



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



CONSTANCIA

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

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PARTE AÉREA DE *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey "MANZANILLA MACHO"

Presentado por:

RAMOS DE LA CRUZ, KEVIN EDUARDO


Bachiller del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es **3%** por el cual se otorga el calificativo de:

APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

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

Observaciones:

Ica, 10 de Diciembre de 2021


.....
LUZ JOSEFINA CHACALTANA RAMOS
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

CHRLJ/osad

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Farmacia y Bioquímica



TITULO:

Determinación de la Actividad Antioxidante y Evaluación de la Toxicidad Aguda del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey "Manzanilla Macho"

Línea de investigación:

Salud pública y consevación del medio ambiente

Autor:

Bach. Ramos De La Cruz, Kevin Eduardo

Ica – Perú

2021

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los logros y enseñanzas que me ha brindado para poder valorarlo cada día más, a mis padres por ser las personas que han sabido guiarme y las cuales admiro por todos los sacrificios que realizaron para que pueda culminar mi carrera profesional. A mis asesores, por el tiempo dedicado, por su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por brindarme salud y bendición para alcanzar mis metas como persona y como profesional.

A MIS PADRES

Por esforzarse en darme una carrera para mi futuro, por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor. Este trabajo que me llevó meses hacerlo es para ustedes, por ser mi motor y motivo.

A MI HERMANA

Por ser mí guía y por forjar en mí, bases de responsabilidad y deseos de superación. Este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían. Sus infinitas virtudes y su gran corazón, hacen que la admire cada día más.

A MIS ASESORES

Dra. Santos Haydee Chávez Orellana, Dr. Felipe Artemio Surco Laos y Dr. Ernesto Torres Veliz. Durante la realización de mi proyecto, ustedes han sido las personas quien me han guiado en el complicado proceso. Es cierto, no ha sido nada fácil, sin embargo, gracias a su ayuda, el proceso fue un tanto menos complicado.

El resultado de mi tesis ha sido espectacular y una gran parte del desarrollo de este excelente trabajo se lo debo a ustedes.

Finalmente, a todas aquellas personas, colegas y amigos que me brindaron su apoyo e información para el logro de mis objetivos.

GRACIAS

INDICE

	Pág.
PORTADA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDO	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	
Descripción de la realidad problemática	12
Problema General.....	12
Problemas Especificos	12
Antecedentes internacionales	13
Antecedentes nacionales	13
Justificación e importancia.....	14
Objetivo General.....	15
Objetivos Especificos.....	15
Hipótesis y Variables de la investigación	15
1.1. Marco teórico.....	17
1.1.1. Clasificación botánica.....	17
1.1.2. Actividad antioxidante.....	17
1.1.2.1. Tipos de antioxidantes	17
1.1.3. Vitamina C.....	19
1.1.4. Antioxidantes en los alimentos	20

1.1.5. Fuentes naturales de los antioxidantes	20
1.1.6. Radicales libres	20
1.1.7. Estrés oxidativo.....	22
1.1.8. Envejecimiento y patologías	23
1.1.9. Polifenoles	23
1.1.10. Flavonoides	25
1.1.11. Métodos de evaluación de la actividad antioxidante	26
1.1.12. Toxicidad	27
1.2. Marco Conceptual.....	29
II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	
2.1. Tipo, Nivel y Diseño de Investigación	30
2.2. Población y Muestra	30
2.3. Técnicas y Procedimientos de recolección de datos	30
2.4. Técnicas de procesamiento de la información	31
2.5. Aspectos Éticos.....	33
III. RESULTADOS	34
IV. DISCUSIÓN	37
V. CONCLUSIONES	38
VI. RECOMENDACIONES	39
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
VIII. ANEXOS	49

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Operacionalización de las variables	16
TABLA 2. Fuentes comunes de radicales libres y fuentes comunes de antioxidantes	23
TABLA 3. Escala de rangos, grados o estimaciones de toxicidad aguda (ETA) en función a la DL50 de la sustancia diseñado por John William Trevan.....	28
TABLA 4. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la parte aérea de <i>Helenium aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”	34
TABLA 5. Resultados de la prueba de toxicidad aguda del extracto etanólico de la parte aérea de <i>Helenium aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”	36
TABLA 6. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la Fracción “A” del extracto etanólico de la parte aérea de <i>helenium aromaticum</i> (hook.) l.h. bailey “manzanilla macho”	64
TABLA 7. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la Fracción “C” del extracto etanólico de la parte aérea de <i>helenium aromaticum</i> (hook.) l.h. bailey “manzanilla macho”	64
TABLA 8. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la Fracción “D” del extracto etanólico de la parte aérea de <i>helenium aromaticum</i> (hook.) l.h. bailey “manzanilla macho”	65
TABLA 9. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la Fracción “E” del extracto etanólico de la parte aérea de <i>helenium aromaticum</i> (hook.) l.h. bailey “manzanilla macho”	65

INDICE DE FIGURA

FIGURA 01. Parte aérea de la planta <i>Helenium aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey “manzanilla macho”.....	14
FIGURA 02. Estructura química de la Vitamina A	19
FIGURA 03. Estructura química de la Vitamina E.....	19
FIGURA 04. Estructura del ácido L-ascórbico y ácido isoascórbico	20
FIGURA 05. Antioxidantes como secuestradores de radicales libres	20
FIGURA 06. Consecuencias de las ERO en enfermedades y el papel preventivo de los polifenoles.....	24
FIGURA 07. Estructura principal de flavonoides.....	25
FIGURA 08. Flavonoides, estructura básica y tipos.....	26
FIGURA 09. Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). La actividad antioxidante de una muestra se expresa en IC50 (concentración mínima necesaria para inhibir al 50% el (DPPH).	27
FIGURA 10. Zona de Molletambo distrito de Yauca del Rosario - Ica	31
FIGURA 11. Capacidad antioxidante de las Fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de la parte aérea de <i>Helenium aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho” mediante el método de DPPH. Constancia del Herbario	35
FIGURA 12. Constancia del Herbario.....	49
FIGURA 13. Recolección y Pre-Selección de la planta <i>Helenium aromaticum</i> “Manzanilla macho”	51
FIGURA 14. Flujograma del tratamiento de la muestra vegetal de la parte aérea de <i>H. aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey.....	52
FIGURA 15. Flujograma de la obtención del extracto etanólico de la parte aérea de <i>H. aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey. Mediante el método de maceración.....	53
FIGURA 16. Flujograma del fraccionamiento del extracto etanólico de la parte aérea de <i>H. aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey.	56
FIGURA 17. Flujograma del Screening Fitoquímico.....	57

FIGURA 18. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción “A” del extracto etanólico de la parte aérea de <i>H. aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey.....	58
FIGURA 19. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción “B” del extracto etanólico de la parte aérea de <i>H. aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey.....	59
FIGURA 20. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción “C” del extracto etanólico de la parte aérea de <i>H. aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey.....	60
FIGURA 21. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción “D” del extracto etanólico de la parte aérea de <i>H. aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey.....	61
FIGURA 22. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción “E” del extracto etanólico de la parte aérea de <i>H. aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey.....	62
FIGURA 23. Determinación de la actividad antioxidante de la Fracción D del extracto etanólico de la planta <i>Helenium aromaticum</i> “Manzanilla macho” mediante la decoloración del catión radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	63

RESUMEN

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PARTE AÉREA DE *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “MANZANILLA MACHO”

Objetivos. Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”. Evaluar el grado de toxicidad aguda en modelos animales. **Materiales y métodos.** Para determinar el efecto antioxidante se utilizó el método del DPPH hasta obtener la IC₅₀. Para evaluar el grado de toxicidad aguda se utilizó 18 ratones divididos en 2 grupos: Un grupo a la dosis de 2000 mg/Kg y otro grupo que recibió solo el vehículo (grupo control). **Resultados.** En la actividad antioxidante, el IC₅₀ de la fracción D fue de 0.462 mg/mL, mientras que la fracción A, C y E fue de (3.049 mg/mL, 9.945 mg/mL, 2.673 mg/mL respectivamente). Respecto a la toxicidad, la dosis límite de 2000 mg/Kg de masa corporal provocó la muerte total de los ratones (9 ratones). **Conclusiones.** La fracción D obtenida del Screening Fitoquímico presenta mayor actividad antioxidante que las otras fracciones propuestas.

Palabras clave: Antioxidante, DPPH, *Helenium aromaticum*, Toxicidad aguda

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ASSESSMENT OF ACUTE TOXICITY OF ETHANOL EXTRACT FROM THE AERIAL PART OF *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey "MALE CHAMOMILE"

Goals. To determine the antioxidant activity of the ethanolic extract of the aerial part of *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey "Male Chamomile." Evaluate the degree of acute toxicity in animal models. **Materials and methods.** To determine the antioxidant effect, the DPPH method was used until obtaining the IC₅₀. To evaluate the degree of acute toxicity, 18 mice divided into 2 groups were used: A group at the dose of 2000 mg / Kg and another group that received only the vehicle (control group). **Results.** In antioxidant activity, the IC₅₀ of fraction D was 0.462 mg / mL, while fraction A, C and E was (3.049 mg / mL, 9.945 mg / mL, 2.673 mg / mL respectively). Regarding toxicity, the limit dose of 2000 mg / Kg of body mass caused the total death of the mice (9 mice). **Conclusions.** Fraction D obtained from the Phytochemical Screening shows greater antioxidant activity than the other proposed fractions.

Keywords: Antioxidant, DPPH, *Helenium aromaticum*, Acute toxicity

I. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son moléculas que interactúan con los radicales libres en cualquier etapa (Iniciación, propagación, terminación, descomposición o posterior oxidación)⁽¹⁾.

Por otra parte, los prooxidantes son los considerados radicales libres, capaces de inducir estrés oxidativo, provenientes de una gran variedad de fuentes⁽²⁾.

Desde un punto de vista fitoquímico, los antioxidantes derivados de las plantas 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, ayudando a la prevención o retraso en el desarrollo de enfermedades degenerativas⁽³⁾.

El estrés oxidativo surge debido a una disminución de la capacidad antioxidante del sistema o en sistemas biológicos luego de una prolongada exposición a oxidantes, relacionándose con la generación de radicales libres como las especies reactivas oxigenadas (EROs)^(4,5).

El exceso de radicales libres, puede causar la inhibición de algunas enzimas como superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas. Generando efectos mortales en las células por la oxidación de DNA, proteínas, lípidos y enzimas; pudiendo prolongar la producción de más radicales libres y aumentando el daño de tejidos. Sin embargo, los agentes antioxidantes pueden inhibir o interrumpir las reacciones de transformación que originan daños a las mencionadas biomoléculas⁽⁶⁾.

En el Perú, se utiliza empíricamente, alrededor de 1 400 especies de plantas con fines medicinales, cuyo uso popular se registra durante miles de años^(7,8). Estas especies poseen gran variedad de moléculas orgánicas (Flavonoides en su mayoría), capaces de captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, ayudando a la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas.

La especie *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey se puede encontrar de manera habitual en Chile y se distribuye desde Valparaíso (Aconcagua) hasta la Concepción, conocida por sus pobladores como “manzanilla del campo”, “manzanilla del cerro”⁽⁹⁾; y en el Perú se encuentra distribuida en los departamentos de Ica, Arequipa, Ayacucho, conocida por sus pobladores como “manzanilla macho”^(10, 11).

Esta planta es empleada en la medicina tradicional como antiinflamatoria en diversas afecciones asociadas a procesos inflamatorios y ya que contiene diversos metabolitos, pudiera comportarse como un potente antioxidante; sin embargo, no existen investigaciones que corroboren dicho uso para esta planta, ni que avalen su seguridad por vía oral, por lo que es preciso realizar estudios farmacológicos y toxicológicos en este sentido.

El objetivo fundamental de esta investigación científica será determinar la actividad antioxidante y evaluar la toxicidad aguda de esta especie.

Descripción de la realidad problemática

El oxígeno es el combustible necesario para la vida, pero nos hace pagar un importante precio por ello, la oxidación, convirtiéndolo en nuestro principal agresor⁽¹²⁾. Lo cierto es que todos los seres vivos que emplean oxígeno para generar energía, liberan radicales libres⁽¹³⁾.

Los radicales libres son partículas inestables que han perdido un electrón y son altamente reactivas⁽¹⁴⁾.

Los radicales libres son fabricados por nuestro propio organismo, pero en cantidades moderadas para combatir contra bacterias y virus. Pero a la vez, estos radicales libres son neutralizados fácilmente por nuestro propio sistema antioxidante.

El aumento de radicales libres por encima de la cantidad de agentes antioxidantes, origina un estrés oxidativo, lo que produce daño celular⁽¹⁵⁾.

El exceso sostenido de radicales libres en nuestro sistema a través de los años, originan que nuestro sistema antioxidante requiera de los antioxidantes de la dieta⁽¹⁶⁾.

Conforme la tecnología avanza, algunas industrias farmacéuticas usan los antioxidantes procedentes de las plantas, en medicina y como preservantes en alimentos (quercetina, tocoferol y caroteno), semejante con los antioxidantes sintéticos de mayor uso como 2-terbutilhidroxitolueno (BHT) y 2-terbutilhidroxianisol (BHA); presentando la desventaja de ser tóxicos⁽¹⁷⁾.

Los antioxidantes naturales están despertando mayor interés en la población, debido principalmente a que son innatamente más seguros que los compuestos sintéticos y debido a la eficacia que puede producir la gran variedad de agentes fitoquímicos, coadyuvando de manera positiva la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento. Por lo expuesto anteriormente nos planteamos la siguiente pregunta de investigación.

Formulación del Problema

Problema general

¿El extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho” presentará actividad antioxidante y toxicidad aguda?

Problemas específicos

PE1. ¿Tendrá el extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho” metabolitos secundarios?

PE2. ¿Tendrá el extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho” actividad antioxidante?

PE3. ¿Cuál será el grado de toxicidad del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”?

Antecedentes Internacionales

Wener et al. (1963), en México reportaron por primera vez la estructuras de las lactonas sesquiterpénicas de la especie *Helenium*: Helenalina, balduilina, mexicanina-1 y neohelenalina (mexicanina D) ⁽²³⁾.

Romo y Nathan (1963), en Chile, reportaron los constituyentes de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey y las estructuras de aromatin y aromaticin por primera vez, aislando la helenalina, mexicanin I y dos nuevas lactonas sesquiterpénicas; aromatin y aromaticin ⁽²⁴⁾.

