

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**Actividad antioxidante de compuestos fenólicos  
aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora*  
(Hook. f.) Regel "cáncer ccora" Ayacucho – 2013.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. OCHOA VARGAS, Alcides Aron**

**AYACUCHO – PERÚ**

**2015**

**Acta de Sustentación de Tesis**  
R. D. N° 238 – CF de la S – UNSCH - 2015.  
Bach. Alcides Aron Ochoa Vargas

En la ciudad de Ayacucho, siendo las seis y cuarenta y cinco del día lunes 30 de noviembre del año dos mil quince en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas se reunieron los miembros del jurado calificador conformado por:

Mg. José Manuel Diez Macavilca (Decano encargado)

Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo (miembro)

Mg. Enrique Aguilar Felices (miembro)

Dr. Edwin Enciso Roca (Asesor)

Dra. Roberta Brita Anaya Gonzales (Cuarto jurado)

Bajo la presidencia del Mg. José Manuel Diez Macavilca en la calidad de decano encargado de la facultad de ciencias de la salud y actuando como secretaria la Q.F. Roxana León Aronés. Acto seguido el señor presidente del jurado evaluador solicita a la secretaria docente dar lectura a los documentos que están en mesa:

- Expediente constituido por resolución decanal N° 238 – FC de la UNSCH – 2015 de la fecha 18 de noviembre de 2015

A continuación el presidente invita al bachiller en farmacia y bioquímica Alcides Aron Ochoa Vargas a exponer el trabajo de tesis titulado: actividad antioxidante de compuestos fenólicos aislados de la hojas de *Perceae hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora" Ayacucho – 2013; en el tiempo reglamentado.

Concluida la etapa la etapa de exposición el Sr. Presidente del jurado evaluador invita a los miembros del jurado evaluador a formular las preguntas pertinentes al trabajo sustentado.

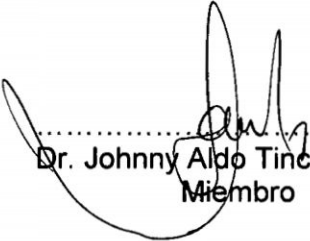
Luego terminada la etapa de preguntas el presidente del jurado evaluador solicita al sustentante Alcides Aron Ochoa Vargas y al público en general a que abandonen momentáneamente el auditorio para la deliberación y calificación en los siguientes rubros:

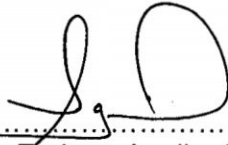
Jurado	Nota de texto	Nota de Exposición	Nota de Rpta a preguntas	Promedio
Mg. José Manuel Diez Macavilca	16	16	16	16
Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo	17	16	16	16
Mg. Enrique Aguilar Felices	17	17	14	16
Dr. Edwin Enciso Roca	16	16	16	16
Dra. Roberta Brita Anaya Gonzales				

Promedio total: 16


Concluyendo en aprobar por unanimidad al bachiller en farmacia y bioquímica con una nota de dieciséis (16), así mismo se sugiere levantar las observaciones que se plasman en los formatos de sustentación de tesis y formatos de resumen de la hoja de calificación para dar fe en lo actuado, el jurado calificador firma al pie. Siendo las ocho y 20 de la noche se concluye con el acto de sustentación.

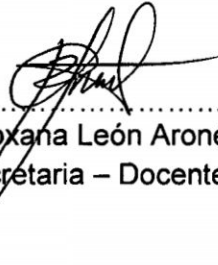
  
.....  
Mg. José M. Diez Macavilca  
Presidente

  
.....  
Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo  
Miembro

  
.....  
Mg. Enrique Aguilar Felices  
Miembro

  
.....  
Dr. Edwin Enciso Roca  
Asesor

  
.....  
Dra. Roberta Brita Anaya Gonzalez  
Cuarto- miembro

  
.....  
Q.F. Roxana León Aronés  
Secretaria – Docente

A mis queridos padres  
Feliciano Ochoa y Florencia  
Vargas, como también a mis  
hermanos.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a mi *Alma Mater* forjadora de profesionales competentes, por brindarme sabiduría, excelencia y también las facilidades y compromiso en el estudio para lograr mis objetivos.

A la Facultad de Ciencias de la Salud y en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por acogerme y brindarme mucho más que una carrera profesional.

A la plana de profesores de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, por transmitirme sus conocimientos y experiencias en cada uno de sus ámbitos, en forma incondicional.

A mi asesor Dr. Q.F. Edwin Carlos Enciso Roca por su constante colaboración y apoyo profesional.

Al Mg. Enrique Javier Aguilar Felices y Q.F. Roxana León Arones por su apoyo en la ejecución y culminación de este trabajo de investigación.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente han contribuido a la materialización del presente trabajo.



## ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel.,	4
2.3. Radicales libres	7
2.4. Antioxidantes	10
2.5. Compuestos fenólicos	14
2.5.1. Ácidos fenólicos	16
2.5.2. Flavonoides	16
2.5.3. Lignanos	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Lugar de ejecución	21
3.2. Definición de la población y muestra	21
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	21
3.3.1. Recolección de muestras	21
3.3.2. Preparación de muestra	22
3.3.3. Extracción de compuestos fenólicos	22
3.4. Identificación	22
3.5. Determinación de actividad antioxidante	23
3.6. Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	25
3.7. Análisis de datos	27
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de antioxidantes.	13
Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes según el sitio de acción.	14
Tabla 3. Clasificación de toxicidad según la CYTED.	26
Tabla 4. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook.f.) Regel "cáncer ccora". Laboratorio de farmacognosia de farmacia y bioquímica, junio de 2015.	30
Tabla 5. Coloración y fluorescencia de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook.f.) Regel "cáncer ccora" con los estándares. Laboratorios de toxicología de farmacia y bioquímica, julio de 2015.	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Agentes oxidantes derivados del metabolismo celular.	9
Figura 2.	Reacción de sales de hierro generando radicales oxidantes.	10
Figura 3.	Mecanismo antirradicalaria de las moléculas antioxidantes.	11
Figura 4.	Sistemas antioxidantes.	14
Figura 5.	2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides.	17
Figura 6.	Reacción de reducción del DPPH.	24
Figura 7.	Porcentaje de captación de radicales libres DPPH por parte de compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". En comparación de los estándares vitamina C y ácido caféico. Laboratorio de toxicología junio de 2015.	32
Figura 8.	Porcentaje de actividad secuestradora de radical libre de DPPH por efecto de los compuestos fenólicos aislados de hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", en comparación con vitamina C y ácido caféico. Laboratorio de toxicología junio de 2015.	33
Figura 9.	Representación gráfica de la prueba de probit para determinación de la Concentración Letal media (CL <sub>50</sub> ) de los compuestos fenólicos aislados de hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". Laboratorio de toxicología junio de 2015.	34

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de la clasificación taxonómica de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora"	50
Anexo 2. Flujograma de obtención del extracto etanólico	51
Anexo 3. Tamizaje fitoquímico según el modelo de Miranda	52
Anexo 4. Recolección de la muestra. Kimbiri. Marzo de 2015.	53
Anexo 5. Maceración (extracción hidroalcohólica de metabólicos) y concentración del extracto hidroalcohólico en el rotavapor. Laboratorios de farmacognosia junio de 2015.	54
Anexo 6. Extracción líquido – líquido del extracto hidroalcohólico, y desengrasado con éter de petróleo. Laboratorio de toxicología.	55
Anexo 7. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico. Dado en los ensayos Laboratorio de farmacognosia.	56
Anexo 8. Tubos de ensayo con la prueba de captación de radical libre DPPH de los compuestos fenólicos aislados.	57
Anexo 9. Sembrado, corrido y desarrollo de la placa cromatografía (Cromatografía en Capa Fina). Con sus respectivos estándares Laboratorio de toxicología agosto de 2015.	58
Anexo 10. Características cromatográficas ante luz ultravioleta con NH <sub>3</sub> y estándares:	59
Anexo 11. Coloración y fluorescencia de los estándares revelados con cloruro férrico y luz ultravioleta. L. de toxicología.	60
Anexo 12. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos aislados y sus respectivos estándares revelados con cloruro férrico al 1%.y se muestra de la siguiente manera Laboratorio de toxicología junio de 2015.	61
Anexo 13. Porcentaje de captación del radical libre DPPH de los compuestos fenólicos aislados a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, con respecto con el estándar ácido ascórbico (vitamina C). L. de toxicología.	62
Anexo 14. Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH	63
Anexo 15. Incubación de en <i>Artemia salina</i> para realizar la bioactividad de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook.f.) Regel "cáncer ccora".	64
Anexo 16. Programa PROBITS, usado para cálculos de de Concentración Letal 50 (CL <sub>50</sub> ).	65
Anexo 17. Bioensayo en nauplios de <i>Artemia salina</i> para determinar la bioactividad de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook.f.) Regel "cáncer ccora".	66
Anexo 18. Curva espectral de los compuestos fenólicos aislados de hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora".	67
Anexo 19. Matriz de consistencia	68

## RESUMEN

Los radicales libres son productos de las reacciones químicas de la célula y de los tejidos al elevarse o disminuirse las concentraciones fisiológicas puede acarrear importantes alteraciones funcionales. El presente trabajo de investigación básico descriptivo se realizó con la finalidad de determinar la actividad antioxidante de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", durante los meses de setiembre de 2013 a marzo de 2014, en los Laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La muestra fue recolectada en el departamento de Cusco, obteniendo el extracto, hidroalcohólico de las hojas, se realizó el tamizaje fitoquímico y el fraccionamiento por extracción líquido – líquido con solventes de diferente polaridad como: éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo para la obtención de compuestos fenólicos con los cuales se realizó los ensayos cromatográficos y espectroscópicos; la actividad antioxidante se evaluó mediante el ensayo de captación de radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). El extracto presentó flavonoides, taninos y/o fenoles, alcaloides, lactonas y/o cumarinas, triterpenos y/o esteroides, catequinas, saponinas y azúcares reductores; mediante ensayos cromatográficos y espectroscópicos se confirmó la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos. En los respectivos porcentajes 84,94%; 70,05%; 66,38% respectivamente a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, En conclusión se afirma que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel., "cáncer ccora" tienen actividad antioxidante.

**Palabras clave:** *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel., actividad antioxidante, compuestos fenólicos.

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser usados en la industria de alimentos, cosméticos y en la atención de la salud para prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres en nuestro organismo.<sup>1</sup>

El envejecimiento celular es cuando el oxígeno usado en el metabolismo de un organismo vivo, y también como elemento imprescindible en la vida de los organismos aerobios, es también la causa del deterioro de los mismos organismos vivos. Este último término son denominados radicales libres, fragmentos atómicos o moleculares con un electrón desapareado de muy alta reactividad responsable de daños en la estructura celular.<sup>2</sup>

También conocido como un proceso irreversible que se caracteriza por una disminución general de las funciones fisiológicas, lo que conduce a la morbilidad y la mortalidad celular. Es un proceso multifactorial controlado por una combinación de factores genéticos y ambientales. En condiciones normales existe un equilibrio entre la generación de los radicales libres y su neutralización por los sistemas de defensas antioxidantes; pero cuando este equilibrio se rompe, se produce el estrés oxidativo o daño oxidativo, mecanismo general del daño celular que conduce a una alteración en el funcionamiento celular directamente relacionada con la patogénesis de muchas enfermedades y finalmente a la muerte celular.<sup>3</sup>

Se consideran radicales libres (RL) a aquellas moléculas que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo. Esta configuración espacial les hace muy inestable, con una enorme capacidad para combinarse con la mayoría de las biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos,

proteínas ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos) provocando un daño en ellas y en las membranas celulares.

Los antioxidantes son sustancias cuya acción consiste en inhibir la tasa de oxidación de los nocivos radicales libres. Existen antioxidantes naturales (fisiológicas), presentes en nuestro organismo, sistémicos; dentro de un grupo los antioxidantes pueden ser enzimas que aumentan la velocidad de ruptura de radicales libres, otros que previenen la participación de iones de metales de transición en la generación de radicales libres y los inactivadores o barredores y de esta manera protegen de las infecciones, deterioro celular, del envejecimiento prematuro y probablemente del cáncer.<sup>4,5</sup>

El antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformando en un radical libre débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y como en algunos casos como la vitamina E pueden generarse en una forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Los antioxidantes se clasifican en endógenos (glutatión, coenzima Q, ácido tiotico, superoxidodismutasa (SOD) catalasa, glutatión peroxidasa), fabricados por la propia célula y exógenos (vitamina E, vitamina C, betacaroteno, licopeno, flavonoides), que ingresan en el organismo a través de la dieta o en suplementos con formulaciones antioxidantes.<sup>3</sup> Si el sistema antioxidante endógeno es insuficiente para protegerlos en acción dañina de los radicales libres, es necesario que ingiera sustancias exógenas.<sup>4</sup>

### **Objetivo general**

- Evaluar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora"

### **Objetivos específicos**

- Identificar los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora".
- Comparar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" con un estándar (vitamina C).
- Evaluar la bioactividad en *Artemia salina* de los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora".

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

La Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga actualmente se ha tomado mucha importancia en el campo de la investigación fitoquímica y farmacológica, generando conocimiento y a su vez aplicando estas investigaciones, las cuales mostramos algunas investigaciones realizados en Facultad de Ciencias de la Salud como:

En trabajo titulado "Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora". Lima - 2007. Utilizó el método de aislamiento de flavonoides, primera extracción hidroalcohólica con etanol al 80% con doble extracción, desengrasado con éter de petróleo, y luego la extracción líquido - líquido con acetato de etilo lo cual se extrajo los compuestos fenólicos.<sup>6</sup>

En otro trabajo titulado "Actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epl. "wayra muña". Ayacucho - 2012". Se menciona que se aislaron con éxito ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido ferúlico y el ácido rosmarínico) con el método de extracción etanólica luego con éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo en la última se evidencia la presencia de compuestos fenólicos.<sup>7</sup>

Otro trabajo titulado "Actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" Ayacucho - 2013. Se obtuvo el extracto etanólico, la cual se redisolvió en agua destilada y luego se procedió a fraccionar en el embudo de separación con diferentes solventes; éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo y la fracción que queda son los compuestos fenólicos.<sup>8</sup>



## **2.2. *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel (cáncer ccora)**

### **2.2.1. Clasificación taxonómica (Sistema de clasificación de Cronquist. A. 1988)**

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	SCROPHULARIALES
FAMILIA	:	GESNERIACEAE
GÉNERO	:	<i>Pearcea</i>
ESPECIE	:	<i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook.f.) Regel
Nombre vulgar	:	"cáncer ccora"

Fuente: Constancia de *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, 2013.

### **2.2.2. Descripción botánica**

**Sinonimia** (*Hypocyrtia brevicalyx*, *Gloxinia hypocyrtiflora*, *Isoloma hypocyrtiflorum*)

Poseen tallos erguidos 5 - 20 cm largo, no ramificado, con rizomas largo y la raíz adventicia de colores marrón y amarillo, hojas con vellosidades, son desiguales en cada par, con hojas ovaladas, en el envés comúnmente cordiforme o forma oblonga, de 2,5 - 17 x 2-10 cm, rugoso, adpreso piloso, a menudo purpúreo, principal y secundario, venas a menudo amarillentas que contrasta con el verde oscuro o áreas purpúreas entre venas. Inflorescencia de 1 - 2 flores, con vellosidades, de color verde, amarillo y púrpura; contiene un pedúnculo de 0,5 cm de largo; una bráctea ovalado, en algunos casos de 5 mm de largo, pero generalmente ausente. Los tubos florales contienen vellosidades; el cáliz es lóbulos, erguidos y urceolado (en forma de jarra) de tubo de corola ancho y ovalado de 1 - 2 mm de largo y 16 - 23 mm de ancho. La garganta con un diámetro de 8 - 15 mm ancho y 2 - 3 mm de largo, de un color rojo característico, poseen vellosidades, puberulento (cubierto de pelillos muy finos, cortos y en poca cantidad) en el interior o glandular, lóbulos 1 - 2 mm de largo de color rojos, estigma débilmente bilobulado. Cápsula y semilla no visto.

La familia *Pearcea* tiene una corola de 1 cm de ancho y 2 cm de largo y teniendo hojas con áreas más oscuras adelante. Las venas laterales también superiores. Abscesos pilosos y rugosos superiores, superficies de hoja y elíptico en el vez de

las hojas ovalada, es amenudo grande, ovalado, purpúreo, y hojas violetas –veteadas (rayadas) se distinguen las *Hypocyrtifloras* de otras especies.<sup>9</sup>

### 2.2.3. Familia Gesneriaceae y género *Pearcea*.

Hierbas, subarbustos, arbustos o bejucos, epífitos o terrestres, crecen de tubérculos, estolones o rizomas; tallos suculentos a leñosos, erectos, péndulos o ascendentes. Indumento compuesto de tricomas hialinos multiseriados. Hojas simples opuestas, arrosetadas (*Koellikeria erinoides* y *Napeanthus apodemus*) o pocas veces alternas (*Reldia veraguensis*, *Rynchoglossum azureum*), subdecusadas, decusadas, dísticas, a veces ternadas (*Achimenes*, *Kohleria*) o verticiladas (*Kohleria*), isófilas, subisófilas o anisófilas, suculentas, membranáceas o coriáceas, margen entero o no, usualmente pecioladas. Inflorescencias terminales o axilares, flores solitarias, fasciculadas, en cimas o racimos; perfectas; zigomorfas o subactinomorfas, con o sin brácteas. Cáliz compuesto por 4 o más comúnmente 5 sépalos libres o connatos en la base, hasta la mitad de su longitud y en *Chrysothemis* hasta el ápice, iguales o desiguales, valvados u ocasionalmente imbricados, con el margen entero o no, verdes a variadamente coloreados. Corola de variados colores y formas, compuesta de 5 pétalos connatos, erecta, oblicua u horizontal en el cáliz, frecuentemente ventricosa, el tubo frecuentemente espolonado en la base y el limbo con 4 o más comúnmente 5 lóbulos, a veces bilabiado; estambres 4 con o sin un estaminodio, usualmente didínamos, filamentos insertos en la base de la corola, a veces connatos, retrayéndose después de que se deposite el polen, anteras coherentes, de diferentes formas y dehiscentes por poros (*Codonanthe*, *Drymonia*) o ranuras longitudinales; ovario ínfero o súpero, unilocular o bilocular, óvulos numerosos con funículos usualmente suculentos, 2 placentas parietales; estilo simple, elongado y estigma bilobado o estomatomorfo; disco ausente o generalmente presente, anular o con 1 a 5 glándulas nectaríferas separadas o connatas. Fruto una baya o cápsula seca o carnosas y está compuesta de 2 a 4 valvas; semillas numerosas y muy pequeñas, fusiformes, oblongas o lineares y estriadas o variadamente marcadas.

La familia Gesneriaceae se distingue por su hábito herbáceo o arbustivo, y su hábitat terrestre o epífito; con las hojas siempre simples y opuestas (LS), en ocasiones anisófilas, con los márgenes frecuentemente aserrados o crenados, y sin estípulas; y por sus flores perfectas, llamativas, con las corolas simpétalas,

zigomorfas, con cuatro estambres didínamos cuyas anteras son coherentes en pares frontales.

