



Universidad Nacional

SAN LUIS GONZAGA



[Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



ESTUDIO FITOQUIMICO DE POLIFENOLES TOTALES Y
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR TRES
DIFERENTES METODOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS PARTES
AÉREAS DE *Senecio nutans* "CHACHACOMA"

AUTOR

HUAMANI ANCASI CRISTHIAN ARTURO

ICA - PERU

2020

DEDICATORIA

A Dios por darme vida, salud y sabiduría. A mis padres Arturo y Luz, por ser los principales promotores de mis sueños, por su apoyo incondicional en cada área de mi vida y a toda mi familia en general

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a Dios por estar siempre presente en esta etapa de mi vida.

A los doctores de análisis instrumental especialmente al Dr. Felipe Surco Laos, quien me apoyo durante todo este proceso quien con su enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo, de igual manera mis agradecimientos a la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”, a toda la Facultad de Farmacia y Bioquímica, a dirección académica quienes me guiaron para la aprobación de este trabajo

ÍNDICE

RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	x
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.1. Descripción de la realidad problemática.....	12
1.2. Formulación del problema	13
1.3. Justificación e importancia.....	14
1.4. Objetivos de la investigación	15
1.5. Hipótesis y Variables.....	16
CAPÍTULO II. BASES TEÓRICAS	19
2.1. Antecedentes de la investigación.....	19
2.2. Marco teórico.....	23
2.3. Marco conceptual.....	28
2.3.1 Extracción.....	28
2.3.2 Screening	28
2.3.3 Metabolitos secundarios.....	29
2.3.4 Actividad antioxidante	29
2.3.5 Especies reactivas de oxígeno.....	30
2.3.6 Métodos para determinar actividad antioxidante	30
CAPÍTULO III. ESTRATEGIAS METODOLOGICAS	32

3.1.	Tipo, Nivel y Diseño de investigación.....	32
3.2.	material de trabajo... ..	33
3.2.1	material de laboratorio, equipos	34
3.2.3.	reactivos	34
3.2.4.	material biológico.....	35
3.3.	población y muestra	35
3.4.	métodos técnicas y procedimientos	35
3.4.1.	análisis químico proximal.....	35
3.4.2.	determinación de grupos funcionales.....	37
3.4.3.	Determinaciones de polifenoles totales.....	40
3.4.4.	Métodos para determinar la actividad antioxidante.....	41
3.5.	TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE DATOS	43
3.5.1.	recolección de datos analíticos.....	43
3.5.2.	procesamiento de datos.....	43
	CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1.	Resultados.....	45
4.2.	Discusión	58
	CONCLUSIONES	62
	RECOMENDACIONES.....	63
	FUENTES BIBLIOGRÁFICAS	64
	ANEXO	70

RESUMEN

En el Perú existen numerosas especies vegetales empleadas en la medicina popular y que se le atribuyen algunas propiedades medicinales en las diferentes regiones del país, muchas de ellas no comprobadas; en el afán de contribuir a dar el real valor de estas especies el presente estudio tuvo como objetivo realizar un estudio fitoquímico, para determinar el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* proveniente del anexo de Pallca, distrito Chipao, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho, conocida comúnmente como “chachacoma”.

El extracto se obtuvo por maceración con alcohol de 96° el cual luego se llevó a sequedad, se realizó un fraccionamiento con solventes de diferentes polaridades y la posterior determinación de metabolitos secundarios por reacciones de precipitación y/o coloración, el contenido de polifenoles totales se ha determinado por el método de Folin Ciocalteu, y la capacidad antioxidante por los métodos de DPPH, FRAP Y ABTS.

Se obtuvo la presencia predominante de flavonoides, esteroides/triterpenos y alcaloides, el contenido medio de polifenoles totales fue de 67,9 mg EAG/100g de extracto seco y la actividad antioxidante por el DPPH con un IC₅₀ de 8,28 mg/mL, y un TEAC de 17,68 mg/mL y 10,27mg/mL por los métodos FRAP y ABTS respectivamente. Se concluye que dicho extracto resaltó por el

contenido de sólidos totales, cenizas; así como también la presencia de metabolitos secundarios del tipo flavonoides y una apreciable capacidad antioxidante por los tres métodos empleados.

ABSTRACT

In Peru there are numerous plant species used in popular medicine and some medicinal properties are attributed to it, many of them not proven; in order to contribute to giving the real value of these species, the present study aimed to carry out a phytochemical study, to determine the content of total polyphenols and the antioxidant capacity of the ethanol extract of the leaves of *Senecio nutans* from the annex of Pallca, district Chipao, Lucanas province, Ayacucho department, commonly known as "chachacoma".

The extract was obtained by maceration with 96° alcohols which was carried out with solvents of different polarities and the subsequent determination of secondary metabolites by precipitation and/or coloration reactions, the content of total polyphenols was determined by the Folin Ciocalteu method, and the antioxidant capacity by the DPPH, FRAP and ABTS methods.

The predominant presence of flavonoids.

Steroids/triterpenes and alkaloids was obtained, the average content of total polyphenols was 67.9 mg EAG/100 g of dry extract and the antioxidant activity by DPPH with an IC_{50} of 8.28 mg/mL, and a TEAC of 17.68 mg/mL and 10.27 mg/mL by the FRAP and ABTS methods respectively.

Conclude that it is characterized by dry extract, highlighted by the content of total solids, ashes; as well as the presence of secondary metabolites of the flavonoid type and an appreciable antioxidant capacity by the three methods used.

INTRODUCCIÓN.

Un aspecto importante de la flora del Perú es el uso medicinal de las plantas desde épocas muy remotas, en el Perú estudios etnobotánicos demuestran que tan importante fue el uso de las plantas en la medicina antigua. En el Perú aproximadamente 5,000 plantas han sido identificadas botánicamente: la mayor parte son nativas de nuestro país (unas 4,400) y unas 600 especies son introducidas. Igualmente, la mayoría de las especies nativas utilizadas son silvestres y cerca de dos mil son cultivadas (INS 2019).¹

Las plantas medicinales se han utilizado durante muchos años y son fuente de nuevas sustancias activas y nuevos medicamentos de interés farmacéutico; sin embargo, existen muchas especies sin estudiar o poco estudiadas o comprobadas científicamente ya sea por la cantidad de especies de plantas que poseemos o por el desinterés de los investigadores por aprovechar los recursos que poseemos.

El conocimiento popular contenido en los mercados al aire libre se estudia a través de la medicina tradicional y es una buena fuente de información para la investigación etnobotánica. Perú es un país con una amplia diversidad de plantas con propiedades terapéuticas, muchas de las cuales necesitan estudios científicos que respalden su uso tradicional. Entre ellas se encuentra la especie *Senecio nutans* “chachacoma” a la que se atribuye algunas propiedades terapéuticas.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), entre otros radicales libres pueden generar estrés oxidativo, que tiene relación con las enfermedades

neurodegenerativas entre otros. Se ha evidenciado que los constituyentes de las plantas son fuentes de compuestos con actividades antioxidantes que tienen la capacidad de capturar EROs (Londoño 2018)². En este estudio se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos crudos de etanol por tres métodos con diferentes mecanismo de acción. Los antioxidantes son moléculas que actúan previamente o durante una reacción en cadena de los radicales libres; ya sea en la etapa de iniciación, propagación, terminación, descomposición o en la subsecuente oxidación de los productos. Por otro lado, los prooxidantes son especies altamente reactivas de oxígeno (ERO) que están presentes en los sistemas biológicos; provienen de una amplia variedad de fuentes y se encuentran tanto en los alimentos como en los sistemas biológicos.²

el proceso de oxidación y generación de la rancidez de los alimentos es causado por los radicales libres por el mecanismo de la peroxidación lipídica y en los sistemas vivos los radicales libres atacan moléculas biológicas claves, produciendo muchas enfermedades degenerativas (Suja et al., 2004)³. Un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes en el organismo genera el fenómeno llamado estrés oxidativo, el cual es clave en el desarrollo de enfermedades crónicas tales como cáncer, arteriosclerosis, artritis reumatoide, algunas formas de anemia, diabetes, entre otras (Celik et al., 2008)⁴.

En los últimos años el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado dramáticamente, debido principalmente a tres razones: (1) la

baja seguridad que ofrece el consumo de antioxidantes sintéticos, (2) la eficacia antioxidante de una variedad de agentes fitoquímicos, y (3) la idea generalizada de que el consumo de ciertos agentes fitoquímicos pueden afectar de manera positiva la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento; además, la creencia de que los compuestos naturales son innatamente más seguros que los compuestos sintéticos y por consiguiente son comercialmente más aceptados (Alfonso, 2000; Avalos – Garcia y Pérez-Urria, 2009)^{5,6}.

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas, los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Palacios, 2011)⁷. Por esta razón, que se pretende encontrar antioxidantes naturales en plantas de la flora de nuestro país, debido a la importancia de conocer nuevos agentes con propiedades antioxidantes y a la facilidad de acceso a recursos naturales de la población de bajos recursos.