Clark (1982), en EE.UU. realizó un estudio de una sustancia amarga que produce estornudos aislada de *Helenium autumnale*. Proponiendo como nombre “Helenalina” ⁽²⁵⁾.

Alvarenga et al. (2001), en Brasil, realizaron un estudio de compuestos naturales aislados de asteraceae, reportando la presencia de lactonas sesquiterpénicas y flavonoides para la tribu heleniaea ⁽²⁶⁾.

Barrera et al. (2011), en México, evaluaron la actividad antibacteriana de ocho extractos diferentes de las flores de *Helenium mexicanum* HBK; frente a 10 bacterias patógenas humanas, mediante los métodos: disco de difusión, dilución en caldo y bioautografía ⁽²⁷⁾.

Antecedentes Nacionales

Hernández Peña Marcos Joel, Mendoza Bautista Roberto Carlos (2014) en Perú realizaron un estudio de Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “manzanilla macho” y evaluación de la actividad antibacteriana ⁽²⁸⁾.

Hernández Peña Marcos Joel et al. (2018), realizaron un estudio del Perfil metabolómico por HPLC-ESI-MS-MS en la fracción gastroprotectora de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “manzanilla macho” ⁽²⁹⁾.



Figura 01. Parte aérea de la planta *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey
“manzanilla macho”

Fuente: Dick Culbert from Gibsons, B.C., Canada

Justificación e Importancia

En la actualidad existen varios productos alimenticios que contienen antioxidantes sintéticos, pero a la vez, existen numerosas alternativas de antioxidantes naturales, entre los cuales se encuentran la vitamina C y los compuestos polifenólicos, ampliamente estudiados por su efecto para contrarrestar algunas enfermedades degenerativas.

Los antioxidantes son sustancias que inhiben o retardan el proceso oxidativo, cuya actividad podría deberse a sus componentes polifenólicos⁽¹⁸⁾.

Los polifenoles son compuestos con actividad antioxidante, presentes en las plantas y alimentos. Dentro de este grupo, se encuentran los flavonoides que son sustancias que manifiestan potente actividad antioxidante⁽¹⁹⁾.

Las plantas poseen diferentes sustancias antioxidantes, por lo cual sería difícil determinar la cantidad en la que se encuentra en cada una de las diferentes especies.

Existen varias divulgaciones científicas en cuanto al conocimiento de las enfermedades y su tratamiento, pero aun existen muchas dudas relacionadas al origen⁽²⁰⁾. En los últimos

años se ha incrementado el predominio de las enfermedades crónicas y enfermedades no transmisibles, siendo más frecuentes las enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer, consideradas como las dos primeras causas de muerte, siendo las sustancias oxidantes, uno de los principales factores de riesgo asociado con su desarrollo ⁽²¹⁾.

El oxígeno, se encuentra generalmente en su forma más estable (O₂) pero algunas veces puede ocurrir que, por exposición a radiaciones ionizantes, contaminación del medio ambiente, exposición a rayos ultravioleta, entre otras, se originen las especies reactivas de oxígeno (EROs), teniendo como objetivo principal la molécula de ADN.

Estos daños que los origina los radicales libres, están íntimamente vinculados con el origen de enfermedades como el cáncer ⁽²²⁾.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Determinar la actividad antioxidante y evaluación de la toxicidad aguda del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”.

Objetivos Específicos:

OE1. Identificar mediante un screening fitoquímico los posibles metabolitos responsables de la actividad antioxidante del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”.

OE2. Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”.

OE3. Evaluar características de toxicidad aguda del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”.

Hipótesis y variables de la Investigación

Hipótesis

H1. El extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla Macho” presenta metabolitos secundarios.

H2. El extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla Macho” presenta alta actividad antioxidante.

H3. El extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla Macho” no presenta características tóxicas a dosis de 2000 mg/Kg.

Variables

TABLA 1. Operacionalización de las variables

Variable	Dimensión	Indicador	Escala de medición
V. Independiente			
Extracto etanólico de la parte aérea de <i>Helenium aromaticum</i> (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”	Estudio Fitoquímico	Análisis organolépticos: Olor, Textura y Color	Nominal
		Metabolitos secundarios: - Flavonoides. - Aminoácidos. - Triterpenoides. - Quinonas. - Alcaloides. - Catequinas. - Lactonas sesquiterpénicas.	Nominal
V. Dependiente			
Actividad Antioxidante	Capacidad antioxidante total	Método DPPH	IC ₅₀
Toxicidad Aguda	Características de la toxicidad aguda	Mortalidad	N° de animales muertos del grupo control vs N° de animales muertos del grupo tratado
		Estudio macroscópico de principales órganos	Comparación del cambio de tamaño y color de los órganos del grupo control vs grupo tratado
		Peso corporal (g)	Peso corporal promedio del grupo control vs grupo tratado a los 7 y 14 días.
		Signos y síntomas	Si presenta / No presenta (temblores, convulsiones, micción, defecación, letargo)

1.1. MARCO TEÓRICO

1.1.1. Clasificación botánica

La muestra vegetal completa ha sido estudiada y clasificada como: *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey, por el Dr. Hind, D.J. Nicholas, investigador responsable en Asteráceas del Royal Botanic Gardens, Kew - UK; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el sistema de clasificación de Arthur Cronquist (1981) “In Integrated System of Classification of Flowering Plants”. La taxonomía, nombre vulgar, sinónimos, descripción de la especie, distribución y usos se encuentran en Anexos ^(30, 31, 32, 33, 34, 35).

1.1.2. Actividad antioxidante

Los antioxidantes de origen vegetal son un conjunto de fitoquímicos tales como los carotenoides, antocianinas, flavonoides y vitaminas, entre los más importantes.

Los antioxidantes son compuestos que son capaces de prevenir e incluso disminuir los daños causados en tejido humano por el efecto normal de oxidación fisiológica ⁽³⁶⁾.

Existen diferentes maneras para determinar la actividad antioxidante, utilizando distintos métodos para la generación de radicales libres; pero dependerá de la capacidad antioxidante que tenga la planta, para poder inhibirlos ⁽³⁷⁾.

Los antioxidantes neutralizan la acción oxidante de los radicales libres, sin perder su estabilidad electroquímica. Los antioxidantes donan electrones y evitan que los radicales libres los capten de las células ⁽³⁸⁾.

Los flavonoides como antioxidantes pueden ayudar a proporcionar protección contra estas enfermedades. Actualmente, existen antioxidantes sintéticos que son comercialmente accesibles, pero pueden ser tóxicos. Por ello, es importante encontrar y desarrollar nuevas técnicas para determinar antioxidantes de origen natural que sean seguras ⁽³⁹⁾.

1.1.2.1. Tipos de antioxidantes

A) Antioxidantes primarios (sistema enzimático)

Previenen la formación de nuevos radicales libres. Este sistema enzimático es el primer nivel de defensa antioxidante y se origina al interior del organismo.

Esto se consigue convirtiendo las ERO en moléculas menos dañinas, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas. En este grupo se destacan las siguientes enzimas encargadas de mantener niveles aceptables de radicales libres en nuestras células ⁽⁴¹⁾:

- **El glutatión peroxidasa (GPx)**, Perteneciente a una familia de enzimas con actividad peroxidasa. La GPx se define como una glicoproteína tetramérica que tiene como cofactor al selenio. En las células animales se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citosol. Se han descrito isoformas de GPx, que difieren tanto en su localización, como en su especificidad hacia el sustrato. La GPx fosfolípido hidroperóxido, tiene como función principal proteger al organismo contra la peroxidación lipídica a nivel de membranas y de las lipoproteínas de baja densidad ⁽⁴⁰⁾.
- **Coenzimas superóxido**, regulan la cantidad de oxígeno que ingresan a las células y así evitan una oxidación elevada de las células.
- **La catalasa**, tiene la función de poder captar los radicales libres y convertirlos en agua y oxígeno, beneficiando así a las células, tiene acción neuroprotectora, ayudando en los procesos inflamatorios del sistema nervioso, funcionando dentro de la célula como antioxidante no enzimático, con capacidad de aceptar los electrones perdidos por las moléculas.

B) Antioxidantes secundarios (sistema no enzimático)

Los antioxidantes secundarios constituyen la segunda defensa antioxidante y capturan los radicales libres que se han formado, para evitar las reacciones en cadena o interrumpiendo su propagación. Ejemplos de ellos son la vitamina C, E, B-caroteno y sustancias endógenas con poder antioxidante (Glutatión urato, bilirrubina y ubiquinona) ⁽⁴¹⁾.

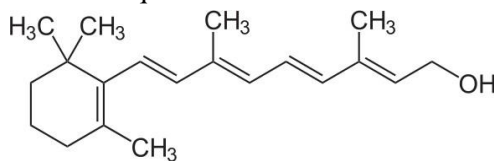
C) Según otros autores

Según Dávila ⁽⁴²⁾, existen antioxidantes que ayudan a protegernos de la formación de radicales libres, entre ellas tenemos:

- **Citroflavonoides:** Como la hesperidina y la rutina. Presentes en ciruelas, uvas, manzana, melon, etc.
- **Coenzima Q10:** Presentes en los pescados como las sardinas, salmon y caballa.
- **Ácido gama linoleico:** Presentes en los aceites vegetales.
- **El glutatión:** Presentes en las espinacas, sandías, fresas, ajo y tomates,
- **Zinc:** Presente en las legumbres, carnes, pescados, cereales, etc.
- **Selenio:** Presente en verduras, mariscos, pescados, verduras y levadura de cerveza.
- **Superóxidos dismutasa (SOD):** Presente en el zapallo, trigo, etc.

- **Vitamina A:** Conocida también como “Retinol” liposoluble ⁽⁴⁴⁾. Presente en las espinacas, camote, zanahorias, manzana, tomate, brócoli, etc.

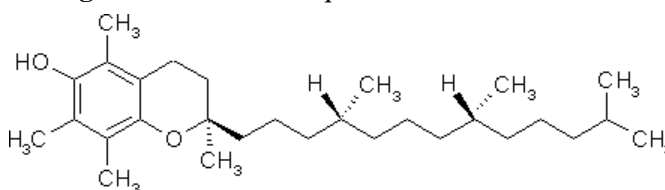
Figura 02. Estructura química de la Vitamina A



Fuente: Robinson (1991)

- **Vitamina E:** Conocida también como “Tocoferol” ⁽⁴³⁾. Es una vitamina liposoluble que actúa como antioxidante protegiendo el tejido corporal del daño originado por los radicales libres ⁽⁴⁵⁾, presente en las almendras, espinacas, aceites vegetales, etc.

Figura 03. Estructura química de la Vitamina E



Fuente: FELIPE Y POSUELO (2004)

1.1.3. Vitamina C

La vitamina C, es una importante vitamina hidrosoluble con actividad antioxidante por su alta capacidad de donar un electron y lograr regresar a su forma reducida ⁽⁴⁶⁾. Se degrada fácilmente por cambios de temperatura, radiación y alta concentración de oxígeno. Esta vitamina se encuentra biodisponible en frutas, hortalizas, zumos y alimentos fortificados. Gracias a su estructura en forma de ácido ascórbico (mayor actividad biológica).

La deficiencia de vitamina C genera escorbuto, que esta asociada a la susceptibilidad de presentar infecciones, fatiga y debilidad muscular. En niños es causa de anormalidades y hemorragias óseas ⁽⁴⁷⁾.

Aproximadamente el 90% de la vitamina C ingerida en la dieta resulta de vegetales frescos, verduras y frutas, de carácter ácido, preferiblemente crudas o cocidas por muy poco tiempo y servidas de inmediato. Siendo sus fuentes principales los cítricos, fresas, pimientos, tomates, coles y brócoli.

El contenido de vitamina C en frutas y verduras varía dependiendo del grado de madurez de las mismas, siendo menor cuando están verdes, aumenta su cantidad cuando están en su punto y luego vuelve a disminuir ⁽⁴⁸⁾.

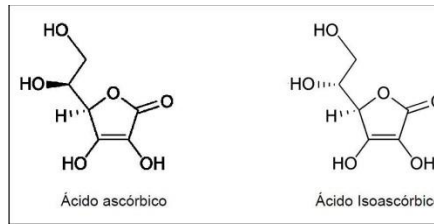


Figura 04. Estructura del ácido L-ascórbico y ácido isoascórbico

Fuente: Barbany J, Javierre C. Archivos de Medicina del deporte. (2006).

1.1.4. Antioxidantes en los alimentos

En nuestro sistema existe un equilibrio de agentes oxidantes/antioxidantes, en la cual, por diversos factores se produce un estrés oxidativo que está ligado a muchos procesos fisiopatológicos. Es por ello, que es importante el consumo de agentes naturales para continuar manteniendo el equilibrio, o incluso a favor de los agentes antioxidantes.

1.1.5. Fuentes naturales de los antioxidantes

Según Aquino ⁽⁴⁹⁾, la capacidad antioxidante que poseen los vegetales se debe a la presencia de polifenoles capaces de retener los radicales libres.

Para Middleton y Kandaswami ⁽⁵⁰⁾, Rice-Evans ⁽⁵¹⁾. Los polifenoles son potentes agentes antioxidantes con efectos anticarcinogénicos y antimutagénicos.

La actividad antioxidante se debe a la presencia de un número variable de grupos hidroxilo fenólicos en su estructura química, los mismos que reaccionan con los radicales libres (**Figura 05**).

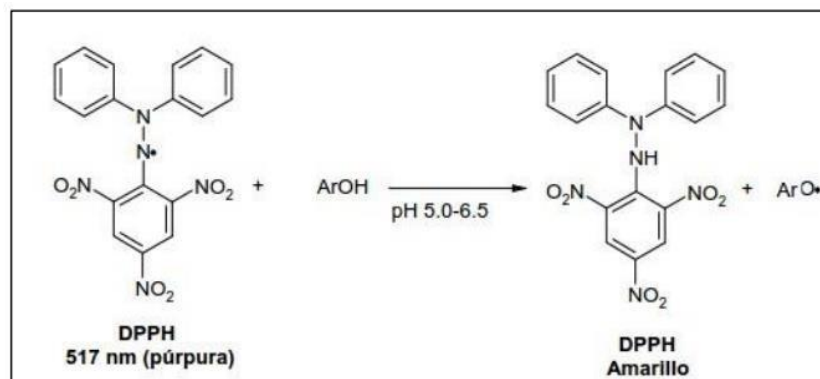


Figura 05. Antioxidantes como secuestradores de radicales libres

Fuente: Sakakibara ⁽⁵²⁾

1.1.6. Radicales libres

Los radicales libres con aquellas especies químicas que presentan un electrón desapareado o impar en su estructura, generando así una inestabilidad. Estos radicales libres son a la vez muy reactivos y con una vida media corta. Dentro de

las fuentes de sustancias oxidantes, tenemos dos grupos endógenas y exógenas⁽⁵³⁾. Entre los daños que pueden ocasionar los radicales libres en las células tenemos:

- Pérdida de identidad de la célula, ocasionada por la destrucción de las proteínas de la membrana celular.
- Fusión entre los lípidos y las proteínas de la membrana, endureciéndola, haciéndola más frágil y quebradiza.
- Ruptura de la membrana celular permitiendo el fácil ingreso de las bacterias y virus.

