

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE LAS HOJAS DE *Achyrocline alata* DC.
(HUIRA-HUIRA) Y SU RELACIÓN CON SU CONTENIDO DE
COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES”, AREQUIPA 2014.**

Tesis presentada por la bachiller:

Nayra Alvarado, Edith

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesora:

Mgter. Julitza Paredes Fuentes.

AREQUIPA – PERÚ

2014

DEDICATORIA

A ti Dios Mío, por no abandonarme. Gracias por ayudarme a levantarme en mis fracasos, por aprender de ellos y principalmente por permitirme realizar el sueño más importante de mi vida. Gracias.

A mis papitos Juan y Sofía, ejemplo de sacrificio, quienes con su amor, apoyó y comprensión incondicional estuvieron siempre a lo largo de mi vida estudiantil; a ellos que siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y que han sido incentivos de mi vida.

A mis hermanas Yaneth y Lizeth quienes han sido mi inspiración para ser mejor cada día, por estar conmigo en este tiempo tan importante para mí.

A mis familiares y amigos, por sus palabras de aliento, y porque nunca dudaron que lograría este triunfo.

A todas las personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo, y que hicieron posible la culminación del mismo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el esfuerzo que realizan día a día en guiar mi vida, por ser siempre fuentes de confianza y amor; porque gracias a ellos crecí con valores, principios y educación.

A mi asesora, Dra. Julitza Paredes Fuentes, por su constante apoyo y los consejos brindados durante la realización del presente trabajo de investigación, demostrando ser, además de una gran maestra, una gran persona.

Al Doctor José Villanueva Salas PhD, que ha sido un privilegio contar con su apoyo durante la elaboración de este trabajo de investigación.

Finalmente, a mis amigos por brindarme su apoyo y palabras de aliento, por compartir buenos y malos momentos conmigo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
HIPÓTESIS.....	3

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. <i>Achyrocline alata</i> DC. “HUIRA-HUIRA”	4
1.1.1.DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	5
1.1.2.UBICACIÓN TAXONÓMICA	6
1.1.3.DISTRIBUCIÓN	6
1.1.4.PROPAGACIÓN.....	7
1.1.5.USOS.....	7
1.2.ESPECIES OXIDANTES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES.....	7
1.2.1.RADICALES LIBRES DE OXIGENO (RLO)	7
1.2.2.DAÑO INDUCIDO POR RADICALES LIBRES	10
1.2.3.ESTRÉS OXIDATIVO.....	11
1.2.4.ANTIOXIDANTES	12
1.2.4.1.ANTIOXIDANTES NATURALES.....	14
1.2.4.2.DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	15
1.3.COMPUESTOS FENÓLICOS	16
1.3.1.CLASIFICACIÓN GENERAL.....	17
1.3.2.EFECTOS DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS	17
1.3.3.ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS	18

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	20
---------------------------------	----

2.2.MATERIALES	20
2.2.1.MATERIAL VEGETAL.....	20
2.2.2.REACTIVOS QUÍMICOS	20
2.2.3.MATERIAL DE LABORATORIO	21
2.2.4.EQUIPOS	21
2.3.MÉTODOS	22
2.3.1.OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS	22
2.3.2.OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.....	22
2.3.2.1.EXTRACTO METANOLICO	23
2.3.2.1.1.MÉTODO 1: SISTEMA SOXHLET	23
2.3.2.1.1.1.FUNDAMENTO.....	23
2.3.2.1.1.2.PROCEDIMIENTO	23
2.3.2.1.2.MÉTODO 2: SISTEMA PERCOLACION	25
2.3.2.1.2.1.FUNDAMENTO.....	25
2.3.2.1.2.2.PROCEDIMIENTO	26
2.4.DETERMINACION DEL EXTRACTO SECO.....	27
2.4.1.FUNDAMENTO.....	27
2.4.2.PROCEDIMIENTO	27
2.5.FRACCIONAMIENTO	28
2.6.ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)	28
2.6.1.FUNDAMENTO.....	29
2.6.2.PROCEDIMIENTO	29
2.6.3.FACTOR DE RETRASO	30
2.6.4.IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	30
2.7. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT).....	31
2.7.1.METODO DE FOLIN- CIOCALTEU	32
2.7.2.DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	32
2.7.3.EXPRESIÓN DE RESULTADOS	34
2.8.DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	35
2.8.1.MÉTODO CUPRAC (ION CÚPRICO REDUCCIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE)	35

2.8.2.DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR ESPECTROFOTOMETRÍA	37
---	----

2.8.3.EXPRESIÓN DE RESULTADOS	37
-------------------------------------	----

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.RECOLECCIÓN	39
---------------------	----

2.PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.....	40
---	----

2.1.OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	41
---------------------------------	----

2.1.1.EXTRACTO METANOLICO OBTENIDO POR EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOXHLET	41
--	----

2.1.2.EXTRACTO METANOLICO OBTENIDO POR PERCOLACIÓN.....	42
---	----

3.FRACCIONAMIENTO	44
-------------------------	----

5.DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES (CFT).....	55
--	----

6.DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE POR EL METODO CUPRAC.....	62
---	----

CONCLUSIONES	71
--------------------	----

SUGERENCIAS	72
-------------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
---------------------------------	----

ANEXOS.....	79
-------------	----

en dos fracciones n- butanol y acetato de etilo, taninos (taninos hidrolizables) presente solo en la fracción n-butanol, saponinas (saponinas esteroideas) solo en fracción n-butanol y cumarinas (hidroxicumarinas y furanocumarinas) presente en las 3 fracciones.

El contenido de compuestos fenólicos totales por el método de *FOLIN- CIOCALTEU* fue mayor en el extracto metanólico obtenido por el método de percolación siendo de 225.88 mg GAE/100 g de extracto y menor el contenido de fenoles totales en el extracto metanólico obtenido por el método de Soxhlet siendo de 155.64 mg de GAE/100 g de extracto.

Finalmente, se determinó la capacidad antioxidante mediante el método de *CUPRAC*, donde la mayor capacidad antioxidante se dio en el extracto metanólico obtenido por el método de percolación siendo de 412.60 μmol equivalente de ácido ascórbico/100 g de extracto y la menor capacidad antioxidante se dio en el extracto obtenido por el método de Soxhlet siendo de 281.91 μmol equivalente de ácido ascórbico/100 g de extracto.

La mayor capacidad antioxidante y cantidad de compuestos fenólicos totales fue en el extracto metanólico obtenido por el método de percolación, hallándose una diferencia significativa frente al método de Soxhlet.

ABSTRACT

This research work presents the identified secondary metabolites in the leaves of *Achyrocline alata* DC. (Huiru-Huiru) also was determined and compared the antioxidant capacity CUPRAC by the method and the amount of total phenolic compounds by the FOLIN-CIOCALTEU of the methanol extracts obtained by two methods of extraction, percolation and Soxhlet.

Achyrocline alata DC. leaves (Huiru-Huiru) previously stabilized, dried and pulverized was used. From leaves powder, two methanol extracts extraction methods (Soxhlet and percolation) was prepared, giving a percentage yield of 29.41 % for the methanol extract obtained by the method of Soxhlet and 19.72 % for the percolation method.

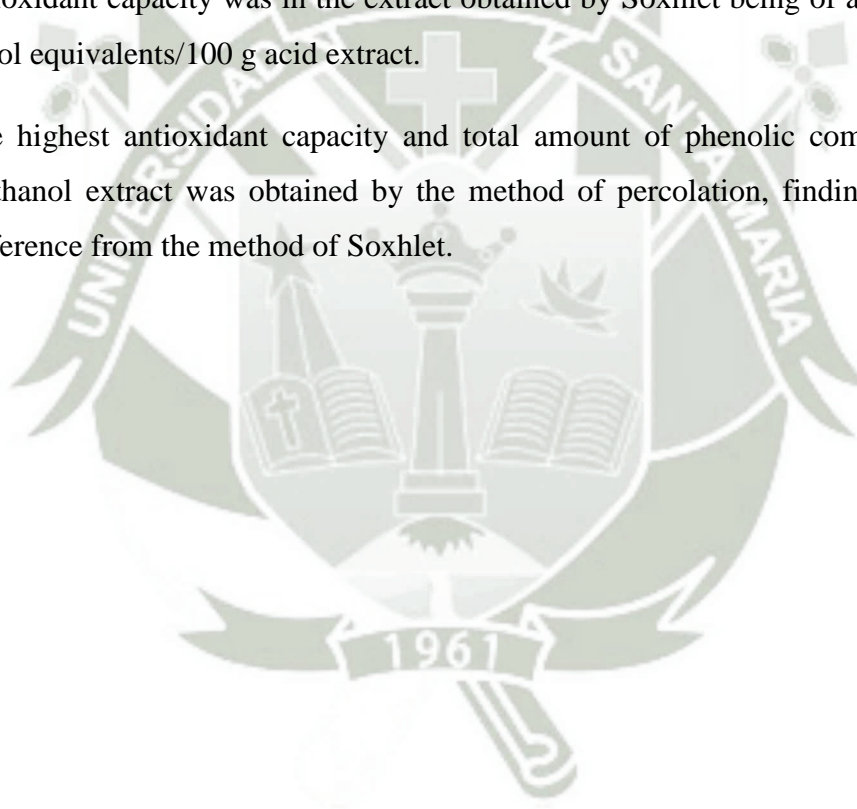
Chromatographic runs were performed in thin layer in order to identify potential secondary metabolites in the methanol extract of the leaves of Huiru-Huiru, which before fractionation was performed from the methanol extract obtained by the method of Soxhelt, solvent of different polarity starting solvent of lower polarity up to solvents of higher polarity (hexane, ethyl acetate and n-butanol), the possible secondary metabolites were identified are phenolic acids (caffeic acid and chlorogenic acid) found in the three fractions, flavonoids (flavones and flavonols) present only on two n-butanol fraction and ethyl acetate, tannin (hydrolyzable tannin)