Las flores de Gesneriaceae tienen néctar como principal recompensa para los polinizadores, entre estos se encuentran aves, insectos y murciélagos. Los frutos abayados de algunos géneros son dispersados por aves, principalmente aquellos que tienen colores atractivos, en los que son menos llamativos sus semillas suelen ser diseminadas por hormigas. Dentro de los géneros con frutos capsulares se dan básicamente dos tipos de las mismas: las cápsulas carnosas, que son regularmente omítocoras, y las secas que análogamente pueden ser anemócoras o hidrocoras.<sup>10</sup>

#### **2.2.4. Composición química**

La bibliografía no menciona el estudio de ese tipo de planta (*Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora"), pero sin embargo hay estudios de algunas de las especies que pertenecen a este género.

#### **2.2.5. Estudios biológicos realizados**

No se reportan estudios biológicos alguno de la planta *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora". Pero la bibliografía refiere que la familia de la planta estudiada tiene estudios biológicos. Sin embargo, mencionan que la mayoría del género que son plantas ornamentales.<sup>10</sup>

#### **2.2.6. Usos tradicionales**

Es una planta silvestre con sustancias químicas y con gran utilidad en la medicina natural. Siendo usada por los pobladores de la zona y lugares aledaños de la selva central (VRAEM) colindando con el departamento de Cusco, sin tener en conocimiento que probablemente pueda causar algunos efectos secundarios en su salud por su consumo indiscriminado por ello el estudio científico de la planta nos sirve para conocer su grado de propiedad antioxidante y citotoxicidad. Por lo que el estudio de esta planta es indispensable para poder tener un criterio científico sobre el uso de esta planta tan difundida por los lugareños de dicha zona.

Muchas de las especies de la familia han sido tradicionalmente usadas como ornamentales. Sin embargo, los pobladores de la zona mencionan que tiene propiedades vulnerarias, antiinflamatorias y antioxidantes. También se han reportado con usos medicinales para las siguientes especies que pertenecen al mismo género como son:

*Chrysothemis friedrichsthaliana* (antidiarréico, antiinflamatorio, antiofídico)  
*Codonanthe crassifolia* (antigripal, antitusivo), *C. uleana* (vulnerario), *Columnea consanguinea* (antiofídico), *Drymonia alloplectoides* (antiofídico), *D. coriacea* (antiofídico, antitusivo, odontalgia), *D. macrophylla* (antiofídico), *D. serrulata* (antiofídico, dermatosis), *D. warscewicziana* (antiofídico), *Kohleria spicata* (antihemorrágico, antivenéreo, nefrosis).<sup>10</sup>

### 2.3. Radicales libres

En general, un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente; sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón del átomo o molécula estable. A las cuales oxida con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que le convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena.<sup>5</sup>

Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado (la cual se encuentra en el último orbital del átomo o molécula), pueden existir de forma independiente y que debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida.<sup>4</sup>

En los sistema de organismos vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales libres de oxígeno. Se utiliza el término Especies reactivas del oxígeno (Resctive Oxygen Species o ROS,) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertibles en radicales.<sup>11</sup>

Los radicales libres son producidos por funciones celulares normales o bien pueden ser inducidos por diferentes factores ambientales o fisiológicos como son las radiaciones ionizantes, radiación ultravioleta, ejercicio físico extenuante o por descenso de la capacidad de los sistemas endógenos antioxidantes. Dentro de estos radicales libres se incluye el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el óxido nítrico ( $\text{NO}$ ). Estas especies,

debido a su alta reactividad química, pueden conducir a la peroxidación de lípidos, oxidación de algunas enzimas, oxidación y degradación proteica, así como daño mutagénico al ácido desoxirribonucleico (ADN).<sup>12</sup>

La generación de RL no se ha de relacionar siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos. En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término especies reactivas del oxígeno (EROS) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno. De forma análoga existen especies reactivas del nitrógeno (ERN), del cloro (ERCl) y del bromo (ERBr).<sup>4</sup>

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero es fuente de radicales libre, que si no se neutralizan de forma adecuada pueden tener efectos deletéreos sobre la función celular. Se dice que existe "estrés oxidativo" cuando existe una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida.<sup>13</sup>

En 1954 una investigadora argentina<sup>14</sup> sugirió por primera vez que las EROS eran agentes tóxicos y generadores de patologías, estableciendo tres postulados básicos:

- Los RL constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales ionizantes.
- El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes producían los efectos tóxicos.
- La producción de RL es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis.

Los radicales libres son componentes anormales de la célula y tejidos, existiendo en ciertas cantidades de compuestos celulares y en algunos tipos celulares. Al elevarse o disminuirse las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno puede acarrear importantes alteraciones funcionales.<sup>14</sup>

Son numerosas las patologías que han sido asociadas con este desbalance entre oxidantes y antioxidantes; arteroesclerosis, cáncer, enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas, situaciones de injuria por isquemia y repercusión en los tejidos, el síndrome de diestrés respiratorio, etc.<sup>13</sup>

### 2.3.1. Principales fuentes de radicales libres

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de EROS y ERNS que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, el ozono y ciertos medicamentos. Aunque la exposición a los EROS procedentes de fuentes exógenas sea extremadamente elevada, la exposición a fuentes endógenas es mucho más importante y extensa, debido a que es un proceso que de forma continua a las células de nuestro organismo a lo largo de la vida.

### 2.3.2 Fuentes endógenas de radicales libres

Podemos distinguir cuatro fuentes endógenas que originan la mayoría de agentes oxidantes producidos por las células:<sup>15</sup>

- a. En el transcurso normal de la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen  $O_2$  reduciéndolo en varias etapas a  $H_2O$ . Inevitablemente, a lo largo de este proceso aparecen subproductos como el  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot}$ .

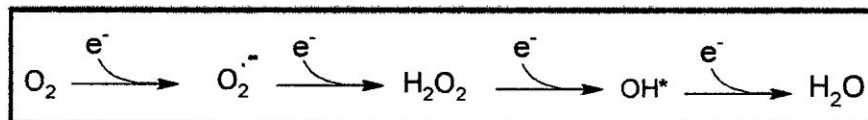


Figura 1. Agentes oxidantes derivados del metabolismo celular.

- b. Las células fagocíticas (leucocitos, neutrófilos, macrófagos y eosinófilos) al activarse por medio de mediadores proinflamatorios o de productos bacterianos, víricos o de parásitos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo (literalmente una “explosión” oxidativa) en el que se producen grandes cantidades de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot}$ . Las infecciones crónicas llevan a una actividad fagocítica continua que provoca una inflamación crónica que es el principal factor de riesgo del cáncer.
- c. Los peroxisomas, orgánulos encargados de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas produce,  $H_2O_2$  como subproducto, que es degradado de forma natural por la enzima catalasa. Bajo ciertas condiciones, algunos de los peróxidos escapa la degradación y se libera a otros compartimentos celulares provocando un incremento del daño por oxidación en el ADN.



d. Las enzimas del complejo Citocromo P<sub>450</sub>, son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. La inducción de estas enzimas previene los efectos de toxicidad aguda de agentes extraños al organismo, pero también produce subproductos oxidantes que pueden dañar el ADN.

### 2.3.3. Fuentes exógenas de radicales libres

Entre las principales fuentes exógenas de radicales libres destacan.<sup>15</sup>

- Los óxidos de nitrógeno del humo de tabaco.
- Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos.

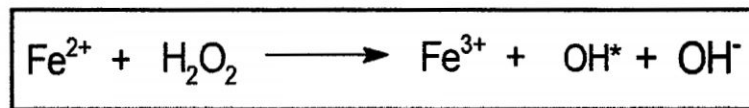


Figura 2. Reacción de sales de hierro generando radicales oxidantes.

- Los alimentos que ingerimos a través de la dieta, especialmente los de origen vegetal, que se oxidan en mayor o menor grado generando diferentes tipos de oxidantes como peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición.

### 2.4. Antioxidante

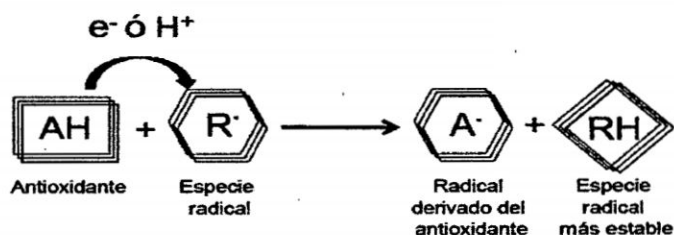
Son sustancias cuya acción consiste en inhibir la tasa de oxidación de los nocivos radicales libres (disminuye las defensas, producen daño celular con la posibilidad de producir cáncer, arteriosclerosis y envejecimiento). Existen antioxidantes naturales (fisiológicas), presente en nuestro organismo, sistémicos; dentro de un grupo los antioxidantes pueden ser enzimas que aumentan la velocidad de ruptura de radicales libres, otros que previenen la participación de iones de metales de transición en la generación de radicales libres y los inactivadores o barredores y de esta manera protegen de las infecciones, deterioro celular, del envejecimiento prematuro y probablemente del cáncer.<sup>5</sup>

Halliwell y Gutteridge en 1998, definieron como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones, con respecto a un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al reaccionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil, con escasos o nulos efectos tóxicos.

Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, puede actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción.<sup>3</sup>

La función y efecto que tienen los antioxidantes en la salud es evitar la oxidación de sustancias que puedan provocar alteraciones fisiológicas, estudios recientes demuestran que la expresión antioxidante enzimática y su actividad se ven drásticamente reducidas en la mayoría de las enfermedades cutáneas.<sup>16</sup>

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción. Para que un antioxidante (AH) tenga actividad antirradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino (RH) después de reaccionar con la especie radical ( $R^\cdot$ ). Esta reacción se basa en una transmisión redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria (Figura 3). Como resultado de esta transferencia, se formará un radical derivado del antioxidante ( $A^\cdot$ ) que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad.<sup>17</sup>



**Figura 3.** Mecanismo antirradicalaria de las moléculas antioxidantes.<sup>18</sup>

El antioxidante al reaccionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Tienen diferentes mecanismos de acción; unos impiden la formación de los RL y/o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los RL (sistema barredor) y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación). Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado radical



libre o hacia varios, puede actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción.<sup>19</sup>

#### **2.4.1. Los productos naturales como los antioxidantes**

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y extintores de oxígeno. Además, algunos ácidos fenólicos tienen un potencial de quelación de metales.<sup>20</sup>

Los resultados de estudios epidemiológicos y científicos muestran que el factor nutricional juega un papel importante en la prevención de las consecuencias de la actividad de los radicales libres en el organismo. Una dieta rica en antioxidantes naturales puede influir significativamente en el aumento de reactivo potencial antioxidante del organismo y disminuir el riesgo de algunas enfermedades de origen radicales libres. Se considera que un nivel adecuado de antioxidantes suministrado en la dieta induce procesos inmunológicos y aumenta la capacidad defensiva de las células en forma adecuada.<sup>21</sup>

#### **2.4.2. Sistema de defensa antioxidante**

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente – membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas: lípidos, proteínas, ADN, etc. funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen.<sup>22</sup>

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen RL. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los RL. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un RL.<sup>12</sup>

### 2.4.3. Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes se clasifican en endógenos, fabricados por la propia célula, y exógenos, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes.<sup>13, 20</sup>

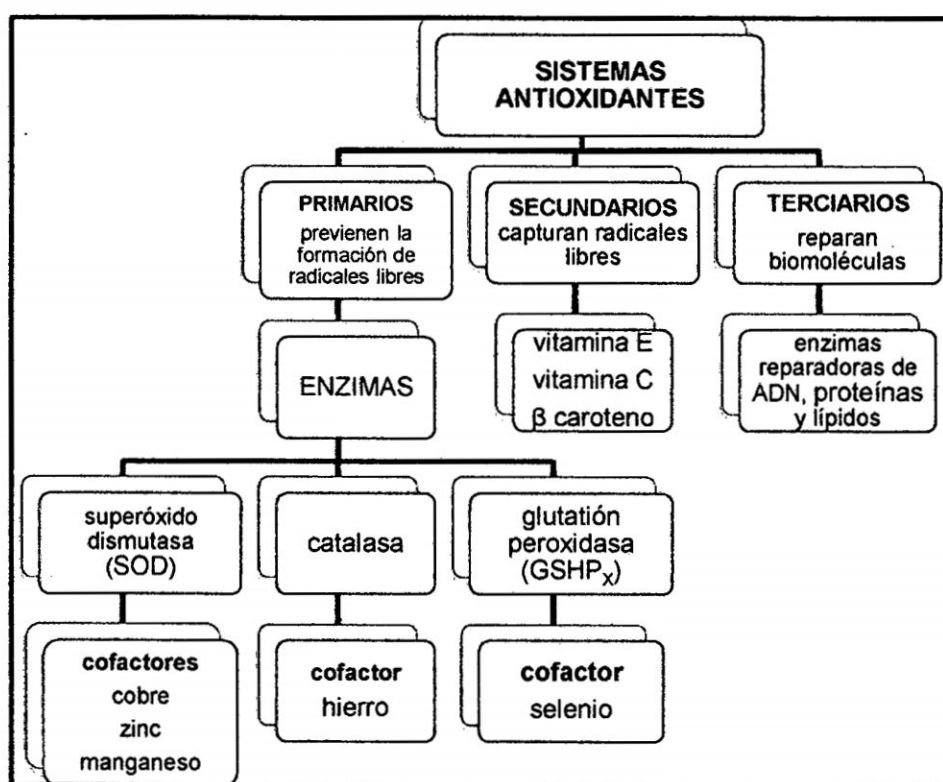
Antioxidantes exógenos: Son antioxidantes que provienen de la dieta, tales como la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el  $\beta$  - caroteno (provitamina A), el cobre, el selenio, el zinc, el manganeso, los polifenoles, los licopenos, los ácidos gálicos, los flavonoides, la quercetina, las catequinas y los taninos.<sup>21</sup>

**Tabla 1.** Clasificación de antioxidantes.<sup>20</sup>

<b>Exógenos</b>	<b>Endógenos</b>	<b>Cofactores</b>
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Beta caroteno	Ácido tióctico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas:	Hierro
Licopeno	Superóxido dismutasa (SOD)	selenio
	Catalasa	
	Glutación peroxidasa	

**Tabla 2.** Clasificación de los antioxidantes según el sitio de acción.<sup>20</sup>

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactofeínas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C



**Figura 4.** Sistemas antioxidantes.<sup>23</sup>

## 2.5. Compuestos fenólicos

Son grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinado con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua.<sup>24</sup>

Las estructuras fenólicas son metabolitos secundarios que pueden proceder de la ruta del ácido shikímico o de ruta acetato.<sup>25</sup>

- Proceden de la ruta del ácido shikímico: fenoles sencillo, ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos, etc.), cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas y taninos.
- Proceden de la ruta de los acetatos o ruta del ácido mevalónico, los siguientes derivados fenólicos: antraquinonas y heterósidos antracénicos.

Los compuestos fenólicos en las plantas se reconocen como compuestos importantes que confieren estabilidad frente a la oxidación. Los compuestos fenólicos antioxidantes naturales puede ser: un grupo lipófilo, tocoferoles y un grupo hidrófilo, incluyendo fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. A pesar de que los químicos han elucidado las estructuras de miles de compuestos fenólicos, todavía hay muchos compuestos que aún no han sido completamente caracterizados y se les conoce como extractos fenólicos. Los flavonoides, taninos y ácidos fenólicos son los principales compuestos fenólicos.<sup>25</sup>

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividad, son constituyentes importantes de las plantas y que a su vez les otorga múltiples efectos benéficos. Están presentes generalmente en forma de glucósidos en los extractos de las frutas, hierbas, vegetales, cereales y otros materiales de plantas ricos en polifenoles lo que ha permitido su utilización por la industria alimentaria no solo por las características organolépticas que le confieren a las frutas y verduras sino que retardan la oxidación de los lípidos y mejoran la calidad nutricional de los alimentos. En adición a esto, los polifenoles presentan una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo la actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antihipertensiva, estrogénica, antioxidante y efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares. Especialmente estos componentes pueden ejercer efecto antioxidante como el secuestro de radicales libres, donan moléculas de hidrógeno, barren moléculas de superóxido, quelan metales de transición; estas propiedades son atribuidas principalmente al grupo hidroxilo presente en su anillo bencénico.<sup>26</sup>

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a

patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiación UV, entre otros. Esta síntesis se da a partir de la fenilalanina por la vía del shikimato. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina, por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, etc). Los compuestos fenólicos son un gran grupo de antioxidantes naturales.<sup>19</sup>

Los fenoles sencillos son poco frecuentes y están en la planta en forma de heterósidos. Los ácidos fenólicos se pueden clasificar en derivados del ácido benzoico y derivados de ácido cinámico.<sup>27</sup>

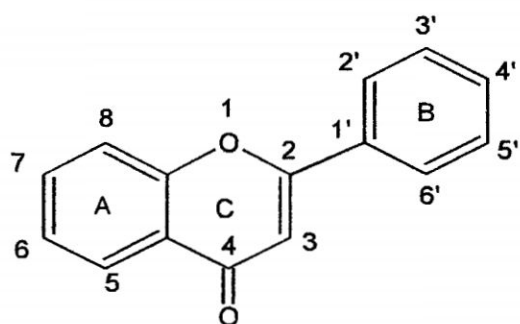
#### **2.5.1. Ácidos fenólicos.**

Compuestos orgánicos que poseen como mínimo un hidróxido fenólico. Son principalmente derivados del ácido benzoico, y de ácido cinámico con propiedades químicas y analíticas diferentes y de interés farmacológico limitado desde un punto de vista fisiológico y terapéutico. Sin embargo, los arbutósidos presentan propiedades antisépticas, los derivados salicílicos presentan propiedades anti-inflamatorias, los ésteres heterosídicos pueden presentar interés como inhibidores enzimáticos, antimicóticos y antibacterianos.<sup>20</sup>

#### **2.5.2. Flavonoides**

Los flavonoides son fenoles de tipo diaril-propano (Ar-C3-Ar) unidos, la mayoría, a una cadena de azúcar.<sup>27</sup>

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Lo cual deja un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6, común en la mayoría de los flavonoides. Y gracias a las variaciones del pirano se logran clasificar. Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo, entre ellos, los flavonoides. Estos compuestos, productos de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico, intervienen en los vegetales en la formación de pigmentos, en la protección frente a la radiación ultravioleta, en la defensa durante la interacción planta-patógeno y posiblemente, modificando la acción de distintas hormonas vegetales (auxinas y citoquinas).<sup>5</sup>



**Figura 5.** 2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides.<sup>27</sup>

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo.<sup>2</sup>

Los flavonoides están ampliamente extendidos en todo el reino vegetal constituyendo la mayoría de los pigmentos amarillos (flavonas, flavonoles, chalcona, auronas), rojas y azules (antocianos) de flores y algunos frutos.<sup>5</sup>

Son particularmente abundantes en las plantas vasculares. Destacan las familias Asteraceae, Rutaceae, Fabaceae, Umbelliferae, Lamiaceae, entre otras, por el contenido y diversidad estructural de flavonoides que existen en ellas.<sup>5</sup>

#### **2.5.2.1. Propiedades farmacológicas**

Poseen propiedades terapéuticas como: antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas. Entre todas, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han sido realizados un sin número de estudios principalmente de corte clínico y nutricional, teniendo en cuenta que a menudo dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos comúnmente recomendados en todo el mundo, como es el caso de las combinaciones vitamínicas (vitamina E más vitamina C y  $\beta$  - caroteno), no producen los efectos esperados o estos resultan dañinos, por lo que para lograr una mejor acción antioxidante se prefiere incluir en la dieta una mezcla de flavonoides y taninos.<sup>28</sup>

Así mismo protectores de la pared vascular o capilar, antiradicales libres, antiespasmódicos, antihemorrágico, antihepatotóxico, diuréticos y anti fúngicos.<sup>29</sup>

Los flavonoides, en general, no parecen ser tóxicos. Consumidos en la dieta habitual en cantidades apreciables (alrededor de un gramo diario, por término medio) podrían proporcionar a nuestro organismo en niveles significativos para

ejercer algunas acciones farmacológicas de la amplia gama que poseen. Con el fin de estudiar la posible asociación entre el consumo de flavonoides con la dieta y la potencial reducción de la morbilidad y mortalidad coronaria, se ha llevado a cabo un estudio de cohorte con 5133 pacientes, durante más de veinte años. El análisis estadístico de los datos han permitido determinar una relación inversa entre la ingestión de flavonoides y mortalidad por enfermedad coronaria, lo que podría deberse a que el efecto antioxidante de los flavonoides ejerza una protección de las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL), previniendo o retrasando el desarrollo de la aterosclerosis.<sup>5</sup>

#### **2.5.2.2. Relación estructura actividad antioxidante**

Con respecto a su estructura, los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y es potenciado este efecto por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4. Además, las agliconas se muestran más potentes en sus acciones antilipoperoxidativas que sus correspondientes glicósidos.<sup>29</sup>

#### **2.5.3. Taninos**

Están constituidos por una amplia gama de plantas estudiadas que contienen estos metabolitos, poseen compuesto hidrosolubles con estructura polifenólicos, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosas, gelatinas). Esta capacidad para precipitar es la base de sus dos propiedades principales: su capacidad de curtir la piel y su poder astringente.<sup>27</sup>

Sus propiedades más conocidas y avaladas por la experimentación son debido a su capacidad para formar complejos con varias sustancias; pero además su actividad antioxidante, basada en la captura de radicales libre. Utilizados desde la antigüedad por su propiedad astringente en uso interno y externo.<sup>5</sup>

#### **2.5.4. Lignanós**

Los lignanos constituyen un grupo de productos naturales ampliamente distribuidos en el reino vegetal, cuyas unidades estructurales son biosintetizadas a través de la ruta de ácido sikimico. Posee la característica común formada por dos unidades de fenilpropano enlazado por el átomo central de sus cadenas laterales.