El daño que puede generar los radicales libres como resultado, está relacionado a diversos procesos patológicos, como cáncer, insuficiencia renal, diabetes mellitus, hipertensión e incluso en mismo proceso de envejecimiento⁽⁵⁴⁾.

El origen de los radicales libres puede deberse de varias maneras, como por ejemplo el estrés oxidativo producido durante el ejercicio físico, por drogas, bacterias o virus⁽⁵⁵⁾. Pero a la vez cabe indicar que los radicales libres no son totalmente dañinos, ya que nuestro organismo los produce de manera moderada para luchar contra bacterias y virus.

Nuestro propio sistema inmune neutraliza fácilmente los radicales libres producidos por el cuerpo para llevar a cabo funciones específicas. Con el paso de los años se produce un exceso sostenido de radicales libres en nuestro sistema, momento en el cual son necesarios los antioxidantes de la dieta. El aumento de radicales libres por encima de la cantidad de las sustancias antioxidantes conlleva al estrés oxidativo, produciendo daño celular⁽⁵⁶⁾.

En el sistema de pruebas, la evaluación de la actividad antioxidante se enfoca en monitorear la capacidad del extracto para capturar radicales libres o inhibir su formación⁽⁵⁷⁾.

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre los antioxidantes y los oxígenos, llevando a cabo el daño celular, por lo que se ha relacionado con el asma, el cáncer, cataratas, diabetes, inflamación gastrointestinal enfermedad hepática, envejecimiento, aterosclerosis, lesión isquémica y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y Alzheimer⁽⁵⁸⁾.

Dentro de las fuentes de sustancias oxidantes, tenemos dos grupos:

Endógenas: El citocromo p450, citocromo b5, catecolaminas, riboflavina, mieloperoxidasa y la NADPH-oxidasa.

Se ha demostrado que los radicales libres cumplen funciones fisiológicas importantes

en nuestro organismo ⁽⁵⁹⁾.

Exógenas: Xenobioticos, (benzopirenos, quinonas, biperilidos), el humo del cigarro, ciertos componentes de la dieta (sales de hierro y cobre), las radiaciones y la hiperoxia.

Las características de un radical libre son ⁽⁶⁰⁾:

- Electrón no apareado.
- Alta inestabilidad.

Las situaciones que aumentan la producción de radicales libres son:

- Humo de cigarro.
- Procesos metabólicos.
- Las dietas ricas en grasas.
- Drogas.
- Contaminación ambiental, etc.

1.1.7. Estrés oxidativo

A pesar que el oxígeno se puede encontrar en su forma estable (O_2), existen acciones enzimáticas, reacciones químicas o efectos de las radiaciones ionizantes que logran generar radicales libres, capaces de generar un daño celular, daño a las macromoléculas, entre otros ⁽⁶¹⁾.

En los orbitales, los electrones se mantienen apareados con un espín particular, cuando se tienen electrones desapareados se pierde la estabilidad, ganando reactividad la molécula, ya que dichos electrones tratarán de robar electrones de otras moléculas para estabilizarse. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pertenecen a este tipo de moléculas conocidas por ser precursores de radicales o también llamados radicales libres (RL). El principal radical libre es el oxígeno y es debido a que posee dos electrones desapareados ⁽⁶²⁾.

Entre los radicales libres más conocidos podemos encontrar a los superóxidos (O_2^-), hidróxidos (OH^-) y especies oxigenadas como peróxidos (H_2O_2) ⁽⁶³⁾. Los radicales libres pueden ser de origen endógeno (cadena respiratoria, auto oxidación de compuestos de carbono, etc) o exógenos (contaminación ambiental, humo, drogas, entre otras) ⁽⁶⁴⁾.

Como respuesta al daño que se genera, nuestro organismo se defiende con ayuda de moléculas antioxidantes, para evitar que se genere un proceso llamado estrés oxidativo ⁽⁶⁵⁾.

Fuentes Comunes de Radicales Libres	Fuentes Comunes de Antioxidantes
<ul style="list-style-type: none"> • Humo del cigarillo • Contaminación del aire • Radiación • Luz UV (como la luz solar) • Consumo excesivo de alcohol/drogas 	<ul style="list-style-type: none"> • Chocolate oscuro • Té y café • Frutas y verduras • Nueces (tales como nueces pecan o nueces de castilla) • Condimentos (canela, orégano) • Frijoles (tales como frijoles pinto, frijoles rojos, alubias)

TABLA 2. Fuentes comunes de radicales libres y fuentes comunes de antioxidantes.

Fuente: Environmental Health Science Core Center – University of Michigan

1.1.8. Envejecimiento y patologías

Uno de los factores principales del envejecimiento se debe a la presencia de los radicales libres, debido a que los radicales libres pueden superar las defensas antioxidantes, debido a un aporte insuficiente en la dieta de antioxidantes, durante el metabolismo de fármacos, o por una activación excesiva del sistema celular ⁽⁶⁶⁾.

Los radicales libres se pueden encontrar en el interior o exterior de las células, pero a la vez podrían encontrarse diseminados por todo el organismo, pudiendo dañar principalmente al tejido conjuntivo, lípidos, proteínas, encimas, fibras de colágeno, ADN y ARN. A la vez los radicales libres son uno de los responsables de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares ⁽⁶⁷⁾.

1.1.9. Polifenoles

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en hojas, flores, semillas, vegetales y cortezas. Son hidrosolubles y poseen un anillo aromático en común, con uno o más sustituyentes de hidroxilos, pueden estar combinados con una molécula de azúcar como glucósido ⁽⁶⁸⁾.

Los polifenoles ayudan en gran medida con el color, textura y sabor de los alimentos. Son a la vez sintetizados en respuesta al ataque de insectos, bacterias, virus y hongos ⁽⁶⁹⁾.

Los fenoles son considerados metabolitos secundarios, nacen del metabolismo de las plantas, por medio de dos vías principales: La ruta del ácido acético y del ácido shikímico ⁽⁷⁰⁾.

Tienen participación en la actividad enzimática, la fotosíntesis, defensa ante

factores adversos del ambiente, entre otros.

Los podemos encontrar en las frutas, verduras, frutos secos, vino, café, té, café, etc. Los niveles del compuesto dependerán de los factores genéticos y ambientales que determinen la germinación, el crecimiento y calidad de los cultivos⁽⁷¹⁾.

Los principalmente efectos beneficiosos se deben por las propiedades antioxidantes⁽⁷²⁾, antiinflamatorias⁽⁷³⁾ y anticancerígenas⁽⁷⁴⁾ que presentaban los polifenoles.

1.1.9.1. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

A lo largo del tiempo, los compuestos fenólicos han sido atribuidos de varios beneficios, y diversos estudios han recomendado el consumo de verduras y frutas para reducir enfermedades cardiovasculares y de cáncer, por las propiedades antioxidantes⁽⁷⁵⁾. Por lo que los polifenoles podrían ayudar a prevenir la la mutación del DNA, oxidación lipídica y el daño del tejido.

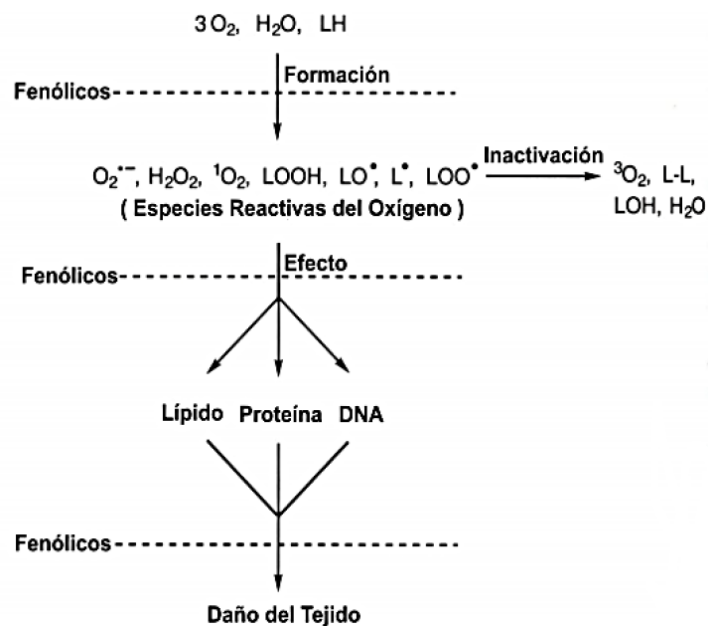


Figura 06. Consecuencias de las ERO en enfermedades y el papel preventivo de los polifenoles.

Fuente: Shahidi y Naczk (2004)

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos parece guardar relación con la capacidad de captar radicales libres, inhibir la lipoxigenasa y quelar metales⁽⁷⁶⁾.

1.1.10. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos vegetales que tienen un esqueleto de carbono C₆ - C₃ - C₆. Los flavonoides están compuestos por 2 anillos aromáticos (A y B), que están unidos por una cadena de tres átomos de carbono (C) ⁽⁷⁷⁾, están ampliamente distribuidos entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas ⁽⁷⁸⁾.

Pinelo ⁽⁷⁹⁾, menciona que la mayoría de flavonoides tienen la terminación INA u OL. Estos nombres fueron asignados por los investigadores que los descubrieron en la naturaleza.

A la combinación núcleo flavonoide básico más una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina glicósidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se las denomina agliconas flavonoides ⁽⁸⁰⁾.

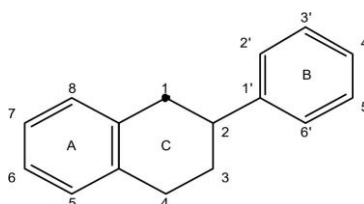


Figura 07. Estructura principal de flavonoides

Fuente: Shahidi y Naczk (1995)

Con la estructura básica permite una multitud de variaciones y sustituciones en el anillo pirona dando lugar a catequinas, flavonoles, chalconas, isoflavonoides, antocianidinas dihidrochalconas, leucoantocianidinas o taninos condensados. Las flavonas, los flavonoles y sus glicósidos son los compuestos más abundantes ⁽⁸¹⁾.

1.1.10.1. Clasificación de los flavonoides

Moreno ⁽⁸²⁾, Menciona que en función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- Flvanos (ejm: catequina)
- Flavonoles (ejm: quercitina)
- Flavonas (ejm: diosmetina)
- Antocianidinas
- Calconas
- Isoflavonoides

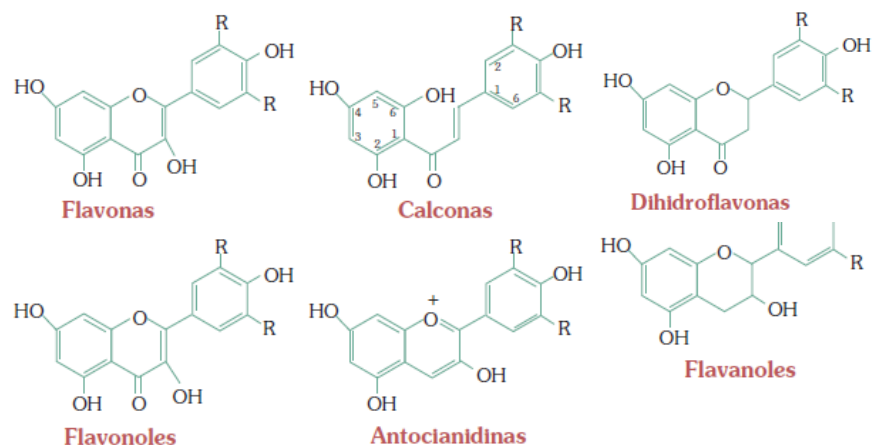


Figura 08. Flavonoides, estructura básica y tipos.

Fuente: Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante (2002)

1.1.10.2. Cuantificación de flavonoides totales

Para poder identificar los flavonoides, se pueden utilizar reacciones de coloración; como las que utilizan tricloruro de azufre, tricloruro de aluminio y tricloruro de hierro; estas reacciones forman complejos que presentan absorbancia en el espectro UV pudiendo ser identificadas mediante la técnica de espectrofotometría UV-visible. También existen otras reacciones de color específicas para poder determinar el tipo de flavonoide al que pertenece y reacciones de color para comprobar la existencia de sustituyentes en la posición orto⁽⁸³⁾.

1.1.11. Métodos de evaluación de la actividad antioxidante

Actualmente para determinar la actividad antioxidante, existen varios métodos basados en su capacidad para captar radicales libres. Entre los cuales, podemos mencionar el uso del 2,2-difenil -1-picril hidrazilo (DPPH), ácido 2,2', azinobis (3 -etilbenzotiazolin) - 6- sulfónico (ABTS), la reacción con el óxido nitroso, dicloridrato de N, N-Dimetilfenilendiamina (DMPD), generación de radicales peróxido, superóxido e hidroxilo, y otros.^(84, 85, 86, 87, 88, 89)

1.1.11.1. Método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil)

Este ensayo es uno de los más conocidos para el estudio de antioxidantes naturales, debido a su simplicidad y alta sensibilidad (Brand-Williams)⁽⁹⁰⁾. El DPPH⁺ (radical con un electrón desapareado de color azul-violeta) acepta un hidrógeno del antioxidante para formar DPPH, decolorándose hacia amarillo pálido.

Para cuantificar el contenido, se realiza por espectroscopía de UV/VIS, a una absorbancia de 517 nm. Los resultados se expresan como TEAC. Se

realizará el método descrito por: Brand-Williams W, con algunas modificaciones ⁽⁹⁰⁾.