La presente investigación se realizó en la especie vegetal doméstica *Senecio nutans* “chachacoma” proveniente del anexo de Pallca, distrito Chipao, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho, conocida comúnmente como “chachacoma”, “wiskatalla”, la cual se denomina: estudio

fotoquímico, polifenoles totales y determinación de actividad antioxidante por tres diferentes métodos del extracto etanólico de las partes aéreas *Senecio nutans* “chachacoma”

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Descripción de la realidad problemática

En el inicio de la humanidad no se contaba con los avances tecnológicos y científicos con los que cuenta hoy, el hombre utilizó diversos elementos de su entorno para sobrevivir y a través del tiempo, estos saberes se han ido perfeccionando mediante el **método ensayo-error**. Hoy en día, el conocimiento de las propiedades de las plantas medicinales se ha extendido de tal forma, que mucha gente las sigue utilizando como medicina alternativa y en ocasiones como apoyo a la llamada medicina tradicional. **La idea de que todo compuesto natural es más seguro que los sintéticos, se ha ido incrementando por esta razón en los últimos años se ha extendido el uso de los recursos naturales, entre ellos principalmente las plantas que se les atribuyen alguna propiedad terapéutica.**

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un

determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies. Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica, por sus diferentes propiedades atribuidas entre las que se encuentra la antioxidante (Avalos –Garcia y Pérez-Urria, 2009; Palacios 2011)^{6,7}.

Los agente antioxidantes, algunos podemos consumirlos de forma directa en los frutos, pero no necesariamente están en estos la mayor concentración de agentes antioxidantes si no que están en algunas otras zonas de la planta, ya sea hojas, tallos, etc; por eso en el presente trabajo se toman hojas de la planta *Senecio nutans* "chachacoma" para poder extraer la mayor cantidad posible de metabolitos secundarios que se puedan correlacionar con la posible actividad antioxidante presente en el extracto de la planta.

La finalidad de este trabajo fue identificar los grupos de metabolitos secundarios, el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante del extracto etanolico de hojas que justifiquen algunas de las propiedades atribuidas por la etnobotánica.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema General

¿Determinar los metabolitos secundarios, el contenido de polifenoles totales y que capacidad antioxidante presenta el extracto alcohólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”?

1.2.2. Problemas Específicos

- ¿Qué características fisicoquímicas presenta el extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”?
- ¿Qué tipos de metabolitos secundarios presenta el extracto de hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”?
- ¿Cuál es el contenido de polifenoles totales en el extracto de hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”?
- ¿Cuál es el nivel de actividad antioxidante que presenta el extracto de hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” por los diferentes métodos aplicados?

1.2.3. Aspectos a considerar:

Comprobar la existencia de la actividad antioxidante del extracto de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” por tres métodos diferentes, como son: DPPH, FRAP y ABTS.

1.3. Justificación e importancia

En cuanto a estudios fitoquímicos y estudios de las propiedades antioxidante de extractos de las hojas de esta especie que se puedan relacionar a las propiedades farmacológicas atribuidas por la etnobotánica, se encontraron escasa referencias bibliográficas; sin

embargo, en cuanto a la aplicación o propiedades de los aceites esenciales de la especie y género es ampliamente estudiada. Pero sabemos que el contenido de principios activos en una especie vegetal, pueden variar de acuerdo a el tiempo y espacio por los diferentes factores ecológicos y agronómicos como: la zona geográfica, parte usada, tiempo de recolección, entre otros factores; los estudios de esta especie procedente de la zona del departamento de Ayacucho en donde le atribuyen una variedad de propiedades medicinales no se ha podido encontrar el conocimiento de la presencia de los metabolitos secundarios y sus posibles propiedades antioxidantes que se pueden asociar a las propiedades terapéuticas de la especie vegetal, por lo tanto consideramos que se justifica la realización del presente estudio, para poder contribuir desde una base científica a verificar las propiedades atribuidas.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.2. General

Determinar la presencia de metabolitos secundarios, el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en el extracto etanólico de las hojas del *Senecio nutans* “chachacoma”

1.4.2 Específicos:

- ✓ Obtener un extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” y su caracterización fisicoquímica.

- ✓ Realizar un screening fitoquímico y la identificación de metabolitos secundarios en el extracto de hojas del *Senecio nutans* “chachacoma”
- ✓ Establecer el contenido de polifenoles totales en el extracto de hojas del *Senecio nutans* “chachacoma”
- ✓ Determinar la capacidad de inhibición del radical DPPH. en el extracto de hojas del *Senecio nutans* “chachacoma”
- ✓ Comprobar la capacidad antioxidante por el método FRAP, en el extracto de hojas del *Senecio nutans* “chachacoma”
- ✓ Comprobar la capacidad antioxidante por método el ABTS, en el extracto de hojas del *Senecio nutans* “chachacoma”

1.5. Hipótesis y variables

1.5.1 Hipótesis

a) General:

- ✓ El extracto etanólico de hojas de *Senecio nutans* presenta diferentes grupos de metabolitos secundarios, un alto contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante por los tres métodos probados.

b) Específicas:

- ✓ El extracto obtenido de hojas de *Senecio nutans* presenta características fisicoquímicas que permite su estabilidad.

- ✓ El extracto de hojas de *Senecio nutans* presenta metabolitos secundarios como: flavonoides, alcaloides, taninos y compuestos fenólicos libres.
- ✓ El extracto de hojas de *Senecio nutans* presenta un alto contenido de polifenoles totales

1.5.2. Presenta una alta actividad antioxidante por los tres métodos empleados.

Variables:

a) Independiente:

- Extracto etanólico de las hojas del *Senecio nutans* (chachacoma)

b) Dependiente:

- Polifenoles totales
- Actividad antioxidante

1.5.3. Operacionalización de variables

VARIABLE	INDICADOR	INDICE
<p>Independiente: Extracto etanólico de las hojas del <i>Senecio nutans</i> (chachacoma)</p>	<p>Parámetros fisicoquímicos</p> <p>Metabolitos secundarios</p>	<p>Sólidos totales, Sólidos solubles, Cenizas, pH</p> <p>Reacciones de coloración y precipitación</p>
<p>Dependiente:</p> <p>Polifenoles totales</p> <p>Actividad antioxidante</p>	<p>Método Folin C.</p> <p>Método del DPPH</p> <p>Método FRAP</p> <p>Método ABTS</p>	<p>EAG/g</p> <p>IC₅₀</p> <p>TEAC</p> <p>TEAC</p>

CAPÍTULO II

BASES TEÓRICAS

2.1. Antecedentes de la investigación

Estudios de la especie son muy escasos en todas las fuentes bibliográficas a las que se accedido; sin embargo, el género si es muy estudiado.

Ochoa et al., 2012. Reporto que el aceite esencial de *Senecio graveolens* mostró actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus*, inhibiendo el crecimiento, con formación de halos de inhibición de 23.67 y 29.33 mm de diámetro, en concentraciones de 100%; 13.33 y 20.67 mm de diámetro, en concentraciones de 90%; y 7.67 y 10 mm de diámetro, respectivamente, en concentraciones de 80%. Sin embargo, no observó actividad cuando se utilizó aceite de *S. graveolens*, en concentraciones de 70% y 60% y no hubo formación de halos de inhibición alrededor del pocillo⁸.

Mostacero et al., 2011. Registraron una clasificación sistemática e información relacionada a diversas plantas medicinales del Perú con referencia a su Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. Con respecto al género *Senecio*, evidencian la existencia de 5 especies de este género en el Perú, tales como: *Senecio canescens* (H. B. K.) Cuatrecasas, *Senecio chionogeton* Weddell, *Senecio mathewsii* Weddell,

Senecio rudbeckiaefolius Meyen & Walpers y *Senecio tephrosioides* Turckz.⁹

Andreani et al., 2015. Determinaron la composición y variabilidad química del aceite esencial de *Senecio vulgaris* L., mediante el análisis de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM) y Cromatografía de Gases/Detector de ionización de llama (CG-FID), recolectadas en 30 localidades de Córcega. Los compuestos principales fueron α -humuleno (1; 57,3%), (E)- β -cariofileno (2; 5,6%), terpinoleno (3; 5,3%), α -curcumeno (4; 4,3%) y geranil linalol (5; 3,4%). Este estudio confirmó que existe una relación entre la naturaleza del suelo, la composición química de los aceites esenciales y características morfológicas de la planta, además proponen que el α -humuleno podría ser utilizado como marcador taxonómico para la clasificación futura del género *Senecio*¹⁰.

Apumayta J, 2015. El estudio consistió en el análisis de tamizaje fitoquímico realizado a la muestra del filtrante de chachacoma, el mencionado análisis sirvió para caracterizar los principales compuestos presentes en la presente planta la cual dio como resultado una alta presencia de compuestos como son los Taninos, saponinas, glicósidos, flavonoides y azúcares reductores, los cuales le dan un realce al producto terminado para su uso agroindustrial.

El tercer paso fue determinar la aceptabilidad del filtrante de chachacoma, para lo cual se realizaron 8 diferentes tratamientos a diferentes parámetros de elaboración como fueron: Proporción de adición (g), Dilución en volumen (mL) y Tiempo de dilución (seg), las cuales fueron degustadas a 30 panelistas semi- entrenados en el análisis organoléptico mediante una escala hedónica de 1 al 5 que van desde un me disgusta mucho a un me gusta mucho¹¹.