Estos compuestos están presentes desde briófitos y helechos hasta plantas superiores donde desempeñan importantes funciones farmacológicas, entre ellos los de tipo defensivo.

Tienen dos tipos de lignanos los simples y ciclolignanos, los primeros presentan una unión carbono- carbono a través de la posición 8 y 8' de sus cadenas laterales, entre la variedad de estos compuestos se tiene como: el ácido guayarético, dibencilbutano, lignanólidos, epoxilignanos, burserano, etc. Y los ciclolignanos resultan de la formación de otro enlace adicional carbono – carbono lo que da lugar a un nuevo anillo, entre ellos se tiene a: megafona, alcohol dehidrocoferílico, magnolol, isomagnolol, etc.<sup>30</sup>

## **2.6. Bioactividad en *Artemia salina***

Uno de los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a *Artemia Salina*'. Desarrollada en 1982 por Meyer y Col. El procedimiento consiste en exponer compuestos activos y / o extractos de plantas a nauplios de *Artemia salina*, para determinar valores de concentración letal 50 (CL50), expresada en g/ml. Sin embargo, los valores obtenidos de CL50, no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular; son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas.

La toxicidad en vivo de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos.

Este bioensayo es aplicable a compuestos con estructuras y modos de actividad diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, que sea usado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos y compuestos de tipo morfínico entre otros.<sup>31</sup>

### **2.6.1. Actividad Toxicológica**

Uno de los aspectos importantes para la evaluación de la actividad toxicológica es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación, conocida como relación dosis-respuesta, constituye entonces la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el medio donde se encuentren las muestras biológicas. La actividad biológica es la capacidad que tiene el material de interactuar químicamente con los tejidos



del organismo, es una expresión que describe los efectos beneficiosos o nocivos de una droga o extracto en organismos vivos. Tanto las investigaciones biológicas básicas como las investigaciones es aplicadas, han determinado muchos adelantos importantes de la ciencia médica. Por eso resulta indispensable seguir realizando investigaciones en ambas clases con el fin de descubrir las causas, mecanismos, prevención y tratamiento de enfermedades que aun no son bien conocidas por el hombre, así como para probar la eficacia e inocuidad de muchos de los principios activos utilizados en medicina humana y veterinaria, y en general para avanzar en el conocimiento biológico.<sup>32</sup>

#### **2.6.2. Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>)**

La CL<sub>50</sub> se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias. En la investigación fitoquímica basándose del principio de la farmacología, se da la toxicología a bajas concentraciones y altas concentraciones la cual se puede correlacionar la bioactividad con el valor de la DL<sub>50</sub> y al mismo tiempo su grado de toxicidad. La determinación de la DL<sub>50</sub> requiere de la estadística, para lo cual es necesario transformar los valores de respuesta obtenidos en unidades Anglit, Logit o Probit y las dosis suministradas en unidades logarítmicas conocidas como dosis metamétricas. Existen algunos programas especializados que realizan este tipo de cálculos automáticamente, pero su confiabilidad depende de la persona o institución que los haya desarrollado. El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser verificado, por ejemplo, 24 horas, esto con el fin de comparar y estimar la potencia relativa del estímulo. Como organismo de prueba se puede utilizar *Artemia salina*.<sup>33</sup>

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de febrero a julio de 2015.

#### 3.2. Definición de la población y muestra

##### 3.2.1 Población

Hojas de la especie *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora", esta es una planta silvestre con sustancias químicas con gran utilidad en la medicina natural. Siendo usada por los pobladores de la zona y lugares aledaños a la selva central (VRAEM) colindando con el departamento de Cusco, sin tener en conocimiento que probablemente pueda causar algunos efectos secundarios en su salud, por consumo indiscriminado, por ello el estudio científico de esta planta nos sirve para conocer y realizar los bioensayos toxicológicos necesarios.

##### 3.2.2 Muestra

Constituyó 500 g de hojas secas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" de la población de distrito de Kimbiri que pertenece a la provincia de la Concepción, departamento de Cusco.

##### 3.2.2.1. Tipo de muestreo.

Se usó un sistema de muestreo no probabilístico por la inaccesibilidad de esta planta, la cual se encontró en peñascos y en la profundidad de la selva.

##### 3.2.2.2. Unidad de análisis

Compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora"

### **3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos**

#### **3.3.1. Recolección de muestra**

Las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", fueron recolectadas en horas de la mañana, en buen estado de conservación, durante el mes de agosto, luego fueron limpiadas, secadas y guardadas en bolsas de tela de color oscuro.<sup>33</sup>

Con una parte de la planta se procedió a la identificación botánica por los especialistas del *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, encargada por la bióloga Laura Aucasime Medina.

#### **3.3.2. Preparación de muestra**

La planta recolectada fue trasladada a los Laboratorios del Área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y fue desecado a temperatura ambiente, posteriormente fue pulverizada utilizando un molino de cuchillas, para obtener un polvo seco que fue almacenándose en frascos ámbar.

#### **3.3.3. Extracción de compuestos fenólicos**

Para el aislamiento de compuestos fenólicos se consideró primero hacer una extracción hidroalcohólica con etanol al 80% con doble extracción, evaporación a sequedad del extracto, desengrasado con éter de petróleo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que puedan interferir con la extracción de compuestos fenólicos.

Extracción líquido-líquido con acetato de etilo utilizando un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo y evaporarla a sequedad.<sup>15</sup> (ANEXO 2)

#### **3.3.4. Ensayo fitoquímico cualitativo al extracto hidroalcohólico**

La caracterización fitoquímica se basó en el agrupamiento de metabolitos estructuralmente semejantes, para identificarlos por su comportamiento químico frente a reacciones estandarizadas. Se realizaron las pruebas de coloración y precipitación.<sup>25, 34</sup>

### **3.4. Identificación**

#### **3.4.1. Cromatografía en capa fina (CCF)**

Las soluciones estándares que se emplearon fueron: Vitamina C, ácido salicílico, quercetina, rutina y el ácido tánico de 0,2 mg/ml.

### **Sistema cromatográfico**

**Fase estacionaria:** placa de cromatografía 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck).

**Fase móvil:** butanol: ácido: acético: agua (4:1:5).<sup>20</sup>

**Volumen de inyección:** 20 µl.

**Revelador:** luz ultravioleta (CAMAG 366 – 254 nm), amoniaco y cloruro férrico.

### **3.4.2. Prueba espectral**

#### **Preparación de las soluciones estándares**

Solución estándar es ácido tánico en metanol a concentración de 0,2 mg/ml.

#### **Preparación de solución de la muestra**

Los extractos de cada una de las fracciones se disolvieron en metanol en una fiola de 50 ml.

**Sistema espectrofotométrico:** Equipo Génesis 6

**Celda:** Cuarzo de 1 cm.

**Longitud de onda:** 200 nm a 500 nm.

**Blanco:** Metanol.

Se registraron los espectros e identificaron los máximos picos de absorción en comparación con el espectro del estándar.

### **3.5. Determinación de la actividad antioxidante**

#### **3.5.1. Método de la actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)**

##### **Fundamento**

Uno de los métodos para determinar la capacidad antioxidante es aquel que emplea al radical DPPH, el cual por su estabilidad es destruido solamente por antioxidantes, de tal manera que el mejor compuesto destructor del DPPH será el mejor antioxidante.<sup>6</sup>

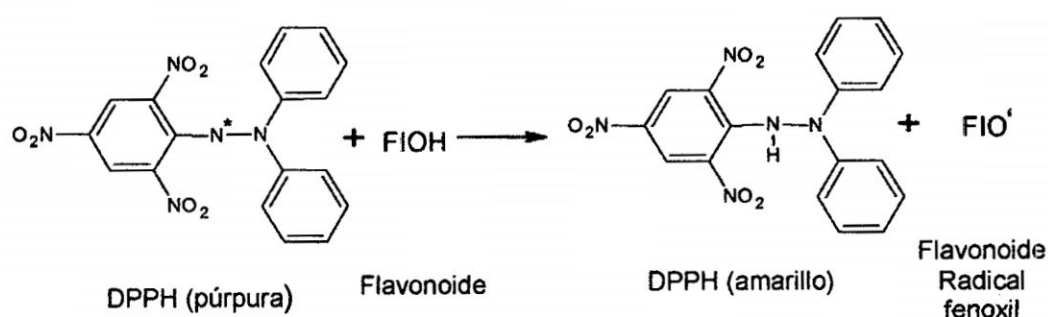
La técnica empleada de DPPH consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul - violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radical libres.<sup>34</sup>

Existen muchos métodos para evaluar la actividad antioxidante en fuentes vegetales, como plantas medicinales y alimentos. Uno de ellos es el método de

neutralización del radical libre 2,2 – difenil picrilhidracil (DPPH). El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa.<sup>16</sup>

La solución de reactivo DPPH es de color violeta y presenta una absorbancia a 517 nm. La reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proviene de un donador (compuesto puro o extracto) por el radical libre DPPH, desarrollando un cambio de color violeta a amarillo a medida que disminuye la concentración de radicales libres; el que se lee en el espectrofotómetro después de 20 a treinta minutos de reacción.<sup>17,6</sup>

La reacción entre la sustancia a evaluar y el DPPH se observa en la siguiente figura 6.



**Figura 6.** Reacción de reducción del DPPH.

### Procedimiento

- Una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l.
- Una solución metanólica de compuestos fenólicos de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" de 300 µg /ml (sol. A).
- Un blanco con metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- Un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (sol. A) y 1,5 ml de metanol.
- Un patrón de referencia (estándar) con 1,5 ml de DPPH y 0,75 ml de agua destilada.
- La muestra con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una concentración final de 100 µg/ml, se dejó a temperatura ambiente por cinco minutos y se realizó la lectura a 517 nm en el espectrofotómetro.

- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 (sol. B) para obtener una concentración final de 50 µg/ml y luego en una proporción de 1: 9 (sol. C) para obtener una concentración final de 10 µg/ml.
- Con las soluciones B y C se procedió igual que en el caso anterior.

Cálculos:

$$\%AA = \left[ \frac{Ac - (Am - Ab)}{Ac} \right] \times 100$$

Donde:

Ac: Absorbancia del control DPPH

Am: Absorbancia de la muestra

Ab: Absorbancia del blanco de la muestra

AA: Actividad Antioxidante

### 3.6. Bioensayos de toxicidad en *Artemia salina*

#### 3.6.1. Fundamento

Se basa en la exposición de este crustáceo que se encuentra en el agua de mar artificial, con soluciones en µg/ml del extracto hidroalcohólico obtenido, todo ello para determinar el número de crustáceos vivos por cada dilución en 24 y 48 horas de exposición.

#### 3.6.2. Protocolo experimental

Se tomó como referencia el método propuesto por CYTED (1995) el cual se realizó en varias jornadas.

**Día: 1**

- Separe las cubetas de plástico o vidrio en dos compartimientos uno totalmente oscuro y el otro con luz artificial permanente.
- Se preparó el agua de mar (3.8 g de sal de mar comercial) en 100 ml de agua destilada y que luego se procede a filtrar.
- Posteriormente se colocó 150 huevos de *Artemia salina* en una cubeta preparada (zona oscura) conteniendo 1000 ml de agua de mar artificial.

**Día: 2**

- En un matraz Erlenmeyer que contiene agua de mar artificial se transfirió la mayor cantidad de nauplios vivos.

**Día: 3**

- Se disolvió 20 mg de compuestos fenólicos de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" en 2 ml de agua destilada. A partir de esta solución se prepararon tres disoluciones de 1000, 100 y 10 ppm (ppm=1mg/l) para ello.
  - Se transfirió 500 µl de la solución en tres tubos
  - Se transfirió 50 µl de la solución en tres tubos
  - Se transfirió 5 µl de la solución en tres tubos
- A cada uno de los tubos de ensayo que contenía 500 µl de la solución se agregó 10 nauplios del crustáceo y luego se completó con 4500 µl de agua de mar artificial fresca para completar un volumen total de 5 ml.
- A cada uno de los tres tubos de ensayo que contenían 5 µl de la solución se le agregó 10 nauplios del crustáceo y luego se completó 4995 µl de agua de mar artificial fresca para completar un volumen total de 5 ml.
- Para el grupo control se usó nueve tubos de ensayo (tres tubos para cada concentración) a los que se añadió 5 ml de agua de mar artificial fresca y 10 nauplios de *Artemia salina*.

**Tabla 3.** Clasificación de toxicidad según CYTED<sup>31, 40</sup>

I	Extremadamente tóxico	1 - 10	µg/ ml
II	Altamente tóxico	10 - 100	µg/ ml
III	Moderadamente tóxico	100 - 500	µg/ ml
IV	Ligeramente tóxico	500 - 1000	µg/ ml
V	Prácticamente no tóxico	1000 - 1500	µg/ ml
VI	Relativamente inocuo	> 1500	µg/ ml

### **3.7. Análisis de datos**

Los resultados de la actividad antioxidante fueron organizados en tablas y una matriz para calcular la media y la desviación estándar. La significancia estadística fue determinado mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ).

Para encontrar la toxicidad ( $CL_{50}$ ) se utilizó el programa Probits.



#### **IV. RESULTADOS**

**Tabla 4.** Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora". Laboratorio de farmacognosia de farmacia y bioquímica, junio de 2015

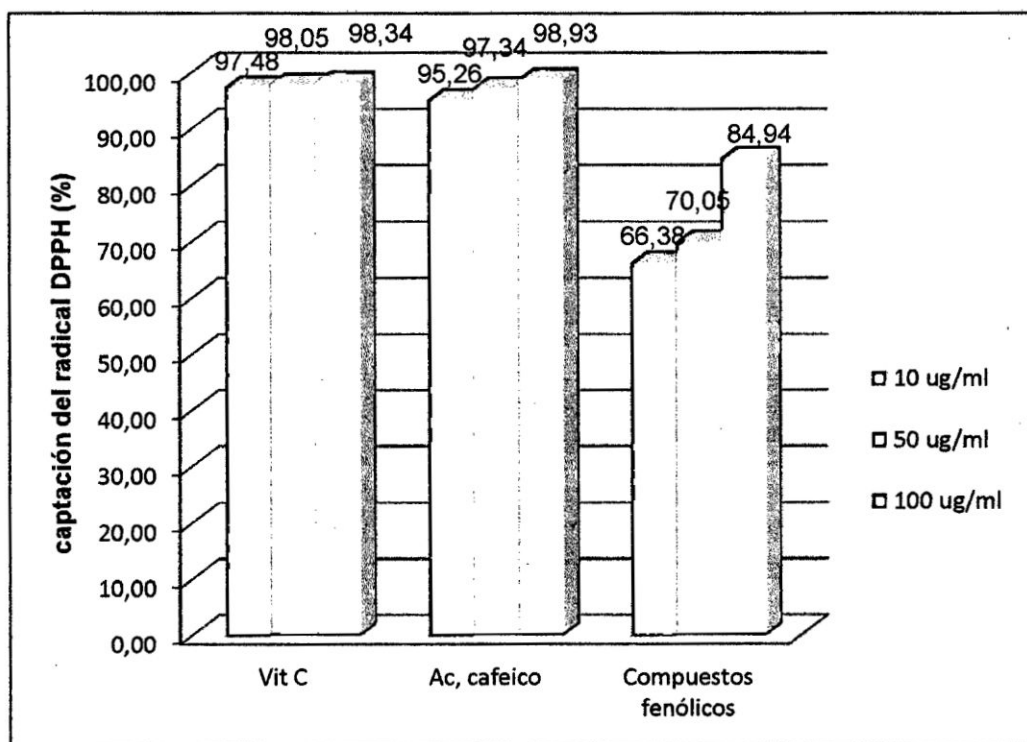
Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff	++	Precipitado naranja
	Mayer	+	Precipitado naranja
	Wagner	+++	Precipitado rojo-vino
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman – Burchard	++	Coloración verde oscuro
	Carbonato de sodio + luz UV	++	Coloración verde carmelita a luz UV
Resinas	H <sub>2</sub> O destilada	+	Precipitado
Azucares reductores	Fehling	+	Precipitado rojo - vino
Saponinas	Espuma	++	Formación de espuma
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico al 1%	+	Coloración rojo-vino
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración rojo-vino
Antocianinas	Rvo. Antocianinas	+++	Coloración rojo - vino

