no hay antecedentes de otros estudios realizados a las hojas y flores de *Chuquiraga spinosa*, por lo que nuestros hallazgos son importantes para contribuir a la investigación de esta especie promisoría.

Siendo los flavonoides responsables de la actividad antioxidante, estos interfieren en las reacciones de propagación del radical libre y en la formación del radical en sí. La posible explicación de la actividad antioxidante de ambos extractos se debería a los diferentes tipos de flavonoides presentes en su composición fitoquímica no elucidada en el presente estudio pero que las diferentes sustituciones como la posición del grupo OH en el anillo B; en particular, una estructura orto-dihidroxilo (grupo catecol) produce una elevada actividad, ya que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; actuando además como sitio de fijación preferida para trazas de metales. La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B (grupo pirogalol) ha sido reportada por incrementar la actividad antioxidante, en comparación con la de flavonoides que contienen un simple grupo hidroxilo. Sin embargo, bajo las mismas condiciones, tales compuestos pueden actuar como prooxidantes, neutralizando el efecto

antioxidante<sup>36</sup>. Un doble enlace entre los carbonos C-2 y C-3, conjugado con el grupo 4-oxo, en el anillo C, la presencia adicional de grupos hidroxilo en posición C-3 y C-5 incrementa la capacidad captadora de radicales de los flavonoides. Un doble enlace entre C-2 y C-3, combinado con un 3-OH, en el anillo C, incrementa también la capacidad captadora de radicales libres, como es el caso del canferol. Una sustitución del grupo 3-OH produce un incremento del ángulo de torsión y una pérdida de coplanaridad y, subsecuentemente, una reducción de la actividad antioxidante. La sustitución de grupos hidroxilo en el anillo B por grupos metoxilos altera el potencial redox y la capacidad captadora de radicales de los flavonoides. Grupos 3-OH y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C son necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante<sup>37</sup>.

La eficiencia antioxidante está directamente relacionada con el grado de hidroxilación, pero este disminuye con la presencia de un enlace de azúcar.

Los resultados presentados en este trabajo se encuentran en concordancia con los presentados por Ramírez et al (2014)<sup>38</sup> en cuanto al contenido de polifenoles, y sugieren que los compuestos fenólicos de las Asteraceae, en particular de los extractos etanólicos aquí estudiados en *Chuquiraga spinosa*, pueden ser utilizados como antioxidantes naturales en la dieta. En vista de las valiosas propiedades medicinales de la huamanpinta.

En los últimos años han sido descritas numerosas propiedades de estos compuestos, como la posibilidad de inhibir el ciclo celular, la proliferación celular y el estrés oxidativo, y de inducir la detoxificación de enzimas, la

apoptosis, y de estimular el sistema inmune <sup>39,40</sup>. Las actividades antioxidantes y anticarcinogénica de los polifenoles de la dieta han sido ampliamente estudiadas en diferentes líneas celulares y en animales de experimentación. Además, diversos estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre el consumo de alimentos y bebidas ricos en polifenoles y la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer.

## CONCLUSIONES

1. Se identificaron los siguientes metabolitos secundarios en hojas y flores de *Chuquiraga spinosa* Less: flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides, taninos, y compuestos fenólicos.
2. El contenido de compuestos fenólicos es mayor en el extracto etanólico de flores en comparación al extracto etanólico de hojas teniendo:  $354,2 \pm 1,9$  mgEAG/g y  $51,8 \pm 1,27$  mgEAG/g extracto respectivamente.
3. Los extractos etanólicos de hojas y de flores presentaron buena actividad antioxidante frente a dos radicales evaluados; la actividad antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH tuvo una  $CI_{50}$  para el extracto etanólico de flores:  $5,69 \mu\text{g/mL}$  y  $CI_{50}$  para el extracto etanólico de hojas:  $14,98 \mu\text{g/mL}$ ; mientras que el TEAC-ABTS fue: TEAC-hojas:  $22,52 \pm 0,19 \mu\text{mol trolox /g}$  de extracto y TEAC flores:  $39,15 \pm 0,31 \mu\text{mol trolox /g}$  de extracto.
4. El extracto con mayor contenido de polifenoles fue el extracto etanólico de flores de *Chuquiraga spinosa* "huamanpinta", teniendo una actividad antioxidante frente al radical DPPH y ABTS directamente proporcional a la cantidad de polifenoles totales determinados en el presente estudio.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar otros estudios químicos que permitan separar y caracterizar la estructura química de los otros metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Chuquiraga spinosa* Less "huamanpinta".
2. Determinar el contenido de polifenoles totales por técnicas cromatográficas como el HPLC.
3. Realizar otros estudios sobre la actividad antioxidante in vivo empleando otros modelos experimentales.
4. Realizar estudios que propongan su conservación, propagación y uso racional, ya que esta especie es considerada como un recurso natural muy promisorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li E. El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los andes. Estado del arte del sector de plantas medicinales en Perú. Ministerio de la Producción. 2008.
2. Montealegre P, Francis L. Actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms en un modelo de inflamación intestinal agudo en ratas. Rev Cubana Plan Med. 2012; 17(4): 343-359.
3. Liu MNJ, Wang C, Wang Z, Zhang C, Lu S, Liu J, The antioxidant and free radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. Food Chem. 2011; 126, 261–269.
4. Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey [J]. Food Chem, 2010, 119: 114-122.
5. Agapito T, Sung I. Fitomedicina: 1100 plantas medicinales (Text in Spanish). Lima, Peru: Edit. Isabel. 2002.
6. Brack, A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Peru (Text in Spanish).CBC–Centro de Estudios Regionales Andinos «Bartolomé de las Casas». Peru: Cuzco. 1999
7. Casado R, Landa A, Calvo J, Garcia-Mina J, Marston A, Hostettmann K, Calvo M. Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. Biol. Pharm. 2011; 49 (6): 620-6.