Mamani D, 2017. Actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Senecio spp* (Chachacoma) en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus sp*. La investigación se realizó en la ciudad de Puno, en la Universidad Nacional del Altiplano Puno, en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Biológicas, como alternativa ante los casos de reportes de incremento de la resistencia antimicrobiana a antibióticos prescritos, debido a la automedicación que originamos los mismos consumidores de fármacos. Los objetivos fueron: a) aislar bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp* a partir de muestras de pacientes con infección urinaria del Centro de Salud Metropolitano de Puno, y b) evaluar el efecto de los extractos alcohólicos de hojas y tallos de *Senecio spp* (chachacoma) en el crecimiento in vitro de bacterias aisladas a partir de muestras de pacientes con infección urinaria. El aislamiento bacteriano se realizó mediante la técnica de cultivo in vitro en agar EMB y Manitol Salado, la evaluación antimicrobiana de los extractos

de hojas y tallos de *Senecio sp* se prepararon en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100%, se realizó mediante el método de Kirby Bauer o de difusión en agar con discos de sensibilidad, determinándose los diámetros de halos de inhibición, donde los datos fueron analizados mediante pruebas de análisis de varianza y de Tukey. Entre los resultados se aislaron las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, mientras tanto no se logró aislar *Enterococcus sp*. Los extractos alcohólicos de hojas y tallos de *Senecio spp* (chachacoma) presentaron efecto inhibitorio solo en bacterias *Staphylococcus aureus*, siendo mayor el efecto del extracto de hojas ($P < 0.05$), mientras tanto *Escherichia coli* y *Klebsiella sp* resultaron resistentes. Los extractos alcohólicos de hojas y tallos de *Senecio sp*, inhibieron entre el 39.71 y 46.89% respectivamente¹².

Estudios de otras especies del género

Kahrman et al., 2011. Reportan que los aceites esenciales de *Senecio pandurifolius* mostraron actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, la mycobacteria (*M. smegmatis*), y los hongos. El aceite no mostró actividad antibacteriana frente a Gram negativas, excepto una leve actividad observada frente a *E. coli* (7 y 8 mm de zona de inhibición) mediante los aceites esenciales de hojas y flores¹³.

Kenoufi M, et al., 2016. Reporta que las actividades antimicrobianas in vitro de los aceites esenciales de *Senecio perralderianus*, la dilución

media del aceite disminuyó la densidad del crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pero la bacteria evaluada fue resistente a la concentración de aceite esencial de 1/4 y 1/8. La composición del aceite esencial de *S. perralderianus* es diferente cuantitativamente y cualitativamente a las otras especies del mismo género¹⁴.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Metabolitos secundarios:

Son moléculas orgánicas que no cumplen ningún rol fisiológico en los vegetales en su crecimiento y el desarrollo. Generalmente se encuentran en cantidades relativamente pequeñas y su producción puede ser extendida o restringida a familias, géneros, o especies particulares (Palacio, 2011)⁷.

- Compuestos fenólicos: flavonoides, leucoantocianos, cumarinas, antocianinas, taninos y antraquinonas.
- Terpenos y esteroides: triterpenos, esteroides, saponinas
- Alcaloides: alcaloides

Metabolismo Secundario

El metabolismo secundario comprende los procesos químicos que son únicos para una planta dada, y no son universales. El metabolismo secundario representa el conjunto de las reacciones químicas que da lugar a la formación de un producto natural. Partes de estas reacciones químicas son comunes a un cierto número de diferentes plantas o familias de plantas, pero el resultado obtenido (producto natural) generalmente es diferente de una planta a otra. Precursores químicos comunes pueden producir resultados diferentes. • Los metabolitos secundarios no parecen ser necesarios (en la mayor parte de los casos) para la supervivencia de la planta, pero pueden conferirle una ventaja competitiva (Ávalos-García A, Pérez-Urria 2009)⁶.

Los compuestos bioactivos, fitoquímicos, son moléculas que tienen una actividad biológica, que se traduce en beneficios para la salud. Los fenoles, flavonoides, alcaloides, taninos, esteroides y cumarinas, son ejemplos de estos compuestos que poseen actividad antioxidante y que atrapan radicales libres.

2.2.2 Actividad antioxidante.

Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)

Los radicales libres se pueden definir como las moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones no

apareados en los orbitales atómicos o moleculares (Valko 2007)¹⁵. Este electrón desapareado puede llegar a tener un gran grado de reactividad. Entre la clase más importante de radicales libres generados en los sistemas vivos se encuentran los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) (Valko 2007)¹⁵. El término de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) hace referencia a aquellos radicales libres y especies no radicales que participan en reacciones de elevación de agentes prooxidantes, los principales ROS son: Radical hidroxilo (OH⁻), Anión superóxido (O⁻), Radical peroxilo (ROO[·]), Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), Oxígeno singlete (1O₂), Óxido nítrico (NO), ozono etc. (Gonzales, 2012)¹⁶.

Sistema de Defensa Antioxidante

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan ROS. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que las neutralicen (Pérez 2000)¹⁷. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre. El antioxidante, al reaccionar con un ROS le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un ROS débil no tóxico (la vitamina E). No todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas catalizan o aceleran

reacciones químicas que utilizan substratos que a su vez reaccionan con los RLO (Valko 2007)¹⁵. Existe una primera línea de defensa antioxidante constituida por enzimas y scavengers o eliminadores de radicales.

Enzimas: La citocromo oxidasa está encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno. La superóxido dismutasa está especializada en captar el radical anión superóxido mediante una dismutación y así convertirlo en peróxido de hidrógeno. Catalasa y peroxidasa (glutación peroxidasa GPx) y glutación reductasa (GR) que neutralizan al H₂O₂ y lo convierten en agua. Scavengers o eliminadores la vitamina E o α tocoferol neutraliza al radical OH por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante. La vitamina C, por su carácter reductor, reacciona rápidamente en el O₂ y con el OH, también es captor del oxígeno singlete y del ion hipoclorito. El glutación (GSH), además de captar el H₂O₂ como substrato de la GPx, también capta al O₂ y al OH. La transferrina y la ceruloplasmina son transportadoras de metales de transición, hierro y cobre respectivamente, que son generadores de RLO (Rojas 2017)¹⁸.

2.2.3 Características de planta.

La chachacoma *senecio graveolens* o también *Senecio Nutans* es un arbusto que crece a más de 3 700 metros sobre el nivel del mar,

en el altiplano. Puede medir hasta 50 centímetros de alto, es ramoso y muy fragante las hojas han sido utilizadas durante siglos por las poblaciones indígenas para contrarrestar los efectos de la puna o mal de altura., pero a nivel químico tiene propiedades anticancerígenas y antimicrobianas. Así lo señala un equipo de investigadores liderado por Carlos Echiburú, biólogo del Centro de Investigaciones en el Hombre en el Desierto (CIHDE) y compuesto por especialistas de distintas disciplinas y universidades chilenas, además de la U. de Arizona, en Estados Unidos, quienes estudian los compuestos de la planta y la probaron in vitro en distintos tejidos de cáncer mamario. En ellos, probaron que el extracto crudo de la especie puede eliminar células cancerígenas, dejando vivas un alto porcentaje de las células sanas. "Aplicamos el extracto y deja viables al menos el 75% de las células control, eso es bueno ya que se dese obtener propiedades farmacológicas (1). Esta planta, denominada también chacha-cuma, sachacoma y raíz del soldado, crece en las elevadas cúspides de las cordilleras andinas del oeste de Bolivia, norte de Chile y desde Cuyo hacia el norte de nuestro país, hasta los 4 000 m de altura. Pertenece a la familia de las Asteráceas (Compuestas); es "pariente" de la vira-vira, achicoria, diente de león, manzanilla, margarita. Es un arbusto perenne, de raíz pivotante y tallo semileñoso, intensamente fragante, muy ramificado, con numerosas ramitas dicotómicas (Malpartida 2015)¹⁹.

2.3 Marco conceptual

2.3.1. EXTRACCIÓN. – es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción. se debe tomar en cuenta que para extraer los principios activos de una planta existen diferentes métodos, los cuales necesitan de un líquido extractivo que depende del procedimiento técnico y de la naturaleza química propia del principio activo. Los métodos más importantes de la extracción

- Percolación
- Maceración
- Decocción
- Infusión
- Digestión

2.3.2. SCREENING. - El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las primeras fases de una investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una especie vegetal y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Lo cual debe permitir ver los resultados de una forma rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y debajo costo.

2.3.3. METABOLITOS SECUNDARIOS: no cumplen ningún rol fisiológico en los vegetales: alcaloides, glicósidos, aceites esenciales, resinas, etc. Sirven para comparar perfiles químicos y diferenciar entre las diferentes especies vegetales. Carecen de interés diagnóstico detectar clorofila, carotenoides, ácidos fenólicos porque son comunes a todas las plantas (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011)²¹.

2.3.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica), de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y, por lo tanto, recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena. Sin embargo, es necesario distinguir también entre actividad estabilizadora de radicales libres o antiradicalaria (en inglés, scavenger) y actividad antioxidante. La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción. Por su parte, la segunda mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad anti-radicalaria no siempre correlaciona con una alta actividad antioxidante; en particular, algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante (Malpartida, 2015 y Rojas, 2017).

2.3.5. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO. - Las ERO, según su propio nombre, presentan una reactividad más alta que el oxígeno molecular. Algunas de ellas pueden ser radicales libres, es decir, moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Este electrón desapareado confiere un grado considerable de reactividad al radical libre logrando además que pueda existir de forma independiente por cortos períodos de tiempo (Valko et al.,2007; Benites y col., 2011 y Rojas 2017) 15,18,22.

2.3.6. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

- Ningún método puede evaluar por si sola la “capacidad antioxidante total” de una muestra, ya que en este indicador deberá expresar la capacidad de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, por lo tanto debe reflejar y diferenciar los diferentes mecanismos antioxidantes y evaluar la reactividad del antioxidante frente a diferentes especies reactivas.

En general, existen varios métodos con aproximaciones para medir actividad antioxidante. Uno de estos métodos se basa en clasificar los métodos como directos e indirectos, mientras que otro los clasifica de acuerdo con el mecanismo mediante el cual sucede el proceso antioxidante.

En los métodos indirectos se estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre, de hecho, se ha popularizado el uso de algunos radicales libres metaestables, coloreados, con fuerte absorción en

el espectro visible, como herramienta para determinar actividad estabilizadora de radicales libres (Ej. DPPH, ABTS).