present only in the n-butanol fraction, saponins (steroid saponins) by only n-butanol fraction and coumarins (hydroxycoumarins and furocoumarins) present in the 3 fractions.

The content of total phenolic compounds by *FOLIN-CIOCALTEU* was higher in the methanol extract obtained by the method of Percolation being 225.88 mg GAE/ 100 g extract had lower total phenol content in the methanol extract obtained by the method Soxhlet being of 155.64 mg of GAE /100 g of extract.

Finally, the antioxidant capacity is determined by the method of *CUPRAC* where the highest antioxidant capacity was in the methanolic extract obtained by percolation method being equivalent of ascorbic 412.60 $\mu\text{mol}/100$ g acid extract and the lowest antioxidant capacity was in the extract obtained by Soxhlet being of ascorbic 281.91 μmol equivalents/100 g acid extract.

The highest antioxidant capacity and total amount of phenolic compounds in the methanol extract was obtained by the method of percolation, finding a significant difference from the method of Soxhlet.



INTRODUCCIÓN

En el Perú un sector de la población aprovecha las plantas medicinales por sus propiedades curativas, estas plantas son utilizadas de manera empírica, es decir, sin fundamentos verdaderos de sus cualidades curativas, sino simplemente basados en conocimientos no comprobados.

Achyrocline alata DC. pertenece a la familia Asteraceae, que son ampliamente utilizadas en América del Sur (Argentina, Uruguay y Brasil) donde se llevaron a cabo muchos estudios de dicha especie, demostrando tener propiedades biológicas tales como actividad antioxidante y antiinflamatorio debido a la presencia de metabolitos secundarios como ácidos fenólicos y flavonoides.

En Perú aún no hay estudios científicos de dicha planta, pero si es muy utilizado de manera empírica para aliviar la tos y como antiinflamatorio, es un arbusto que crece alrededor del lago Titicaca en las cercanías de Pomata, departamento Puno, conocido popularmente como Huirá-Huirá.

Los antioxidantes constituyen un grupo de sustancias que, cuando están presentes en bajas concentraciones (en relación con otros compuestos oxidables), inhiben o retrasan los procesos oxidativos, a través de un mecanismo que suele conllevar su propia oxidación. Los suplementos antioxidantes, o los o las frutas o plantas que contienen antioxidantes, pueden ser usados para reducir los daños oxidativos relacionados con la edad y con enfermedades como la arteriosclerosis, diabetes, cáncer, cirrosis, etc.

Tratando de cumplir con lo mencionado anteriormente, se estudió la capacidad antioxidante y la cantidad de compuestos fenólicos totales que presenta las hojas de *Achyrocline alata* DC, tratando así fomentar el consumo de dicha planta, así prevenir enfermedades causadas por procesos oxidativos, y de contribuir a la investigación científica de la flora del Perú, ya que mencionamos que no existe bibliografía alguna que señale sus actividades terapéuticas, así como sus principios activos.

OBJETIVOS

1. Obtener extractos metanólicos por dos métodos de extracción (Soxhlet y percolación).
2. Fraccionar el extracto metanólico obtenido, con solventes de diferente polaridad como hexano, acetato de etilo y n-butanol.
3. Identificar por cromatografía de capa fina los principales grupos de metabolitos secundarios.
4. Determinar y comparar la cantidad de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos por los dos diferentes métodos de extracción (Soxhlet y percolación).

HIPÓTESIS

Dado al uso empírico de la planta *Achyrocline alata* DC. “Huir-Huir” por la población alto andina y a la poca información científica que certifique probables efectos farmacológicos de dicha especie es que se plantea el estudio fitoquímico, cuantificación de compuestos fenólicos y determinación de la capacidad antioxidante de dicha especie estudiada.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 *Achyrocline alata* DC. “Huiru-Huiru”

El *Achyrocline* género perteneciente a la familia Asteraceae y consta de veinte a treinta especies distribuidas por las regiones tropicales y subtropicales de América Central y del Sur. Asteraceae es ampliamente utilizados en América del Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela), tales como: *A. alata*, *A. tomentosa*, *A. flaccida* y *A. satuireioides*. Investigaciones químicas anteriores de *A. alata* y otras especies de *Achyrocline* recogidos en América del Sur (Argentina, Uruguay y Brasil) se llevaron a cabo, mostrando perfiles similares con respecto a sus componentes fenólicos y flavonoides.^{(2) (3)}

Achyrocline alata y *Achyrocline flaccida*, que pertenece al género *Achyrocline*, han demostrado propiedades biológicas tales como actividad antioxidante y antiinflamatoria. La acción terapéutica de las especies *Achyrocline* es principalmente por la presencia de flavonoides.^{(2) (3)}

Planta que crece en los andes peruanos, la cual hoy en día en Perú no se realizó ningún tipo de estudios fitoquímicos ni farmacológicos, a pesar de ser conocida y utilizada por la población en la sierra.

1.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

- **Aspecto general:** Mata o arbusto pequeño, no muy leñoso, de 0.7-1 m de altura en el ámbito, con ramitas erectas, ralas, alargadas. Tiene abundante follaje en las partes basales, de aspecto lanuginoso en el envés de las hojas. Las flores están en grupos de cabezuelas en los extremos de las ramitas; son muy pequeñas y de aspecto pajizo, de un amarillo muy claro y brillante.⁽¹⁾
- **Ramitas terminales:** Blanco-cenizo a verduzcas, cilíndricas, muy regulares, cubiertas de pubescencia algodonosa.⁽¹⁾
- **Hojas:** Simples, alternas, muy escasas o ausentes en las zonas distales, agrupadas a fasciculadas y abundantes en las partes basales de las ramitas. Tienen forma elíptico-alargada a lanceolado-alargada, y unos 4-6 cm. longitud por 4-5 mm de ancho; el ápice agudo con un breve (1-2 mm) acumen; son sésiles y con parte de la lámina decurrente por la ramita. El margen es regular o irregularmente crenado o dentado. Hay pelos cortos en el haz, visibles con lupa de 10 X; el envés es lanuginoso-algodonoso y blanquecino. La nervación es inconspicua.⁽¹⁾
- **Inflorescencias Terminales:** En cimas de cabezuelas de 2-3 cm de longitud y 3-4 cm de diámetro, en promedio. Cabezuelas de 5-6 mm de longitud y 2-3 mm de diámetro, de color cenizo-amarillento brillante y pajizo.⁽¹⁾
- **Flores:** Muy pequeñas, de unos 3 mm de longitud, de color amarillo blanquecino.⁽¹⁾

En la **Figura N° 1** se puede observar la planta entera de *Achyrocline alata* DC. creciendo a orillas del lago Titicaca (3812 msnm), en las cercanías de Pomata, departamento Puno, observándose las cabezuelas de color amarillo blanquecino en el extremo de los tallos muy características de la planta, es conocida popularmente por la población alto andina como “Huiru-Huiru”, dicha planta crece en suelos arenosos o pedregosos.

1.1.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA

Nombre científico: *Achyrocline alata* (H.B.K.) DC.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsidae*.

Subclase: *Asteridae*.

Orden: *Asterales*.

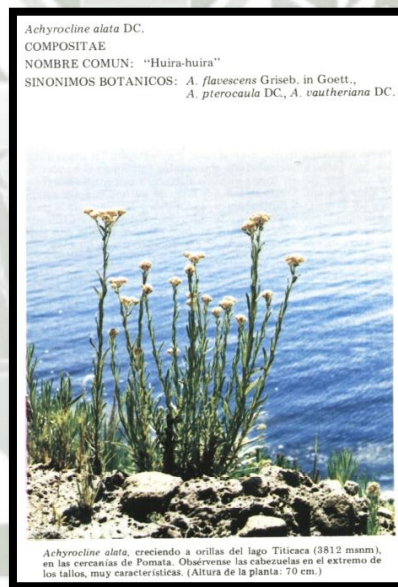
Familia: *Asteraceae*.