**Leyenda:**

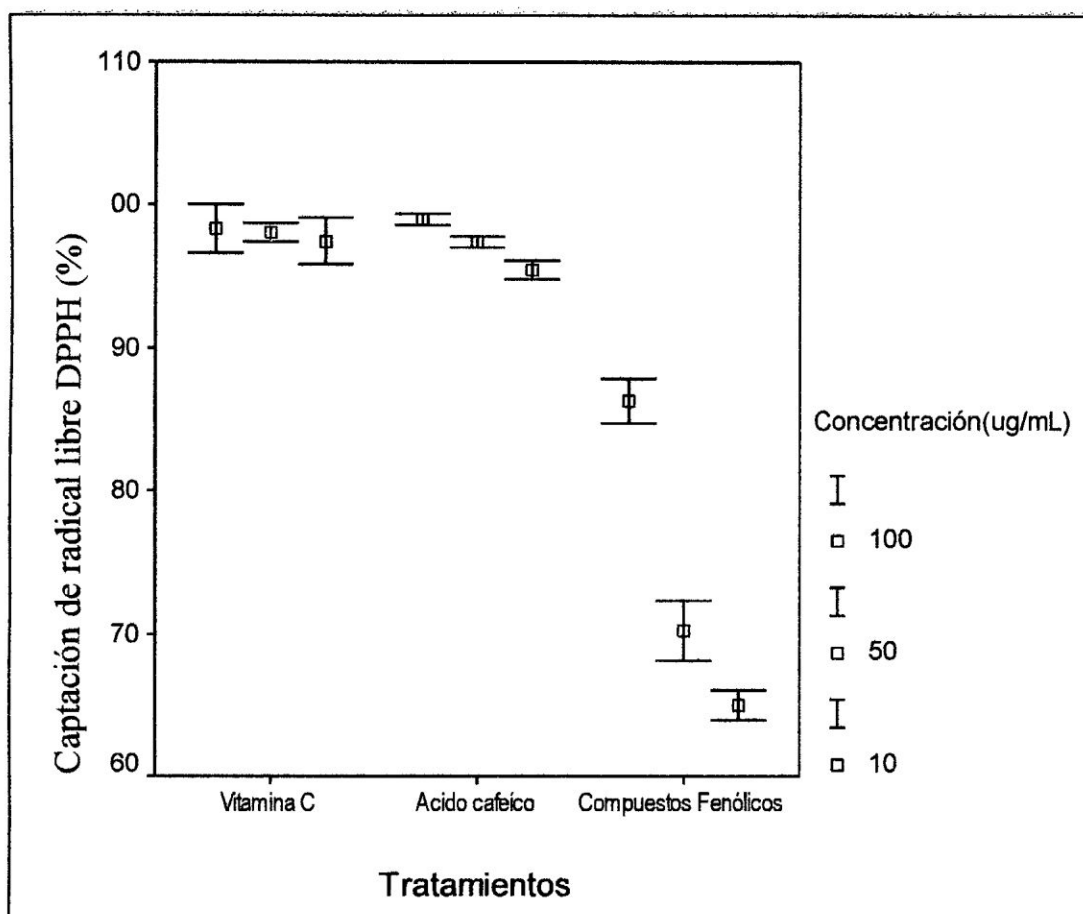
- (-) : Ausente
- (+) : Poco
- (++) : Moderado
- (+++): Abundante

**Tabla 5.** Coloración y fluorescencia de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora" con los estándares. Laboratorios de toxicología de farmacia y bioquímica, julio de 2015

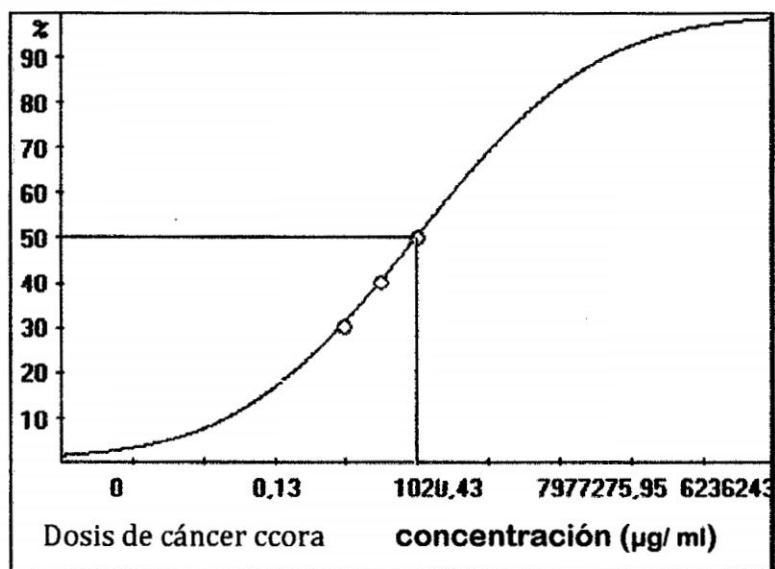
Compuestos	Visualización visible	Cloruro férrico al 1%	Fluorescencia al ultravioleta	
			Sin NH <sub>3</sub>	Con NH <sub>3</sub>
Cáncer ccora	Mancha marrón	Marrón oscuro	Púrpura - mancha rojo vino	Fluorescencia púrpura - rojo
Rutina	Mancha marrón	Marrón oscuro	Púrpura mar bajo	Amarrillo bajo
Quercetina	Mancha marrón bajo	Mancha turquesa	Amarrillo bajo	Se intensifica la fluorescencia.
Acido tánico	Línea marrón	Azul oscuro	Línea oscura	Se intensifica la fluorescencia.
Ac. Salicílico	Incoloro	violeta	Verde bajo fluorescente	Intensifica la fluorescencia
Ac. Ascórbico	Incoloro	Mancha verde	Verde fluorescente	Se intensifica la fluorescencia.



**Figura 7.** Porcentaje de captación de radicales libres DPPH por parte de compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". En comparación de los estándares vitamina C y ácido caféico. Laboratorio de toxicología junio de 2015



**Figura 8.** Porcentaje de actividad secuestradora de radical libre de DPPH por efecto de los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", en comparación con vitamina C y ácido caféico. Laboratorio de toxicología junio de 2015



**Figura 9.** Representación gráfica de la prueba de probit para determinación de la Concentración Letal media ( $CL_{50}$ ) de los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". Laboratorio de toxicología junio de 2015.

## V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que el extracto o compuestos fenólicos obtenidos de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", presentan actividad antioxidante, los cuales son los responsables de las actividades farmacológicas.

Para la extracción de los diversos metabolitos se realizó extracción líquido - líquido donde se utilizó diferentes solventes: el éter de petróleo con la finalidad de eliminar las grasas, ceras, pigmento y otros metabolitos, la segunda extracción con cloroformo que tiene como finalidad extraer a los terpenos y sesquiterpenos, la tercera extracción con acetato de etilo que tiene la finalidad de extraer compuestos fenólicos.<sup>36</sup>

En las Tabla 4, 5 y Anexo 7, el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico y las fracciones aisladas es desarrollado según la técnica de Lock de Ugaz<sup>25</sup> y Miranda<sup>36</sup> por el cual, reportan la presencia de taninos y/o fenoles, flavonoides, lactonas y/o cumarinas, saponinas, triterpenos y/o esteroides, catequinas, antocianinas, azúcares reductores y alcaloides; estos metabolitos están presentes en las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" siguiendo los procedimientos indicados por Lock de Ugaz<sup>25</sup> y Miranda.<sup>36</sup>

El ensayo cualitativo para detectar los taninos son cloruro férrico al 1 por ciento: para taninos hidrolizables es precipitado rojo - vino. Compuestos fenólicos en general y taninos condensados es precipitado verde y con la solución de gelatina (clara de huevo) forma precipitado característico.<sup>25, 36</sup> Por lo tanto, el extracto etanólico de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" presentan compuestos fenólicos en general (Tabla 4 y 5, Anexo 7).

Los taninos están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructuras polifenólicos, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, celulosas, gelatinas). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus propiedades principales: curtir la piel y su poder astringente.<sup>35</sup>

Mediante ensayos cromatográficos preliminares, se confirmó la presencia de compuestos fenólicos observándose manchas con luz ultravioleta (CAMAG) 210 nm y así mismo revelándose con  $\text{FeCl}_3$  al 1 por ciento para estos compuestos. Los compuestos fenólicos fueron detectados en el extracto etanólico. Las manchas caracterizadas fueron: Azul – turquesa y la clorofila, por la fluorescencia roja característica.<sup>25, 36</sup> (Anexo 10 y 12).

Según Lock de Ugaz<sup>25</sup> la detección de los flavonoides por cromatografía de papel y capa delgada pueden hacerse por el color que desarrollan en la cámara de luz ultravioleta, apareciendo como manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otra, las cuales se intensifican o cambian de fluorescencia luego de su exposición a vapores de amoníaco, cual se pudo apreciar en la parte experimental (Tabla 5 y Anexo 10, 12).<sup>25</sup>

Los flavonoides resultantes en la fracción de acetato de etilo fueron aislados y purificados mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa, las manchas caracterizadas fueron recuperados del silicagel con metanol, lográndose aislar dos fracciones.<sup>13</sup> Por la concentración mínima de los compuestos fenólicos no se muestran curvas bien definidas, las estructuras químicas de los compuestos fenólicos aisladas por la cromatografía fueron elucidadas mediante correlaciones químicas con los datos obtenidos por espectro ultravioleta en metanol y por comparación con espectros dados en la literatura por Mabry.<sup>37</sup> sugiriéndose como una estructura de los ácidos fenólicos (Anexo 17).

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste en dos máximos de absorción en los rangos de 240 – 285 nm (banda II, BII) y 300 – 550 nm (banda I, BI). Podría indicarse como característica que en dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavonas la banda I es de baja intensidad (más baja de la banda II).<sup>25</sup>

Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoilo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático a (funcionalidad benzoilo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas se muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-OH-sustituídos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm.<sup>11-39</sup> Espectrofotométricamente observamos que cada extracto posee diferente longitud de onda, en la cromatografía realizada se



encontró dos coloraciones con las cuales se hizo el respectivo análisis y se extrajo la curva espectral y se encontró dos coloraciones, una coloración fluorescencia Azul – Turquesa y la otra, fluorescencia roja. La primera fluorescencia Azul – Turquesa muestra longitud de onda: 210 y 275 nm y la segunda coloración fluorescencia roja muestran longitud de onda: 205 nm, lo cual se puede atribuir en ambos casos que se trata de ácidos fenólicos por la semejanza en algunas características como la coloración en luz UV (C/S NH<sub>3</sub>) y grafica espectral (Anexo 17).

Para la detección de la actividad antioxidante fue necesario elegir el método que nos permita la rapidez, la precisión, la exactitud, por ello se eligió el método de neutralización del radical libre DPPH, el cual permite estimar la capacidad de captación de radicales libres por antioxidantes fenólicos principalmente.<sup>1</sup>

Existen una variedad de métodos para evaluar propiedades antioxidantes el cual están agrupados como: sustrato diana, este es uno de los primeros métodos para medir la propiedad antioxidante que se basaron a la protección frente a la oxidación de lípidos, solo detectan estados avanzados de daño oxidativo, usando como dianas a proteínas y por su sensibilidad permite evaluar los pasos iniciales del proceso oxidativo; el de especies reactivas son sustancias ajenas a los organismos como el DPPH y el ABTS, y estos actúan a la quelación de los radicales libres, son más importantes a nivel fisiológico por que se evalúa a los hidroxilos o peroxilos; Otro método es la polaridad de interferencias, la produce interacciones con los radicales libres con los compuestos antioxidantes la deficiencia de este método es si existe diferencias entre la concentraciones molares, estos métodos muestran mayor sensibilidad y especificidad; existen otros métodos de identificación y captación de radicales, sin embargo los mencionados son los más conocidos.<sup>39</sup>

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el método de captación del radical libre 1,1- difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), donde se observó que los compuestos fenólicos presentes en el extracto de acetato de etilo mostraron actividad antioxidante dependiente de la concentración, pero mostraron algunas diferencias cuando se compara con la vitamina C y el ácido caféico tal como se muestra en sus respectivas pruebas estadísticas (gráfico 7, 8 y Anexo 8, 9, 13 y 14), el análisis de varianza muestra que no existe diferencia significativa entre los compuestos fenólicos de extracto aislado de la planta estudiada con los

estándares expuestos, es decir tiene una actividad antioxidante comparativamente similar a la vitamina C y ácido caféico (Anexo 14).

Se usó varios compuestos puros que sirvieron como estándares como el ácido gálico que juega un papel muy importante en la constitución de los taninos hidrolizables.<sup>5</sup> la naturaleza química de los compuestos polifenoles es muy heterogénea y engloba un amplio surtido de disposiciones estructurales libre a conjugadas (estructuras polifenólicas unidas a sustancias de distinta naturaleza). Así, los flavonoides son compuestos polifenólicos que reflejan un gran número de estas estructuras. Los ácidos fenólicos constituyen un ejemplo representativo de estructuras que están asociadas con otras sustancias no necesariamente polifenoles, en la naturaleza.<sup>14</sup> los azúcares reductores dan un precipitado de color rojo ladrillo al realizar pruebas de Fehling. También los azúcares reductores son considerados antioxidantes.<sup>12</sup>

Estudios recientes demostraron que ciertos productos de las plantas como flavonoides y taninos son sustancias antioxidantes naturales que tienen normalmente una fracción fenólica en su estructura molecular lo que atribuye un gran poder destructor de radicales libres.<sup>39</sup>

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular, la cual influye en la facilidad con la que un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático puede ser donado a un radical libre y en la habilidad del fenol de soportar un electrón no apareado. La estructura O-dihidroxi en el anillo B se considera determinante en la neutralización radical y/o el potencial oxidativo.<sup>38</sup>

Es así que la fracción de acetato de etilo de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" tuvo una actividad antioxidante de: 84,94%; 70,05%; 66,38% respectivamente a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, esto debido a que los diferentes solventes utilizados arrastraron diferentes metabolitos que presentan actividad antioxidante, los más polares como etanol para glicósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas.<sup>23</sup>

Es así que los solventes utilizados para su extracción son seleccionados de acuerdo con la polaridad de los flavonoides u otras sustancias como los ácidos fenólicos. Los glicósidos y las geninas más polares, tales como flavonas hidroxiladas, flavonoles, auronas y chalconas son generalmente aislados a partir del material vegetal por extracción con acetona, alcohol, agua o mezcla de éstos.

Las geninas altamente metiladas (menos polares) son usualmente extraídas con solventes tales como cloroformo, éter o acetato de etilo.<sup>25</sup>

Así como la *satureja brevicalex* Epl. "wayra muña" contiene propiedad antioxidante en un 96,40%; 94,79%; 61,88% respectivamente a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.<sup>7</sup> y la *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" es antioxidante como muestra en sus resultados 92,24%; 84,41%; 65,09%. Respectivamente a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.<sup>8</sup> Por ello, con las diferencias observadas muestran que la *satureja brevicalex* Epl. "wayra muña" tienen ligeramente más actividad antioxidante que la *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". Sin embargo, estadísticamente son similares por tanto las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", también tiene actividad antioxidante significativo. En los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a *Artemia Salina*. (Desarrollada en 1982 por Meyer y Col). El procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *Artemia salina*, para determinar valores de Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>), y/o Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) expresada en µg/ml. Sin embargo, los valores obtenidos de CL<sub>50</sub>, no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular; son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas.<sup>31</sup>

La toxicidad *in vivo* de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos.

Este bioensayo es aplicable a compuestos con estructuras y modos de actividad diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, que sea usado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos y compuestos de tipo morfínico entre otros.<sup>31</sup>

Por tanto el extracto de compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", se demostró la actividad citotóxica, la cual muestra su Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) en el bioensayo con *Artemia salina* muestra CL<sub>50</sub> de 1020,13 µg/ ml y según el CYTED menciona que es prácticamente no tóxico. (Tabla 3)

## VI. CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". presentan actividad antioxidante.
2. Los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" contienen: alcaloides, triterpenos y/o esteroides, catequinas, resinas, azúcares reductores saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas.
3. Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". presentan actividad antioxidante semejantes a el ácido ascórbico (vitamina C) y el ácido caféico ( $p < 0,05$ ).
4. La  $CL_{50}$  de los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" fue 1020,43  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . y se considera prácticamente no tóxico.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Proseguir con los estudios de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" puesto que demostró tener actividad antioxidante.
2. Aislar los compuestos fenólicos responsables de dicha actividad, por métodos más específicos como por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), resonancia magnética nuclear de protones RMN-H<sup>1</sup> y resonancia magnética nuclear de carbono 13 RMN-C<sup>13</sup>.
3. Realizar estudios de toxicidad en ratas albinas para demostrar y comprobar la Dosis Letal (DL) de los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora".
4. Realizar estudios de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" en ensayos con infusión y cocimiento.

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Castillo P. Estudio químico y de actividad antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.). [Tesis de maestría]. Lima. Universidad PUCP; 2004.
2. Eunok Choe y David B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods, New York, N. Y. [Artículo en internet]. Publicado el 16 de setiembre de 2009. [Acceso 25 de junio 2014]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x/full>.
3. Criado C, Moya M. Vitaminas y antioxidantes. Ed. Sanidad y Ediciones. S.L. Barcelona. Actuaciones el médico; 2009.
4. Ugartondo V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo en modelos celulares. [Tesis pregrado]. España. Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia; 2009.
5. Villar M. Farmacognosia general: Síntesis. España; 1999.
6. Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smilax sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de maestría]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
7. León L. Actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epl. "wayra muña". [Tesis pregrado] Ayacucho Universidad San Cristóbal de Huamanga – 2012.
8. López N. Actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" [Tesis pregrado] Ayacucho Universidad San Cristóbal de Huamanga - 2013
9. Kvisit P, y Laurence S, Revision of *Pearcea* (Gesneriaceae). SMITHSONIAN INSTITUTION PRESS. Washington, D.C. 1996. . [libro virtual]. [Acceso 13 de junio 2013]. Disponible en: [http://www.sil.si.edu/smithsoniancontributions/botany/pdf\\_hi/sctb-0084.pdf](http://www.sil.si.edu/smithsoniancontributions/botany/pdf_hi/sctb-0084.pdf).
10. Byrne R. & B D. Morley. 1976. Hybridisation studies in *Columnea* L. (Gesneriaceae). 2. The *C. querceti* complex. Bot. J. Linn. Soc. 72: 199-210. [Acceso 20 de junio 2013]. Disponible en: <http://sura.ots.ac.cr/local/florula3/families/GESNERIACEAE.pdf>.
11. Mitjavila M, Lopez D, Sáiz M. Los radicales libres y su implicación en procesos fisiológicos y patológicos. España 2001. [revista científica]. [Acceso 20 de octubre 2014]. [http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1837/06.VUC\\_BIBLIOGRAFIA.pdf?sequence=7](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1837/06.VUC_BIBLIOGRAFIA.pdf?sequence=7).
12. López A, Fernando C, Lazarova Z, Bañuelos R, Sánchez S. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. Anacem. [revista en internet] recibido el 13 de enero de 2012, Aceptado el 15 de marzo de 2012. [acceso 14 de febrero del 2013]; 6 (1). Disponible en: <http://revista.anacem.cl/web/wp-content/uploads/2012/04/Antioxidantes-un-paradigma-en-el-tratamiento-de-enfermedades.pdf>
13. Mayor R. 2010. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. Inst. Med. Trop. [revista en internet] 2010. [acceso 11 de mayo del 2013]; 5 (2): 23-29. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>.
14. Muñoz A, Ramos D, Alvarado C, Castañeda B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Soc Quím [revista en internet] 2007 Julio. [acceso 20 de febrero del 2013]; 73(3): 142-149. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v73n3/a03v73n3.pdf>.