Los métodos directos están basados en el estudio del efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, de los cuales los más usados han sido: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas, entre otros (Valko et al.,2007; Benites y col., 2011 y Rojas 2017)^{15,18,22}.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

31. . Tipo, Nivel y Diseño de investigación

3.1.1 Tipo: Básica.

Se caracteriza por la adquisición de conocimientos básicos o fundamentales con el fin de incrementar el conocimiento de los principios fundamentales de la naturaleza o de la realidad por sí misma.

3.1.2 Nivel: Descriptivo y Explicativo. (Deobold B. V. Dalen y F. Arias 2012)

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

Explicativo: Se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto.

3.1.3. Diseño de investigación: Experimental.

Se trata de una colección de diseños de investigación que utilizan la manipulación y las pruebas controladas para entender los procesos causales. En general, una o más variables son manipuladas para determinar su efecto sobre una variable dependiente. Es un experimento, donde el investigador manipula una variable

y controla/aleatoriza el resto de las variables. Cuenta con un grupo de control, los sujetos han sido asignados al azar entre los grupos y el investigador sólo pone a prueba un efecto a la vez.

32 Materiales, Reactivos y Equipos.

3.2.1 Materiales:

Papel kraft

Papel Filtro

Papel aluminio

Vasos Precipitados. 250 mL, 500 mL

Pipeta de 5 mL. 1ml

Micropipeta de 100 y 1000 μ L

Tubos de Ensayo.

Viales de 5 mL

Gradilla

Espátula

Bagueta

Luna de Reloj

Pera de Bromo

Pinzas

Embudo

Propipeta

Placa de porcelana

Capsula de porcelana

Crisol

Fiola

Probeta

Algodón

3.2.2 Equipos:

Estufa
Molino
Balanza analítica
Rotavapor
Potenciómetro
Plancha calefactora
Mufra
Espectrofotómetro
Refractómetro
pHmetro

3.2.3 Reactivos:

Gelatina
Cloruro de sodio
Tricloruro férrico
Ácido Clorhídrico
Limaduras de magnesio
Ninhidrina
Etanol 96°
Diclorometano
Cloruro de mercurio
Yoduro de potasio
Nitrato de bismuto pentahidratado
Ácido nítrico
Yodo
Amoniaco
DPPH
Metanol
Ácido pícrico

Ácido clorhídrico
TPTZ
Acetato de sodio trihidratado
Ácido acético
Persulfato de sodio
ABTS
Trolox

3.2.4 Material biológico

Hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”

3.3 Población y muestra

Especie de *Senecio nutans* (chachacoma)

La muestra en estudio son las hojas de la especie *Senecio nutans* (chachacoma) que se recolecto en el anexo de Pallca, distrito de Chipao, provincia de Lucana, departamento de Ayacucho.

3.4 Métodos, técnicas y procedimientos de recolección de datos.

3.4.1 Métodos y técnicas

RECOLECCION Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA VEGETALES

La especie *Senecio nutans* (chachacoma) se recolecto en el mes de junio del 2019, luego la planta fue colocada en bolsas de papel kraft, y posteriormente fue trasladada a la ciudad de Ica tan pronto como fue posible. Una porción fue usada para la clasificación taxonómica en la ciudad de Lima.

Se realizó desecación a una temperatura ambiente en los laboratorios de química general, bajo sombra para no alterar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la especie en estudio. Luego se procedió a la molienda con un molino obteniéndose un polvo fino que se conservó en frascos de boca ancha de color ámbar debidamente rotulado hasta su procesamiento.

3.4.1 SCREENING FITOQUÍMICO

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consistió en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación.

Procedimiento

Se tomó 500 g de las partes aéreas secas y pulverizadas de la especie *Senecio nutans* (chachacoma) se realizó una maceración con alcohol de 96 °C por 15 días, con agitación periódica para optimizar la extracción de los metabolitos secundarios, se filtró y luego se procedió a obtener un extracto seco mediante uso de un rotavapor a una temperatura menor a 40 °C (Vargas, 2018)²³.

3.4.2 DETERMINACION DE GRUPOS FUNCIONALES.

Separadas las fracciones se procedió a realizar reacciones de coloración o precipitación para identificar grupos funcionales y grupos de metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Senecio nutans* (chachacoma).

1. DETECCION DE TANINOS

Reacción de gelatina-Sal.- Se tomaron tres tubos de ensayo a los que se le adiciono 0,5 mL de extracto al 1° tubo se adiciono 1 mL de NaCl 5%, al tubo 2° gelatina 1% y al tubo 3°gelatina – sal, la precipitación con este último reactivo o con ambos 1° y 2° es indicativo de la presencia de taninos, si solamente ocurre con el 1°, podría ser un falso positivo (Lock, 1988)²⁴.

Reacción de Cloruro Férrico. - En un tubo de ensayo se colocaron 0,5 mL de la fracción A y se la agregó una gota de disolución acuosa de FeCl₃ 1%. La Reacción fue positiva cuando apareció colores entre verde o azul verdoso (Lock, 1988)²⁴.

2. DETECCION DE FLAVONOIDES

Reacción de Shinoda. - Colocaron 20 gotas del extracto en un tubo de ensayo, agregando limaduras de magnesio y 3 gotas de HCl concentrado. Observando el cambio de color. La reacción es positiva cuando aparecieron tonos de color rojo, anaranjado y violeta (Lock, 1988)²⁴.

3. DETECCION DE AMINOACIDOS

Reacción de Ninhidrina. - Sobre tiras de papel filtro se colocaron con una pipeta capilar:

- ✓ Una de extracto + una gota de reactivo Ninhidrina al 2%.
- ✓ Blanco: Solución etanólica de Ninhidrina al 2%.

Luego de secar a temperatura ambiente las tiras de papel se colocaron en una plancha calefactora hasta la aparición de un color en el blanco.

La reacción fue positiva cuando el papel de la muestra presentó un color azul violáceo (Lock, 1988)²⁴.

4. DETECCION DE ALCALOIDES

Se usaron 4 tubos de ensayo y en cada uno colocaron 4 mL de extracto y 1 mL de HCl 1% y luego se procedió con la reacción de precipitación:

- ✓ **Dragendorff:** Se añadió de 2-4 gotas y observo un precipitado anaranjado
- ✓ **Mayer:** se añadió 2 - 4 gotas y observó precipitado blanco.
- ✓ **Hager:** se adicionó 2 - 4 gotas y observó precipitado amarillo (Lock, 1988)²⁴.

5. DETECCION DE SAPONINAS

Prueba de espuma. - En dos tubos de ensayo se colocó 2,5 mL del extracto y se agito por un minuto. Se dejó reposar 15 minutos y observa la formación de espuma. Se considera negativa si la altura de la espuma es menor de 5 mm (Lock, 1988)²⁴.

PROCEDIMIENTO DE CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICAS

Sólidos totales. - AOAC 925.03B Solids (Total) and Moisture.

Determinación: Se pesó aproximadamente 2 g de la muestra molida y tamizada en una placa petri, (previamente seca a 130° por una hora enfriada en un desecador y pesada cuando alcanzo la temperatura ambiente). La placa destapada se colocó en la estufa y se secó a $130 \pm 3^\circ$ por una hora (desde cuando la estufa alcanza los 130°), cubrió la placa con su tapa dentro de la estufa y fue transferida al desecador y pesada cuando alcanzó la temperatura ambiente. Reportó la pérdida de peso como humedad²⁵.

Sólidos solubles: AOAC 932.12.

Se determinó por el método refractométrico, en el cual se preparó una suspensión al 10% y luego de calibrar el equipo se realizó la medición directamente²⁵.

Cenizas: AOAC 923.03 Ash

Determinación: Se pesó de 1 a 3 g de la muestra bien mezclada dentro de un crisol previamente incinerado a la temperatura de tratamiento (550°) y enfriado en un desecador. Se Incineró en la mufla a 550° aproximadamente hasta cenizas blanca o ligeramente grises o hasta peso constante. Se enfrió en el desecador y peso tan pronto alcanzó la temperatura ambiente. Calculando el residuo como cenizas totales²⁵.

pH. - AOAC 981.12 pH

Se determinó por el método electrométrico, en el cual se prepara una suspensión al 10% y luego de calibrar el equipo se realizó la medición directamente²⁵.

3.4.3 METODO PARA DETERMINAR LOS POLIFENOLES TOTALES

Determinación de compuestos fenólicos: Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 1-7,5 µg/mL. El extracto etanólico de la muestra vegetal fue evaluado a una concentración de 0,9 mg/mL. A 0,3 mL de la muestra se le añadió 0,45mL de la solución de Folin-Ciocalteu (diluido 1 en 2 con agua grado HPLC) y se dejó reposar durante cinco minutos, luego se adicionó 0,45 mL de Na₂CO₃ 20% y posteriormente agua

ultrapura (HPLC) hasta un volumen total de 3mL. Se agitó vigorosamente, se cubrió de la luz y se le llevó a reposo por 30 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro. La muestra fue analizada por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico/g de extracto etanólico²⁶.