Género: *Achyrocline*

Especie: *Achyrocline alata* (H.B.K.) DC.

FIGURA N°: 1

Achyrocline alata (H.B.K.) DC.



FUENTE: Planta *Achyrocline alata* DC "Huirá- Huirá".⁽¹⁾

1.1.3 DISTRIBUCIÓN

Amplia distribución en Sudamérica, desde Ecuador hasta Chile. En Perú, generalizada en toda la sierra entre los 2,500 y 4,000 msnm, aunque también se le encuentra a menores altitudes. Es una especie ruderal. Suele crecer a orilla de caminos y carreteras, y en adyacencia a muros y cercos vivos.⁽¹⁾

1.1.4 PROPAGACIÓN: Por semilla.

1.1.5 USOS

Achyrocline alata DC, que pertenece al género *Achyrocline*, ha demostrado propiedades biológicas tales como actividad antioxidante y antiinflamatoria (en Brasil, Argentina, Uruguay). La acción terapéutica de las especies *Achyrocline* es principalmente por la presencia de flavonoides, (Estudios realizados en Brasil, Uruguay).⁽²⁾⁽⁴⁾

Utilizada para curar la ronquera, tos, asma y catarros: las ramitas, hojas y flores se toman en infusión y como antiinflamatorio en emplasto. (EN PERU).⁽¹⁾

Dichas utilidades no fueron comprobadas mediante estudios científicos, utilizadas de manera empírica, es decir dichas cualidades curativas son simplemente basadas bajo conocimientos no comprobados.

1.2 ESPECIES OXIDANTES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

1.2.1 RADICALES LIBRES DE OXIGENO (RLO)

El oxígeno, elemento imprescindible en la vida de los organismos aerobios, es también la causa del envejecimiento y del deterioro del mismo. Es requerido para la generación de todas las especies reactivas (**Tabla N° 1**), es decir las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de cloro (RCS).⁽¹⁸⁾

Un radical libre (RLO) se define como un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados girando en sus orbitas externas. Es por esto que los radicales libres oxidan a las moléculas vecinas para así adquirir un equilibrio químico.⁽¹⁵⁾

Pero esas moléculas vecinas al momento de ser oxidadas por los radicales libres, se convierten en especies radicalarias inestables (señalizado por el punto situado a la derecha del símbolo) que van en busca de electrones de otras moléculas vecinas y es así como se genera una reacción en cadena capaz de destruir estructuras biológicas importantes si los antioxidantes no intervienen.⁽¹⁵⁾

Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tiene una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forma y son difíciles de dosificar.⁽¹⁵⁾

TABLA N°: 1

ESPECIES REACTIVAS Y RADICALES LIBRE⁽¹⁸⁾

	RADICAL LIBRE	NO RADICAL
ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)	Superoxido ($O_2^{\cdot-}$). Hidroxilo ($\cdot HO$). Hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}). Peroxilo (RO_2^{\cdot}). Alcohexilode lípido (LO^{\cdot}). Peroxilo de lípido (LO_2^{\cdot}).	Peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Ác. Hipobromoso ($HOBr$). Ác. Hipocloroso ($HOCl$). Ozono (O_3). Singlete de oxígeno (O). Peróxidos orgánicos ($ROOH$).
ESPECIES REACTIVAS DEL CLORO (RCS)	Cloro atómico (Cl^{\cdot}).	Ác. Hipocloroso ($HOCl$). Cloruro de nitrilo (NO_2Cl). Cloraminas. Gas de cloro (Cl_2).
ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO (RNS)	Óxido nítrico (NO^{\cdot}). Dióxido de nitrógeno (NO_2).	Catión de nitroso (HNO_2). Aniones de nitrosilo (NO^+). Aniones de nitroxilo (NO^{\cdot}). Tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4). Peroxinitrito ($ONOO$). Ác. Peroxinitroso ($ONOOH$). Catión nitrilo (NO). Peroxinitrito de alquilo ($ROONO$). Cloruro de nitrilo (NO_2Cl).

Desde el punto de vista molecular, son pequeñas moléculas difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por los que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo.⁽¹⁵⁾

Los radicales libres son producidos por un gran número de mecanismos tanto endógenos como exógenos.⁽¹⁹⁾

Existen cuatro fuentes principales que explican la producción de radicales libres endógenamente:

- a) La mitocondria, que funciona como el sistema energético de la célula, interactúa con el oxígeno para producir la síntesis de ATP, produciendo radicales libres, que bajo condiciones especiales del organismo se convierten en sustancias tóxicas, responsables de daños celulares. En estas condiciones fisiológicas, la formación de radicales está vinculada a la actividad física e incluso a la intensidad de oxigenación. Esta producción puede también intensificarse cuando se producen desordenes mitocondriales genéticos, inflamatorios o nutricionales.⁽¹⁹⁾
- b) La inflamación es otra fuente de radicales libres producidos directamente por el complejo enzimático NADPH oxidasa de las células fagocitarias activadas. Este mecanismo, cuando se controla, es capital en la lucha infecciosa ya que permite la fagocitosis de las bacterias y cuerpos extraños. Además las células inflamatorias e inmunes pueden producir citoquinas como el TNF- α que es capaz de hacer producir radicales libres para las mitocondrias de las células destino.⁽¹⁹⁾
- c) En los animales, las enzimas del citocromo P450 constituyen uno de los sistemas de defensa primario contra los componentes químicos naturales de las plantas (que tienen la mayor fuente de toxinas de la dieta). La inducción de estas enzimas previenen efectos tóxicos de los químicos.⁽¹⁹⁾
- d) Peroxisomas, los cuales son los organelos responsables de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas. Estos producen peróxido de hidrogeno como subproducto que luego es degradado por la catalasa.⁽¹⁹⁾

Como fuentes exógenas de producción de radicales libres encontramos:

- a) Los metales tóxicos (cromo, vanadio, cobre) y también el hierro libre generan en presencia de peróxido de hidrogeno, radicales muy reactivos.⁽¹⁸⁾
- b) Los rayos ionizantes, rayos x, rayos gamma o ultravioletas son capaces de producir aniones superóxidos.

1.2.2 DAÑO INDUCIDO POR RADICALES LIBRES

Los radicales libres producidos en cantidades moderadas pueden ser neutralizados por el propio sistema. En general, una agresión oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir posteriormente condiciones más oxidantes. ⁽³⁵⁾

Sin embargo, las ERO que escapan a los sistemas de defensa, producen continuamente irremediables daños a los carbohidratos, ADN, proteínas y lípidos que alcanzan. Las consecuencias pueden ser muy variadas e irremediables a corto, mediano o largo plazo. ⁽³⁵⁾

- **Daño al ADN:** Se sabe que el daño oxidativo sobre el ADN, es producido específicamente por el $\cdot\text{HO}$, conduce a diversas modificaciones, principalmente en la desoxirribosa, provocando una liberación de bases nitrogenadas que se encuentran unidas a este azúcar. Lo anterior produce el rompimiento de una o ambas cadenas ocasionando deleciones que dan como resultado mutaciones, reordenamientos cromosómicos, activación o inactivación de genes, que afectan incluso la biosíntesis de cadenas de ADN. Además el estrés oxidativo produce errores durante la transcripción y la traducción del ARN. Así, el daño oxidativo sobre las diversas biomoléculas puede conducir a un deterioro del metabolismo y estructura celular que provoca la muerte de las células. ⁽³²⁾⁽³⁶⁾
- **Daño a las Proteínas:** Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. Los radicales libres oxidan a los aminoácidos, que constituyen a las proteínas produciendo diversas modificaciones tales como: la formación de grupos carbonilos, asociación de fragmentos proteicos por entrecruzamiento de enlaces disulfuro, rompimiento de enlaces peptídicos, pérdida de la afinidad por los metales, incremento en la hidrofobicidad, ocasionando que las proteínas sufran cambios en su estructura, actividad y funcionalidad. Los radicales provocan que las proteínas sufran daño oxidativo presenten un deterioro en la actividad hormonal y enzimática, así como el transporte de iones, además de una mayor sensibilidad a la degeneración proteolítica. ⁽²⁸⁾⁽³²⁾

- **Daño en los lípidos:** El daño producido se conoce como peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo, ya que afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos polinsaturados (PUFA). Los PUFA son parte esencial de los fosfolípidos que forman la capa bilipídica de las membranas brindándolas fluidez e integridad respectiva, al ser oxidados por los radicales libres dan lugar a la lipoperoxidación, una reacción en donde los PUFA ceden sus electrones a los radicales libres. Este efecto provoca el mayor daño a la célula al producir cambios en la estructura molecular de la membrana, lo anterior sumado a la formación de puentes disulfuro de las proteínas de membrana, dan como resultado a la pérdida de permeabilidad y estabilidad de la membrana, provocando la muerte celular, por pérdida de permeabilidad fluidez e integridad de las membranas. ^{(28) (32)}
- **Daño a los carbohidratos:** los radicales hidroxilos ($\cdot\text{HO}$) reacciona con los carbohidratos, secuestrando al azar un hidrogeno de un átomo de carbono, produciendo un radical carbono que ocasionaría la ruptura de importantes moléculas tales como el ácido hialurónico, la condroitina y el dermatán sulfato (polisacárido del grupo de los glucosaminoglucanos). ⁽³²⁾⁽³⁵⁾

1.2.3 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS o ERO) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermediarios o reparar el daño resultante. El estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aun una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar necrosis. ⁽²³⁾

El estrés oxidativo puede originarse por dos motivos: ⁽¹⁹⁾

- Disminución de antioxidantes debido a la malnutrición.
- Producción excesiva de especies reactivas de oxígeno a causa de la exposición de células a elevados niveles de oxígeno u otras toxinas que en si misma son especies reactivas.