15. Enciso E, Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides extraídos de las hojas de *Jungia rugosa* Less "matico de puna" [Tesis Doctoral]. Lima. UNMSM; 2010.
16. Chavez R; y col. Antioxidantes de origen vegetal. [revista química]. Lima - Perú.
17. Nemadis N y tsimidov M. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compound using 1, 1 – diphenyl – 2 –picrylhydrazyl (DPPH) Tests. [revista en internet] [Acceso 15 de junio 2015]. disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.465.8118&rep=rep1&type=pdf>.
18. López V, Akerreta S, Cavero R, Calvo I. Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. Fitoterapia [revista en internet] 2007. [acceso 03 de agosto del 2013]; 7 (1): 43-47. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RF7-1-Navarra.pdf>.
19. López A, Femando C, Lazarova Z, Bañuelos R, Sánchez S. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. Anacem. [revista en internet] recibido el 13 de enero de 2012, Aceptado el 15 de marzo de 2012. [acceso 14 de febrero del 2013]; 6 (1). Disponible en: <http://revista.anacem.cl/web/wp-content/uploads/2012/04/Antioxidantes-un-paradigma-en-el-tratamiento-de-enfermedades.pdf>.
20. Maestri M, Nepote V, Lamarque A, Zygadlo J. Productos naturales como antioxidantes. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal - CONICET – UNC. Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina; 2006. [Acceso 13 de abril 2015]. Disponible en: [http://www.tmrres.com/ebook/uploads/imperato/T\\_1231133728Imperato5.pdf](http://www.tmrres.com/ebook/uploads/imperato/T_1231133728Imperato5.pdf).
21. Sikora E, Cieslik E, Topolska K. Las fuentes de antioxidantes naturales. Nutrición de la Universidad de Agricultura de Cracovia. Polonia. Acta Sci.Pol. Desarrol. Aliment [revista en internet] 2008. [acceso 24 de febrero del 2013]; 7 (1), 5-17. Disponible en: [http://www.food.actapol.net/pub/1\\_1\\_2008.pdf](http://www.food.actapol.net/pub/1_1_2008.pdf).
22. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Med Milit [revista en internet]. 2002. [acceso 19 de febrero del 2013]; 31(2):126-133. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v31n2/mil09202.pdf>.
23. Quintanar M, Calderón J. Capacidad antioxidante total: Bases y aplicaciones. Educación Bioquímica REB [revista en internet] 2009. [acceso 20 Febrero del 2013]; 28(3):89-101. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49016098004>.
24. Toma J. Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja bredicalyx* "Wayra muña" sobre el cerebro de ratas Albinas Holtzman recién nacidas en un modelo de hipoxia isquémica. [Tesis pregrado]. Ayacucho. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2008.
25. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2ª Ed. Lima. Fondo Editorial; 1994.
26. Muñoz A, Ramos F. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. Horizonte Médico [revista en internet] Junio 2007. [acceso 10 de febrero del 2013]; 7(1): 23-31. Disponible en: [http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2007\\_I/Art3\\_Vol7\\_N1.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2007_I/Art3_Vol7_N1.pdf).
27. Kuklinski C. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 2000.

28. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Invest Biomed [revista en internet] 2003. [acceso 04 de mayo del 2013]; 22(1) 48-57. Disponible en:  
[http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22\\_1\\_03/ibi07103.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.pdf).
29. Bruneton J. Plantas Medicinales. Fitoquímica y Farmacognosia. España: Acribia Zaragoza. S. A. España. 2001.
30. Boluda C, Duque, B, Aragon, Z,. lignanos (I) estructura y funciones de la planta. Instituto universitario de bioinorganica Antonio Gonzales Laguna - Tenerife [revista en internet] 2005 [acceso 13 de octubre del 2015]; 52 (1): Disponible en:  
<http://static1.1.sqspcdn.com/static/f/1381323/18832419/1340082460950/lignanos+I.pdf?token=9kWrgURpwG50osabt3TLw54HH70%3D>
31. Sánchez L, Neira A. Letalidad en *Artemia salina* a las fracciones del extracto etanolico de *Psidium guajava* L (guayaba) y *Psidium guineense* Sw, (choba) [revista en internet] 2005. [acceso 15 de febrero del 2014]; 40: Disponible en:  
<http://www.revistasjdc.com/main/index.php/ccient/article/download/76/72.pdf>.
32. Cortés J. Actividad biológicas de extractos de plantas usadas para tratamiento del cáncer e infecciones terapéuticas [Tesis pregrado], Hidalgo. Universidad Autónoma de Hidalgo, Área académica de biología, Noviembre 2005 [Acceso 15 de junio 2015]. disponible en:  
<http://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/licenciatura/documentos/Actividad%20biologica%20de%200extractos.pdf>.
33. Rojas F. Determinación del efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Baccharis tricuneata* "yana taya". [Tesis pregrado]. Ayacucho. UNSCH; 2009.
34. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico [revista en internet] 2008 Julio. [acceso 08 de agosto del 2013]; 8(1). Disponible en:  
[http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008\\_I/Art4\\_Vol8\\_N1.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_I/Art4_Vol8_N1.pdf).
35. Miranda M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana. Cuba; 2002.
36. Aguilar E. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja brevicalix* Epl. "Wayra Muña". Informe de investigación en desarrollo de potenciales económicas y bionegocios. Área de recursos biológicos y terapéuticos. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas. Ayacucho. UNSCH; 2010.
37. Mabry T, Markham K, Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York.Heidelberg. Berlin; 1970.
38. Calderón P. Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento. [Tesis pregrado]. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007.
39. Bafna A, Mishra S. Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchoides* Gaertn. Ars Pharm [revista en internet] 2005. [acceso 15 marzo del 2013]; 46 (2): 125-138. Disponible en:  
<http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/316.pdf>.
40. Pinzón R, Sánchez C. Manual de técnicas de investigación (1995) CYTED p.p 63-70.



## **ANEXOS**

## Anexo 1

Certificado de la clasificación taxonómica de *Pearcea hypocyrthiflora* (Hook. f.)  
Regel "cáncer ccora".



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

**C E R T I F I C A**

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. Alcides Arón, OCHOA VARGAS  
ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.  
Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación  
de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	SCROPHULARIALES
FAMILIA	:	GESNERIACEAE
GENERO	:	Pearcea
ESPECIE	:	<i>Pearcea hypocyrthiflora</i> (Hook.f.) Regel..
N.V.	:	"cáncer ccora"

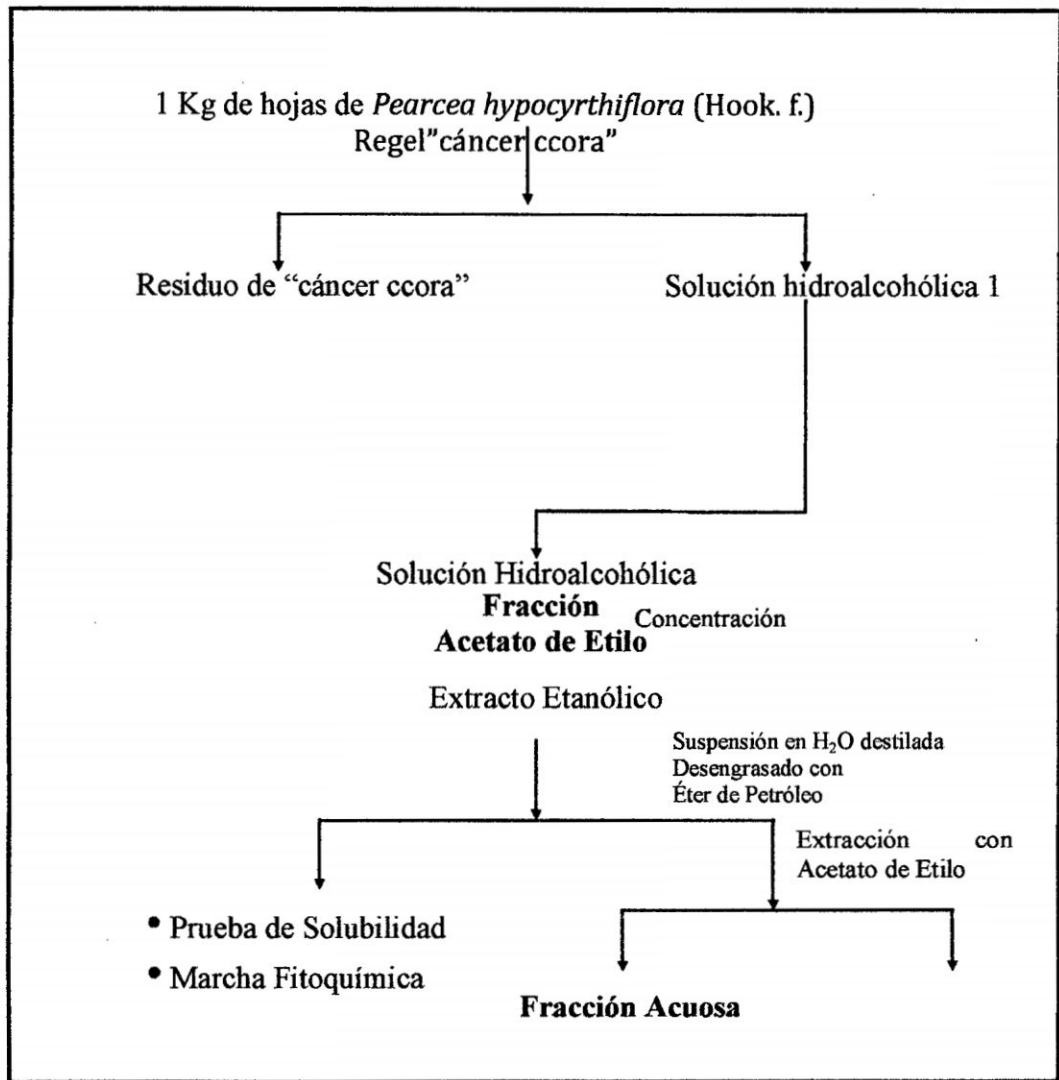
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada  
para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 27 de Agosto del 2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Bija. Laura Pucastur Medina  
JEFE

## Anexo 2

Flujograma de obtención del extracto etanólico.



### Anexo 3

Tamizaje fitoquímico según el modelo de Miranda (2002).

Metabolitos secundarios	Ensayos con reactivos	Resultados
		Observación
Alcaloides	Dragendorff	Formación de precipitado
	Mayer	blanco en todas las reacciones.
	Wagner	
Lactonas y cumarinas	Baljet	Precipitado o coloración blanco
Flavonoides	Shinoda	Coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo-vino en la fase amílca.
Catequinas	Catequinas	Coloración verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo.
Saponinas	Espuma	Formación de espuma en la superficie.
Azúcares reductoras	Fehling	Formación de precipitado rojo-vino.
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	Coloración rojo - vino.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Coloración azul violáceo.
Cardenólidos	Kedde	Coloración rojo vino.
Resinas	Resinas	Formación de precipitado

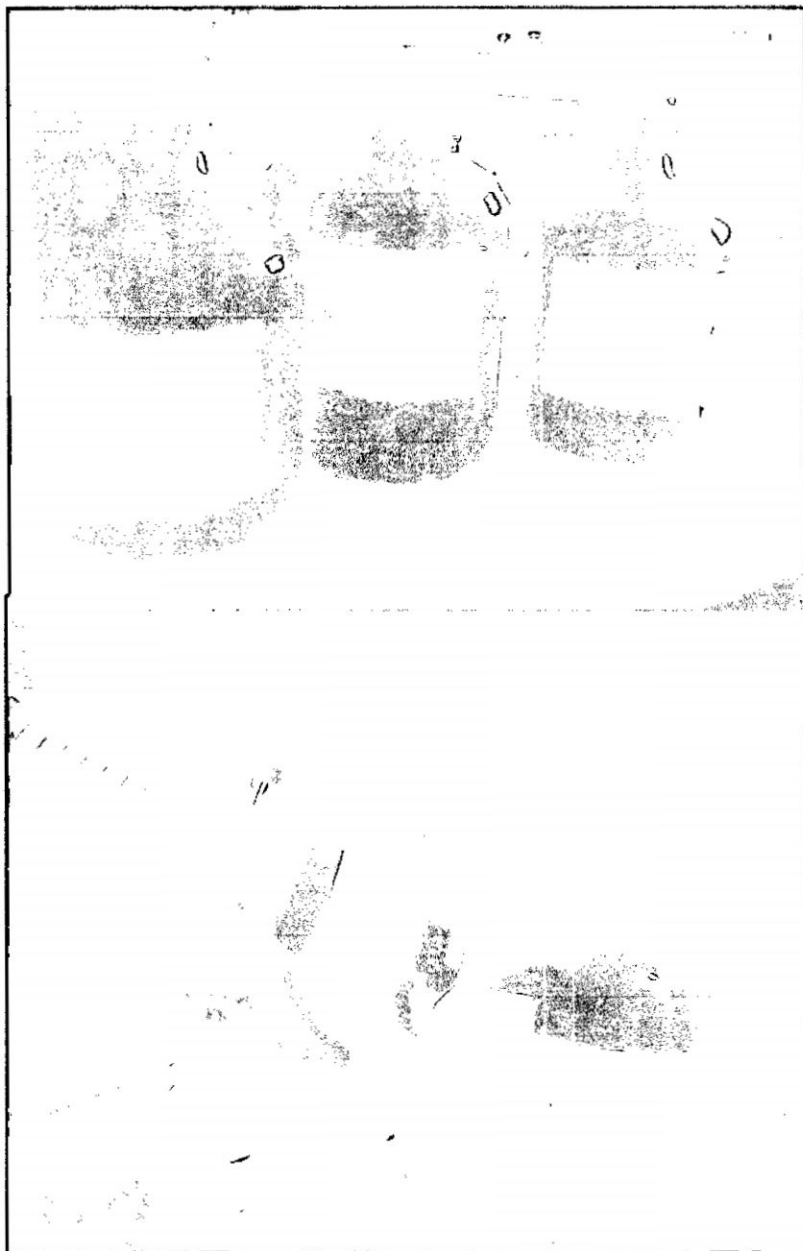
#### Anexo 4

Recolección de la muestra. Kimbiri. Marzo de 2015.



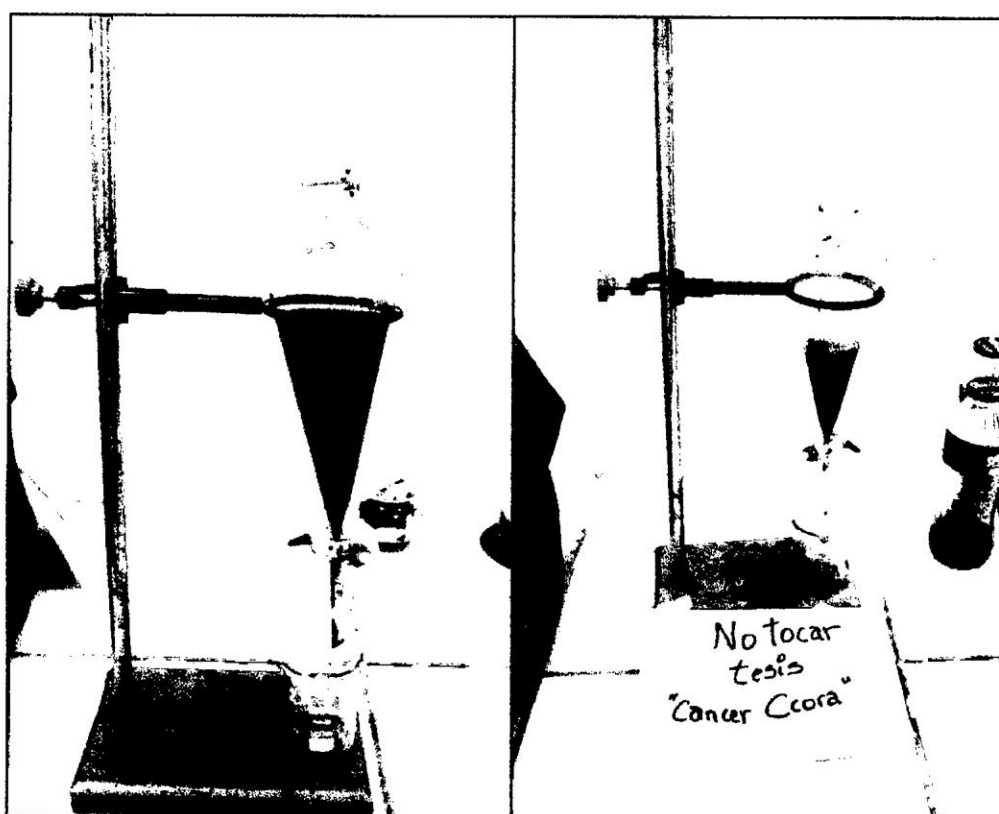
## Anexo 5

Maceración (extracción hidroalcohólica de metabólicos) y concentración del extracto hidroalcohólico en el rotavapor. Laboratorios de farmacognosia junio de 2015



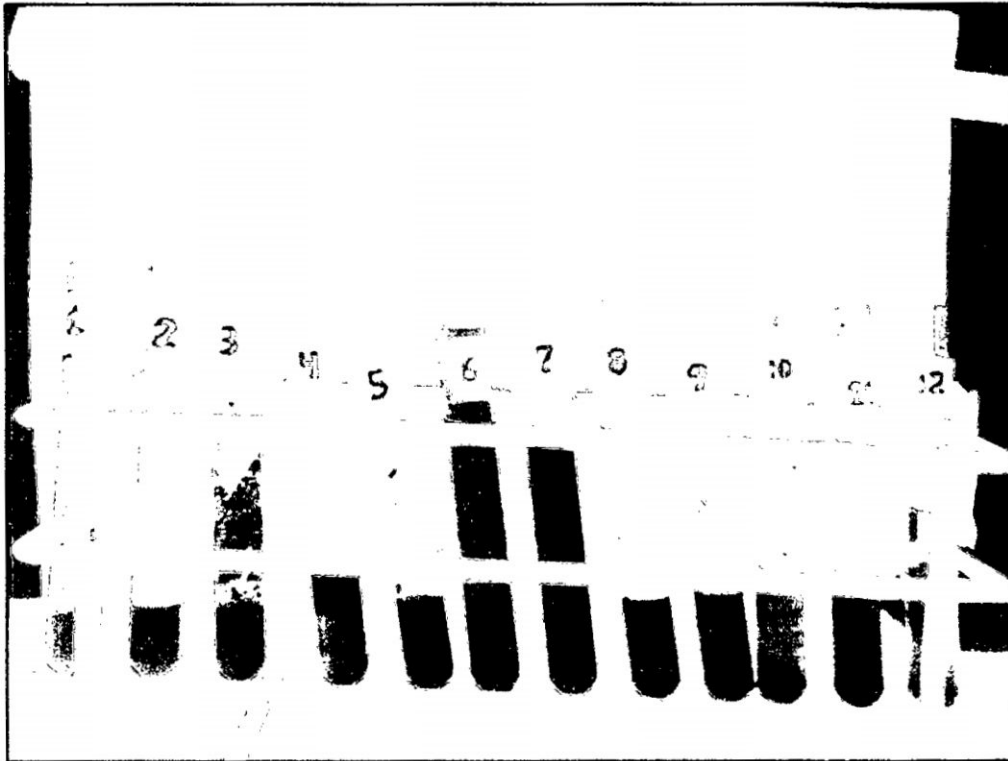
Anexo 6

Extracción líquido – líquido del extracto hidroalcohólico, y desengrasado con éter de petróleo. Laboratorio de toxicología.