3.4.4 METODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

a) Determinación de actividad antioxidante por método DPPH:

Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizó el método basado en la molécula 2,2- difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Este método fue originalmente diseñado por Marsden Blois en 1958, y dentro de sus modificaciones posteriores destaca la de Brand-Williams et. Al., 1995²⁷, que es el método utilizado en la actualidad. El proceso de evaluación de la capacidad antioxidante por DPPH consiste en utilizar dicha molécula, la cual es un radical libre estable que al mezclarse con una sustancia que le dona un átomo de hidrógeno pasa a su forma reducida, proceso que se puede observar ya que cuando la molécula se encuentra como radical es coloreada (violeta) y al reducirse pierde su color llegando hasta una coloración amarilla. (Molyneux, 2004)²⁸. Para el protocolo desarrollado se preparó una solución del radical DPPH a una concentración de 100 Mm en

metanol analítico al 80 por ciento y mediante el espectrofotómetro se estableció la absorbancia entre 0.9 - 1.0 a una longitud de onda de 517 nm, en donde el radical tiene su máximo pico de absorción y por ende un comportamiento lineal de las absorbancias al mezclarse con el extracto, lo que permite que los datos sean más precisos²⁸.

B) Determinación de actividad antioxidante por método FRAP:

Se siguió el procedimiento descrito por Benzie y Strain (1999) con ligeras modificaciones. Para iniciar el análisis se preparó el reactivo de trabajo, que consiste en una mezcla de tampón acetato 300 mM (pH = 3,6), TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y tricloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM en una proporción 10:1:1 (v: v: v). Una vez preparado, se añadió 3 mL de este reactivo en una cubeta, y se midió la absorbancia a 593 nm. Posteriormente, se agregó 100 μL de una de las soluciones de los ácidos (0,25 – 1,0 mM) y se agitó en un vórtex durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó la lectura de absorbancia nuevamente a 593 nm, al que se restó el valor de la absorbancia inicial. Las muestras se ensayaron por triplicado²⁹.

C) Ensayo de decoloración con el radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$:

se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$ es un

cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3- etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. En la evaluación se utilizaron 10 µL de extracto y 990 µL de la solución del radical ABTS•+. A los 4 min de reacción a 37°C, se leyó el cambio en la absorbancia respecto a la referencia del reactivo. La referencia del reactivo consistió en una solución del radical ABTS•+ con el solvente de la muestra. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como valores TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) mediante la construcción de una curva patrón de Trolox a partir de una solución stock de 10 mM²⁹.

3.5 Técnicas de procesamiento de la información

3.5.1 RECOLECCIÓN DE DATOS ANALITICOS.

Se realizo en los cuadernos de trabajos o hoja de ensayo donde se registra los resultados de las técnicas analíticas aplicadas en cada caso.

3.5.2 PROCESAMIENTOS DE DATOS.

Estos son tratados por métodos estadísticos paramétricos y no paramétricos y a través de las hojas de cálculos del programa Excel,

lo que permitio obtener una información más confiable y su respectivo tratamiento adecuado

3.6 Aspectos éticos

El ejercicio de la investigación científica y el uso del conocimiento producido por la ciencia demandan conductas éticas en el investigador y el maestro. La conducta no ética no tiene lugar en la práctica científica de ningún tipo. Debe ser señalada y erradicada. Aquél que con intereses particulares desprecia la ética en una investigación corrompe a la ciencia y sus productos, y se corrompe a sí mismo. Hay un acuerdo general en que hay que evitar conductas no éticas en la práctica de la ciencia. Es mejor hacer las cosas bien que hacerlas mal. Pero el problema no es simple porque no hay reglas claras e indudables. Cabalmente la ética trata con situaciones conflictivas sujetas a juicios morales³⁰.

Los aspectos éticos que son aplicables a la ciencia en general son aplicables en la presente investigación. Por ejemplo, no plagio, autoría responsable y criterios éticos entre otros.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

Tabla 1. Caracterización del extracto etanólico de *Senecio nutans* chachacoma

PARAMETRO	RESULTADO	UNIDADES
Sólidos Totales	98,19	g/100g
Sólidos Solubles	3,5	En una solución al 10%
Cenizas	16,14	g/100g
pH	3,75	--
Color	Verde oscuro	
Aspecto	Denso/viscoso	---
Olor	Suigeneris	---

Fuente: Propia del autor

Nota: Suigeneris se refiere a un olor característico propio

Tabla 2. Resultados de las reacciones de identificación de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de *Senecio nutans* chachacoma

Fracción	Tipo de metabolito	Reacción	Resultado
A	Aminoácidos libres	Ninhidrina	--
	Taninos	R. Cloruro férrico	++
B	Esteroides	R. Lieberman Burchard	++
	Quinonas	R. Borntrager	+
C	Esteroides	R. Lieberman Burchard	+
	Cardenolidos	R. Kedde	+
D	Alcaloides	Dragendorff	+++
		Mayer	++
		Hager	++
E	Flavonoides	R. Shinoda	++

Nota: + Reacción positiva ligera intensidad

++ Reacción de mediana intensidad

+++ Reacción positiva de fuerte intensidad

- Reacción negativa

Tabla 3. Medida de absorbancia a las diluciones de patrón (ácido gálico) para la determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu.

Acido gálico µg/mL	Abs 1	Abs2	Promedio
0,1	0,133	0,140	0,137
0,3	0,320	0,294	0,307
0,5	0,518	0,508	0,513
0,7	0,632	0,648	0,640
0,9	0,902	0,878	0,890
Muestra	0,665	0,659	0,662

Las lecturas de se realizaron por duplicado.

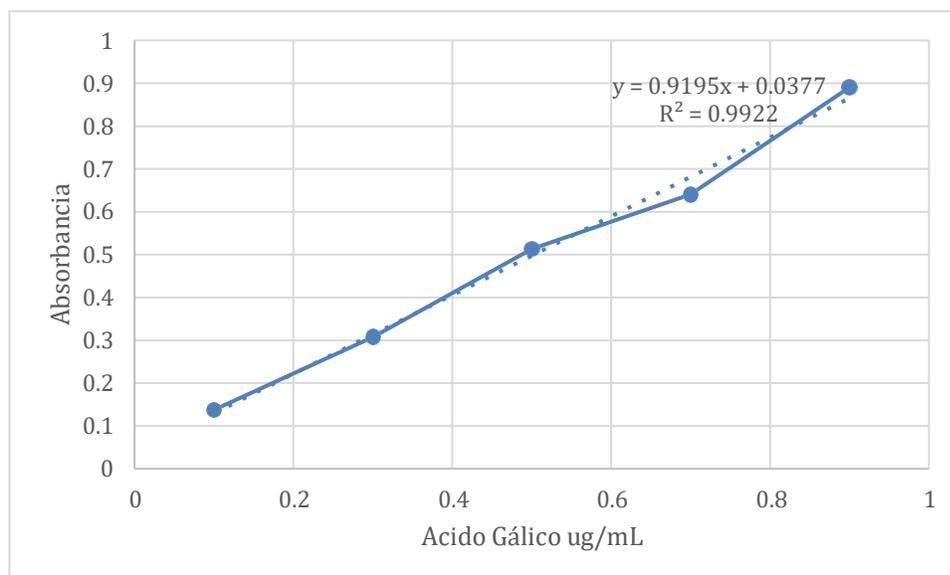


Gráfico 1. Correlación de absorbancia y concentraciones de ácido gálico

Por lo tanto: $Y = 0,9195x + 0,0377$

$$0,662 = 0,9195x + 0,0377$$

$$X = 0,679 \text{ µg EAG/mg de extracto}$$

$$\text{€ } 67,9 \text{ mg EAG/100g de extracto}$$

Tabla 4. Determinación del Porcentaje de inhibición del Radical DPPH frente a diluciones del extracto etanólico de *Senecio nutans* chachacoma

Concentración de extracto mg/mL	Lectura de absorbancia	Promedio de Lectura absorbancia	% de Inhibición
0,95	0,814	0,817	16,63
	0,820		
1,9	0,730	0,725	26,02
	0,719		
3,8	0,638	0,642	34,49
	0,646		
7,6	0,512	0,508	48,16
	0,504		
15,2	0,226	0,228	76,73
	0,230		
Blanco	0,980		

Nota: Se realizó dos repeticiones de cada dilución

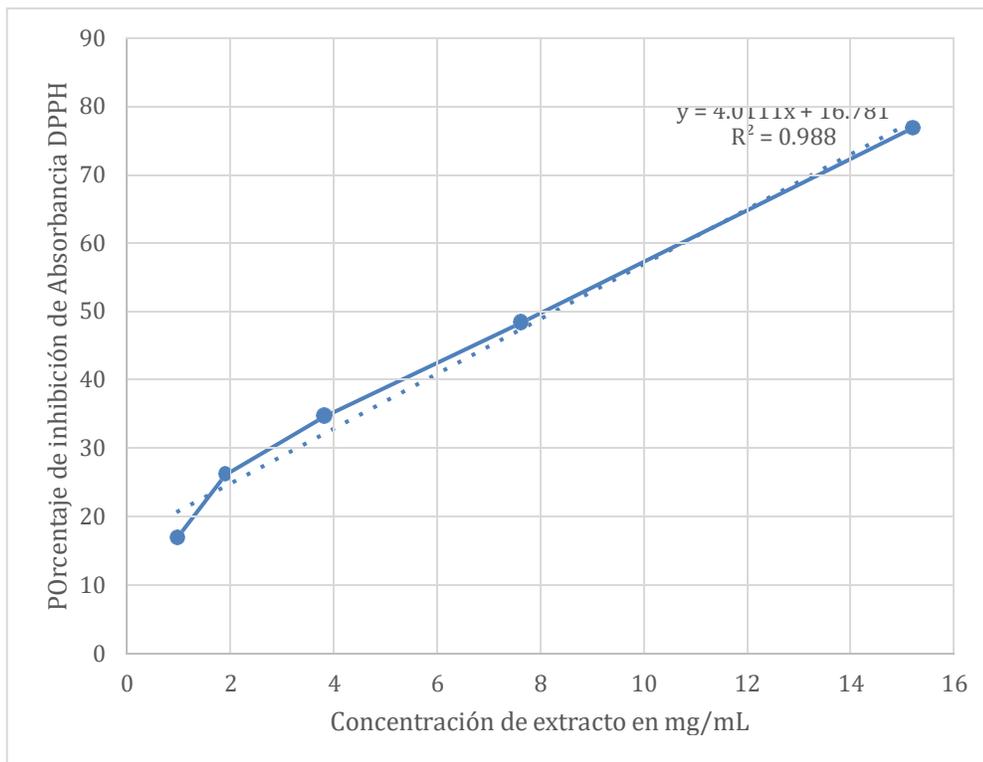


Figura 2. Correlación entre la concentración del extracto de etanólico de *Senecio nutans* chachacoma y porcentaje de inhibición del radical DPPH

$$Y = 4,0111X + 16,781$$

$$50 = 4,0111X + 16,781$$

$$X = 8,28$$

$$\mathbf{IC_{50} = 8,28 \text{ mg/mL}}$$

Tabla 5. Lectura de absorbancia de las diluciones del patrón Trolox por el método FRAP