Las células pueden tolerar casos de estrés oxidativo leve, sin embargo, situaciones severas pueden afectar el metabolismo celular, a través de la ruptura de moléculas de DNA, daño de proteínas o peroxidación de lípidos.⁽²³⁾

En la actualidad se ha reportado casi 100 enfermedades en las que existe certeza experimental sobre la incidencia del desbalance del estado oxidativo en su surgimiento y desarrollo entre ellas: cardiovasculares, neurológicas, endocrinas, respiratorias, de origen inmune y autoinmune, isquemia, trastornos gástricos, carcinogénesis y progresión de tumores. Quizás las enfermedades más estudiadas en relación con su progresión y el incremento de marcadores del estrés oxidativo son las neurodegenerativas. El papel de los radicales libres en enfermedades cardiovasculares es crucial, en aquellos pacientes que presentan estos padecimientos, la capacidad del organismo se ve disminuida en la formación de vasos sanguíneo (neovascularización), desarrollando enfermedades de riesgo como hipertensión y aterosclerosis vascular.⁽¹⁷⁾

Es importante tener en cuenta otros factores que desencadenan el estrés oxidativo, como el tipo de vida y de dieta que actúan como prooxidantes, como el tabaco inhalado, el cual es considerado un poderoso prooxidante exógeno. En cuanto a los factores alimenticios, se conoce que las dietas ricas en grasa pueden contribuir a un estrés oxidativo debido al incremento de peroxidación lipídica; las carnes rojas ricas en grasa se cree que intensifican el estrés oxidativo a través de la ingesta del hierro hemo, moléculas que contienen metales como el hierro que son capaces de hacer ciclo redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal; esta acción cataliza la reacciones que producen radicales hidroxilo y especies reactivas de oxígeno.

1.2.4 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es una molécula que cuando se presenta a bajas concentraciones comparadas con la del sustrato oxidable, es capaz de retardar o prevenir la oxidación de dicho sustrato. Sustrato oxidable es casi todo (excepto agua) lo que se encuentra en alimentos y en tejidos biológicos que puedan estar constituidos por proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. Los antioxidantes terminan las reacciones de

oxidación quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos.⁽²⁰⁾

Sustancias capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres para que estos alcancen su estabilidad de tal modo no puedan dañar las células. Los antioxidantes son absolutamente críticos para el mantenimiento celular óptimo y el sistema y bienestar saludable.⁽²⁰⁾

El antioxidante al reaccionar con el radical libre (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.⁽²⁹⁾

Existen muchos tipos de clasificación de antioxidantes, pero para simplificarla, se tomó una clasificación específica según su naturaleza: (**Ver Tabla N° 2**)

Los antioxidantes se clasifican en ENDOGENOS, fabricados por la propia célula, y EXOGENOS, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes.⁽²⁹⁾

- **Antioxidantes enzimáticos o endógenos:** Incluyen a enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-PX) y glutatión reductasa.
- **Antioxidantes no enzimáticos o exógenos:** Muchas sustancias de origen vegetal, denominados en conjunto “fitonutrientes”, o “fitoquímicos”, son cada vez más conocidos por su actividad antioxidante, son de bajo peso molecular provenientes de la dieta, como la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), β -caroteno (provitamina A), flavonoides, polifenoles y algunos elementos traza (selenio, cobre, zinc y magnesio). Estos antioxidantes pueden funcionar como atrapadores o *scavengers* de radicales libres deteniendo las reacciones en cadena evitando de este modo daños a los tejidos biológicos importantes o como coenzima y cofactores de las enzimas antioxidantes del sistema endógeno.

TABLA N°: 2

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS Y NO ENZIMÁTICOS ⁽¹⁹⁾

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	UBICACIÓN CELULAR	PROPIEDADES ANTIOXIDANTES
Superóxidodismutasa	Mitocondria.	Eliminación de radical superóxido.
Catalasa	Citosol y mitocondria.	Remueve hidroperóxidos (H ₂ O ₂).
Glutatióperoxidasa	Citosol y mitocondria.	Remueve hidroperóxidos.
Glutatióreductasa	Citosol y mitocondria.	Reducción del glutatió oxidado.
ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	UBICACIÓN CELULAR	PROPIEDADES ANTIOXIDANTES
Vitamina C	Soluble en agua, localizado en el citosol.	Neutraliza una amplia variedad de ROS en fase acuosa, regenera la vitamina E.
Vitamina E	Compuestos fenólicos solubles en lípidos, localizados en membranas.	Principal antioxidante que disrumpe la cadena de peroxidación lipídica.
Ácido lipóico	Tiol endógeno, localizado tanto en la fase acuosa como en la fase lipídica.	Interviene en el reciclado de la vitamina C por ser buen sustituto de la GSH.
Ubiquinonas	Derivado de quinonas, soluble en lípidos; localizadas en membranas.	Las formas reducidas son antioxidantes eficientes.
Carotenoides	Soluble en lípidos, localizado principalmente en membranas.	Antioxidante, reduce la peroxidación lipídica.

1.2.4.1 ANTIOXIDANTES NATURALES

Las frutas y vegetales ayudan a reducir de manera considerable las enfermedades crónicas, como el cáncer o enfermedades cardiovasculares. Este efecto de protección ha sido asociado con una variedad de constituyentes nutrientes y no nutrientes, siendo mucho de ellos caracterizados por sus propiedades antioxidantes. ⁽³⁰⁾ Se trata además de productos que deben consumirse dentro de la dieta habitual para conseguir efectos beneficiosos que van más allá de los requerimientos tradicionales habituales. ⁽³⁰⁾

El alimento funcional se define: cualquier alimento en forma natural o procesada que, además de sus componentes nutritivos, contiene componentes adicionales que

favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona. El calificativo de funcional se relaciona con el concepto bromatológico de “propiedad funcional”, o sea la característica de un alimento, en virtud de sus componentes químicos y de los sistemas fisicoquímicos de su entorno, sin referencia a su valor nutritivo. ⁽³⁰⁾

Los polifenoles son micronutrientes abundantes en nuestra dieta y existen evidencias de su rol en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. ⁽¹¹⁾ Miles de moléculas que contienen la estructura de polifenoles (grupos hidroxilos en anillos aromáticos) han sido encontradas en plantas comestibles como en las hojas de *Achyrocline alata*. Estas moléculas son metabolitos secundarios de plantas y generalmente están envueltos en defensas contra la radiación ultravioleta y de la agresión de patógenos.

1.2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

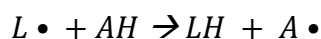
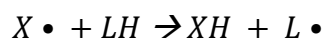
Se basa en comprobar como un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Dicha inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. ⁽¹⁴⁾

Existen diversos métodos para medir o determinar la capacidad antioxidante de un compuesto; estos difieren en el agente oxidante o sustrato que utilicen, en la medida del punto final, en la técnica de instrumentación utilizada y en las posibles interacciones con el medio de reacción. ⁽⁴¹⁾

Los antioxidantes pueden desactivar los radicales principalmente por dos mecanismos: ⁽¹⁶⁾

- **Transferencia de átomos de hidrogeno (HAT):** Mide la capacidad de un antioxidante para estabilizar un radical libre mediante la transferencia de átomos de hidrogeno. Como se muestra, un sustrato oxidable (LH) es atacado por un radical libre (X[•]) generando una especie no radicalaria (XH) y un nuevo radical libre (L[•]). Por su parte, en la segunda reacción se muestra como un antioxidante

(AH) transfiere un átomo de hidrogeno para estabilizar el radical libre ($L\cdot$) y generando la especie $A\cdot$.⁽⁴¹⁾



Básicamente compuesta de un generador sintético de radicales libres, una molécula oxidable y un antioxidante.