## Anexo 7

Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico. Dado en los ensayos  
Laboratorio de farmacognosia



Leyenda:

- (1) Dragendorff,
- (2) Mayer,
- (3) Wagner,
- (4) Baljet,
- (5) Lieberman – Burchard,
- (6) Resinas,
- (7) Fehling,
- (8) Espuma,
- (9) Cloruro férrico al 1%,
- (10) Shinoda,
- (11) Kedde,
- (12) Antocianinas.



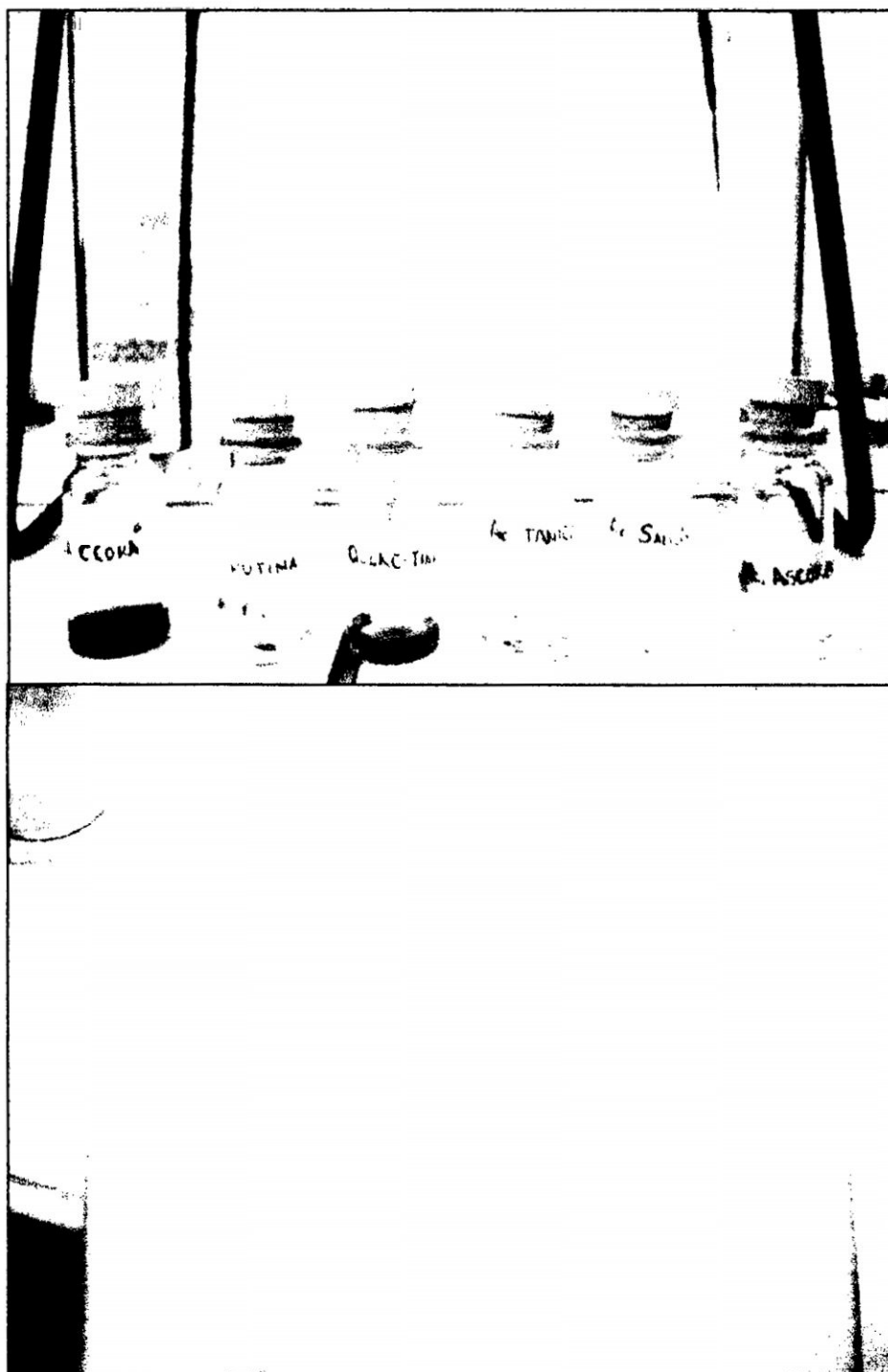
## Anexo 8

Tubos de ensayo con la prueba de captación de radical libre DPPH de los compuestos fenólicos aislados.



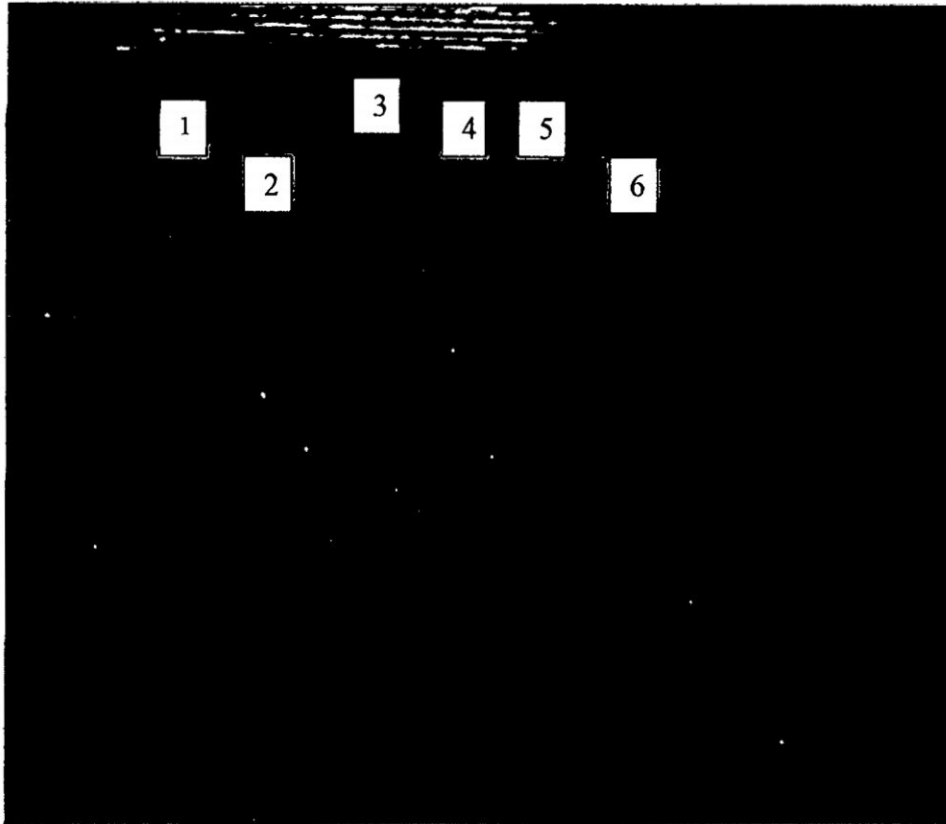
### Anexo 9

Sembrado, corrido y desarrollo de la placa cromatografía (Cromatografía en Capa Fina). Con sus respectivos estándares Laboratorio de toxicología agosto de 2015



## Anexo 10

Características cromatográficas ante luz ultravioleta con  $\text{NH}_3$  y estándares: (



Leyenda:

- 1) Compuestos fenólicos de "cáncer ccora",
- (2) Rutina,
- (3) Quercetina,
- (4) Ácido tánico,
- (5) Ácido salicílico.
- (6) ácido ascórbico (vitamina C).

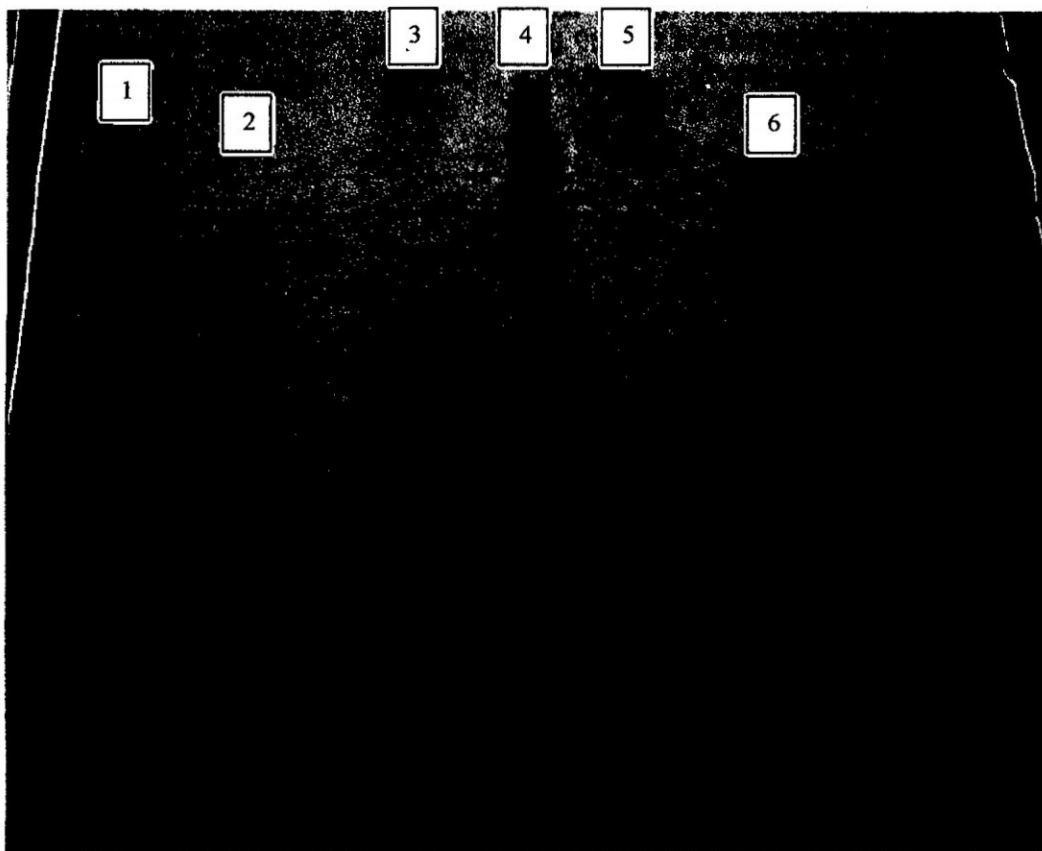
## Anexo 11

Coloración y fluorescencia de los estándares revelados con cloruro férrico y luz ultravioleta. Laboratorio de toxicología junio de 2015

Estándares	Visualización visible	Cloruro férrico al 1%	Fluorescencia al ultravioleta	
			Sin NH <sub>3</sub>	Con NH <sub>3</sub>
Rutina	Amarillo	Negro	Negro	Mancha negra
Quercetina	Amarillo	Negro	Marrón, amarillo	Se intensifica la fluorescencia.
Ácido tánico	Café	Púrpura	Negro	Se intensifica la fluorescencia.
Ácido salicílico	Mancha incolora	Violáceo	Verde amarillo	Aumenta fluorescencia
Vitamina C	Mancha incolora	Negro	Verde fosforescente	Se intensifica la fluorescencia.

## Anexo 12

Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos aislados y sus respectivos estándares revelados con cloruro férrico al 1%.y se muestra de la siguiente manera Laboratorio de toxicología junio de 2015

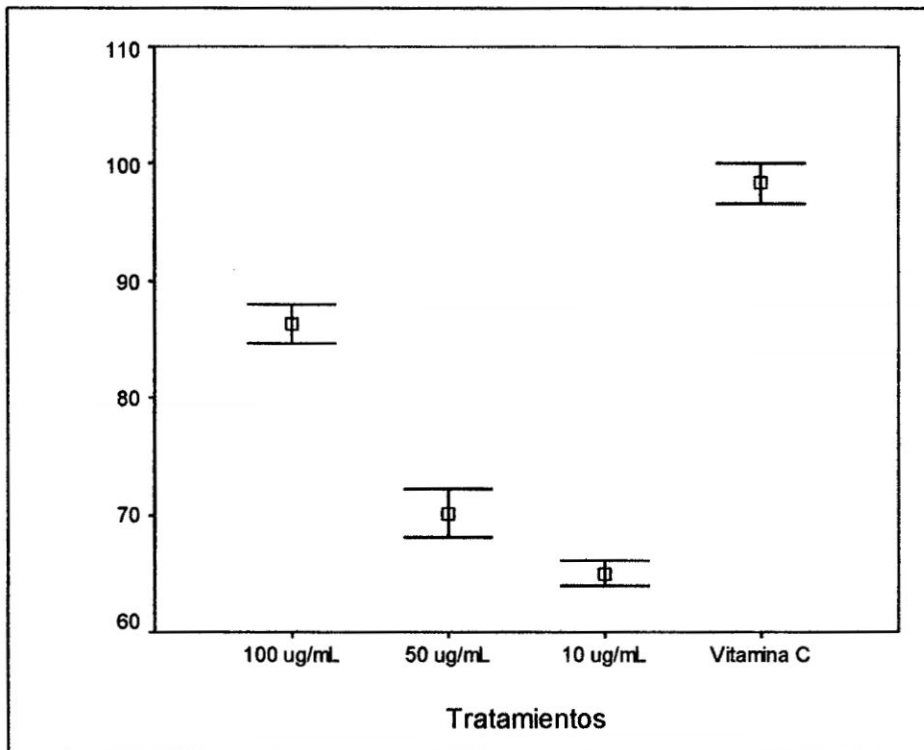


Leyenda:

- 1) Compuestos fenólicos de "cáncer ccora",
- (2) Rutina,
- (3) Quercetina,
- (4) Ácido tánico,
- (5) Ácido salicílico.
- (6) ácido ascórbico (vitamina C).

### Anexo 13

Porcentaje de captación del radical libre DPPH de los compuestos fenólicos aislados a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, con respecto con el estándar ácido ascórbico (vitamina C). Laboratorio de toxicología junio de 2015



## Anexo 14

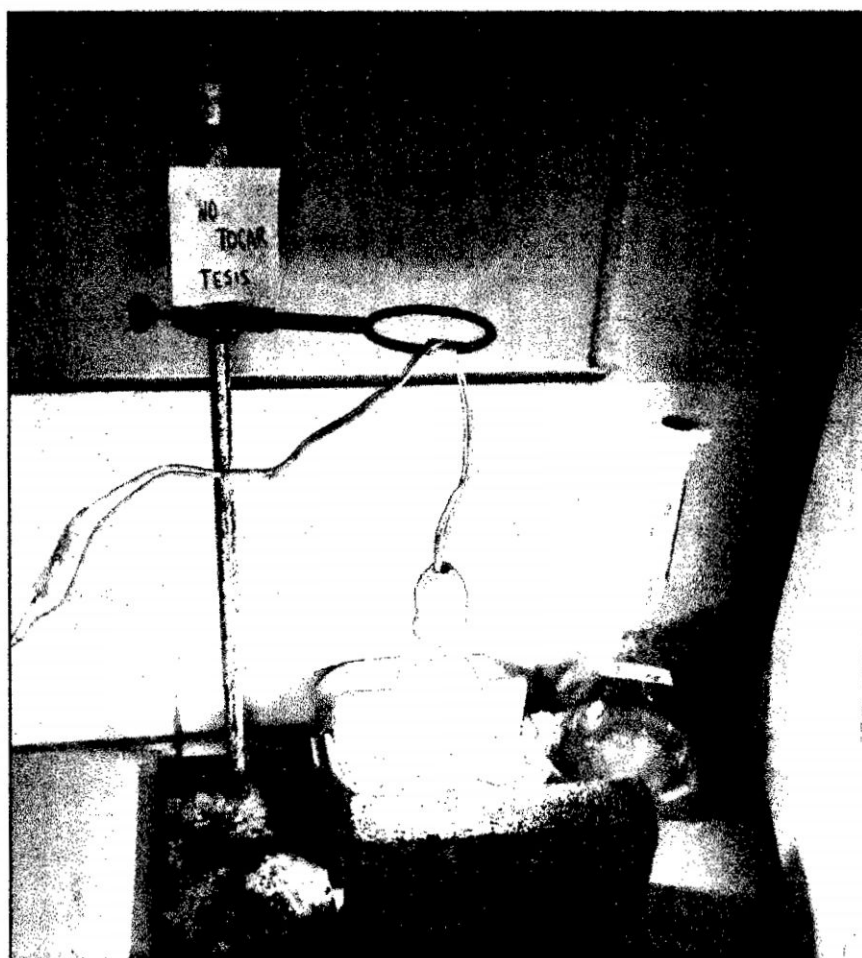
Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH.

			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Secuestramiento de DPPH (%)	Covariables	Tratamientos	2620,880	1	2620,880	50,447	0,000
	Efectos principales	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	348,304	2	174,152	3,352	0,053
	Modelo		2969,184	3	989,728	19,050	0,000
	Residual		1194,920	23	51,953		
	Total		4164.103	26	160,158		

- a. Secuestramiento del DPPH (%) por concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) con tratamientos
- b. Todos los efectos introducidos simultáneamente

## Anexo 15

Incubación en *Artemia salina* para realizar la bioactividad de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora". Laboratorio de toxicología junio de 2015





## Anexo 16

Programa PROBITS, usado para cálculos de de Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) o Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>).

Form1

ANALISIS DE PROBITS

Para la determinación de la Dosis Letal 50 o la Dosis Efectiva 50

Para encontrar la potencia relativa primero hay que efectuar los cálculos de las muestras por separado y archivarlas

Dosis Letal 50

Potencia Relativa

Salir

Para uso de SCC UPCH.