8. Chávez H, Molina A, Ramos R, Ferreyra C, Revatta L. Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios bioactivos de *Chuquiraga spinosa* "huamanpinta". I Congreso Internacional y III Congreso Nacional de investigación científica tecnológica. Libro de resúmenes. Ica-Perú. 2011.
9. Torres M. Actividad antiinflamatoria prostática del extracto atomizado de la especie *Chuquiraga spinosa lessing* "qarisirwi" en *Canis familiares*. Tesis de Químico Farmacéutico. Ayacucho-Perú. 2004.
10. Contreras C. Tamizaje fitoquímico y evaluación de los extractos bencénico, alcohólico y acuoso de las hojas de *Chuquiraga spinosa Lessing* "jarisirwi". Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga-Ayacucho. 2003.
11. Arenas, J. Marcha Fitoquímica y Efecto Diurético de *Chuquiraga spinosa* (Asteraceae) en *Cavia porcellus* (cobayos). Universidad Nacional San Agustín. Arequipa-Perú. 2000.
12. Sotelo, C. Atividade antiinflamatória da *Chuquiraga spinosa* subsp. "huamanpinta" em ratos e camundongos. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Teses de Mestre em Ciências. 1998.
13. Kapoor M, Clarkson A, Sutherland B, et al. The role of antioxidants in models of inflammation: Emphasis on L-arginine and arachidonic acid metabolism. *Inflammopharmacology*. 2005; 12(5-6): 505-519.
14. Arroyo J, Cisneros C. Modelos experimentales de Investigación Farmacológica. Facultad Medicina Humana. UNMSM. 2012.

15. Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J. Manual de Modelos Experimentales de Farmacología. Facultad Medicina Humana. UNMSM. 2004.
16. Gómez H, González K, Medina D. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. Santiago, Chile. 2011; 10(3): 182-217.
17. Katzung B, Masters S, Trevor A. Farmacología básica y clínica. 11va edición. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. China. 2010.
18. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman y Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 9ma. Edición. México. 1996.
19. Newman D, Cragg G, Snader K. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. J Nat Prod. 2003; 66: 1022 -1037.
20. Pichardo N, Teo A. Actividad Inmunomoduladora de Especies Cultivadas Nativas de Mesoamérica (*P. alliacea* L y *S. domingensis* Willd). Tesis de Química Bióloga. Facultad de ciencias Químicas y Farmacia. Universidad San Carlos de Guatemala. 2010.
21. Sánchez C, Gupta M, Santana A. Actividad Inmunomoduladora de plantas. Revista de Fitoterapia. 2002; 2(2): 151-163.
22. Fabri R, Nogueira M, Dutra L, Bouzada M, Scio E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de especies da família Asteraceae. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu. 2011; 13 (2):183-189.
23. León F, Cabieses F. Efecto Antiinflamatorio de la *Uncaria tomentosa* "uña de gato". Odontología Sanmarquina. 2000; 1(6): 66-68.