- **Transferencia de electrones individuales (ET):** Estos métodos determinan la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. Describen reacciones más lentas que las HAT, y por esto los cálculos de actividad antioxidante se basan en porcentaje de disminución en los productos más que en cinéticas de reacción. Implican una reacción redox con el antioxidante, como un indicador del punto final de la reacción.⁽⁴¹⁾

1.3 COMPUESTOS FENÓLICOS

Son un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividad, el término de compuestos fenólicos se refiere a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Estos se encuentran generalmente en plantas en forma de esterres o glucósidos.⁽¹¹⁾

Según su estructura química, estos compuestos se pueden subdividir en flavonoides o no flavonoides, según sean o no derivados de la estructura básica del fluoroglucinol, caracterizadas por un esqueleto de 2 anillos bencénicos unidas por una cadena de 3 átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado.⁽³⁷⁾

Se presenta en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los azuceres asociados a los polifenoles pueden ser

monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos glucorónicos y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y otros compuesto fenólicos.^{(25) (41)}

1.3.1 CLASIFICACIÓN GENERAL

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos, que a continuación describiremos:⁽²⁴⁾

NO FLAVONOIDES

- Fenoles no Carboxílicos: Fenoles simples. **Por ejemplo:** Catecol, Guaiacol y Floroglucinol.
- Ácidos Fenoles: Derivados del ácido benzoico C6-C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3. **Por ejemplo:** Ácido Gálico y Ácido Salicílico.

FLAVONOIDES (C6-C3-C6) *son los más comunes.*

Formados por 2 grupos bencénicos unidos a una cadena de tres átomos de carbono (difenílpropano C6-C3-C6).

- Antocianinas.
- Flavonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Taninos condensados y lignanos.

1.3.2 EFECTOS DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS

La característica principal de los compuestos fenólicos es su habilidad para bloquear la acción de enzimas específicas que acusan inflamación, modifican los pasos metabólicos de las prostaglandinas y por lo tanto protegen la aglomeración de plaquetas, inhiben la activación de carcinógenos, son antioxidantes y como tales atrapan radicales libres y previenen que estos se unan y dañen las moléculas de DNA, un paso crítico en la iniciación de procesos carcinogénicos, previenen la

peroxidación de lípidos, los cuales, siendo radicales libres pueden causar daño estructural a las células normales. El daño estructural en las membranas de las células normales interfiere con el transporte de molécula través de estas afectando el crecimiento y proliferación celular.⁽³⁸⁾

Sin embargo, la principal razón que ha hecho que el estudio de los compuestos fenólicos haya sido objeto de numerosas investigaciones en los últimos 15 años es su contribución a la mejora de la salud. En los últimos años se han acumulado evidencias de que algunos compuestos fenólicos ingeridos en la dieta habitual pueden reducir las incidencias de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cánceres. De hecho varias organizaciones internacionales del ámbito de la nutrición como la OMS, recomiendan un consumo diario de antioxidantes, como los compuestos fenólicos, principalmente a través de frutas y verduras, con el fin de prevenir o acentuar patologías asociadas al estrés oxidativo.⁽³⁹⁾

1.3.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS

El número y la posición de grupos hidroxilo, la glicosilación y otras sustituciones determinan la actividad de secuestro de radicales por los compuestos fenólicos. Las diferencias que existen entre la actividad de secuestro de radicales están atribuidas a las diferencias estructurales de hidroxilación, glicosilación y methoxilación.⁽⁴⁰⁾

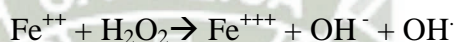
Las disposiciones estructurales que imparten mayor actividad antioxidante son la sustitución 3' y 4' orto dihidroxilo en el anillo "B", las disposiciones en posiciones meta en los carbonos 5' y 7' del anillo "A" y en combinación con los grupos ceto en posición 4' e hidroxilo en posición 3' de la cadena cíclica de tres átomos de carbonó. Los grupos orto-dihidroxilo estructuralmente son los más importantes por presentar una alta actividad.⁽⁴⁰⁾

Los antioxidantes naturales son principalmente compuestos fenólicos que pueden estar presentes en todas las partes de la planta. Compuestos fenólicos puede actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos.⁽²⁴⁾

a) COMO CAPTADORES DE RADICALES LIBRES: Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrogeno de un grupo hidroxilo

aromático a un radical libre, en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres; deteniendo las reacciones en cadena en la que estos están implicados. Al ceder ese átomo de hidrogeno se da lugar a la formación de un radical intermedio llamado radical fenoxilo. Este es menos reactivo dado a que se estabiliza por resonancia con los electrones “p” del anillo aromático.

- b) **COMO QUELANTES DE METALES:** Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos al anillo aromático. De este modo, los orto dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton.



Sin embargo, existen otros factores que afectan la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Así, el número y posición de grupos hidroxilo, la presencia de azucres y el grado de polimerización determinaran sus propiedades tales como la solubilidad y la tendencia a ceder electrones o átomos de hidrogeno.

El grado de polimerización de los compuestos fenólicos tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros.⁽²²⁾

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo durante los meses de Agosto a Enero 2014, en los Laboratorios (Proyecto Mercurio Pabellón H-202 y H-103) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica De Santa María.

2.2 MATERIALES

2.2.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado fue las hojas de *Achyrocline alata* DC. (Huira-Huira).

2.2.2 REACTIVOS QUÍMICOS

- Estándar de ácido ascórbico (Merck).
- Alcohol metílico P.A. (Induquímica S.R.).
- Reactivo de Follin-Ciocalteau P.A (Merck).

- Ácido gálico P.A (Sigma Aldrich).
- Carbonato de sodio P.A (Merck).
- Acetato de amonio (Merck).
- Acetato de etilo (Merck).
- Cloruro de cobre (II) (Merck).
- Neocuproína (Merck).
- Agua destilada.
- Hexano.
- N-butanol.

2.2.3 MATERIAL DE LABORATORIO

- Fiolas (5, 10, 25, 50 y 10mL) (Marca Kimax).
- Balones de vidrio de 200mL.
- Frascos ámbar tapa rosca.
- Micropipetas de 0-100 y 100-1000 μ L (Marca Transferpette).
- Papel Aluminio.
- Papel filtro (Marca Whatman).
- Pipetas de 0.5, 1, 2, 5 y 10mL (Marca Hirschmann).
- Probetas de 10 y 100mL.
- Tubos de ensayo con tapa.
- Vasos de precipitados de 10 y 100mL (Marca Pirex).
- Capilares de vidrio.
- Cuba de TLC.
- Placas de Silica Gel 60 F₂₅₄ (Marca Merck).

2.2.4 EQUIPOS

- Balanza analítica (Marca Ohaus Pioner TM).
- Equipo de extracción Soxhlet.
- Lámpara de Luz UV (Marca Camag).

- Cámara para Cromatografía de Capa Fina.
- Espectrofotómetro UV/V (Marca CARY60 UV-VIS, Agilent Technologies).
- Rotavapor (Marca Buchi).
- Agitador Vórtex Analog mixer.
- Refrigerador.
- Percolador.
- Cocina eléctrica.
- Baño maría.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se recolecto aproximadamente 4 kg de planta entera de *Achyrocline alata* “Huirá- Huirá” en horas de la mañana, a orillas del lago Titicaca - Pomata, departamento de Puno. **(Ver Anexo 4)**

Luego, se procedió a seleccionar las hojas y estabilizar el material vegetal a temperatura ambiente en un cuarto ventilado fuera del alcance del sol, luego de la desecación del material vegetal se procede a pulverizarlo para su conservación en un frasco de color ámbar.

Finalmente se separa una muestra representativa para su posterior identificación taxonómica en el laboratorio de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa “HERBARIUM AREQUIPENSE”. **(Ver Anexo 5)**

2.3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

El proceso de extracción es un método que se realiza con el fin de obtener los principios activos o metabolitos secundarios de la planta. La extracción únicamente separa las sustancias que pueden ser disueltas en un líquido o una mezcla de líquidos conocidos como solventes o líquidos extractores. Se obtuvo extractos con el solvente metanol mediante dos métodos de extracción por Soxhlet y percolación, las cuales se hicieron por triplicado para determinar el

rendimiento después de su desecación verificando la reproductibilidad del procedimiento. El porcentaje de rendimiento se determinó por diferencia de pesada.

2.3.2.1 EXTRACTO METANOLICO

2.3.2.1.1 MÉTODO 1: SISTEMA SOXHLET

Se obtuvo extractos con el solvente metanol por el método de Soxhlet, las cuales se hicieron por triplicado para determinar el rendimiento después de su desecación verificando la reproductibilidad del procedimiento.