Concentraciones de trolox (mM)	Lectura de absorbancia	Promedio de lectura	Desviación estándar
	0,018		
0,0312	0,015	0,018	0,003
	0,021		
	0,062		
0,0625	0.071	0.066	0.005
	0.065		
	0.113		
0,125	0.118	0,119	0,006
	0.125		
	0,332		
0,250	0.321	0,331	0,010
	0.340		
	0,623		
0,5	0,615	0,624	0,010
	0,635		

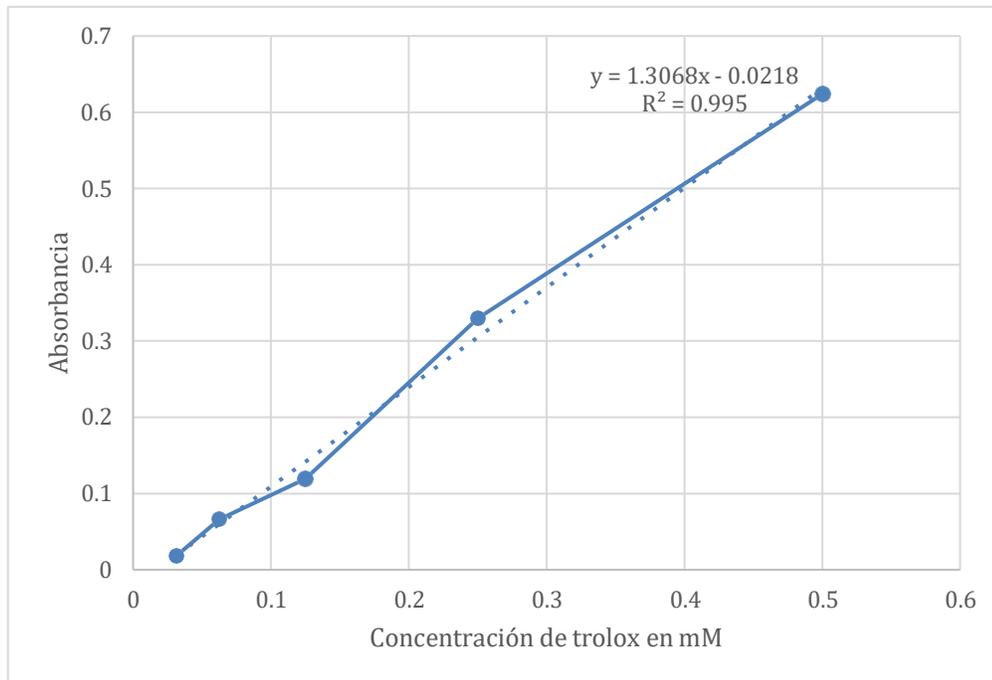


Figura 3. Gráfico de correlación entre concentración de trolox y absorbancia para la curva de calibración

Mediante la aplicación de la ecuación de la curva $Y = 1,3068x + 0,0218$; se obtendrán los equivalentes de trolox de cada una de las diluciones del extracto

Tabla 6. Determinación de la capacidad equivalente a trolox de las diluciones del extracto de *Senecio nutans* chachacoma por el método FRAP

Concentración de extracto (mg/mL)	Lectura de absorbancia	Promedio de lectura	TEAC (mM)
0,95	0,093	0,093	0,088
	0,090		
	0,097		
1,9	0,162	0,173	0,149
	0,171		
	0,185		
3,8	0,247	0,259	0,215
	0,260		
	0,271		
7,6	0,580	0,575	0,457
	0,571		
	0,576		
15,2	0,823	0,824	*
	0,815		
	0,835		

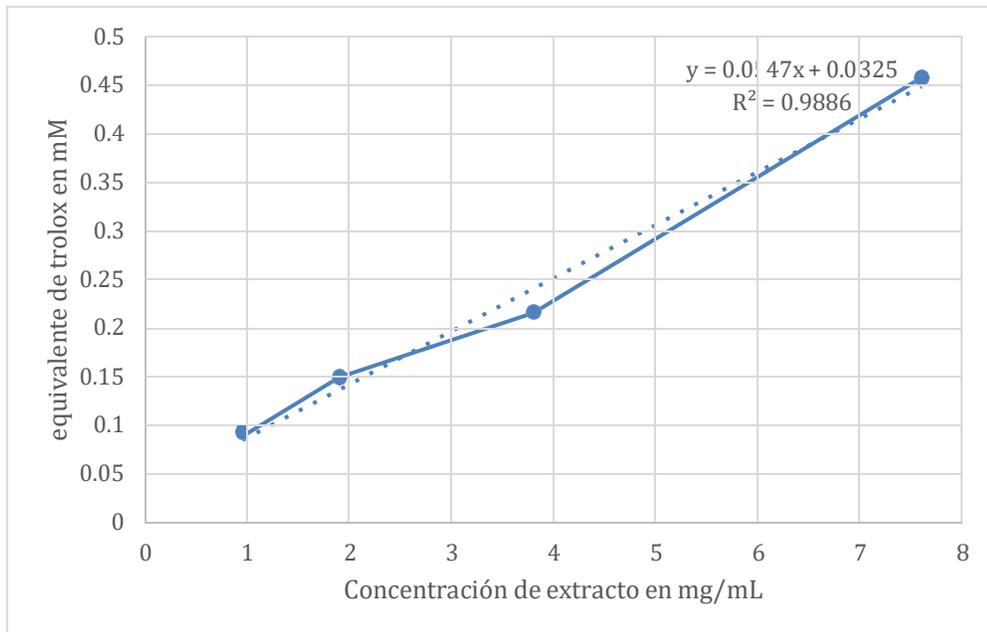


Figura 4. Correlación entre concentración del extracto etanólico de *Senecio nutans* chachacoma y la equivalencia a trolox

Empleado la ecuación de la curva $Y = 0,0547x + 0,0325$ se obtiene:

17,68 mg de extracto \approx 1mM de trolox

Tabla 7. Absorbancia de las concentraciones de trolox por el método ABTS

Concentración de Trolox	Absorbancia a inicial	Absorbancia a final	Absorbancia a corregida	Promedio
1 mM	0.661	0.011	0.65	
	0.671	0.015	0.656	0.654
	0.668	0.013	0.655	
0,5 mM	0.668	0.344	0.324	
	0.664	0.338	0.326	0.325
	0.673	0.349	0.324	
0,25 mM	0.667	0.487	0.18	
	0.669	0.493	0.176	0.178
	0.674	0.495	0.179	
0,125 mM	0.671	0.568	0.103	
	0.663	0.556	0.107	0.106
	0.67	0.562	0.108	
0,0625 mM	0.677	0.589	0.088	
	0.67	0.583	0.087	0.088
	0.673	0.585	0.088	
0,03125 mM	0.66	0.592	0.068	
	0.669	0.603	0.066	0.067
	0.673	0.606	0.067	

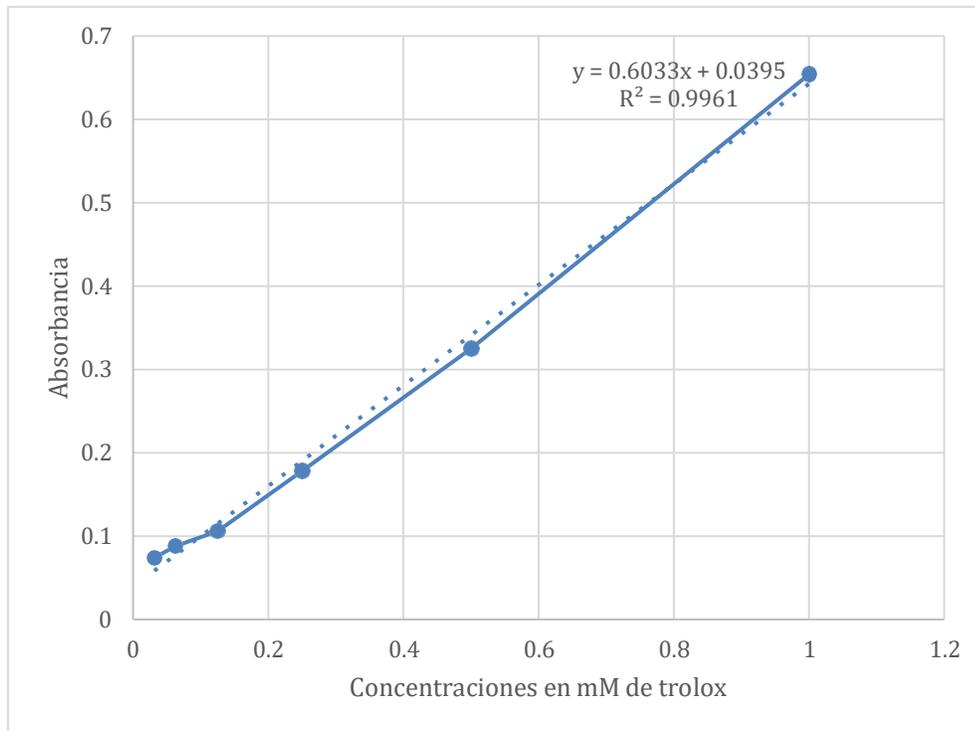


Figura 5. Gráfico de correlación entre concentración y absorbancia de trolox por el método de ABTS

Se utiliza la ecuación de la curva $Y = 0,6033x + 0,0395$ para obtener los equivalentes de trolox de cada dilución del extracto.