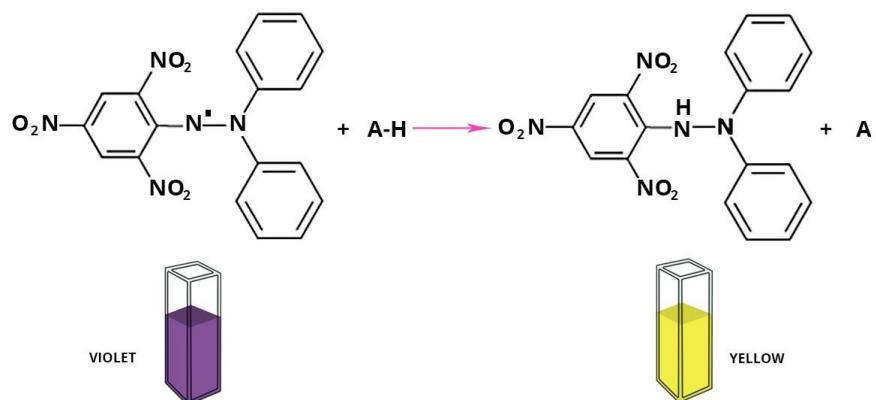


Figura 09. Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). La actividad antioxidante de una muestra se expresa en IC50 (concentración mínima necesaria para inhibir al 50% el (DPPH).

Fuente: CHIMACTIV – Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH

1.1.12. Toxicidad

Aquella sustancia exógena que reacciona con las moléculas endógenas del organismo, causando daños temporales o permanentes de los tejidos. La potencialidad tóxica dependerá de la dosis administrada, mientras menor sea la dosis para producir el efecto nocivo, mayor será la potencialidad tóxica ⁽⁹¹⁾.

Para determinar el peligro potencial del agente químico, se utilizan animales de experimentación donde son expuestos a dosis únicas para determinar la toxicidad aguda o a dosis repetidas para la determinación de la toxicidad subaguda, subcrónica y crónica ⁽⁹²⁾, en la cual se evalúa la mortalidad, incidencia de signos tóxicos, consumo de alimentos y peso corporal. Los daños fisiológicos pueden ser reversibles o irreversibles ⁽⁹³⁾.

1.1.12.1. Parámetros que se utilizan para determinar la toxicidad

A) Toxicidad aguda

Presentan signos, síntomas y efectos adversos, manifestados en segundos, minutos, horas o días (14 días máximo), luego de una administración por vía oral o cutánea de una dosis elevada del agente químico. A la vez se puede realizar otros estudios, como la administración de dosis múltiples a lo largo de 24 horas (DL50) o inhalación durante cuatro horas (CL50) (ver TABLA 3) ⁽⁹¹⁾⁽⁹²⁾⁽⁹⁴⁾.

RANGO	GRADOS DE TOXICIDAD	DL50 RATA, VÍA ORAL, DOSIS ÚNICA	
		mg/Kg	g/Kg
1.	Extremadamente tóxico	< 1	
2.	Altamente tóxico	1 – 50	
3.	Moderadamente tóxico	50 – 500	
4.	Ligeramente tóxico	500 – 5000	0,5 – 5
5.	Prácticamente no tóxico	5000 – 15 000	5 – 15
6.	Relativamente inocuo	> 15 000	> 15

TABLA 3. Escala de rangos, grados o estimaciones de toxicidad aguda (ETA) en función a la DL50 de la sustancia diseñado por John William Trevan

(91)(92)(94)(95)

B) Toxicidad crónica

Presencia de síntomas clínicos, durante largo tiempo, que pueden durar unos días o un año o más, tras exposiciones repetidas a una sustancia potencialmente tóxica ⁽⁹²⁾⁽⁹⁴⁾⁽⁹⁵⁾.

1.1.12.2. Dosis letal media (DL50)

Es una dosis de sustancia que produce la muerte del 50% de los animales de experimentación, en la cual, son observados (para revisar los síntomas, signos, hallazgos patológicos y efectos tóxicos); durante 14 días después de la administración de la sustancia ⁽⁹¹⁾⁽⁹²⁾⁽⁹⁴⁾.

1.1.12.3. Bases legales

1) Normas nacionales

La ley General de Salud ⁽⁹⁶⁾ N° 26842 en el ítem XV del título preliminar establece que el estado promueve la investigación científica y tecnológica enfocada en la salud del ser humano.

2) Normas internacionales

En el comentario VI del texto Pautas Éticas de Investigación en Sujetos Humanos: Nuevas perspectivas del programa regional de bioética de la OPS/OMS indica que se debe establecer pautas para cuidar el medio ambiente y el bienestar de los animales de experimentación utilizados ⁽⁹⁷⁾.

1.2. Marco Conceptual

Fitoquímicos: Serie de compuestos bioactivos que no tienen valor nutricional, encontrados en las plantas.

Screening fitoquímico: consiste en la extracción de metabolitos secundarios con los solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración.

Metabolitos secundarios: Aquellos compuestos orgánicos en la cual no desempeñan un rol directo en el crecimiento y reproducción del mismo, pero importantes por sus diversas propiedades farmacológicas.

Flavonoides: Son metabolitos secundarios presentes en diversas frutas, verduras y especias.

Capacidad Antioxidante: Es la capacidad que tiene una sustancia antioxidante para disminuir la presencia de la especie reactiva de oxígeno antes de reaccionar con diversos sustratos (lípidos, proteínas, ADN)

DPPH: Compuesto orgánico químico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, utilizado para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto determinado.

Radicales libres: Son moléculas que contienen un electrón no apareado, pudiendo causar un daño oxidativo, desde células hasta tejidos.

II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

2.1. Tipo, Nivel y Diseño de la Investigación

2.1.1. Tipo de investigación: Básica

Son los conocimientos básicos con el fin de incrementar los principios fundamentales de la naturaleza. En esta investigación se obtuvieron conocimientos básicos relacionados a metabolitos secundarios, actividad antioxidante y toxicidad.

2.1.2. Nivel de investigación: Descriptivo- Explicativo

Descriptivo: Es examinar características del problema escogido.

Explicativo: Se encarga de buscar el porqué de los hechos. En el presente trabajo se estableció la posible relación que tendrían los metabolitos secundarios hallados y la actividad antioxidante y la toxicidad aguda.

2.1.3. Diseño de la investigación: Experimental

Es aquella donde el investigador manipula una variable y controla o aleatoriza el resto de variables. Se cuenta con un grupo control y los sujetos que han sido asignados al azar entre los grupos.

2.2. Población y Muestra

2.2.1. Material Botánico

Población: La planta *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla Macho” se recolectará en el Departamento de Ica, provincia de Ica, distrito de Yauca en la zona de Molletambo.

Muestra: Se recolectará la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla Macho”

2.2.2. Material biológico

Población: Ratones albinos hembras

Muestra: Ratones albinos hembras cepa balb/c, del Instituto Nacional de Salud, con peso de 25 ± 5 g.

2.3. Técnicas y procesamiento de recolección de datos

La especie vegetal *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey fue recolectada por el autor en la zona de Molletambo, distrito de Yauca del Rosario, región y departamento de Ica; en los puntos de georreferenciación (GPS): latitud (S): $14^{\circ}11'1.73''$, longitud (W): $75^{\circ}22'47.28''$, en los meses de abril 2017 - Junio 2017. La zona de recolección fue delimitada a un área no mayor de 120m², dividida en cuadrantes pequeños. La recolección se realizó por la mañana, utilizando unas tijeras de podar y utilizando bolsas de papel kraft para transportarlas a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.



Figura 10. Zona de Molletambo distrito de Yauca del Rosario - Ica

2.4. Técnicas de procesamiento de la información.

2.4.1. Tratamiento de la muestra

El tratamiento de la muestra se realizó el secado de la muestra vegetal en un lugar seco, al aire libre y en ausencia de los rayos solares por 21 días, tomando una muestra representativa para su clasificación taxonómica, realizada por el Blgo. Alfonso Orellana García (Ver anexo, Fig.12). Luego se realizó la selección de la parte aérea del *H. aromaticum* que se encontraba en buen estado ⁽⁹⁸⁾⁽⁹⁹⁾⁽¹⁰⁰⁾.

2.4.2. Ensayo Fitoquímico

2.4.2.1. Obtención del extracto etanólico

7 kg de la parte aérea de *H. aromaticum*, secas y molidas, se sometieron a reflujo por un tiempo de 4 horas hasta agotamiento con etanol de 96°, se filtró en caliente y posteriormente se concentró en un rotavapor modelo HEIDOLPH LABORATORA 4000 hasta sequedad. Se obtuvo 250 g de extracto seco de color marrón oscuro ⁽¹⁰¹⁾ (Ver anexo, Fig. 15).

2.4.2.2. Screening fitoquímico:

Las reacciones de coloración y/o precipitación servirán para el reconocimiento de los metabolitos secundarios. La obtención de fracciones y la identificación de metabolitos secundarios se realizaron de acuerdo al libro “Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales” del Autor: Olga Lock Sing, indicado en el anexo ⁽⁹⁹⁾⁽¹⁰⁰⁾.

2.4.3. Prueba de Toxicidad Aguda Oral

El ensayo fue conducido según el método de las clases tóxicas agudas descrito en la normativa N° 423 de la OECD (OECD Guideline For Testing of Chemical «Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class Method» N° 423 Adoptada, 20 de diciembre, 2001). Se realizó de acuerdo al principio de la prueba límite a 2000 mg/Kg por vía oral para sustancias con baja toxicidad. Se realizó en 18 ratones, hembras de 15 – 24 g de peso. Previamente se pesaron los ratones y aleatoriamente se conformaron 2 grupos de 9 ratones cada uno, un grupo se le administró el extracto a la dosis de 2000 mg/Kg y el otro grupo de 9 ratones, solo se administró el vehículo (grupo control).

Los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche antes del experimento y bajo condiciones estándar. Se procedió a administrar el extracto a la dosis mencionada disuelto en una solución de Tween al 5% en un volumen de 100 mg/mL en forma secuencial cada 24 horas. Se observaron los animales experimentales para detectar algún cambio en su peso (inicio, 7 y 14 días), y la mortalidad por un período de 14 días después del tratamiento ⁽¹⁰³⁾. La atención se dirigió a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Al concluir el período experimental se sacrificaron a los animales, y se realizó un examen macroscópico de órganos y tejidos (corazón, riñón, pulmón, hígado, bazo, estómago).

2.4.4. Determinación de la actividad antioxidante

Para cuantificar la capacidad captadora de radicales libres de los extractos, se determinaron por grado de decoloración que provocan sus componentes a una solución metanólica de DPPH mediante el método de *Brand-Williams*, con algunas modificaciones. Se realizó el control positivo con ácido ascórbico. Se preparó una solución madre de DPPH aproximadamente 30mg/L del radical en metanol cuya absorbancia debe estar entre 0.9 a 1.1, 2.9 mL de esta solución se mezclan con 100μL de cada extracto a concentraciones diferentes. Se preparó un blanco de referencia con 2.9 mL DPPH y 100μL de solvente. Se incubó a una temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 517nm en un espectrofotómetro en el rango visible ⁽⁹⁰⁾. Los experimentos se llevaron a cabo usando un bloque de diseño al azar, por triplicado.

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación, para posteriormente hallar su IC₅₀. Y su respectivo equivalente como ácido ascórbico.

2.5. ASPECTOS ÉTICOS

El manejo de animales de experimentación se realizó según “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals”⁽¹⁰³⁾.

III. RESULTADOS

TABLA 4. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”

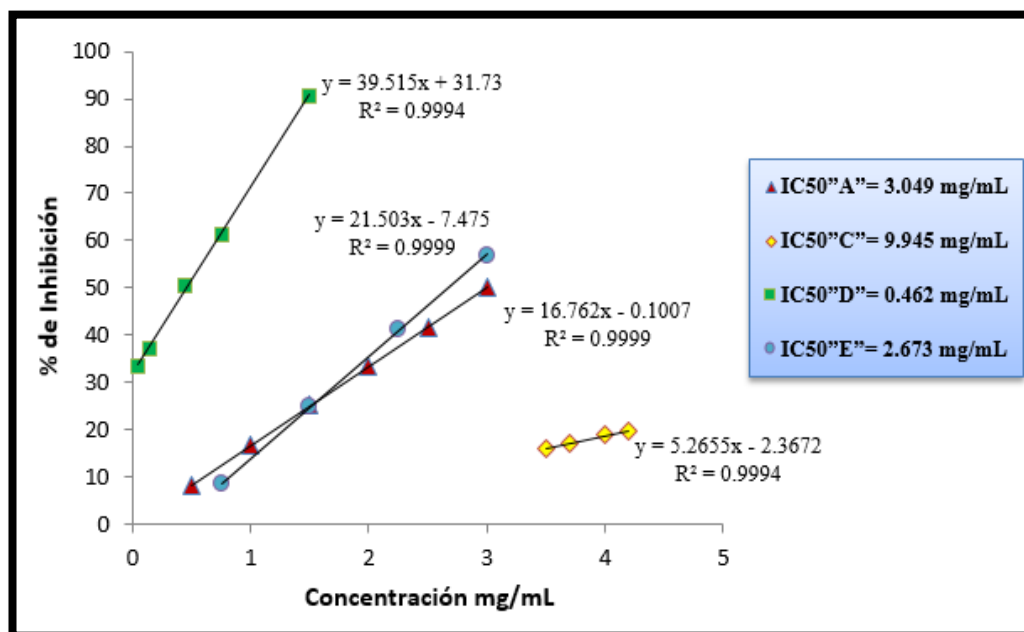
Fracciones	Metabolitos	Reacciones	Resultados
A	Flavonoides	Rx. de Shinoda	+
	Aminoácidos	Rx. de Nihidrina	+
	Taninos	Rx. de Gelatina	-
		Rx. de Cloruro férrico	+
B	Triterpenoides y/o esteroides	Rx. de Lieberman	+
		Burchard	
	Flavonoides	Rx. de Shinoda	+
C	Triterpenoides y/o esteroides	Rx. de Lieberman	+
		Burchard	
	Lactonas sesquiterpénicas	Rx. de Kedde	+
D	Alcaloides	Rx. de Mayer	+
		Rx. de Munier	+
		Rx. de Dragendorf	+
	Flavonoides	Rx. de Shinoda	+
E	Catequinas	Rx. de Rosenheim	+
	Triterpenoides y/o esteroides	Rx. de Lieberman	+
		Burchard	
	Alcaloides	Rx. de Mayer	+
		Rx. de Munier	+
		Rx. de Dragendorf	+
Rx. Wagner	+		

A: Extracto etanólico total D: fracción diclorometánica – etanólica

B: Fracción insoluble E: fracción acuosa remanente

C: Fracción diclorometánica (-): Ausencia (+): Presencia

Figura 11. Capacidad antioxidante de las Fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de la parte aérea de *Helonium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho” mediante el método de DPPH.