2.3.2.1.1.1 FUNDAMENTO

Este método se fundamenta en la extracción por agotamiento de sustancias activas de la planta usando sustancias volátiles. Este sistema de extracción sólido – líquido se realiza en un aparato que consta de un balón de fondo plano, un cuerpo extractor y un refrigerante. En el cuerpo extractor se coloca la materia prima, generalmente envuelta en un material poroso que permita el contacto con el disolvente. En el balón se coloca el solvente, se lleva a ebullición y los vapores del solvente ascienden por el tubo lateral y llegan al refrigerante donde condensan y caen sobre la materia prima situada en el cuerpo extractor del Soxhlet. Cuando el cuerpo extractor se llena de líquido extractivo, éste se vacía por el sifón lateral interno y desemboca en el balón inferior. El solvente se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se van concentrando en el matraz inferior.⁽⁴⁵⁾

2.3.2.1.1.2 PROCEDIMIENTO

Se pesó 10 g de las hojas de “Huirá-Huirá” previamente estabilizadas, pulverizadas y luego se procedió a envolver con papel filtro formando pequeños paquetes que luego fue colocado al cuerpo extractor del Soxhlet. En el balón se colocaron 150 mL del solvente en este caso metanol, se llevó a baño maría controlando que la temperatura no excediera el punto de ebullición del solvente.

El disolvente llega hasta su punto de ebullición, ascendiendo por el tubo lateral al estado gaseoso para luego llegar hasta el refrigerante, donde se condensa y cae hasta ponerse en contacto con la muestra (paquete de papel filtro con 10 g de *Achyrocline alta DC.*), cubriendo el disolvente toda la muestra, una vez que el disolvente alcance el nivel del tubo lateral interno desciende por el mismo en este momento las sustancias activas extraídas por el disolvente caen al balón que inicialmente contenían el solvente puro, este procedimiento se repite cuantas veces fueran necesarias, con el fin de extraer la mayor cantidad de sustancias activas que contiene la planta. (Ver Figura N° 2)

FIGURA N°: 2
EXTRACCIÓN- MÉTODO SOXHLET



FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

Después de transcurrido el tiempo establecido para la extracción, se obtuvo el extracto, recuperando un volumen de extracto igual al volumen de solvente, que se añadió a la muestra en un principio. En seguida se elimina el solvente presente en el extracto, llevándolo primero al equipo de rotavapor (Ver Figura N° 3) y luego a baño maría hasta eliminar completamente el solvente y así poder

calcular el porcentaje de rendimiento. Finalmente, una vez obtenida el dato del peso del extracto seco, se vuelve a reconstituir el extracto con 10 mL del solvente metanol para su posterior análisis la cual se recolecto en un frasco ámbar y se almaceno bajo refrigeración.

FIGURA N°: 3

ELIMINACIÓN DEL SOLVENTE POR ROTAVAPOR.



FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

2.3.2.1.2 MÉTODO 2: SISTEMA PERCOLACION

2.3.2.1.2.1 FUNDAMENTO

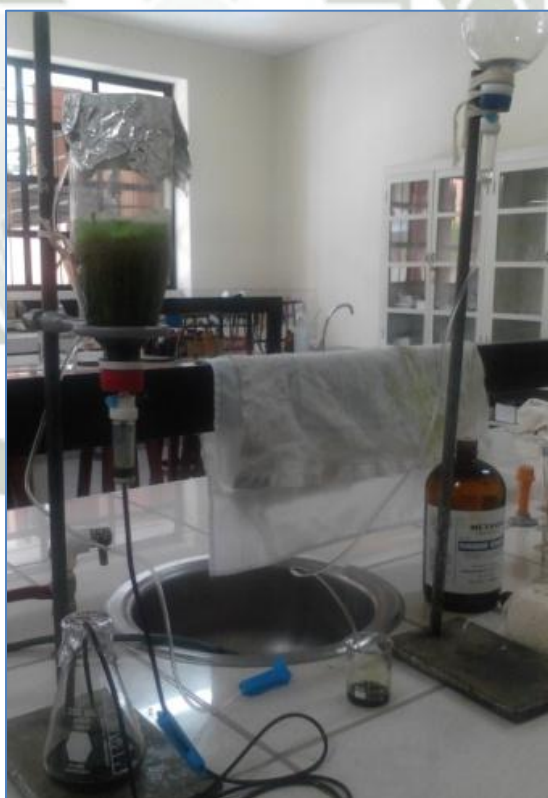
Conocido sistema de extracción sólido – líquido.

En este método se utiliza un equipo llamado lixiviador o percolador, que es equivalente a un embudo de decantación, en el cual se coloca el material vegetal pulverizado en una cantidad adecuada, para luego proceder a humectarlo con el solvente extractor. La operación anterior se realiza con la llave de salida cerrada. Luego de la humectación se efectúa la elusión del solvente extractor, para lo cual se necesita una alimentación continua de solvente por la parte superior, la cual debe ser graduada con la llave de salida.⁽⁴⁷⁾

2.3.2.1.2.2 PROCEDIMIENTO

Se pesó 40 g de material vegetal pulverizado, previamente estabilizadas y pulverizadas. En una botella equivalente a un embudo de decantación, se colocó una torunda de algodón en la punta y se procedió al llenado con 40 g de material vegetal pulverizado. Después se colocó papel filtro en la parte superior. Luego con la llave cerrada se agregó el solvente en este caso metanol hasta que todo el material vegetal pulverizado se encuentre humectado, obteniendo un sobrenadante de 2 cm. Se dejó reposar por 2 horas y se procedió a agregar solvente por goteo por la parte superior y recibir el extracto de la parte inferior a la misma velocidad de goteo (20 a 25 gotas/minuto). Finalmente se recibió el extracto hasta un volumen de 200 mL. (Ver Figura N° 4)

FIGURA N°: 4
EXTRACCIÓN- MÉTODO PERCOLACIÓN.



FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

Después de transcurrido el tiempo establecido para la extracción, se obtuvo el extracto. En seguida se elimina el solvente presente en el extracto, llevándolo primero al rotavapor (equipo) y luego a baño maría hasta eliminar completamente el solvente y así poder calcular el porcentaje de rendimiento. Finalmente, una vez obtenida el dato del peso del extracto seco, se vuelve a reconstituir el extracto con 40 mL del solvente metanol para su posterior análisis la cual se recolecto en un frasco ámbar y se almaceno bajo refrigeración.

2.4 MÉTODO GRAVIMÉTRICO: DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO

2.4.1 FUNDAMENTO

La determinación del porcentaje de sólidos solubles conocido como % RE (de porcentaje de rendimiento de extracción) se basa en el método gravimétrico. El cuál consiste en la determinación de la diferencia de peso al evaporar todo el solvente del extracto obtenido. Este método utiliza dos datos experimentales como el peso de la muestra propiamente dicha y el peso del solido obtenido a partir de la muestra.

2.4.2 PROCEDIMIENTO

Se tomó los extractos metanólicos obtenidos por los dos métodos de extracción (Soxhlet y percolación), se colocó en un balón para su evaporación mediante el equipo de rotavapor, seguidamente se procedió a su evaporación por sequedad en un vaso de vidrio previamente tarado, para luego ser llevado a baño maría a una temperatura de 65°C para la evaporación del solvente hasta la aparición del residuo con peso constante, al término del cual se procedió a determinar el porcentaje de rendimiento de los extractos secos.

El porcentaje de rendimiento del extracto se calcula de la siguiente manera:

$$\%ES = \frac{PF}{PI} \times 100$$

Dónde:

Pi = Peso inicial

Pf = Peso final

% ES = Porcentaje de extracto seco.

2.5 FRACCIONAMIENTO

Método que consiste en la separación de fracciones o grupo de constituyentes de un extracto total por afinidad en diferentes solventes.

En un vaso de precipitado se colocó una cantidad de extracto metanólico seco equivalente a 10 g de material vegetal, donde se disolvieron con 15 mL de agua destilada. Seguidamente se colocó en una pera de decantación, a partir de ello se procedió a fraccionar por extracción con solventes no miscibles en agua, teniendo en cuenta su polaridad, empezando con el solvente de menor polaridad hasta llegar al de mayor polaridad (hexano, acetato de etilo y n- butanol).

En primer lugar, se tomaron 15 mL de hexano que se adicionaron a la pera de decantación, se agito fuertemente durante un tiempo prudente, para luego dejar reposar por 20 min y retirar la fase superior de hexano.

En segundo lugar, se midieron 15 mL de acetato de etilo y n-butanol sucesivamente, teniendo en consideración tomar las fases superiores de acetato de etilo y n-butanol.

Finalmente las tres fracciones fueron guardadas en frascos de vidrio de color ámbar en un lugar fresco para su posterior análisis.