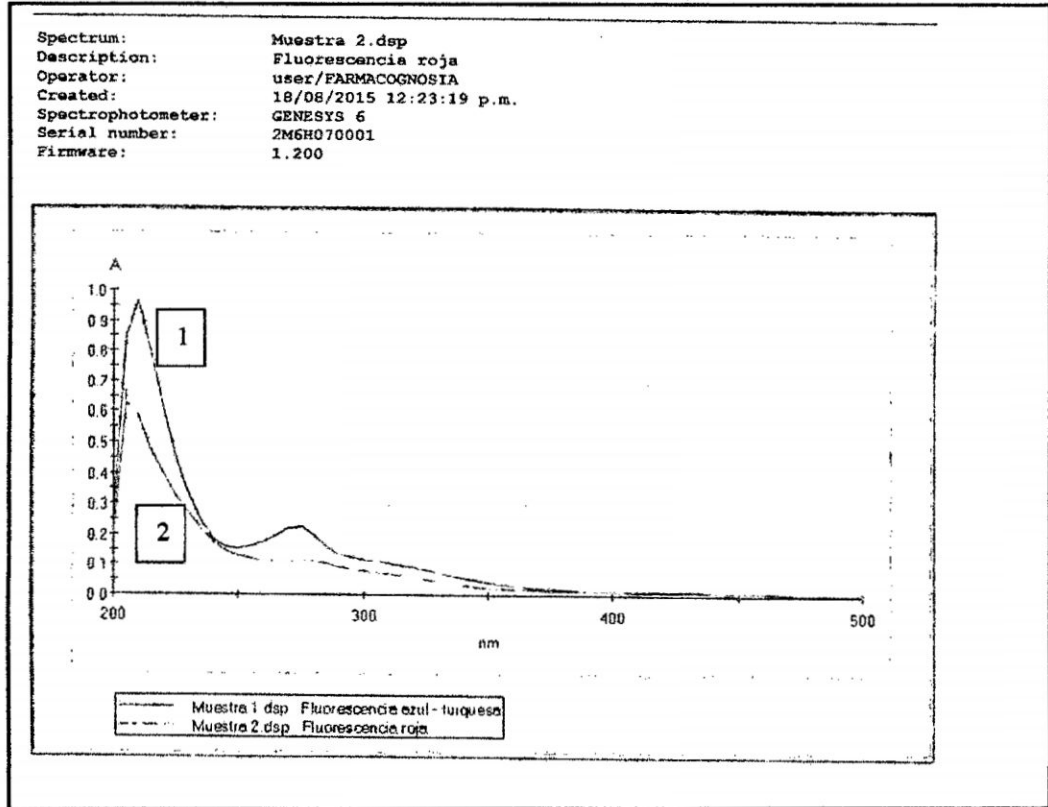
### Anexo 17

Bioensayo en nauplios de *Artemia salina* para determinar la bioactividad de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora". Laboratorio de toxicología junio de 2015

□ PPM	Nauplios						Promedio(muertos)
	vivos			muertos			
	P 1	P 2	P 3	P 1	P 2	P 3	
1000	5	6	7	5	6	4	5
100	7	6	8	3	4	2	3
10	8	9	7	2	1	3	2

## Anexo 18

Curva espectral ultravioleta de los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". Laboratorio de farmacognosia junio de 2015



Muestra 1. dsp fluorescencia Azul - Turquesa

Máxima Threshold: 0,01 A  
1 210 nm; 0,968 A 2 275 nm; 0,228 A

Muestra 2. dsp fluorescencia Roja

Máxima Threshold: 0,01 A  
1 205 nm; 0,627 A

## Anexo 19

### Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
Actividad antioxidante de compuestos fenólicos aislados de hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora"	¿Tendrá Actividad Antioxidante los compuestos fenólicos aislados de hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora"?	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora"</li> </ul>	Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" posee actividad antioxidante	<p><b>Variable independiente</b></p> <p>Los Compuestos fenólicos aislados de hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora"</p> <p><b>Indicador:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Porcentaje (%) de captación de radicales.</li> </ul>	<p><b>Radical libre</b></p> <p>Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos.<sup>18</sup></p> <p><b>Antioxidantes</b></p> <p>Un "antioxidante" es "cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de este sustrato".<sup>1, 21</sup></p> <p><b>Actividad neutralizadora de radicales</b></p> <p>Existen muchos métodos para evaluar la actividad antioxidante en fuentes vegetales, como plantas medicinales y alimentos. Uno de ellos es el método de neutralización del radical libre 2,2 - difenilpicrilhidracil (DPPH). El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa.<sup>17</sup></p>	<p><b>Tipo de investigación</b></p> <p>Básico-Descriptivo.</p> <p><b>Régimen de investigación</b></p> <p>Libre</p> <p><b>La población:</b> Especie <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" de la población de distrito de Kimbiri que pertenece a la Provincia de la Concepción del departamento de Cusco.</p> <p><b>La muestra:</b> 500 g de hojas secas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" recolectadas en un buen estado y conservadas en bolsas.</p> <p><b>Diseño metodológico para recolección de datos</b></p> <p>Se realizará extractos de compuestos fenólicos de las hojas secas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" en las cuales compararé la actividad antioxidante con el método de secuestro de DPPH.<sup>27</sup></p> <p><b>Determinación de la actividad antioxidante</b></p> <p>Actividad Secuestradora del Radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH)</p> <p><b>Análisis de datos</b></p> <p>Mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95%.</p>
Ayacucho - 2013	ccora"	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos aislados de hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" con los estándares.</li> <li>• Evaluar la bioactividad de los compuestos fenólicos aislados de hojas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora"</li> </ul>	<p><b>Variable determinante</b></p> <p>Actividad antioxidante</p> <p><b>Indicador:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Porcentaje (%) de captación de radicales.</li> </ul>	<p><b>Radical libre</b></p> <p>Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos.<sup>18</sup></p> <p><b>Antioxidantes</b></p> <p>Un "antioxidante" es "cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de este sustrato".<sup>1, 21</sup></p> <p><b>Actividad neutralizadora de radicales</b></p> <p>Existen muchos métodos para evaluar la actividad antioxidante en fuentes vegetales, como plantas medicinales y alimentos. Uno de ellos es el método de neutralización del radical libre 2,2 - difenilpicrilhidracil (DPPH). El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa.<sup>17</sup></p>	<p><b>Tipo de investigación</b></p> <p>Básico-Descriptivo.</p> <p><b>Régimen de investigación</b></p> <p>Libre</p> <p><b>La población:</b> Especie <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" de la población de distrito de Kimbiri que pertenece a la Provincia de la Concepción del departamento de Cusco.</p> <p><b>La muestra:</b> 500 g de hojas secas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" recolectadas en un buen estado y conservadas en bolsas.</p> <p><b>Diseño metodológico para recolección de datos</b></p> <p>Se realizará extractos de compuestos fenólicos de las hojas secas de <i>Pearcea hypocyrtiflora</i> (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" en las cuales compararé la actividad antioxidante con el método de secuestro de DPPH.<sup>27</sup></p> <p><b>Determinación de la actividad antioxidante</b></p> <p>Actividad Secuestradora del Radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH)</p> <p><b>Análisis de datos</b></p> <p>Mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95%.</p>	

# “Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga”

## Actividad antioxidante de compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel “cáncer ccora” Ayacucho, 2013.

Alcides Aron Ochoa Vargas

Laboratorio de toxicología y Laboratorio de Farmacognosia – UNSCH. Ayacucho

### RESUMEN

Los radicales libres son productos de las reacciones químicas de la célula y de los tejidos al elevarse o disminuirse las concentraciones fisiológicas puede acarrear importantes alteraciones funcionales. El presente trabajo de investigación básico descriptivo se realizó con la finalidad de determinar la actividad antioxidante de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel “cáncer ccora”, durante los meses de setiembre de 2013 a marzo de 2014, en los Laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La muestra fue recolectada en el departamento de Cusco, obteniendo el extracto, hidroalcohólico de las hojas, se realizó el tamizaje fitoquímico y el fraccionamiento por extracción líquido – líquido con solventes de diferente polaridad como: éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo para la obtención de compuestos fenólicos con los cuales se realizó los ensayos cromatográficos y espectroscópicos; la actividad antioxidante se evaluó mediante el ensayo de captación de radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). El extracto presentó flavonoides, taninos y/o fenoles, alcaloides, lactonas y/o cumarinas, triterpenos y/o esteroides, catequinas, saponinas y azúcares reductores; mediante ensayos cromatográficos y espectroscópicos se confirmó la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos. En los respectivos porcentajes 84,94%; 70,05%; 66,38% respectivamente a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, En conclusión se afirma que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel., “cáncer ccora” tienen actividad antioxidante.

Palabras clave: *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel., actividad antioxidante, compuestos fenólicos.

### SUMMARY

The free radicals are products of the chemical reactions of the cell and of the fabrics when rising or to diminish the physiologic concentrations can carry functional important alterations. The present basic descriptive investigation work was carried out with the purpose of determining the anti-rust activity of the leaves of *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cancer ccora", during the months of September of 2013 to March of 2014, in the Laboratories of the Area of Pharmacy of the Ability of Sciences of the Health of the National University of San Cristóbal of Huamanga. The sample was gathered in the department of Cusco, obtaining the extract, hidroalcohólico of the leaves, was carried out the phytochemical tamizaje and the division for extraction liquid. liquid with solvents of different polarity like: ether of petroleum, chloroform, ethyl acetate for the obtaining of compound fenólicos with which he/she was carried out the tests cromatográficos and espectroscópicos; the anti-rust activity was evaluated by means of the test of reception of free radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). The extract presented flavonoides, tannins and/or fenoles, alkaloids, lactonas and/or cumarinas, triterpenos and/or steroids, catequinas, saponinas and sugars reducers; by means of tests cromatográficas and espectroscópicos you confirmed the flavonoides presence and sour fenólicos. In the respective porcentajes 84,94%; 70,05%; 66,38% respectively to the concentrations of 100 µg / ml, 50 µg / ml and 10 µg / ml, In conclusion is affirmed that the isolated compound fenólicos of the leaves of *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel., "cancer ccora" has anti-rust activity.

Keywords: *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel., activity anti-rust, compound fenólicos.

### INTRODUCCIÓN

El envejecimiento celular es cuando el oxígeno usado en el metabolismo de un organismo vivo, y también como elemento imprescindible en la vida de los organismos aerobios, es también la causa del deterioro de los mismos organismos vivos. Este último término son denominados radicales libres, fragmentos atómicos o moleculares con un electrón desapareado de muy alta reactividad responsable de daños en la estructura celular.<sup>2</sup>

También conocido como un proceso irreversible que se caracteriza por una disminución general de las funciones fisiológicas, lo que conduce a la morbilidad y la mortalidad celular. Es un proceso multifactorial controlado por una combinación de factores genéticos y ambientales. En condiciones normales existe un equilibrio entre la generación de los radicales libres y su neutralización por los sistemas de defensas antioxidantes; pero cuando este equilibrio se rompe, se produce el estrés oxidativo o daño oxidativo, mecanismo general del daño celular que conduce a una alteración en el funcionamiento celular directamente

relacionada con la patogénesis de muchas enfermedades y finalmente a la muerte celular.<sup>3</sup>

Los antioxidantes son sustancias cuya acción consiste en inhibir la tasa de oxidación de los nocivos radicales libres. Existen antioxidantes naturales (fisiológicas), presentes en nuestro organismo, sistémicos; dentro de un grupo los antioxidantes pueden ser enzimas que aumentan la velocidad de ruptura de radicales libres, otros que previenen la participación de iones de metales de transición en la generación de radicales libres y los inactivadores o barredores y de esta manera protegían de las infecciones, deterioro celular, del envejecimiento prematuro y probablemente del cáncer.<sup>4,5</sup>

### Objetivo general

- Evaluar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel “cáncer ccora”

### Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora".
- Comparar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" con un estándar (vitamina C).
- Evaluar la bioactividad en *Artemia salina* de los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora".

## MATERIALES Y METODOS

### 3.1. Lugar de ejecución.

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de febrero a julio de 2015.

### 3.2. Definición de la población y muestra

#### 3.2.1 Población

Hojas de la especie *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora", esta es una planta silvestre con sustancias químicas con gran utilidad en la medicina natural. Siendo usada por los pobladores de la zona y lugares aledaños a la selva central (VRAEM) colindando con el departamento de Cusco, sin tener en conocimiento que probablemente pueda causar algunos efectos secundarios en su salud, por consumo indiscriminado, por ello el estudio científico de esta planta nos sirve para conocer y realizar los bioensayos toxicológicos necesarios.

#### 3.2.2 Muestra

Constituyó 500 g de hojas secas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" de la población de distrito de Kimbiri que pertenece a la provincia de la Concepción, departamento de Cusco.

#### 3.2.2.1. Tipo de muestreo.

Se usó un sistema de muestreo no probabilístico por la inaccesibilidad de esta planta, la cual se encontró en peñascos y en la profundidad de la selva.

#### 3.2.2.2. Unidad de análisis

Compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora"

### 3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

#### 3.3.1. Recolección de muestra

Las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", fueron recolectadas en horas de la mañana, en buen estado de conservación, durante el mes de agosto, luego fueron limpiadas, secadas y guardadas en bolsas de tela de color oscuro.<sup>33</sup>

Con una parte de la planta se procedió a la identificación botánica por los especialistas del *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, encargada por la bióloga Laura Aucasime Medina.

#### 3.3.2. Preparación de muestra

La planta recolectada fue trasladada a los Laboratorios del Área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y fue desecado a temperatura ambiente, posteriormente fue pulverizada utilizando un molino de cuchillas, para obtener un polvo seco que fue almacenándose en frascos ámbar.

#### 3.3.3. Extracción de compuestos fenólicos

Para el aislamiento de compuestos fenólicos se consideró primero hacer una extracción hidroalcohólica con etanol al 80% con doble extracción, evaporación a sequedad del extracto, desengrasado con éter de petróleo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que puedan interferir con la extracción de compuestos fenólicos. Extracción líquido-líquido con acetato de etilo utilizando un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo y evaporarla a sequedad.<sup>15</sup> (ANEXO 2)

#### 3.3.4. Ensayo fitoquímico cualitativo al extracto hidroalcohólico

La caracterización fitoquímica se basó en el agrupamiento de metabolitos estructuralmente semejantes, para identificarlos por su comportamiento químico frente a

reacciones estandarizadas. Se realizaron las pruebas de coloración y precipitación.<sup>25</sup>

### 3.4. Identificación

#### 3.4.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Las soluciones estándares que se emplearon fueron: Vitamina C, ácido salicílico, quercetina, rutina y el ácido tánico de 0,2 mg/ml.

#### Sistema cromatográfico

**Fase estacionaria:** placa de cromatografía 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck).

**Fase móvil:** butanol: ácido acético: agua (4:1:5).<sup>20</sup>

**Volumen de inyección:** 20 µl.

**Revelador:** luz ultravioleta (CAMAG 366 – 254 nm), amoniaco y cloruro férrico.

#### 3.4.2. Prueba espectral

##### Preparación de las soluciones estándares

Solución estándar es ácido tánico en metanol a concentración de 0,2 mg/ml.

##### Preparación de solución de la muestra

Los extractos de cada una de las fracciones se disolvieron en metanol en una fiola de 50 ml.

**Sistema espectrofotométrico:** equipo génesis 6

**Celda:** Cuarzo de 1 cm.

**Longitud de onda:** 200 nm a 500 nm.

**Blanco:** Metanol.

Se registraron los espectros e identificaron los máximos picos de absorción en comparación con el espectro del estándar.

### 3.5. Determinación de la actividad antioxidante

#### 3.5.1. Método de la actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

##### Fundamento

Uno de los métodos para determinar la capacidad antioxidante es aquel que emplea al radical DPPH, el cual por su estabilidad es destruido solamente por antioxidantes, de tal manera que el mejor compuesto destructor del DPPH será el mejor antioxidante.<sup>6</sup>

La técnica empleada de DPPH consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul - violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radical libres.<sup>34</sup>

Existen muchos métodos para evaluar la actividad antioxidante en fuentes vegetales, como plantas medicinales y alimentos. Uno de ellos es el método de neutralización del radical libre 2,2 - difenil picrilhidracil (DPPH). El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa.<sup>16</sup>

La solución de reactivo DPPH es de color violeta y presenta una absorbancia a 517 nm. La reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proviene de un donador (compuesto puro o extracto) por el radical libre DPPH, desarrollando un cambio de color violeta a amarillo a medida que disminuye la concentración de radicales libres; el que se lee en el espectrofotómetro después de 20 a treinta minutos de reacción.<sup>17,6</sup>

##### Procedimiento

- Una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l.
- Una solución metanólica de compuestos fenólicos de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" de 300 µg/ml (sol. A).
- Un blanco con metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- Un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (sol. A) y 1,5 ml de metanol.
- Un patrón de referencia (estándar) con 1,5 ml de DPPH y 0,75 ml de agua destilada.
- La muestra con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una concentración final de 100 µg/ml, se dejó a temperatura ambiente por cinco minutos y se realizó la lectura a 517 nm en el espectrofotómetro.
- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 (sol. B) para obtener una



concentración final de 50 µg/ml y luego en una proporción de 1: 9 (sol. C) para obtener una concentración final de 10 µg/ml.

- Con las soluciones B y C se procedió igual que en el caso anterior.

Cálculos:

$$\%AA = \left| \frac{Ac - (Am - Ab)}{Ac} \right| \times 100$$

Donde:

Ac: Absorbancia del control DPPH

Am: Absorbancia de la muestra

Ab: Absorbancia del blanco de la muestra

AA: Actividad Antioxidante

### 3.6. Bioensayos de toxicidad en *Artemia salina*

#### 3.6.1. Fundamento.

Se basa en la exposición de este crustáceo que se encuentra en el agua de mar artificial, con soluciones en µg/ml del extracto hidroalcohólico obtenido, todo ello para determinar el número de crustáceos vivos por cada dilución en 24 y 48 horas de exposición.

#### 3.6.2. Protocolo experimental

Se tomó como referencia el método propuesto por CYTED (1995) el cual se realizó en varias jornadas.

Día: 1

- Separe las cubetas de plástico o vidrio en dos compartimientos uno totalmente oscuro y el otro con luz artificial permanente.
- Se preparó el agua de mar (3.8 g de sal de mar comercial) en 100 ml de agua destilada y que luego se procede a filtrar.
- Posteriormente se colocó 150 huevos de *Artemia salina* en una cubeta preparada (zona oscura) conteniendo 1000 ml de agua de mar artificial.

Día: 2

- En un matraz Erlenmeyer que contiene agua de mar artificial se transfirió la mayor cantidad de nauplios vivos.

Día: 3

- Se disolvió 20 mg de compuestos fenólicos de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" en 2 ml de agua destilada. A partir de esta solución se prepararon tres diluciones de 1000, 100 y 10 ppm (ppm=1mg/l) para ello.
  - Se transfirió 500 µl de la solución en tres tubos
  - Se transfirió 50 µl de la solución en tres tubos
  - Se transfirió 5 µl de la solución en tres tubos
- A cada uno de los tubos de ensayo que contenía 500 µl de la solución se agregó 10 nauplios del crustáceo y luego se completó con 4500 µl de agua de mar artificial fresca para completar un volumen total de 5 ml.
- A cada uno de los tres tubos de ensayo que contenían 5 µl de la solución se le agregó 10 nauplios del crustáceo y luego se completó 4995 µl de agua de mar artificial fresca para completar un volumen total de 5 ml.
- Para el grupo control se usó nueve tubos de ensayo (tres tubos para cada concentración) a los que se añadió 5 ml de agua de mar artificial fresca y 10 nauplios de *Artemia salina*.

Tabla 3. Clasificación de toxicidad según CYTED<sup>31, 40</sup>

I	Extremadamente tóxico	1 - 10	µg/ ml
II	Altamente tóxico	10 - 100	µg/ ml
III	Moderadamente tóxico	100 - 500	µg/ ml
IV	Ligeramente tóxico	500 - 1000	µg/ ml
V	Prácticamente no tóxico	1000 - 1500	µg/ ml
VI	Relativamente inocuo	> 1500	µg/ ml

### 3.7. Análisis de datos

Los resultados de la actividad antioxidante fueron organizados en tablas y una matriz para calcular la media y la desviación estándar. La significancia estadística fue determinado mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% (p<0,05).

Para encontrar la toxicidad (CL<sub>50</sub>) se utilizó el programa Probits.

## RESULTADOS

Tabla 4. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora". Laboratorio de farmacognosia de farmacia y bioquímica, junio de 2015.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff	++	Precipitado naranja
	Mayer	-	Precipitado naranja
	Wagner	+++	Precipitado rojo-vino
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman-Burchard	++	Coloración verde oscuro
	Carbonato de sodio + luz UV	++	Coloración verde carmelita a luz UV
Resinas	H <sub>2</sub> O destilado	-	Precipitado
Azúcares reductores	Fehling	+	Precipitado rojo-vino
Saponinas	Espuma	++	Formación de espuma
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico al 1%	+	Coloración rojo-vino
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración rojo-vino
Antocianinas	-	+++	Coloración rojo-vino

Leyenda:  
 (-) : Ausente  
 (+) : Poco  
 (++) : Moderado  
 (+++) : Abundante

Tabla 5. Coloración y fluorescencia de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook.f.) Regel "cáncer ccora" con los estándares. Laboratorios de toxicología de farmacia y bioquímica, julio de 2015.