24. Amir Jhorfran Z, Azadbacht H, Karimi M. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 72: 167-172.
25. Sreejayan MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J.Pharm.Pharmacol*. 1997; 49: 105-107.
26. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J. Nutr*. 1986; 44: 307-315.
27. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996; 239:70–6.
28. Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. *Braz.J.med.Biol.Res*. 2002; 35(5):523-534.
29. Trease E, Evans WC. *Pharmacognosy*. 15th ed. San Diego, CA: Harcourt Publishers Limited; 2002:343–545..
30. Villanueva- Tiburcio, Condezo-Hoyos, L.; Asquiere, E. Antocianina, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante en la cascara de Camu camu (*Myrciaria dubia*(H.B.K) Mc Vaugh. *Revista Ciencia y Tecnología de alimentos*. 30(supl.1)151-160. Campinas. Brazil. 2010.
31. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technolog*. 1995; 28 (1): 25 -30.
32. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M,

- et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 2003; 133: 2812–9.
33. Soares JR, Dinis TCP, Cunha AP, Ameida LM. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Rad. Res.* 1997; 26: 469-478.
34. Duh PD, Tu YY, Yen GC. Antioxidant activity of water extract of harnng jyr (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm.-Wiss.u-Technol.* 1999; 32: 269-277.
35. Halliwell B, Gutteridge JMC. In: Free radicals, ageing and disease. *Free radicals in Biology and Medicine.* 1985; 2nd edition. Clarendon Press. Oxford. 279-315.
36. Marletta MA. Nitric oxide: Biosynthesis and biological significance. *Trends Biol.Sci.* 1989; 14: 488-492.
37. Shimazaki H. Antioxidants. In: Niki E, Shimazaki, H, Mino, M (eds), *Free radicals and biological defense.* 1994; Japanese Science Societies Press. Tokyo. 45-57.
38. Ramírez R. Capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de Chuquiraga Less "huamanpinta". [Tesis para obtener el grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2014.
39. Lin JM, Lin CC, Chen MF. Scavenging effects of *Mallotus repandus* on active oxygen species. *J. Ethnopharmacol.* 1995;46:175-181.
40. Houghton PJ. Pharmacognosy: the basis for quality herbal medicinal products. *Pharm. News.* 1999; 6(4): 21-27

# ANEXOS

## ANEXO N° 01

### CLASIFICACION TAXONÓMICA VEGETAL DE LA HUAMANPINTA



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



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

#### CONSTANCIA N° 222 -USM-2014

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 (tallo, hoja y flor), recibida de los alumnos **Miguel Jesús SÁNCHEZ LLAMOSA** y **Nataly Esther ANICAMA PARIONA** ha sido estudiada y clasificada como: *Chuquiraga spinosa* Less. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: ASTERALES**

**FAMILIA: ASTERACEAE**

**GENERO: *Chuquiraga***

**ESPECIE: *Chuquiraga spinosa* Less.**

Nombre vulgar: "huamanpinta"  
Determinado por: Mag. Hamilton Beltrán.

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

Fecha, 01 de Julio 2014



*Haydee Montoya Terreros*  
Dra. **HAYDEE MONTOYA TERREROS**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

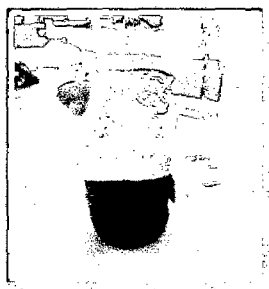
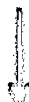
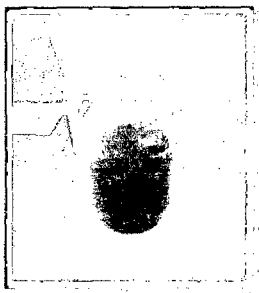
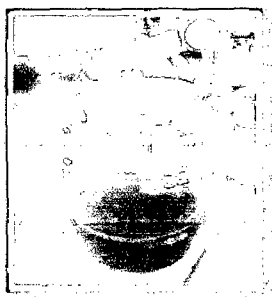
## ANEXO N° 02

Obtención del extracto etanólico de *Chuquiraga spinosa* Less (Huamanpinta).

Obtención de la planta

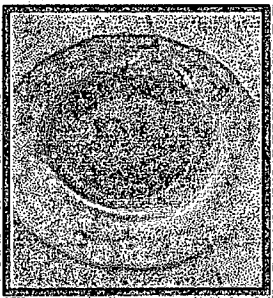
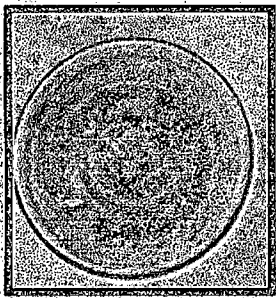
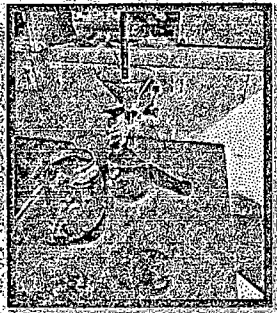
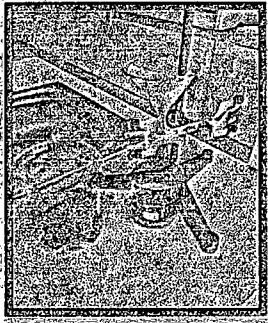


Maceración



Humectación de hojas y flores de huamanpinta, con etanol. Previamente protegido de la luz.