2.6 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

Cromatografía en capa fina, o también llamada “Thin Layer Chromatography (TLC)”, es una de las técnicas más utilizadas para la separación, identificación y purificación de sustancias químicas.

2.6.1 FUNDAMENTO

En la cromatografía de capa fina, la muestra se desplaza con una fase móvil que es un líquido. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria de gel de sílice o alúmina con la que es inmisible, y que se fija a una superficie sólida como una lámina de vidrio, plástico o aluminio. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto. Entre la fase móvil y la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, la cual sube a lo largo de la fase sólida por capilaridad, por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativamente. ⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾

2.6.2 PROCEDIMIENTO

- Como fase estacionaria (FE) se emplearon placas de Silica gel (60F con marcador fluorescencia a una longitud de onda de 254 nm) y medidas de 20 x 20 cm. de una placa entera de Sílica gel se dividieron 20 plaquitas de 2 x 10 cm, en cada una de ellas se trazaron una línea horizontal de 1cm del borde inferior u origen y 1 cm del borde superior.
- Se tomaron como muestras los 3 extractos (hexano, acetato de etilo y n-butanol), para identificar las sustancias presentes en el fraccionamiento.
- Se procedió a aplicar los extractos sobre la línea del borde inferior con la ayuda de capilares, se dejó secar durante el tiempo necesario para una mejor migración de las sustancias presentes en los extractos.
- Se prepararon las fases móviles correspondientes cubriendo el fondo de la cuba de desarrollo.

- Se introdujo la placa al sistema en forma vertical y en contacto con la fase móvil, de forma que el disolvente no toque la línea horizontal inferior donde se colocó los extractos.
- Se hizo desarrollar el cromatograma hasta que la fase móvil llegó a la línea horizontal superior marcada anteriormente.
- Se retiró la placa para dejarla secar durante 30 minutos aproximadamente y se observó a la luz UV/V a 254 nm, procediéndose a marcar cuidadosamente las manchas donde se podía visualizar un componente de la muestra.
- Finalmente, se aplicó sobre el cromatograma el revelador apropiado.

2.6.3 FACTOR DE RETRASO

La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el centro de la mancha, los cálculos se simplifican si el denominador es 10. Para que los R_f sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de R_f que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un R_f entre 0.55 y 0.7. Téngase en cuenta que si las manchas no son simétricas la medición se basa en la posición de intensidad máxima. ⁽⁵¹⁾⁽⁴⁹⁾

El parámetro característico para cada soluto está dado por el R_f :

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

2.6.4 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Para la **identificación de taninos** por cromatografía de capa fina se utilizó como fase móvil, metanol: agua (9:1) y revelador FeCl_3 al 1% en etanol, pudiendo dar un color azul negruzco en caso se trate de taninos pirogalotaninos o color verde en caso se trate de taninos condensados. ⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾

Para la **identificación de flavonoides** por cromatografía de capa fina se utilizó como fase móvil, acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (10:1.1:1.1:2.6) y revelador AlCl_3 al 1% en etanol, pudiéndose observar fluorescencia amarilla y azules a luz UV a 366 nm. ⁽⁴⁵⁾⁽⁵⁰⁾

Para la **identificación de cumarinas** por cromatografía en capa fina se utiliza como fase móvil, tolueno: éter (10:10) saturado con 10 % de ácido acético y lo más usual para reconocer cumarinas, es por la fluorescencia que ellas desarrollan a luz UV a 366 nm, si presentan fluorescencia púrpura se trata de alcoxycumarinas, fluorescencia celeste en caso se trate de hidroxycumarinas o fluorescencia amarilla opaca u ocre en caso se trate de furanocumarinas los cuales el color que presentan las furanocumarinas pueden ser intensificadas con el revelador KOH al 5% en etanol. ⁽⁵⁰⁾⁽⁴⁷⁾

Para la **identificación de alcaloides** por cromatografía en capa fina se utiliza como fase móvil, acetato de etilo: metanol: agua (10:1.35:1) que es adecuado como sistema de screening para muchos alcaloides y revelador Dragendorff, si hay presencia de alcaloides se evidenciara manchas de color marrón o anaranjado intenso. ⁽⁴⁵⁾

Para la **identificación de saponinas** por cromatografía en capa fina se utiliza como fase móvil, acetato de etilo: metanol: agua (10: 13.5:11) y revelador de Liebermann- Burchard, si presenta manchas azul-verdosas se trataría de saponinas esteroídicas o si presenta manchas rosada púrpura se trataría de la presencia de saponinas triterpénicas. ⁽⁴³⁾⁽⁵⁰⁾

2.7 . DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT)

Para la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT), se utilizó el ensayo Folin-Ciocalteu.

2.7.1 METODO DE FOLIN- CIOCALTEU

Este reactivo consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{10}$) y de ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que se reduce; por oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). La coloración azul producida posee una absorción máxima aproximadamente a los 760 nm y es proporcional a las tasas de compuestos fenólicos, y se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico o catequinas. Por lo tanto, la respuesta de este análisis depende de la cantidad de fenoles presentes en el extracto obtenido. ⁽⁴¹⁾

2.7.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Para la determinación de compuestos fenólicos totales por el método de Folin - Ciocalteu:

- Primero, se preparó la solución de carbonato de sodio al 20 %: Se pesó 5 g de carbonato de sodio y se disolvió en 25 mL de agua destilada.
- Segundo, se preparó una solución madre de ácido gálico de 1000 ppm: Pesar 0.005 g de ácido gálico, transferirlo a una fiola de 5 mL, disolver y diluir con agua destilada. A partir de la solución madre, se preparó 05 diluciones de diferentes concentraciones en un rango entre 02-100 ppm siguiendo la ecuación de dilución.

$$C \times V = C' \times V'$$

$$1000 \frac{mg}{L} \times V = 2 \frac{mg}{L} \times 0.01 L$$

$$V = 0.02 mL = 20 \mu L$$

En la **Tabla N° 3** se muestra los volúmenes utilizados para preparar las 05 diluciones a partir de la solución madre de ácido gálico de 1000 ppm, las cuales

fueron llevadas a fioas de 10 mL para de ahí partir a obtener la curva estándar de ácido gálico.

TABLA N°: 3

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR DE ÁCIDO GÁLICO.

Concentración de ácido gálico (mg/L)	Solución patrón de ácido gálico 1000 ppm (µL)
2 ppm	20
4 ppm	40
6 ppm	60
8 ppm	80
10 ppm	100

FUENTE: Elaboración propia, 2014

En la **Tabla N° 4** se muestra los volúmenes utilizados para la preparación de la curva de calibración. Finalmente esta mezcla se dejó reaccionar por 2 horas en la oscuridad. Se preparó un blanco el cual sirvió para ajustar la absorbancia a cero.

TABLA N°: 4

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁC. GÁLICO

N° Patrón	Blanco	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5
Concentración de ácido gálico (mg/L).	0	2	4	6	8	10
Solución patrón de ácido gálico 1000 ppm (mL).	0	1	1	1	1	1
Reactivo de Folin-Ciocalteu (µL).	250	250	250	250	250	250
Agua destilada (mL)	4	4	4	4	4	4
Carbonato de sodio al 20% (mL).	2	2	2	2	2	2
Volumen final de los tubos de ensayo (mL).	7.25	7.25	7.25	7.25	7.25	7.25

FUENTE: Elaboración propia, 2014

Finalmente, se procedió a medir las absorbancias a 760 nm en el espectrofotómetro. Se trazó la absorbancia contra la concentración para obtener la curva estándar.

Para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos en las muestras obtenidos por los dos métodos de extracción (Soxhlet y percolación), se hizo el mismo procedimiento de la **Tabla N° 4**, donde en lugar de adicionar ácido gálico se utiliza el extracto de la muestra, utilizando 0.5 mL de una dilución de 500 μ L en 50 mL de agua destilada. Estas fueron leídas en el espectrofotómetro contra un blanco a 760 nm, previa exposición a una temperatura ambiente y en oscuridad por 2 horas.

2.7.3 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El contenido de los compuestos fenólicos totales, fueron expresados como miligramos (mg) de ácido gálico equivalente (GAE)/100 g de extracto de *Achyrocline alata* DC.

- Despejamos x de la ecuación de la recta de ácido gálico:

$$Y = B X + A$$
$$X = \frac{mg}{L} = \frac{mg}{mL} (C1)$$

- Se despeja C2 de la siguiente relación con respecto a las diluciones hechas previamente:

$$C1 V1 = C2 V2$$
$$C2 = \frac{C1 V1}{V2}$$

Dónde:

- C1=X= Concentración de compuestos fenólicos en el volumen total del matraz aforado.
- V1= Volumen total en matraz aforado.