En la **Figura 11** se observa el rendimiento de cada una de las fracciones analizadas, así mismo, la fracción A presento un IC₅₀ = 3.049, la fracción C un IC₅₀ = 9.945, la fracción D un IC₅₀ = 0.462, la fracción E un IC₅₀ = 2.673.

TABLA 5. Resultados de la prueba de toxicidad aguda del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”.

	Grupo Control	Grupo tratado 2000 mg/Kg	Observación
Mortalidad	Todos sobrevivieron	Todos murieron	Debió replantearse a la dosis de 1500 mg/Kg, pero por motivos económicos y de logística no se pudo realizar (La pandemia no lo permitió).
Estudio macroscópico de principales órganos	Sin cambios significativos	Se observó un cambio significativo con respecto a los órganos del grupo control en el tamaño y color.	-
Peso corporal promedio (g)	22.08 g (± 0.62)	No se pudo evaluar debido a que los ratones murieron en un lapso promedio de 2 horas	-
Signos y síntomas	Temblores	No presenta	Si presenta
	Convulsiones	No presenta	Si presenta
	Micción	No presenta	Si presenta
	Defecación	No presenta	Si presenta
	Letargo	No presenta	Si presenta

IV. DISCUSION

Los resultados obtenidos por el método del DPPH indican que la Fracción D del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey mostró un valor IC50 mayor (IC50 de 0,462mg/mL) que de la Fracción C (IC50 9,945 mg/mL) para inhibir el radical DPPH, siendo la Fracción D del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey, la fracción que presentó mayor actividad antioxidante.

Dicha capacidad antioxidante se atribuiría al alto contenido de Flavonoides, Taninos (Catequinas), triterpenos y/o esteroides y alcaloides totales que presenta, esto de acuerdo con estudios previos que indican una relación directa entre actividad antioxidante y el contenido de taninos y su eficiencia antirradical. ^{(116) (117)}

En cuanto al potencial toxicológico del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey, se ha observado que la dosis letal media estaría por debajo de 2000 mg/Kg de peso, debió replantearse a dosis de 1500 mg/Kg, pero no se pudo realizar por motivos económicos y de carencia de animales de experimentación debido a que la pandemia no lo permitió, lo que implica realizar estudios de toxicidad aguda a dosis menores y así estimar el nivel de toxicidad aguda. De acuerdo a la composición química del extracto, el potencial tóxico se debería a la presencia de lactonas sesquiterpénicas del extracto total administradas en los ratones, para lo cual, se cree que los grupos α -metileno- γ -lactonas, grupos ciclopentenonas α , β -insaturadas y grupos epoxi presentes en las lactonas sesquiterpénicas pueden influir en su actividad. El grupo α , β insaturado puede reaccionar con grupos sulfhidrilos, encontrados en las enzimas y proteínas, originando efectos tóxicos. Pudiendo considerar a las lactonas sesquiterpénicas, como moléculas interesantes para la medicina, pero a la vez tóxicas ⁽¹⁰⁴⁾.

Investigaciones afines, consideraron en un principio a las lactonas sesquiterpénicas como muy citotóxicas, pero las modificaciones químicas introducidas en estas moléculas han incrementado sus actividades farmacológicas (antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatoria, antioxidante, antiulcerogénica, antihelmíntica, hepatoprotectora, antiprotozoaria y antidepresiva) y han disminuido su citotoxicidad, de modo que han atraído la atención como moléculas líderes.

Es por ello, que los estudios fitoquímicos, farmacológicos y toxicológicos del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey deben profundizarse para poder así ser empleados como prototipos para el desarrollo de nuevas drogas útiles a la terapéutica, como el cáncer.

V. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios encontrados en el Screening Fitoquímico del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho” fueron: Fracción A (Flavonoides, Aminoácidos, Taninos), Fracción B (Triterpenoides y/o esteroides, Flavonoides, Quinonas), Fracción C (Triterpenoides y/o esteroides, Lactonas sesquiterpénicas, Alcaloides), Fracción D (Flavonoides, Catequinas, Triterpenoides y/o esteroides, Alcaloides) y la Fracción E (Flavonoides, Catequinas).
2. Las fracciones del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho” presentaron una buena actividad Antioxidante, siendo la Fracción D la que presentó una mayor actividad, con un IC₅₀ de 0.462 mg/mL.
3. En el extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho” presentó características tóxicas agudas a dosis de 2000 mg/Kg.

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio antioxidante probando otros métodos en las diferentes fracciones del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”.
2. Realizar diferentes extractos de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho” utilizando otros solventes de distinta polaridad.
3. Realizar estudios de toxicidad aguda a la dosis de 1500 mg/Kg y 1000 mg/Kg de peso, del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”.
4. Comparar la actividad antioxidante entre un fármaco antioxidante de elección y la fracción que presentó mayor actividad antioxidante del extracto etanólico de la parte aérea de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “Manzanilla macho”.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cardoso L., Silva S, Castro-Gamboa I, Bolzani S. New Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis turbinata* and their Antioxidant Activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*; (2005) 16: 1353- 1359.
2. Carocho, M. & Ferreira, I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, (2013). 51, 15–25 pp.
3. Marwah G., Fatope O., Mahrooqi A., Varma B, Abadi A., Khamis S., Burtamani I. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*. (2007); 101:465-470.
4. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. (2002);30(6): 620-50.
5. Kohen R, Chevion S, Scharz R, Berry EM. Evaluation of the total low molecular weight antioxidant activity of plasma in health and diseases: a new approach. *Cell Pharmacol*. (1996); 3:335-59.
6. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review Nutrition*. (1996); 16(1):33-50.
7. Brak A. Tratado de Libre Comercio y Biodiversidad en el Perú [En línea]. Fecha de acceso [17 de Marzo del 2019]. Disponible en: <http://educared.fundacion.telefonica.com.pe/sites/bibliotecavirtual/index.php/site/default/detalle/id/486/tratado-de-libre-comercio-y-biodiversidad-del-peru>.
8. Palacios E. Economía y plantas medicinales. Facultad de Ciencias Económicas de la UNMSM [En línea]. Fecha de acceso [20 de Marzo del 2019]. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/consejo/boletin52/Pdf/a04.pdf>.
9. Inostroza V. Evaluación de extractos de flores de manzanilla de campo (*Helenium aromaticum*. Bailey) en el control de polilla del frejol (*Epinotia aporema*. Walsingham), sobre el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*). Tesis para obtener el título de ingeniero agrónomo. Santiago, Universidad Santo Tomas. Esc. de Agronomía. 2008.
10. Missouri Botanical Garden. Tropicos: *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey [En línea]. Fecha de acceso [30 de Marzo del 2019]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/2702606>.

11. Brako L. y Zarucchi J. (eds.). Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 1993, 45: 1-1286.
12. Marsicano, J.. Los radicales libres. GEN Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología, (1994): 48 (1), 39-44.
13. Troncoso, L. & Guija, E.. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* L. (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. Anales de la Facultad de Medicina, (2007): 68 (4), 333-343.
14. Halliwell, B.. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? Journal of Laboratory Clinical Medical, (1992): 119 (6), 598- 620.
15. Pereira, M., Steffens, R., Jablonski, A., Hertz, P., Ríos, A., Vizzotto, M., & Flores,. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2012): 60, 3061-3067.
16. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? Journal of Laboratory Clinical Medical, (1992): 119 (6), 598- 620.
17. Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M., Ogiso, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. J Natl Cancer Inst. (1983); 70(2):343- 52.
18. Chand, N., Chaulya, Kanti, P., Mukherjee, A. In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of rhizome of *Cyperus tegetum* Roxb. (Cyperaceae). International Journal of Current Pharmaceutical Research, (2010): 2(3), 39- 43.
19. Kalpna, R., Mital, K., & Sumitra, Ch. Vegetable and fruit peels as a novel source of antioxidants. Journal of Medicinal Plants Research, (2011): 5(1), 61-71).
20. Venereo, J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de Medicina Militar, (2002): 31 (2), 126-133.
21. Delgado, L., & Martínez, G. El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral. Revista Cubana de Farmacia, (2009): 43(1).
22. Zorrilla, A., Eirez, M., & Izquierdo, M. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. Revista Cubana de Investigación Biomédica, (2004): 23 (1), 51-57.
23. Herz W., Romo De Vivar A., Romo J. y Viswanthan N. Constituents of *Helenium* Species. XIII. The Structure of Helenalin and Mexicanin A. J. Amer. Chem Soc.1962; 85: 19-26.
24. Romo J. y Joseph-Nathan P. The constituents of *Helenium aromaticum* (Hook) Bailey: The structures of aromatin and Aromaticin. Tetrahedron.1964; 20:79-85.

25. Clark E. Helenalin. I. Helenalin, the Bitter Sternutative Substance Occurring in *Helenium autumnale*. J Amer.Chem.Soc.1982; 58:1982-1983.
26. Alvarenga, S., Ferreira, M., Emerenciano, V. y Cabrol-Bass D. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. Elsevier. Chemometr. Intell. Lab. 2001; 56: 27-37.
27. Barrera, E., Loeza, D., Hernández, A., Lopez, E., Molina, L., Del Río, N., Martínez, M., Lopez, R. y Salgado M. Antibacterial activity of flower extracts from *Helenium mexicanum* H.B.K. Emir. J. Food Agric. 2011; 23: 258-264.
28. Hernández Peña Marcos Joel y Col. “Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey “manzanilla macho” y evaluación de la actividad antibacteriana” [En línea]. Fecha de acceso [17 de abril del 2019]. Disponible en: <http://repositorio.unica.edu.pe/bitstream/handle/UNICA/1930/500.040.TE.0000048.PDF?sequence=1&isAllowed=y>
29. Hernández Peña Marcos Joel y Col. “Perfil metabolómico por HPLC-ESI-MS-MS en la fracción gastroprotectora de *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey” – Congreso Iberoamericano de Química – XXIX Congreso Peruano de Química (2018)
30. Cronquist, A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Nueva York; 1981.
31. The Plant List [En línea]. Fecha de acceso [12 de Abril del 2019]. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/tpl/record/gcc-131722>.
32. Flora of North America Editorial Committee, Magnoliophyta: Asteridae, part 8: Asteraceae, en: Flora of North America Collection. Oxford University Press, New York; 2006.
33. Missouri Botanical Garden. Tropicos: *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey [En línea]. Fecha de acceso [14 de Abril del 2019]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/2702606>.
34. Brako L. Y Zarucchi J. (eds.). Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 1993, 45: 1-1286.
35. Información sobre los medicamentos [En línea]. Fecha de acceso [15 de Marzo del 2019]. Disponible en: <http://www.losmedicamentos.net/planta/manzanilla-del-campo>.

36. Belsare, P., Pal, C., Kazi, A., Kankate, S., and Vanjari, S., Evaluation of Antioxidant Activity of Chalcones and Flavonoids. *Int. J. ChemTech. Res*; (2010); 2(2), 1080-1089.
37. Sánchez-Moreno, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int*, (2002).8(3), 121-137.
38. Castro AJ. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* [tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; (2008).
39. Marwah G., Fatope O., Mahrooqi A., Varma B, Abadi A., Khamis S., Burtamani-Al. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*. (2007); 101:465-470.
40. Katalinic v., Modun D., Music I., Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*; (2005). 140: 47-52.
41. Doria E., Buonocore D., Focarelli A., Marzatico F. (2012). Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2012: 13 paginas.
42. Dávila Trujillo, R. 2003. "Determinación de taninos, vitamina C. y capacidad antioxidante en fruto de carambola (*Averrhoa carambola* L.)" Tesis para Mg. UNALM – Perú.
43. Robinson, David. 1991. "Bioquímica valor nutritivo de los alimentos". Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España.
44. Aristizabal Giraldo, C. 2004. "Las Vitaminas". Disponible online en: <http://www-monografias.com/trabajos11/lasvitaminas.shtml> Julia F. Morton, Miami, FL.
45. Dávila Trujillo, R. 2003. "Determinación de taninos, vitamina C. y capacidad antioxidante en fruto de carambola (*Averrhoa carambola* L.)" Tesis para Mg. UNALM – Perú.
46. Chebrolu, K., Jayaprakasha, G., Yoo, K., Jifon, J. & Patil, S. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. *LWT - Food Science and Technology*, (2012). 47(2), 443–449 pp.
47. González C. Caracterización físico química del fruto de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) [tesis de maestría]. Santiago de Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales; (2010).

48. Aristizabal Giraldo, C. 2004. "Las Vitaminas". Disponible online en: <http://www-monografias.com/trabajos11/lasvitaminas.shtml> Julia F. Morton, Miami, FL.
49. Aquino R., Morelli S., Lauro M.R., Abdo S., Saija A., Tomaino A. Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of an Extract of Anthurium versicolor Leaves. *J. Nat. Prod.* 2001; 64, 1019-1023 p.
50. Middleton, E. y Kandaswami, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London. 1994; 619-652 p.
51. Rice, C. Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes: In Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. Portland Press, London. 1995; 1- 32 p.
52. Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51, 571-581 p.
53. Montero M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. *Anales de la Facultad de medicina.* (1996); 57 (4): p.36-44.
54. Rueda C. Antioxidantes naturales: Cómo reducir el riesgo de cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares. 1era ed. Madrid: Ediciones Nowtilus S.L.(2010).
55. Zamora, D. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de Nutrición*, (2007). 34(1), 17-26.
56. Pereira, M., Steffens, R., Jablonski, A., Hertz, P., Ríos, A., Vizzotto, M., & Flores, Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2012). 60, 3061-3067.
57. Beltrán A, Mera J, "Elaboración del Tubérculo Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) Troceada en miel y determinación de la capacidad antioxidante. Tesis de grado no publicada. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. (2014).
58. Patil, C.B., Mahajan, S.K., and Katti, S.A., Chalcone: A Versatile Molecule, *J. Pharm. Sci & Res.* (2009); 1(3), 11-22.
59. García, B., Saldaña, A., & Saldaña, L. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, (2013) 12 (2), 187-196.
60. Prior, R. 1998. "Antioxidant Capacity and Health Benefits of fruits and Vegetables". NABC meeting, postland, Oregon. Disponible online en: <http://www.blueberry.org/ofts.html>
61. Venereo, J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, (2002). 31 (2), 126-133.