Filtración



Extracto etanólico seco de Hojas

Extracto etanólico seco de Flores

Después del filtrado, este se guarda en unos envases, y se protege de la luz, con papel aluminio.

Extracto

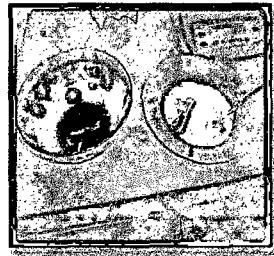
### ANEXO N°03

#### Evaluación de la cuantificación de polifenoles totales presentes en el extracto etanólico de *Chuquiraga spinosa* Less (Huamanpinta).

Preparación del reactivo  
Folin ciocalteu.



Preparación de la muestra



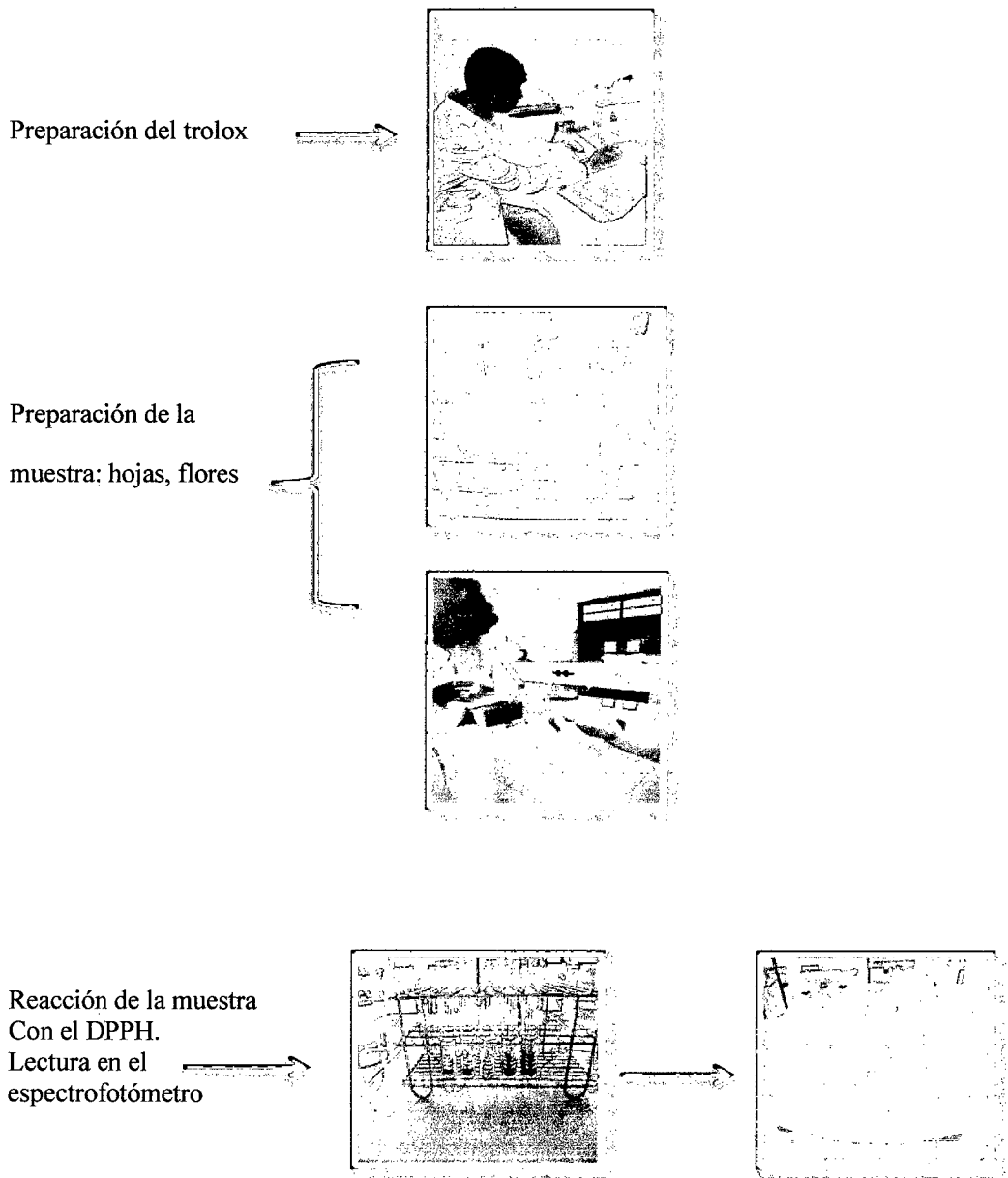
Lectura de las absorbancias  
en el espectrofotómetro