Tabla 8. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox por ABTS del extracto etanólico de *Senecio nutans* chachacoma

Concentración de extracto (mg/mL)	Lectura de absorbancia	Promedio de lectura	TEAC (mM)
	0,173		
0,95	0,170	0,174	0,223
	0,179		
	0,262		
1,9	0,251	0,259	0,364
	0,265		
	0,337		
3,8	0,330	0,336	0,492
	0,341		
	0,500		
7,6	0,511	0,509	0,778
	0,516		
	0,823		
15,2	0,815	0,824	*
	0,835		

*Valores fuera de curva

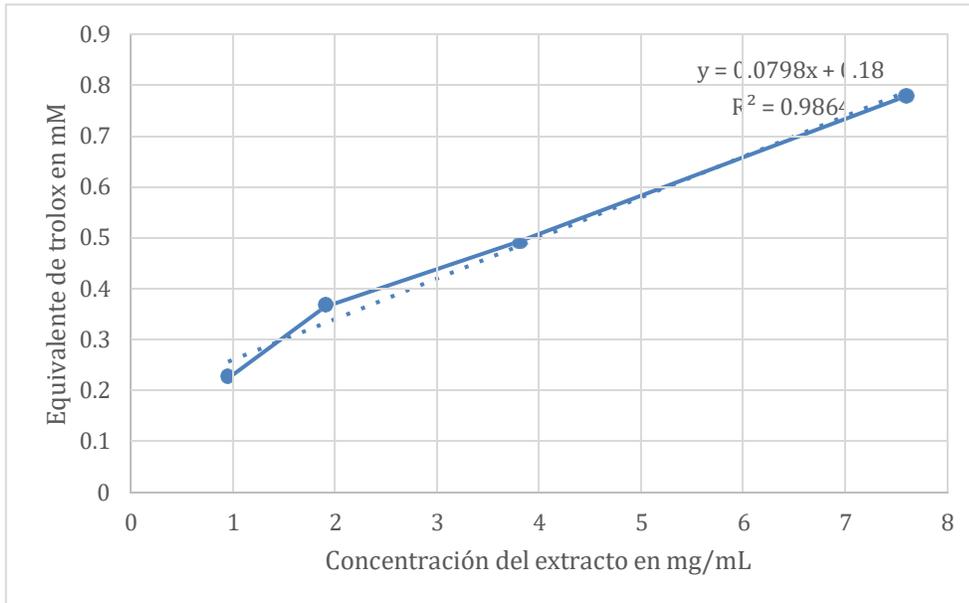


Figura 6. Correlación entre concentración del extracto etanólico de *Senecio nutans* chachacoma y la equivalencia a trolox por ABTS

Aplicando la ecuación de la curva: $Y = 0,0798x + 0,18$ se obtiene:

10,27 mg de extracto \approx 1mM de trolox

4.2. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar un estudio fitoquímico de polifenoles totales y determinación de la actividad antioxidante por tres diferentes métodos del extracto etanólico de las partes aéreas de *Senecio nutans* “chachacoma” que se recolectó en el anexo de Pallca, distrito de Chipao, provincia de Lucana, departamento de Ayacucho; centrándose principalmente en las hojas, que es la parte de la planta que más se utiliza en la medicina tradicional. La chachacoma pertenece a la familia asterácea, (también conocida como Compositae) es la más diversa de las angiospermas, conteniendo aproximadamente 1620 géneros y más de 23600 especies. Esta familia se distribuye por todo el mundo, excepto en la región antártica (Bessada et al., 2015)³¹. El extracto etanólico se obtuvo por maceración de las hojas en alcohol a 96°, el cual luego se concentró hasta obtener un líquido denso viscoso, de color verde oscuro y olor suigéneris; además fue caracterizado mediante las determinaciones que se muestran en la tabla 1, es así que presentó un contenido de sólidos totales de 98,19 g/100g este resultado nos indica que el extracto está prácticamente excepto de agua; sin embargo, el contenido de sólidos solubles expresa que aproximadamente un tercio de sus constituyentes son solubles en agua (sólidos solubles 3,5 en una solución a 10%), otro parámetro a destacar es el alto contenido de cenizas lo que nos indica el

considerable aporte de sales minerales del extracto. En cuanto al estudio fitoquímico, se obtuvo el extracto etanólico seco (concentrado), se realizó un screening con solventes de distintas polaridades de acuerdo a una de las marchas indicadas por Lock 1988²⁴, lo que permitió obtener 5 fracciones como se muestra en la tabla 2, en las cuales se realizaron diferentes reacciones de coloración y/o precipitación que permitió detectar la presencia de los siguientes grupos de metabolitos secundarios: taninos, quinonas, esteroides, cardenolidos, alcaloides y flavonoides, concordando solo en la presencia de flavonoides, taninos con lo obtenido por Apumayta J, 2015; esta diferencia podría deberse a que Apumayta realizó el screening en hojas secas de chachacoma por lo tanto pudo no detectar la presencia de algunos compuestos que se encontrara en bajas concentraciones; así mismo la procedencia de su especie fue de la zona de Huancavelica y como sabemos los metabolitos secundarios pueden variar considerable en una especie dependiendo de factores agronómicos y climáticos entre otros. Esto último se refuerza si vemos que, para la misma especie procedente de Chile, Matta M, 2009³² determinó la presencia de esteroides y flavonoides concordante con nuestros resultados; hay que destacar que en este estudio Matta analizó tres especies de *Senecio* (*S. nutans*, *S. trifurcifolios* y *S. adenophyllos Meyen*) y las tres especies solo coincidieron en la presencia de esteroides/triterpenos y flavonoides. Con respecto al contenido de

polifenoles totales (Tabla 3 y grafico 1) podemos observar que la cantidad obtenida mediante la extrapolación a la curva del patrón usado (ácido gálico) el valor se puede considerar entre el promedio reportado para otras especies del mismo género^{7,32}.

En lo que respecta a la actividad antioxidante, uno de los objetivos del presente estudio podemos afirmar en el extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” presentó una considerable actividad por los tres métodos empleados. Debemos recordar que existen dos mecanismos conocidos para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro*, los cuales se denominan SET (transferencia de electrones simples) y el llamado HAT (transferencia de átomo de hidrogeno), por lo que se aconseja que para afirmar que una especie tiene actividad antioxidante se debe probar al menos dos métodos que implique mecanismos diferentes (García et al., 2004). En ese contexto podemos ver que la determinación de la actividad antioxidante por el método de captación del radical DPPH (que se base en la propiedad de ambos mecanismos mencionados) visualizado en la tabla 3 y figura 1, se obtuvo un IC₅₀ de 8,28 mg/mL de extracto, esto expresada que para obtener una inhibición de 50 por ciento de la absorbancia del radical DPPH necesitamos un extracto de dicha concentración. En lo referente al método de FRAP (Tabla 5 y 6; y gráficos 3 y 4) la actividad antioxidante se compara ante un patrón que en este caso fue el trolox,

el cual es el equivalente hidrosoluble de la vitamina E; se obtuvo un valor de TEAC de 17,68 mg/mL, esto representa que dicha concentración posee una actividad antioxidante equivalente a una solución de 1mM de trolox, se debe tener en cuenta que este método se base solo en el mecanismo de transferencia de electrones (SET); mientras que por el método de ABTS el cual según bibliografía también está basado en los dos mecanismos (SET y HAT, pero con predominando del SET), se obtuvo un TEAC de 10,27 mg/mL equivalente a una solución de 1mM de trolox como se explicó anteriormente. En cuanto a la determinación de la actividad antioxidante solo hallo reportes para la especie *S. Westermanii Dusen* en la cual el extracto con acetato de etilo por el método de DPPH reporta un $IC_{50} = 26,28 \mu\text{g/mL}$; así como la presencia de alcaloides, flavonoides y esteroides/triterpenos (Merino et al., 2015).

En relación a los resultados obtenidos podemos correlacionar que la actividad antioxidante está directamente relacionada a los metabolitos secundarios determinados, considerando que tanto los flavonoides, esteroides/ triterpenoides y taninos determinados en este estudio son relacionados con dicha actividad.