62. Salas, R. C. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *heliocarpus terebinthinaceus*. *Universidad tecnológica de la mixteca*, 1-5.
63. Olson, J. A. (1996). The bioavailability of dietary carotenoids. *Paper presented at the XVII IVACG Meeting*, 1-4.
64. Bomman, J. (1999). Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J. Ethnopharmacol*, 95, 393-397.
65. Davis, J. K. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.*, 61, 1-31.
66. Marwah R.G., Fatope M.O., Mahrooqi R.A., Varma G.B, Abadi H.A., Khamis S., Burtamani-Al. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*. (2007); 101:465-470.
67. Zamora, D. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de Nutrición*, (2007). 34(1), 17-26.
68. Muchuweti, M.; Moyo, y Muschipe,S,(2005). Some Properties of the Polygalactunase from Four Zimbabwean Wild Fruits (*Uapacakirkiana* *Zizphusmauritianana*, *Tamarindus* *Indicant* *Berchemia* *Discolor* Fruits).*Food Chem*.2005; 90:655-661.
69. Johnson, J.R., D. Fahy, N. Gish y P.K. Andrews,(1999). Influence of ascorbic acid sprays on apple sunburn. *Good Fruit Grower* 50:81-83.
70. Harborne, J.B. & H. Baxter, (1999). *The Handbook of Natural Flavonoids*, Wiley, Nueva York, EEUU.
71. Manach, C., G. Williamson, C. Zarzamora, A. Scalbert and C. Rémésy,(2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Rev of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*;81: 230S-42S.
72. Frankel, E.N., A.L. Waterhouse and P.L. Teissedre,(1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*; 43:519-525.
73. Haqqi TM, D. Anthony, S. Gupta, N. Ahmad, M.S.Lee, G.K. Kumar and H.Mukhta,(1999). Prevention of collageninduced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(8):4524-9.
74. Yang, CS., J.M. Landau, M-T H uang. and H.L. Newmark, (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr*.21: 381- 406.
75. Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Van Buren L., Wagner E., Wiseman,

S., Van de Put F., Dacombe C. y Rice-Evans, C.A. The oxidants activity of a regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free radicals Research*. 2002; 36 (2): 217-233 p.

76. Decker, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants. *Nutritional Reviews*. 1997; 55 (1): 396- 398 p.
77. Troncoso, A. G. (2003). Capacidad antioxidante del chimichurri y sus componentes,. *I(4)*, 42-49.
78. Roberts, W. &. (2003). Determination of the antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *J. Agric. Food Chem*, 51(2), 1486-1493.
79. Pinelo, M. M. (2004). Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem*, 52(5), 1177-1180.
80. Fogliano, V. V. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem*, 47(4), 1035-1040.
81. Martinez-Valverde, I.; M. J. Periago y G.ROS, 2000. “Significado Nutricional de los Compuestos Fenólicos en la Dieta”. En *archivos latinoamericanos de nutrición*. Vol 50. p.p. 5-18.
82. Moreno S., S. T. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Res*, 40, 223-231.
83. McMurry, J. (2001). *Química Orgánica* (Quinta edición internacional ed.). México: Editorial Thompson.
84. Kuskoski E, et Al col. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*. (2005);25(4):7266732.
85. Miller, N. R.-E. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sciences*, 84(2), 407–412.
86. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Yang, M., Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, (1999), 26 89-10): 1231-1237.
87. Roginsky, V., Lissi, E., Review of methods to determine Chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. (2005), 92:235-254.
88. Roginsky, V., Lissi, E.A. Review of mitos to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 2005; 92, 235–254 p.
89. Fogliano, V.; Verde, V.; Randazzo, G.; Ritieni, A.1999. “ Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of

wines". J. Agric. Food Chem. 47, 1035-1040.

90. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical método to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol. (1995); 20: 25-30.
91. Repetto M. & Repetto G. (2009). Toxicología fundamental. (4.^a ed.). Madrid: Díaz de Santos; p. 244.
92. Mendoza N. (2008). Farmacología médica. México D. F.: Médica Panamericana; pp. 102, 139-144.
93. Arencibia D. & cols. (2009). Toxicología experimental: toxicidad aguda. Servicio de Toxicología del sanatorio de niños Sertox, Argentina. Revista de toxicología en línea Retel; 22(1): 1-15 [Citado el 4 marzo de 2012].
94. Bello J. & López de Cerain A. (2001). Fundamentos de ciencia toxicológica. Madrid: Díaz de Santos; p. 41.
95. United Nations. (2006). Sistema global armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Estados Unidos: United Nations Publications; pp. 115 y 460.
96. El peruano. Ley General de Salud. Lima. Congreso de la República. 20 de julio de 1997
97. Lola S, Quezada S. Pautas Éticas de Investigación en Sujetos Humanos: Nuevas Perspectivas. OPS/OMS. (2013).
98. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Lima; 1995.
99. Lock O. Investigación Fitoquímica, Método en el Estudio de Productos Naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima; 1994.
100. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello y CYTE, Santa Fe de Bogotá; 2000.
101. Díaz M. Aislamiento y elucidación estructural de los flavonoides presentes en los tallos de *Baccharis tricuneata* (L.f.) Pers. Taya. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico. Ica, Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Esc. de Farmacia y Bioquímica; 2013.
102. OECD Guidelines for testing chemicals, Guidelines 423, acute oral toxicity: acute toxic class method. Paris, 2001.
103. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. (1984) <http://www.cioms.ch/index.php/12-newsflash/227-cioms-and-iclas-release->

- 104.** Amorim H.R., R.M. Gil da Costa, C. Lopes, M.M. Bastos (2013) Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 43:559-79.

VIII. ANEXOS

CONSTANCIA DE MUESTRA VEGETAL PARA HERBARIO CARTA N° 007-2019-AOG

Quien suscribe deja expreso por la presente constancia que la muestra vegetal fértil y completa (01 espécimen), colectada en Tingue-Quebrada Huarangal-Molletambo (distrito Yauca del Rosario, provincia de Ica, departamento de Ica) y facilitada por el estudiante **KEVIN EDUARDO RAMOS DE LA CRUZ** de la Facultad de Farmacia y Bioquímica en la Universidad Nacional San Luis Gonzaga. El espécimen mencionado ha sido revisado y determinado taxonómicamente como ***Helenium aromaticum* (Hook.) L.H.Bailey** "**Manzanilla macho**"; teniendo la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981):

REINO : PLANTAE Haeckel
DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal
CLASE : MAGNOLIOPSIDA Cronquist, Takht. & Zimmerm.
SUB-CLASE : ASTERIDAE Takht.
SUPER-ORDEN : ASTERANAEE Takht.
ORDEN : ASTERALES Link.
FAMILIA : ASTERACEAE Bercht. & J. Presl
GÉNERO : *Helenium* L.
ESPECIE : ***Helenium aromaticum* (Hook.) L.H.Bailey**
Publicado en: The Standard Cyclopedia of Horticulture 3: 1443 (1915).
<https://www.ipni.org/n/118690-2>

BASIÓNIMO : *Graemia aromatica* Hook.
SINÓNIMOS : *Cephalophora aromatica* (Hook.) Schrad.
Cephalophora collina Phil.
Cephalophora lanceolata Phil.
Cephalophora tenera Cass.
Gaillardia aromatica Baill.
Graemia aromatica Poepp. ex Hook.
Grahamia aromatica Spreng.
Helenium aromaticum var. *aromaticum*
Helenium collinum (Phil.) F.Meigen

<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-131722>
<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=2702606> (System APG)



Determinado por: Blgo. Alfonso Orellana García
Voucher de Colecta generado : AO-086 (USM).
Vouchers de Colecta revisados : AO-062 (USM), DPP-222 (MOL, K con BARCODE_K000325925).

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para su Tesis de grado, titulada: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PARTE AÉREA DE *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H.Bailey "MANZANILLA MACHO" y para los fines académicos que crean conveniente.

Ica, 13 de Setiembre del 2019


Alfonso Orellana Garcia
BIÓLOGO
C.B.P. 9040
Investigador en flora de Ica y Perú
bio_aog@hotmail.com

Figura 12. Constancia del Herbario

CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

a) Taxonomía:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub-Clase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae (= Compositae)

Género: *Helenium*

Especie: *Helenium aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey

b) Nombre vulgar: “manzanilla macho” (Yauca del Rosario/Ica), “manzanilla de campo” o “manzanilla de cerro” (Valparaíso/Chile).

c) Sinónimos ⁽³¹⁾

Cephalophora aromatica (Hook.) Schrad.

Cephalophora collina Phil.

Cephalophora lanceolata Phil.

Cephalophora tenera Cass.

Gaillardia aromatica Baill.

d) Descripción de la especie

Es una hierba hasta de 0,60m de altura, erecto y poca ramificada basalmente, formando una cobertura de hasta 30 cm. Tallo delgado verde amarillento semi-pubescente. Hojas lanceoladas de borde ligeramente dentado en la parte superior de la planta y hojas basales en mayor número lanceoladas-espatuladas de borde más sinuoso y dentado (a lobulado). Hojas alternas, sésiles, de color verde claro y con nervadura central notoria en el haz de coloración blanquecina. Flores pequeñas de color Amarillo limón de olor característico agradable similar a manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), dispuestas en cabezuelas totalmente esféricas terminales y compactas de aproximadamente 10-14 mm de diámetro. Sus frutos son pequeños, a manera de conos invertidos, con la base negruzca y ápice blanquecino, de 2-3mm largo. Hábitat en zonas de escorrentía de huaycos y ribereños con humedad esporádica, en suelos arenosos y arcillosos.

e) Distribución

Helenium es un género nativo de Norteamérica y Centroamérica. Comprende 208 especies descritas y de estas, solo 39 aceptadas ⁽³²⁾. *H. aromaticum* es una especie que en el Perú se distribuye en Arequipa, Ayacucho, Lima e Ica ^(33, 34).

f) Usos

Planta de valor medicinal, de nulo valor ornamental. En infusión y extracto se usa como febrífugo ⁽³⁵⁾.



Figura 13. Recolección y
Pre- Selección de la planta
Helenium aromaticum
“Manzanilla macho”

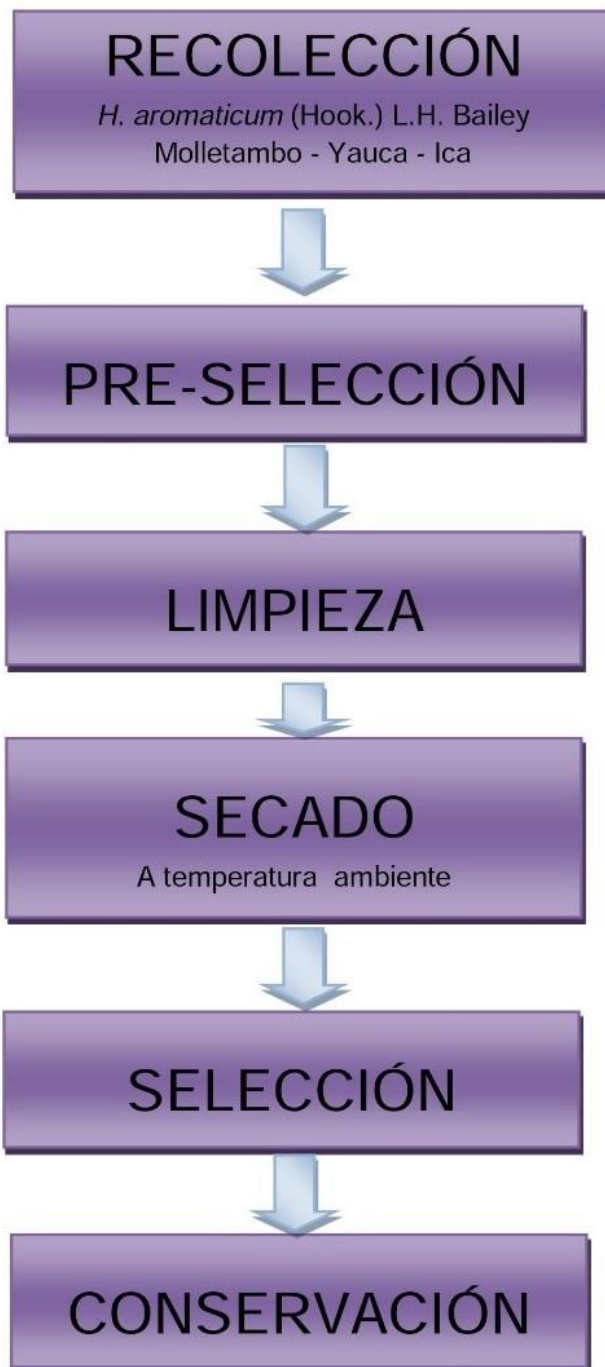


Figura 14. Flujograma del tratamiento de la muestra vegetal de la parte aérea de *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey.