## ANEXO N°04

### Evaluación de la actividad antioxidante in vitro

#### Ensayo del DPPH

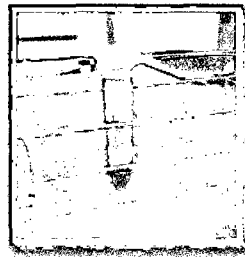
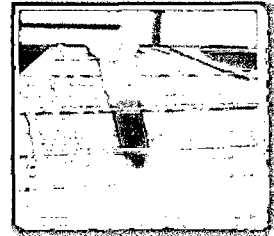


**ANEXO N°05**

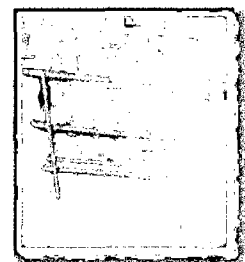
**Ensayo de la actividad antioxidante in vitro**

**Ensayo con el ABTS**

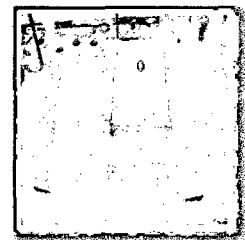
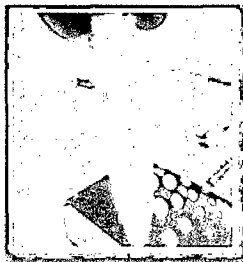
Reacción del ABTS con el persulfato de potasio y formación de un radical libre



Preparación de la muestra: Hojas, flores y reacción Con el radical libre



Las flores contienen mayor cantidad de flavonoides, ya que está en contacto con el reactivo viro a color transparente



# Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica

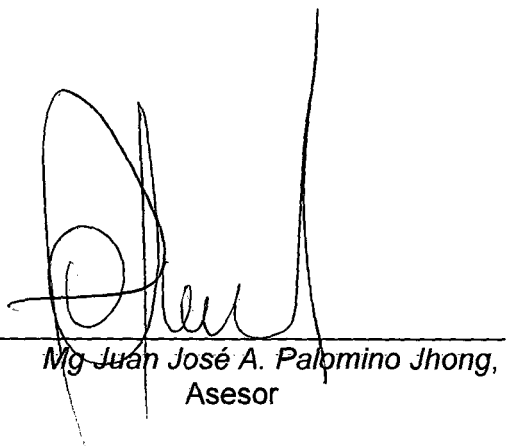
## Facultad de Farmacia y Bioquímica

*El Mg Juan José A. Palomino Jhong, asesor del trabajo de tesis intitulado*  
**"CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**  
**IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS Y FLORES DE**  
***Chuquiraga spinosa* Less. "huamanpinta" presentado por el Bachiller en**  
*Farmacia y Bioquímica.*

Bach. Sánchez Llamosa Miguel Jesús

Bach. Anicama Pariona Nataly Esther

*Certifica mediante la presente que el informe de Tesis correspondiente al*  
*trabajo en mención ha sido revisado y corregido, ante lo cual autoriza la*  
*presentación del mismo a la Comisión de Grados y Títulos de la Facultad de*  
*Farmacia y Bioquímica para su sustentación.*



---

Mg Juan José A. Palomino Jhong,  
Asesor

14 de Agosto del 2015

# Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica

## Facultad de Farmacia y Bioquímica

*El Mag OSCAR HERRERA CALDERON, co- asesor del trabajo de tesis in intitulado "CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS Y FLORES DE *Chuquiraga spinosa* Less."huamanpinta", presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica.*

Bach. Sánchez Llamosa Miguel Jesús

Bach. Anicama Pariona Nataly Esther

*Certifica mediante la presente que el informe de Tesis correspondiente al trabajo en mención ha sido revisado y corregido, ante lo cual autoriza la presentación del mismo a la Comisión de Grados y Títulos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica para su sustentación.*

14 de Agosto del 2015

  
Mg. Oscar Herrera Calderón  
Co - Asesor