CONCLUSIONES:

- ✓ Se obtuvo un extracto etanólico viscoso el cual fue caracterizado organoléptica y fisicoquímicamente en el que destaca el alto contenido de sólidos totales y cenizas.
- ✓ Los metabolitos secundarios predominantes en el extracto de hojas del *Senecio nutans* “chachacoma” fueron flavonoides, esteroides/triterpenos y alcaloides.
- ✓ El contenido de polifenoles totales en el extracto de hojas del *Senecio nutans* “chachacoma” se encuentra en un valor promedio para las especies del género.
- ✓ La capacidad antioxidante determinada por los tres métodos empleados (DPPH, FRAP y ABTS) en el extracto de hojas del *Senecio nutans* “chachacoma” es apreciable.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar un estudio que permita determinar el tipo de metabolitos secundario, ya como se tiene referencia existe variación entre la misma especie de diferentes zonas.
- ✓ Realizar un estudio de la actividad antioxidante de las diferentes fracciones porque como se tiene referencia de una especie de *Senecio* en la cual el extracto de acetato del etilo presente una capacidad antioxidante muy superior.
- ✓ Establecer estudios de actividad antioxidante in vivo para comprobar si el valor obtenido in vitro es extrapolable.
- ✓ Estudios de comprobación de actividad antibacteriana que le atribuyen la medicina popular.

FUENTES DE LA INFORMACION

1. INS. Plantas medicinales. (consultado 30 abril 2019). Disponible en:
<https://web.ins.gob.pe/es/salud-intercultural/medicina-tradicional/plantas-medicinales>
2. Londoño J. Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad. Parte III. Capítulo 9. (consultado 2 de mayo 2019). Disponible en:
<http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>
3. Suja, K.P., Abraham, J.T., Tamiz, S.N., Jayalekshmy, A., Arumughan, C. (2004). Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry* 84, 393-400.
4. Çelik, H., M. Özgen, S. Serçe and C. Kaya. 2008. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Scientia Horticulturae* 117(4): 345-348.
5. Alfonso G. Remington: The science and practice of pharmacy, 20° edición [Internet]. Philadelphia, USA: Libarmed Verlag S.A.; 2000 [revisado 2001; citado 2018 marzo 25]. Disponible en:
<https://books.google.com.pe/books?id=Av4llsyHqcC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
6. Ávalos-García A, Pérez-Urria C. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2009: 2 (3): 119-145.

7. Palacio M. Farmacognosia fitoquímica. 2011. [consultado 2018 abril] files.selvafarma.webnode.es/200000192-6def76ee8d/TEMA_04.pdf.
8. Ochoa K, Paredes L, Bejarano D, Silva R. Extracción, Caracterización y evaluación de la Actividad Antibacteriana, del aceite esencial de *Senecio Graveolens* Weed (Wiskataya). *Scientia Agropecuaria*. 2012. e-ISSN:2306-6741
9. Mostacero J, Castillo F, Mejia F, Gamarra O, Charcape J, Ramirez R. *Plantas Medicinales del Perú – taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica*. Trujillo: Asamblea Nacional de rectores; 2011
10. Andreani S, Paolini J, Costa J, Muselli A. Essential-oli composition and chemical variability of *senecio vulgaris* L. from Corsica. *Chem Biodivers*. 2015;12(15): 752-766.
11. Apumayta J. Caracterización de los componentes bioactivos y la aceptabilidad organoléptica del filtrante a base de chachacoma (*Senecio graveolens*). Tesis. Universidad Nacional de Huancavelica. Facultad de Ciencias Agrarias. 2015.
12. Mamani D. Actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Senecio spp* (Chachacoma) en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus sp*. Tesis título. Universidad Nacional del Altiplano Facultad de Ciencias Biológicas. 2017
13. Kahriman N, Tosun G, Terzioğlu S, Alpay S and Yaylı N. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the

Flower, Leaf, and Stem of *Senecio pandurifolius*. *Rec. Nat. Prod.* 5:2 (2011) 82-9

14. Kenoufi M, Lograda T, Chalard P, Figueredo O, Randani M. Chemical Composition, Antimicrobial Activity and Chromosome Number of *Senecio giganteus* Desf from Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Reseaech.* 2016; 8(11) 1772-1777.
15. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
16. González, G., García, D. *Ejercicio físico y radicales libres, ¿es necesario una suplementación con antioxidantes? Rev Internac Med Ciencias Actividad Física Deporte.* 2012; 12 (46): 369-88.
17. Pérez P y Perez J. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cub Med Mil.* 2000 v.29 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic.
18. Rojas B. 2017. Determinación de la máxima retención de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el néctar de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Rev. Soc. Quím. Perú* vol.83 no.2 Lima
19. Malpartida, S. Col. 2015 "Tamizaje fitoquímico, cromatografía en capa fina y determinación de la actividad antioxidante de *Solanum radicans* L.F "ñuchco hembra" (Solanaceae).

Extracción. Disponible en:

20. www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wp-content/uploads/2013/02/Extracción.pdf

21. Pérez-Alonso N, Jiménez E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro* *Biotecnología Vegetal* 2011. Vol. 11, No. 4: 195 – 211
22. Benites J, Bravo F, Rojas M, Fuentes R, Moiteiro C, Venâncio F. Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and stems of *Senecio atacamensis* phil. from Chile. *J. Chil. chem. soc.*, 2011: 56, n°2, págs.: 712-714
23. Vargas A. Contenido de flavonoides y fenoles totales en hojas de tres especies del género *Senecio* y determinación de su actividad antioxidante *in vitro*. Ayacucho, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2018
24. Lock O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. PUCP., Fondo Editorial., Lima. 1988.
25. AOAC. Methods Official of Analysis. AOAC International, 16^a Edition. Rockville, Maryland. 2012.
26. Jurado B, Aparcana I, Villarreal L, Ramos E, Calixto M, Hurtado E, Acosta K. Evaluación del contenido de Polifenoles Totales y capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Rev Soc Quím Perú*. 2016, 82(3): 271-279.

27. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity. *Lebensm. -Wiss. Technology/Food Science and Technology* 1995; 28: 25-30.
28. Molyneux P. The use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2004; 26 (2): 211-219.
29. García A, de Pascual T, Santos C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food chemistry* 2004; 84: 13-18.
30. Gonzales A. Aspectos Éticos de la Investigación Cualitativa - OEI. 2005 www.oei.es/historico/salactsi/mgonzalez5.htm
31. Bessada, S.M.F., Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P. 2015. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76: 604–615.
32. Matta M. Screening fitoquímico, antimicrobiano y antioxidante de plantas pre-andinas y del altiplano chileno”. Tesis. Universidad de Chile. Santiago de Chile 2009.
33. Merino, F.; Oliveira, V.; Paula, C.; Cansian, F.; Souza, A.; Zuchetto, M.; Hirota, B.; Duarte, A.; Kulik, J.; Miguel, M.; Miguel, O. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *artemia salina*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, 2015, v.17, n.4, supl. iii, p.1031-1040.

ANEXO 1 MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: Estudio fitoquímico y actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *Senecio nutans*.

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	MARCO TEORICO	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLES	METODOLOGIA
¿Qué grupos de metabolitos secundarios y que capacidad antioxidante presenta el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie <i>Senecio nutans</i> ?	Determinar la presencia de metabolitos secundarios y actividad antioxidante en el extracto etanólico de las partes aéreas del <i>Senecio nutans</i>	Metabolitos secundarios: Son moléculas orgánicas que no cumplen ningún rol fisiológico en los vegetales en su crecimiento y el desarrollo. Generalmente se encuentran en cantidades relativamente pequeñas y su producción puede ser extendida o restringida a familias, géneros, o especies particulares. • Compuestos fenólicos: flavonoides, leucoantocianos, cumarinas, antocianinas, taninos y antraquinonas. • Terpenos y esteroides: triterpenos, esteroides, saponinas • Alcaloides: alcaloides	El extracto etanólico de partes aéreas de <i>Senecio nutans</i> presenta diferentes grupos de metabolitos secundarios y una actividad antioxidante por los dos métodos probados	INDEPENDIENTE Extracto de las partes aéreas de <i>Senecio nutans</i> Indicador: Parámetros fisicoquímicos Metabolitos secundarios Índice: Sólidos totales Sólidos solubles Cenizas pH Reacciones de color y precipitación	TIPO DE INVESTIGACION Básica. NIVEL DE INVESTIGACION: Descriptivo y Explicativo. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: Experimental. POBLACION: Especie <i>Senecio nutans</i>
Problemas específicos ¿Qué característica fisicoquímica presenta el extracto etanólico de las partes aéreas <i>Senecio nutans</i> ¿Qué tipos de metabolitos secundarios presenta el extracto de partes aéreas de <i>Senecio nutans</i> ? ¿Cuál es el nivel de actividad antioxidante que presenta el extracto etanólico de partes aéreas de <i>Senecio nutans</i>	Objetivos específicos Obtener un extracto etanólico y su caracterización fisicoquímica. Realizar un screening fitoquímico y la identificación de metabolitos secundarios. Determinar la capacidad de inhibición del radical DPPH. Comprobar la capacidad antioxidante por FRAP.	Actividad antioxidante: Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan ROS. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que las neutralicen (Pérez 2000). A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un radical libre. El antioxidante, al reaccionar con un ROS le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un ROS débil no tóxico (la vitamina E).	Hipótesis específicos: El extracto obtenido de partes aéreas de <i>Senecio nutans</i> presenta características fisicoquímicas que permite su estabilidad El extracto presenta metabolitos secundarios como: flavonoides, alcaloides, taninos y compuestos fenólicos libres. Presenta una alta actividad antioxidante frente al trolox por ambos métodos empleados.	DEPENDIENTE Actividad antioxidante Indicador: Método DPPH Método FRAP Índice: - IC ₅₀ -TEAC	TECNICAS E INSTRUMENTOS: ✓ Constancia de museo de Historia Natural ✓ Screening fitoquímico ✓ Métodos de análisis espectrofotométricos.

ANEXO 2

Recolección de la muestra vegetal



Figura 2: Trituración de la planta



Figura 3: obtención del extracto etanolico