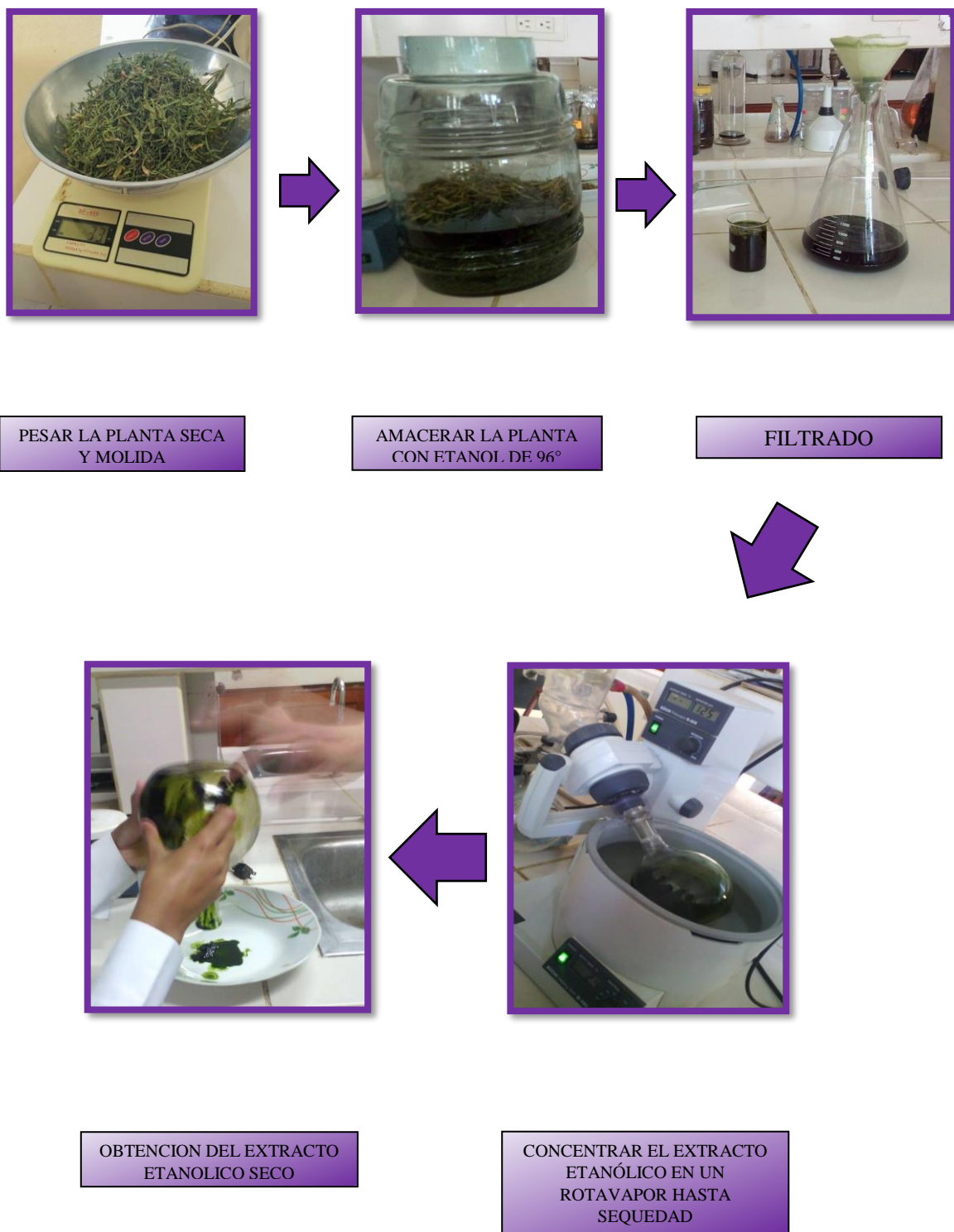


Figura 15. Flujograma de la obtención del extracto etanólico de la parte aérea de *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey. Mediante el método de maceración

A. Obtención de Fracciones:

A partir de 250 g de extracto etanólico seco, se realizó el fraccionamiento por extracción con disolventes orgánicos de diferente polaridad que facilitan la separación de los metabolitos secundarios.

Se realizó el siguiente procedimiento:

- Se separó 10 g de la muestra, formando así la **fracción "A"**.
- Al resto de la muestra, se agregó 350 mL de HCl al 1%, se filtró y se obtuvo 2 partes, a la muestra restante se le agregó 350 mL de HCl al 1%, se filtró y se obtuvo 2 partes, una insoluble que lavándola con agua destilada se obtendría un pH neutro, para posteriormente filtrarlo y dejarlo secar a temperatura ambiente, para luego ser disuelto en 100 mL de diclorometano, formando así, la **fracción "B"**.
- La parte soluble ácida se neutralizó con 7 mL de hidróxido de amonio al 25%, hasta pH 11, se colocó la solución en una pera de bromo y se agregó porciones de 100 mL de diclorometano, se agitó fuertemente formando dos fases, en la cual, se colectó la fase diclorometánica; repitiendo esta operación por triplicado, la cual, luego se dejó secar la fase diclorometano a temperatura ambiente, formando así, la **fracción "C"**.
- A la fase acuosa se agregó 100 mL de diclorometano-etanol en la proporción 3:4, se agitó y dejó separar la fase orgánica de la acuosa, luego se colectó la fase diclorometánica-etanólica, repitiéndose esta operación 8 veces; se filtró, formando así, la **fracción "D"**.
- La solución acuosa restante se secó a temperatura ambiente, formando así, la **fracción "E"**.

B. Identificación de metabolitos secundarios

Se realizaron los siguientes ensayos de identificación de metabolitos secundarios.

a) Detección de taninos:

- **Reacción de cloruro férrico:** En un tubo de ensayo se colocó 0,5 mL de la fracción "A" y se agregó una gota de solución acuosa de FeCl_3 1%.
La reacción es positiva cuando la torna de un color azul-negro, verde o azul verdoso.
- **Reacción de gelatina-sal:** Se agregó 0,5 mL de extracto de la fracción "A" sobre 5 mL de solución de NaCl 5%, gelatina 1% y gelatina-sal, la precipitación con este último reactivo o con ambos el 1° y 2° es indicativo de la presencia de taninos, si solamente ocurre con el 1°, podría ser un falso positivo.

b) Detección de aminoácidos:

- **Reacción de ninhidrina:** Sobre tiras de papel de filtro se colocó con un capilar:
 - ✓ Una gota de fracción "A" más una gota del reactivo de ninhidrina.

✓ Blanco: Una gota de solución etanólica de ninhidrina al 2%.

✓ Testigo: Una gota de solución de metionina 5%.

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

La reacción es positiva si el papel de la muestra torna de un color azul violáceo.

c) Detección de flavonoides:

✓ **Reacción de Shinoda:** En una placa se agregó 1 mL de la fracción “A” disuelta en etanol, limaduras de Mg y 0,5 mL de HCl concentrado. La reacción es positiva cuando torna de un color rojo, anaranjado y violeta.

d) Detección de triterpenoides y/o esteroides:

✓ **Reacción de Lieberman Burchard:** Sobre 1 mL de la fracción “B” disuelta en diclorometano, se vertió 5 gotas de ácido acético y 1 mL de anhídrido acético.

La reacción es positiva si torna de un color verde, azul verdoso (vía rojo o azul).

e) Detección de antraquinonas:

✓ **Reacción de Borntrager:** A 5 mL de la fracción “B” disuelta en diclorometano, se agregó 5 mL de NaOH 5% y se agitó suavemente.

La reacción es positiva si la fase acuosa torna un color rojo.

f) Detección de lactonas sesquiterpénicas:

✓ **Reacción de kedde:** Se utilizó dos soluciones; a: ácido 3,5-dinitrobenzoico 2% disuelto en metanol. b: Hidróxido de potasio 5,7% disuelto en agua. Se mezcló las soluciones a + b, en volúmenes iguales esto constituye el reactivo (R).

Se colocó en un tubo de ensayo 1 mg de la fracción “C” + 2 gotas del reactivo.

Si la reacción es positiva se torna un color púrpura o violáceo.

g) Detección de alcaloides: Se evaporó la fracción “C” hasta sequedad, luego se agregó 2 mL de HCl 1% y se filtró. Se realizó las reacciones de precipitación de Dragendorf, Mayer y Munier.

La reacción es positiva si aparece un precipitado.

h) Detección de leucoantocianidinas y catequinas:

✓ **Reacción de Rosenheim:** A 0,2 mL de la fracción “D” se agregó 0,1 mL de HCl concentrado, luego se calentó durante 10 minutos a 100 °C, se dejó enfriar y se adicionó 2 mL de agua y 0,4 mL de alcohol amílico, agitar y observar el color en la fase amílica.

La reacción se considera positiva si torna un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro.

Si es rojo indica presencia de antocianidinas. Si es marrón indica presencia de catequinas (Ver anexo, Fig. 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22).

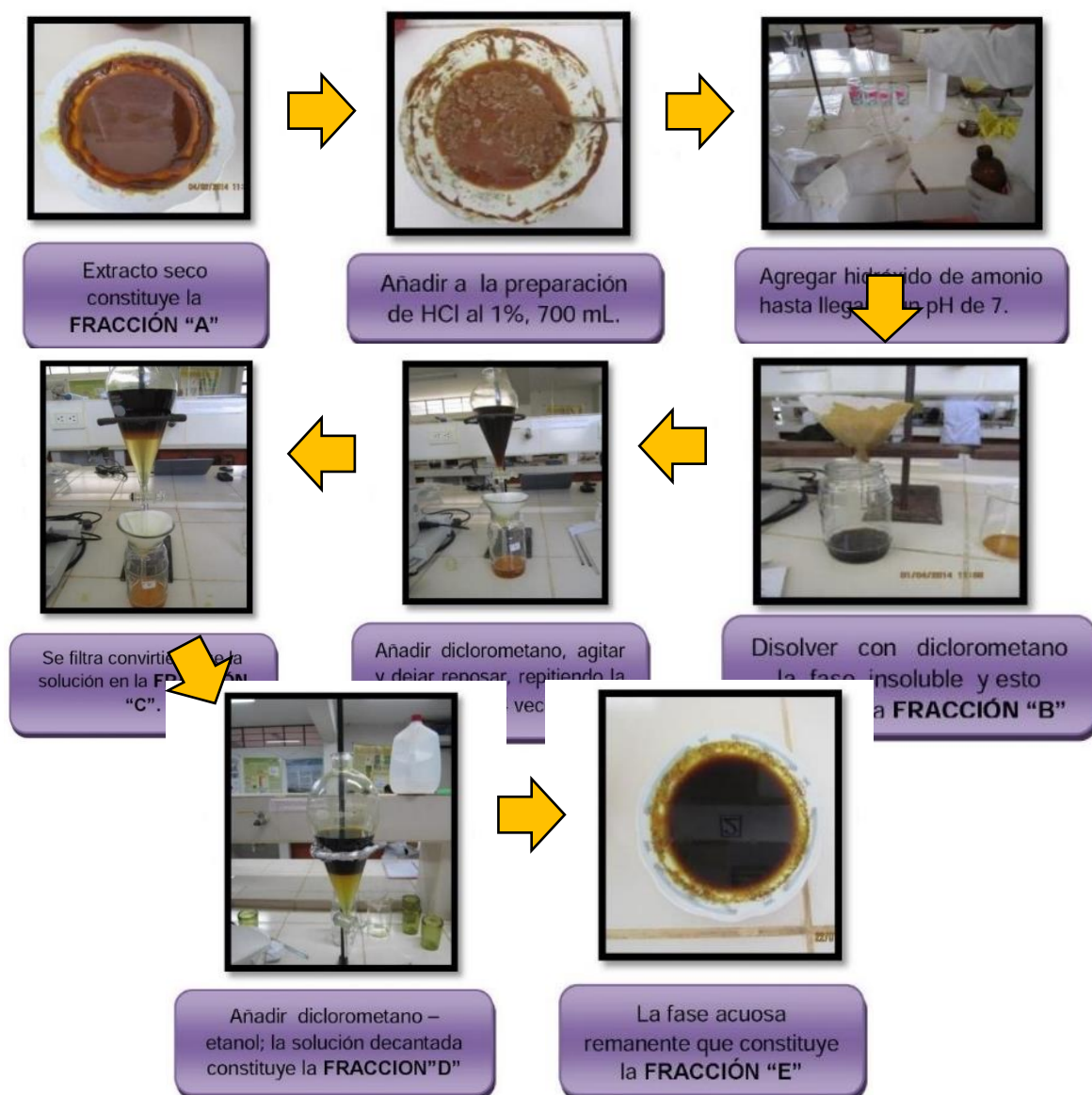


Figura 16. Flujograma del fraccionamiento del extracto etanólico de la parte aérea de *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey.

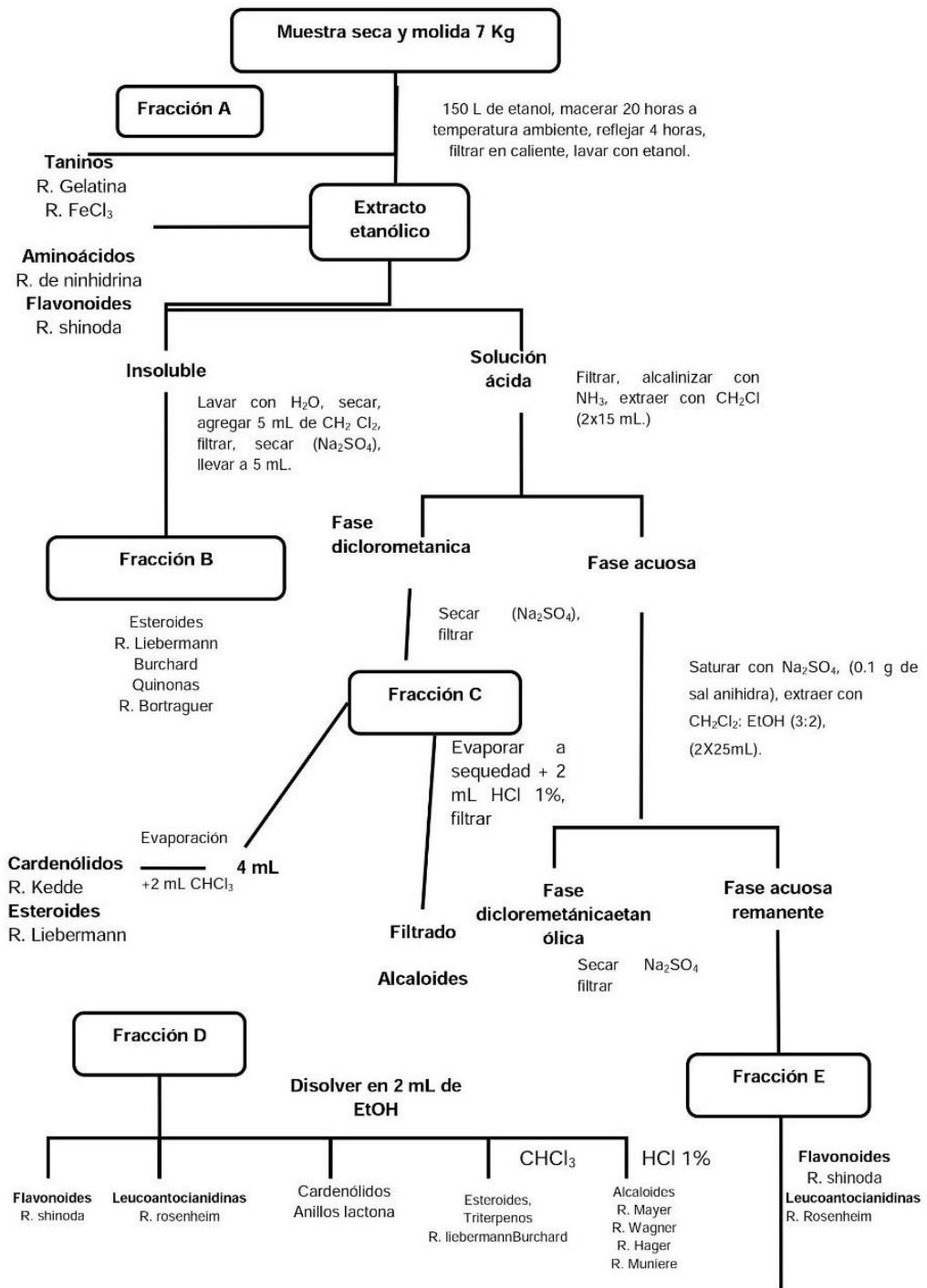


Figura 17. Flujoograma del Screening Fitoquímico

FRACCION "A"