Compuestos	Visualización visible	Cloruro férrico al 1%	Fluorescencia al ultravioleta	
			Sin NH <sub>4</sub>	Con NH <sub>4</sub>
Cáncer ccora	Mancha marrón	Marrón oscuro	Púrpura - mar	Fluorescencia mancha rojo-vino
Rutina	Mancha marrón	Marrón oscuro	Púrpura mar bajo	Amarrillo bajo
Quercetina	Mancha marrón bajo	Mancha turquesa	Amarillo bajo	Se intensifica la fluorescencia.
Ácido tánico	Línea marrón	Azul oscuro	Línea oscura	Se intensifica la fluorescencia.
Ac. Salicílico	Incoloro	violeta	Verde bajo	Intensifica la fluorescencia
Ac. Ascórbico	Incoloro	Mancha verde	Verde	Se intensifica la fluorescencia.

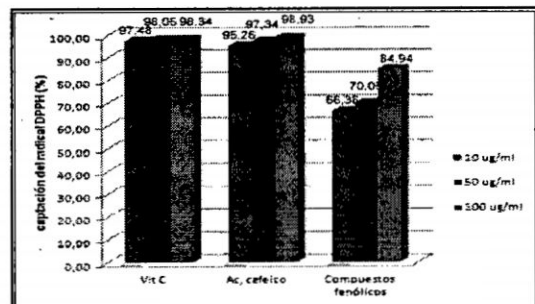


Figura 7. Porcentaje de captación de radicales libres DPPH por parte de compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". En comparación de los estándares vitamina C y ácido caféico. Laboratorio de toxicología junio de 2015.

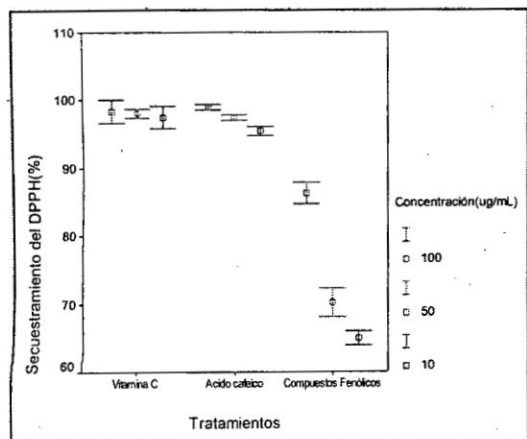


Figura 8. Porcentaje de actividad secuestradora de radical libre de DPPH por efecto de los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", en comparación con vitamina C y ácido caféico. Laboratorio de toxicología junio de 2015.

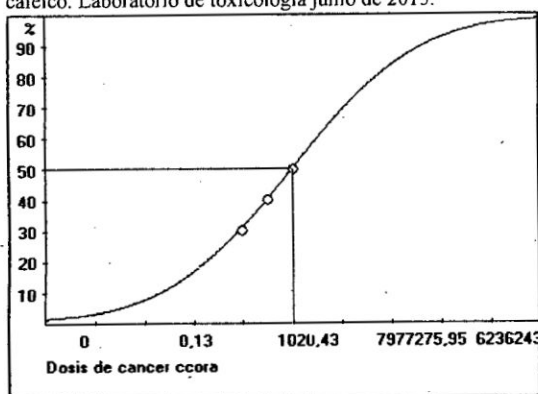


Figura 9. Representación gráfica de la prueba de probit para determinación de la Concentración Letal media (CL<sub>50</sub>) de los compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". Laboratorio de toxicología junio de 2015.

## DISCUSION

En el presente trabajo se demostró que el extracto o compuestos fenólicos obtenidos de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", presentan actividad antioxidante, los cuales son los responsables de las actividades farmacológicas.

Para la extracción de los diversos metabolitos se realizó extracción líquido - líquido donde se utilizó diferentes solventes: el éter de petróleo con la finalidad de eliminar las grasas, ceras, pigmento y otros metabolitos, la segunda extracción con cloroformo que tiene como finalidad extraer a los terpenos y sesquiterpenos, la tercera extracción con acetato de etilo que tiene la finalidad de extraer compuestos fenólicos.<sup>36</sup>

Los taninos están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructuras polifenólicas, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, celulosas, gelatinas). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus propiedades principales: curtir la piel y su poder astringente.<sup>35</sup>

Mediante ensayos cromatográficos preliminares, se confirmó la presencia de compuestos fenólicos observándose manchas con luz ultravioleta (CAMAG) 210 nm y así mismo revelándose con FeCl<sub>3</sub> al 1 por ciento para estos compuestos. Los compuestos fenólicos fueron detectados en el extracto etanólico. Las manchas caracterizadas fueron: Azul - turquesa y la clorofila, por la fluorescencia roja característica.<sup>25,36</sup> (Anexo 10 y 12).

Según Lock y Ugaz<sup>25</sup> la detección de los flavonoides por cromatografía de papel y capa delgada pueden hacerse por el color que desarrollan en lacámara de luz ultravioleta,

apareciendo como manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otra, las cuales se intensifican o cambian de fluorescencia luego de su exposición a vapores de amoníaco, cual se pudo apreciar en la parte experimental (Tabla 5 y Anexo 10, 12).<sup>25</sup>

Los flavonoides resultantes en la fracción de acetato de etilo fueron aislados y purificados mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa, las manchas caracterizadas fueron recuperados del silicagel con metanol, lográndose aislar dos fracciones.<sup>13</sup> Por la concentración mínima de los compuestos fenólicos no se muestran curvas bien definidas, las estructuras químicas de los compuestos fenólicos aisladas por la cromatografía fueron elucidadas mediante correlaciones químicas con los datos obtenidos por espectro ultravioleta en metanol y por comparación con espectros dados en la literatura por Mabry.<sup>37</sup> sugiriéndose como una estructura de los ácidos fenólicos (Anexo 17).

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste en dos máximos de absorción en los rangos de 240 - 285 nm (banda II, BII) y 300 - 550 nm (banda I, BI). Podría indicarse como característica que en dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavonas la banda I es de baja intensidad (más baja de la banda II).<sup>25</sup>

Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoilo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático a (funcionalidad benzóilo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas se muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-OH-sustituidos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm.<sup>11-39</sup> Espectrofotométricamente observamos que cada extracto posee diferente longitud de onda, en la cromatografía realizada se encontró dos coloraciones con las cuales se hizo el respectivo análisis y se extrajo la curva espectral y se encontró dos coloraciones, una coloración fluorescencia Azul - Turquesa y la otra, fluorescencia roja. La primera fluorescencia Azul - Turquesa muestra longitud de onda: 210 y 275 nm y la segunda coloración fluorescencia roja muestran longitud de onda: 205 nm, lo cual se puede atribuir en ambos casos que se trata de ácidos fenólicos por la semejanza en algunas características como la coloración en luz UV (C/S NH<sub>3</sub>) y grafica espectral (Anexo 17).

Para la detección de la actividad antioxidante fue necesario elegir el método que nos permita la rapidez, la precisión, la exactitud, por ello se eligió el método de neutralización del radical libre DPPH, el cual permite estimar la capacidad de captación de radicales libres por antioxidantes fenólicos principalmente.<sup>1</sup>

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el método de captación del radical libre 1,1- difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), donde se observó que los compuestos fenólicos presentes en el extracto de acetato de etilo mostraron actividad antioxidante dependiente de la concentración, pero mostraron algunas diferencias cuando se compara con la vitamina C y el ácido caféico tal como se muestra en sus respectivas pruebas estadísticas (gráfico 7, 8 y Anexo 8, 9, 13 y 14), el análisis de varianza muestra que no existe diferencia significativa entre los compuestos fenólicos de extracto aislado de la planta estudiada con los estándares expuestos, es decir tiene una actividad antioxidante comparativamente similar a la vitamina C y ácido caféico (Anexo 14).

Se usó varios compuestos puros que sirvieron como estándares como el ácido gálico que juega un papel muy importante en la constitución de los taninos hidrolizables.<sup>5</sup> la naturaleza química de los compuestos polifenoles es muy heterogénea y engloba un amplio surtido de disposiciones estructurales libre a conjugadas (estructuras polifenólicas unidas a sustancias de distinta naturaleza). Así, los flavonoides son compuestos polifenólicos que reflejan un gran número de estas estructuras. Los ácidos fenólicos constituyen un ejemplo representativo de estructuras que están asociadas con otras sustancias no necesariamente polifenoles, en la naturaleza.<sup>14</sup> los azúcares reductores dan



un precipitado de color rojo ladrillo al realizar pruebas de Fehling. También los azúcares reductores son considerados antioxidantes.<sup>12</sup>

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular, la cual influye en la facilidad con la que un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático puede ser donado a un radical libre y en la habilidad del fenol de soportar un electrón no apareado. La estructura O-dihidroxi en el anillo B se considera determinante en la neutralización radical y/o el potencial oxidativo.<sup>38</sup>

Es así que la fracción de acetato de etilo de las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora" tuvo una actividad antioxidante de: 84,94%; 70,05%; 66,38% respectivamente a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, esto debido a que los diferentes solventes utilizados arrastraron diferentes metabolitos que presentan actividad antioxidante, los más polares como etanol para glicósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas.<sup>23</sup>

Así como la *satureja brevicalex* Epl. "wayra muña" contiene propiedad antioxidante en un 96,40%; 94,79%; 61,88% respectivamente a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.<sup>7</sup> y la *Cestrum auriculatum* L Heritier "hierba santa" es antioxidante como muestra en sus resultados 92,24%; 84,41%; 65,09%. Respectivamente a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.<sup>8</sup> Por ello, con las diferencias observadas muestran que la *satureja brevicalex* Epl. "wayra muña" tienen ligeramente más actividad antioxidante que la *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora". Sin embargo, estadísticamente son similares por tanto las hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", también tiene actividad antioxidante significativo.

En los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a *Artemia Salina*. (Desarrollada en 1982 por Meyer y Col). El procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *Artemia salina*, para determinar valores de Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>), y/o Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) expresada en µg/ml. Sin embargo, los valores obtenidos de CL<sub>50</sub>, no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular; son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas.<sup>31</sup>

La toxicidad *in vivo* de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos.

Este bioensayo es aplicable a compuestos con estructuras y modos de actividad diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, que sea usado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos y compuestos de tipo morfínico entre otros.<sup>31</sup>

Por tanto el extracto de compuestos fenólicos aislados de hojas de *Pearcea hypocyrtiflora* (Hook. f.) Regel "cáncer ccora", se demostró la actividad citotóxica, la cual muestra su Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) en el bioensayo con *Artemia salina* muestra CL<sub>50</sub> de 1020,13 µg/ml y según el CYTED menciona que es prácticamente no tóxico. (Tabla 3)

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castillo P. Estudio químico y de actividad antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.). [Tesis de maestría]. Lima. Universidad PUCP; 2004.
2. Eunok Choe y David B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods, New York, N. Y. [Artículo en internet]. Publicado el 16 de setiembre de 2009. [Acceso 25 de junio 2014]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x/full>.
3. Criado C, Moya M. Vitaminas y antioxidantes. Ed. Sanidad y Ediciones. S.L. Barcelona. Actuaciones el médico; 2009.

4. Ugartondo V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo en modelos celulares. [Tesis pregrado]. España. Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia; 2009.
5. Villar M. Farmacognosia general: Síntesis. España; 1999.
6. Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de maestría]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
7. León L. Actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja brevicalex* Epl. "wayra muña". [Tesis pregrado] Ayacucho Universidad San Cristóbal de Huamanga – 2012.
8. López N. Actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier "hierba santa" [Tesis pregrado] Ayacucho Universidad San Cristóbal de Huamanga – 2013
9. Kvisit P, y Laurence S, Revision of *Pearcea* (Gesneriaceae). SMITHSONIAN INSTITUTION PRESS. Washington, D.C. 1996. [libro virtual]. [Acceso 13 de junio 2013]. Disponible en: <http://www.sil.si.edu/smithsoniancontributions/botany/pdf/hi/sctb-0084.pdf>.
10. Byrne R. & B D. Morley. 1976. Hybridisation studies in *Columnea* L. (Gesneriaceae). 2. The *C. querceti* complex. Bot. J. Linn. Soc. 72: 199-210. [Acceso 20 de junio 2013]. Disponible en: <http://sura.ots.ac.cr/local/florula3/families/GESNERIACEAE.pdf>.
11. Mitjavila M, Lopez D, Sáiz M. Los radicales libres y su implicación en procesos fisiológicos y patológicos. España 2001. [revista científica]. [Acceso 20 de octubre 2014]. [http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1837/06.VUC\\_BIBLIOGRAFIA.pdf?sequence=7](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1837/06.VUC_BIBLIOGRAFIA.pdf?sequence=7).
12. López A, Fernando C, Lazarova Z, Bañuelos R, Sánchez S. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. Anacem. [revista en internet] recibido el 13 de enero de 2012. Aceptado el 15 de marzo de 2012. [acceso 14 de febrero del 2013]; 6 (1). Disponible en: <http://revista.anacem.cl/web/wp-content/uploads/2012/04/Antioxidantes-un-paradigma-en-el-tratamiento-de-enfermedades.pdf>
13. Mayor R. 2010. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. Inst. Med. Trop. [revista en internet] 2010. [acceso 11 de mayo del 2013]; 5 (2): 23-29. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>.
14. Muñoz A, Ramos D, Alvarado C, Castañeda B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Soc Quím [revista en internet] 2007 Julio. [acceso 20 de febrero del 2013]; 73(3): 142-149. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v73n3/a03v73n3.p>
15. Enciso E, Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides extraídos de las hojas de *Jungia rugosa* Less "matico de puna" [Tesis Doctoral]. Lima. UNMSM; 2010.
16. Chavez R; y col. Antioxidantes de origen vegetal. [revista química]. Lima - Perú.
17. Nemadis N y tsimidov M. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compound using 1, 1 – diphenyl – 2 – picrylhydrazyl (DPPH) Tests. [revista en internet] [Acceso 15 de junio 2015]. disponible en: <http://citeserx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.465.8118&rep=rep1&type=pdf>.
18. López V, Akerreta S, Cavero R, Calvo I. Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina

- tradicional navarra. Fitoterapia [revista en internet] 2007. [acceso 03 de agosto del 2013]; 7 (1): 43-47. Disponible en <http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RF7-1-Navarra.pdf>.
19. López A, Fernando C, Lazarova Z, Bañuelos R, Sánchez S. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. Anacem. [revista en internet] recibido el 13 de enero de 2012, Aceptado el 15 de marzo de 2012. [acceso 14 de febrero del 2013]; 6 (1). Disponible en: <http://revista.anacem.cl/web/wp-content/uploads/2012/04/Antioxidantes-un-paradigma-en-el-tratamiento-de-enfermedades.pdf>.
20. Maestri M, Nepote V, Lamarque A, Zygadlo J. Productos naturales como antioxidantes. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal - CONICET – UNC. Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina; 2006. [Acceso 13 de abril 2015]. Disponible en: [http://www.trnres.com/ebook/uploads/imperato/T\\_123133728Imperato5.pdf](http://www.trnres.com/ebook/uploads/imperato/T_123133728Imperato5.pdf).
21. Sikora E, Cieslik E, Topolska K. Las fuentes de antioxidantes naturales. Nutrición de la Universidad de Agricultura de Cracovia. Polonia. Acta Sci.Pol. Desarrol. Aliment [revista en internet] 2008. [acceso 24 de febrero del 2013]; 7 (1), 5-17. Disponible en: [http://www.food.actapol.net/pub/1\\_1\\_2008.pdf](http://www.food.actapol.net/pub/1_1_2008.pdf).
22. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Med Milit [revista en internet]. 2002. [acceso 19 de febrero del 2013]; 31(2):126-133. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v31n2/mil09202.pdf>.
23. Quintanar M, Calderón J. Capacidad antioxidante total: Bases y aplicaciones. Educación Bioquímica REB [revista en internet] 2009. [acceso 20 Febrero del 2013]; 28(3):89-101. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49016098004>.
24. Toma J. Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja bredicalyx* "Wayra muña" sobre el cerebro de ratas Albinas Holtzman recién nacidas en un modelo de hipoxia isquémica. [Tesis pregrado]. Ayacucho. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2008.
25. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontifica Universidad Católica del Perú. 2ª Ed. Lima. Fondo Editorial; 1994.
26. Muñoz A, Ramos F. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. Horizonte Médico [revista en internet] Junio 2007. [acceso 10 de febrero del 2013]; 7(1): 23-31. Disponible en: [http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2007\\_1/Art3\\_Vol7\\_N1.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2007_1/Art3_Vol7_N1.pdf).
27. Kuklinski C. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 2000.
28. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Invest Biomed [revista en internet] 2003. [acceso 04 de mayo del 2013]; 22(1) 48-57. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22\\_1\\_03/ibi07103.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.pdf).
29. Bruneton J. Plantas Medicinales. Fitoquímica y Farmacognosia. España: Acribia Zaragoza. S. A. España. 2001.
30. Boluda C. Duque, B. Aragon, Z., lignanos (I) estructura y funciones de la planta. Instituto universitario de bioorganica Antonio Gonzales Laguna -Tenerife [revista en internet] 2005 [acceso 13 de octubre del 2015]; 52 (1): Disponible en: <http://static1.1.sqspcdn.com/static/f/1381323/18832419/1340082460950/lignanoso+I.pdf?token=9kWrgURpwG5Qosabt3TLw54HH70%3D>
31. Sánchez L, Neira A. Letalidad en *artemia salina* a las fracciones del extracto etanolico de *Psidium guajava* L. (guayaba) y *Psidium guineense* Sw. (choba) [revista en internet] 2005. [acceso 15 de febrero del 2014]; 40: Disponible en: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/ccient/artic/e/download/76/72.pdf>.
32. Cortés J. Actividad biológicas de extractos de plantas usadas para tratamiento del cáncer e infecciones terapéuticas [Tesis pregrado], Hidalgo. Universidad Autónoma de Hidalgo, Área académica de biología, Noviembre 2005 [Acceso 15 de junio 2015]. disponible en <http://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/licenciatur/a/documentos/Actividad%20biologica%20de%20extractos.pdf>.
33. Rojas F. Determinación del efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Baccharis tricuneata* "yana taya". [Tesis pregrado]. Ayacucho. UNSCH; 2009.
34. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico [revista en internet] 2008 Julio. [acceso 08 de agosto del 2013]; 8(1). Disponible en: [http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008\\_1/Art4\\_Vol8\\_N1.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_1/Art4_Vol8_N1.pdf).
35. Miranda M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana. Cuba; 2002.
36. Aguilar E. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja brevicallix* Epl. "Wayra Muña". Informe de investigación en desarrollo de potenciales económicas y bionegocios. Área de recursos biológicos y terapéuticos. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas. Ayacucho. UNSCH; 2010.
37. Mabry T, Markham K, Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin; 1970.
38. Calderón P. Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento. [Tesis pregrado]. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007.
39. Bafna A, Mishra S. Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn. Ars Pharm [revista en internet] 2005. [acceso 15 marzo del 2013]; 46 (2): 125-138. Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/316.pdf>.
40. Pinzón R, Sánchez C. Manual de técnicas de investigación (1995) CYTED p.p 63-70.