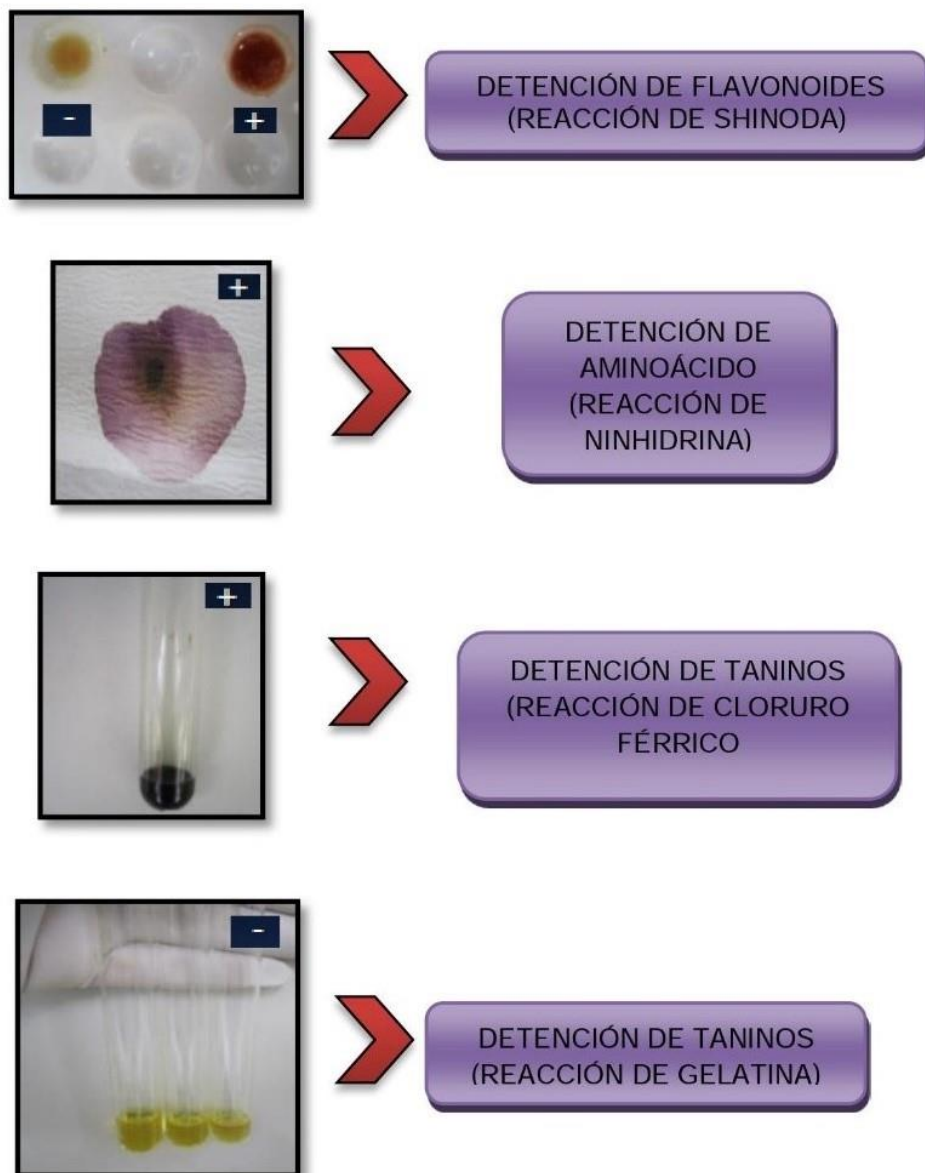
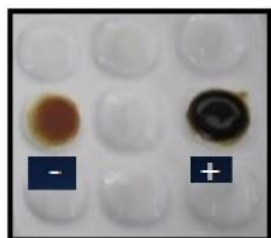


Figura 18. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción "A" del extracto etanólico de la parte aérea de *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey.

FRACCION "B"



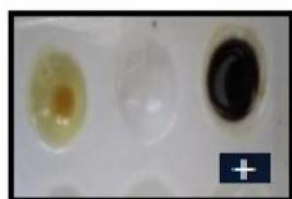
DETECCIÓN DE
QUINONA
(REACCIÓN DE
BORNTRAGER)



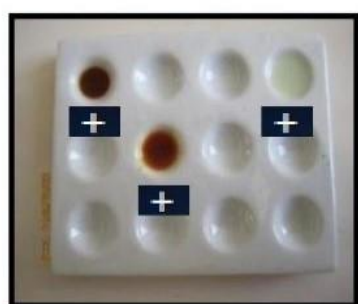
DETECCIÓN DE TRITERPENOIDES
Y/O ESTEROIDES (REACCIÓN DE
LIEBERMAN BURCHARD)

Figura 19. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción "B" del extracto etanólico de la parte aérea de *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey.

FRACCION "C"



DETECCIÓN DE
TRITERPENOIDES Y/O
ESTEROIDES (REACCIÓN DE
LIEBFERMAN BURCHARD)



DETECCIÓN DE ALCALOIDES
(REACCIÓN DE DRAGENDORF
Y MUNIER)



DETECCIÓN DE LACTONAS
SESQUITERPENICAS
(REACCIÓN DE KEDDE)

Figura 20. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción "C" del extracto etanólico de la parte aérea de *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey.

FRACCION "D"

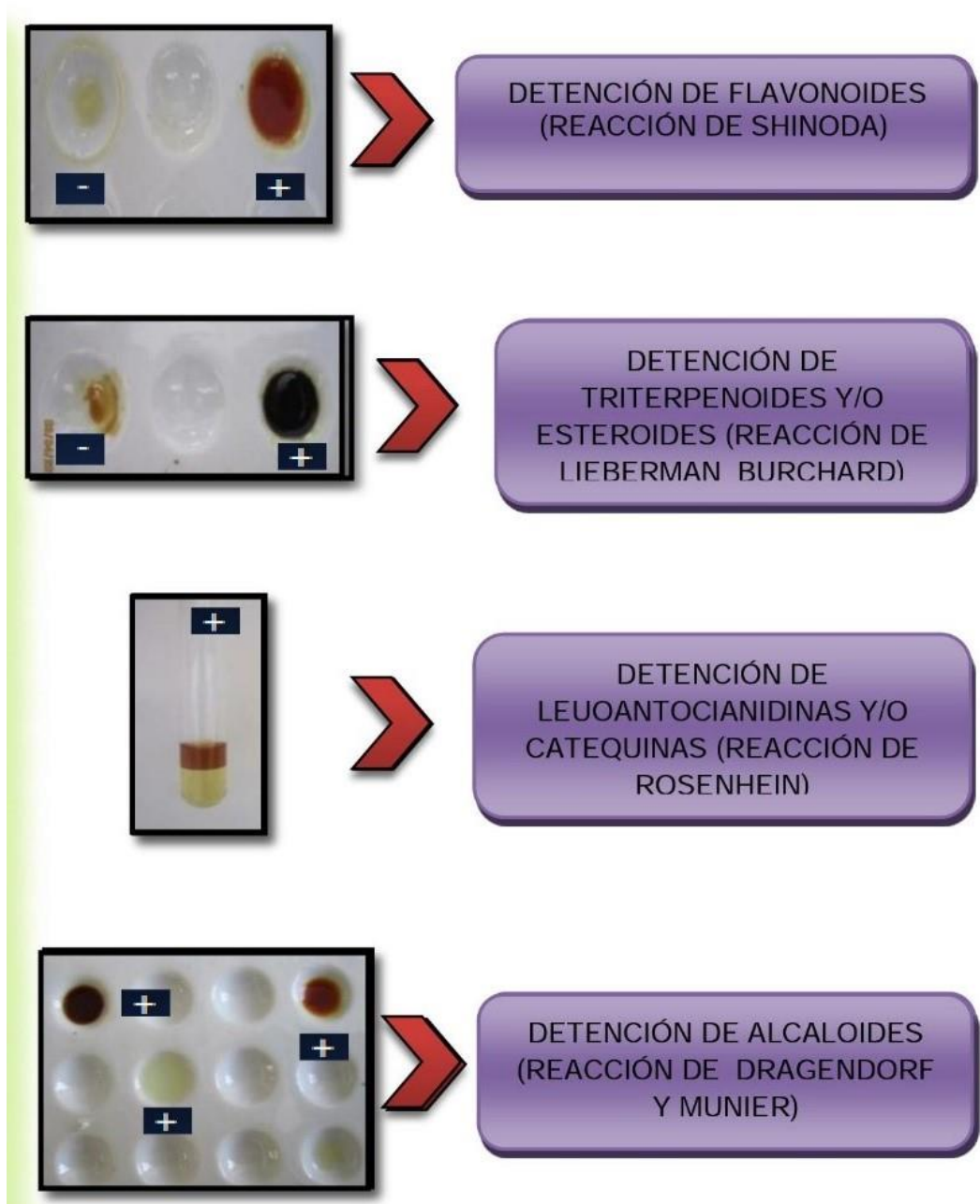


Figura 21. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción "D" del extracto etanólico de la parte aérea de *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey.

FRACCION "E"



Figura 22. Identificación de los metabolitos secundarios de la fracción "E" del extracto etanólico de la parte aérea de *H. aromaticum* (Hook.) L.H. Bailey.



Figura 23. Determinación de la actividad antioxidante de la Fracción D del extracto etanólico de la planta *Helonium aromaticum* “Manzanilla macho” mediante la decoloración del catión radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) .



Concentración (mg/mL)	Absorbancia Blanco	Absorbancia final	% Inhibición Radical DPPH
3	0.918	0.458 ± 0.013	50.10893246
2.5	0.918	0.535 ± 0.014	41.72113289
2	0.918	0.610 ± 0.011	33.55119825
1.5	0.918	0.686 ± 0.019	25.27233115
1	0.918	0.765 ± 0.010	16.66666666
0.5	0.918	0.843 ± 0.017	8.16993464

TABLA 6. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la Fracción “A” del extracto etanólico de la parte aérea de *helenium aromaticum* (hook.) l.h. bailey “manzanilla macho”

Concentración (mg/mL)	Absorbancia Blanco	Absorbancia final	% Inhibición Radical DPPH
4.2	1.040	0.835 ± 0.013	19.71153846
4	1.040	0.845 ± 0.014	18.75000000
3.7	1.040	0.862 ± 0.011	17.11538461
3.5	1.040	0.873 ± 0.019	16.05769230

TABLA 7. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la Fracción “C” del extracto etanólico de la parte aérea de *helenium aromaticum* (hook.) l.h. bailey “manzanilla macho”

Concentración (mg/mL)	Absorbancia Blanco	Absorbancia final	% Inhibición Radical DPPH
1.5	0.920	0.085 ± 0.013	90.76086956
0.75	0.920	0.355 ± 0.014	61.41304347
0.45	0.920	0.456 ± 0.011	50.43478260
0.15	0.920	0.578 ± 0.019	37.17391304
0.05	0.920	0.612 ± 0.010	33.47826086

TABLA 8. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la Fracción “D” del extracto etanólico de la parte aérea de *helenium aromaticum* (hook.) l.h. bailey “manzanilla macho”

Concentración (mg/mL)	Absorbancia Blanco	Absorbancia final	% Inhibición Radical DPPH
3	0.978	0.422 ± 0.013	56.85071574
2.25	0.978	0.575 ± 0.014	41.20654396
1.5	0.978	0.736 ± 0.011	24.74437627
0.75	0.978	0.894 ± 0.019	8.58895705

TABLA 9. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la Fracción “E” del extracto etanólico de la parte aérea de *helenium aromaticum* (hook.) l.h. bailey “manzanilla macho”

OTROS METODOS DE EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

A) Método ABTS (Ácido 2,2-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolin)-6- Sulfónico)

Este método se basa en la cuantificación de la reducción de la coloración verde/azul producida por el radical $ABTS^+$, debido a la presencia de agentes antioxidantes ^(85, 86). Para cuantificar el contenido, se realiza por espectroscopía de UV/VIS, a una absorbancia entre 734 – 754 nm.

B) Método FRAP (Reducción del hierro férrico a ferroso)

Este método se basa en la reducción del hierro férrico (Fe^{+3}) que se encuentra en el reactivo de FRAP, hasta la forma de hierro ferroso (Fe^{+2}), debido a la presencia de agentes antioxidantes ⁽⁸⁷⁾. Para cuantificar el contenido, se realiza por espectroscopía de UV/VIS, a una absorbancia entre 593 - 595 nm.

C) Método de Folin-Ciocalteu (FC)

Este método consiste en mezclar tungstato y molibdato en un medio altamente básico (Na_2CO_3 al 5-10%, acuoso), en la cual, al ser reducidos por los grupos fenólicos (fácilmente oxidables), da lugar a un complejo de color azul intenso, la cual servirá para cuantificar el contenido por espectroscopía de UV/VIS debido a que absorbe a una longitud de 750 - 765nm.

A la vez, este método no requiere de una estandarización de las condiciones de análisis ⁽⁸⁸⁾.

D) Método DMPD (dcloridrato de N,N-Dimetil-PFenilendiamina)

Este método propuesto por Fogliano ⁽⁸⁹⁾, consiste en la cuantificación de la reducción de la coloración producida por el radical $DMPD^+$, debido a la presencia de agentes antioxidantes. Para cuantificar el contenido, se realiza por espectroscopía de UV/VIS, a una absorbancia entre 506 - 553 nm.