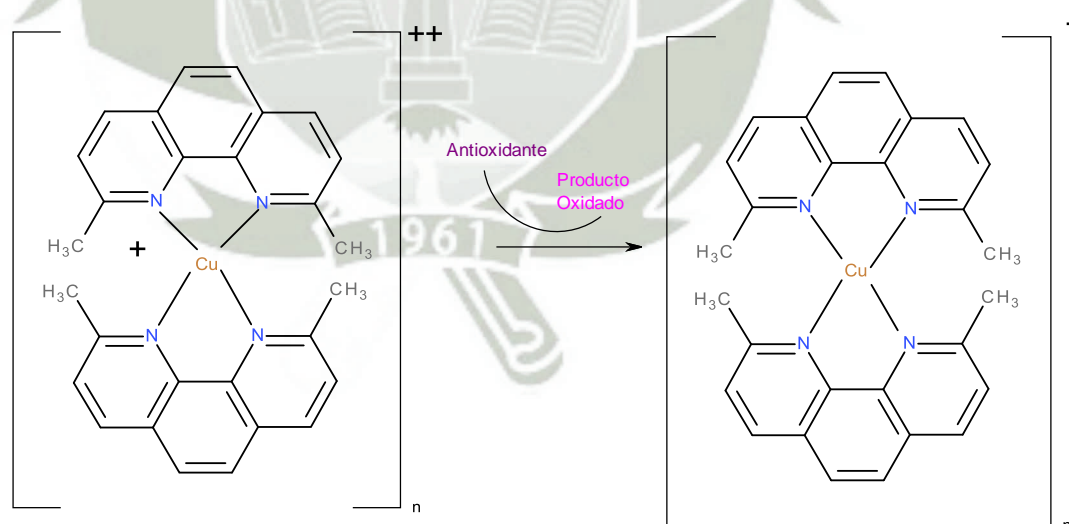
- V_2 = Volumen de extracto empleado.
- C_2 = Concentración de compuestos fenólicos en el volumen de extracto empleado.

2.8 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Existen diversos métodos que permiten evaluar la capacidad antioxidante de muestras naturales o sintéticas. Se ha elegido el método CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*).

2.8.1 MÉTODO CUPRAC (ION CÚPRICO REDUCCIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE)

Este método utiliza Cu^{+2} y la Neocuproína para reaccionar con el compuesto en estudio formando un quelato coloreado de Cu^{+1} : $[\text{Cu-Nc}_2]^{+1}$, el cual es soluble en agua y en medios orgánicos. Esta relación se lleva a cabo a pH 7, controlado por el buffer acetato de amonio. El quelato formado con el cobre reducido es medido a 450 nm. Normalmente, la formación de este complejo se completa en 30 min. Sin embargo, antioxidante de reacción lenta necesitan de incubación a temperatura elevada para completar su oxidación (50 °C por 20 min).⁽⁴²⁾



El método CUPRAC presenta ventajas sobre otros métodos para evaluar la capacidad antioxidante:⁽³¹⁾

El reactivo CUPRAC es lo suficiente rápido para oxidar antioxidantes que otros métodos no detectan, como son los antioxidantes que poseen grupos tioles.

El reactivo CUPRAC usado para la lectura de los resultados está disponible en la mayoría de los laboratorios.

La reacción redox que da lugar al complejo coloreado de Cu^{+1} es relativamente insensible a parámetros adversos con el aire, luz solar, tipo de solvente y pH, los cuales afectan a reactivos como DPPH.

Las gráficas de concentración vs. absorbancias del método CUPRAC son perfectamente lineales dentro de un amplio rango de concentración, a diferencia de otros métodos que generan curvas polinomiales.

Los valores de actividad antioxidante total (TAC) encontrados por el CUPRAC son perfectamente aditivos. Por ejemplo: la TAC de una mezcla polifenólica es igual a la suma de la TAC de sus constituyentes fenólicos.

Este método involucra una mínima preparación de muestra, por lo que el procedimiento experimental es flexible para la automatización.

La reacción redox se lleva a cabo con un pH cercano al fisiológico y a los protones liberados son tamponados por el buffer acetato de amonio.

El método puede medir simultáneamente antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

Dado que el ion Cu^{+1} producido como producto de la reacción redox está en estado quelado [$\text{Cu}^{+1}\text{-Nc}$], no puede actuar como un pro-oxidante, por lo tanto no se podría producir un error negativo en la determinación antioxidante por efectos del Cu^{+1} .

Reactivos a preparar:

- Acetato de Amonio: Solución Buffer 1M a pH 7.
- Neocuproína: Solución 7.5×10^{-3} M en Etanol.
- Cloruro de Cobre Dihidratado: Solución $1,2 \times 10^{-2}$ M en Agua.
- Ácido Ascórbico: Solución Stock 2.0×10^{-4} M en Etanol.

2.8.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Se dispuso de 05 tubos a los cuales se les añadió cada uno de las siguientes soluciones en el orden a mencionar; 1 mL de Buffer Acetato de Amonio, 1 mL de Neocuproína, 1 mL de CuCl_2 , Ácido Ascórbico 0.25 mL, 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL, 2 mL, con excepción del blanco, finalmente se agregara agua destilada 2 mL, 1.75 mL, 1.5 mL, 1 mL, 0.5 mL, excepto al tubo número 05. (**Tabla N° 5**)

Posteriormente fueron mezcladas y dejadas en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad, y fueron leídas en el espectrofotómetro a 450 nm.

TABLA N°: 5
PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

	Blanco	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5
Buffer Acetato (mL)	1	1	1	1	1	1
Neocuproína (mL)	1	1	1	1	1	1
CuCl_2 (mL)	1	1	1	1	1	1
Ácido Ascórbico (mL)	-	0.25	0.5	1	1.5	2
Agua destilada (mL)	2	1.75	1.5	1	0.5	-

FUENTE: Elaboración propia, 2014.

Para proceder a determinar la capacidad antioxidante de las muestras obtenidos por los dos métodos de extracción (Soxhlet y percolación), se hizo el mismo procedimiento de la **Tabla N° 5**, donde en lugar de adicionar ácido ascórbico se utiliza el extracto de la muestra, utilizando 1.5 mL de una dilución de 500 μL en 50 mL de agua destilada.

Estas fueron leídas en el espectrofotómetro contra un blanco a 450 nm previa exposición a una temperatura ambiente y en oscuridad por 30 minutos.

2.8.3 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados serán expresados como la Capacidad Antioxidante Equivalente de Ácido Ascórbico (AAEAC), que se reporta como μmol de ácido ascórbico por gramo de sustancia.

En primer lugar, se construye una gráfica de calibración de ácido ascórbico, con las respuestas ploteadas en el eje Y, y las concentraciones de ácido ascórbico en el eje X. Se calcula la ecuación de regresión lineal para la gráfica de calibración obtenida:

$$Y = a + b(X)$$

Dónde:

- Despejamos x de la ecuación de la recta de ácido gálico:

$$Y = B X + A$$
$$X = (C1)$$

- Se despeja C2 de la siguiente relación con respecto a la diluciones realizadas:

$$C1 V1 = C2 V2$$
$$C2 = \frac{C1 V1}{V2}$$

Dónde:

- $C1 = X =$ Concentración de μM ácido ascórbico en el volumen total del matraz aforado.
- $V1 =$ Volumen total en matraz aforado.
- $V2 =$ Volumen de extracto empleado.
- $C2 =$ Concentración de μM ácido ascórbico en el volumen de extracto empleado.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RECOLECCIÓN

La planta entera de *Achyrocline alata* DC. fue recolectada de su habita natural ubicada a orillas del lago Titicaca (3812 msnm) en las cercanías de Pomata, que es uno de los 7 distritos que conforma la provincia de Chucuito, ubicada en el departamento de Puno en el sudeste de Perú. (Ver Figura N° 5)

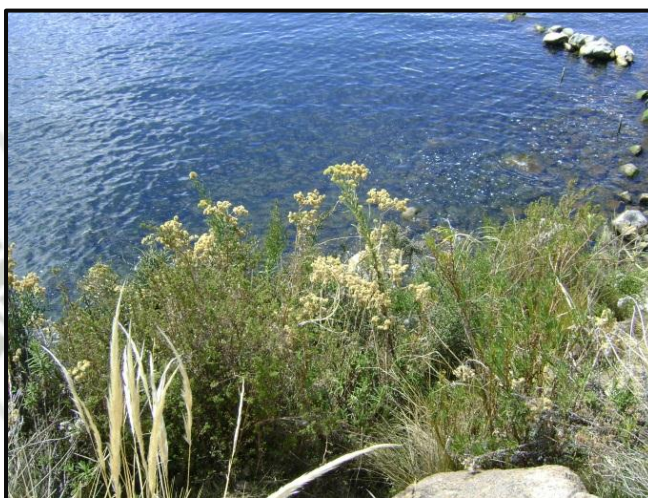
La cantidad de planta entera recolectada fue aproximadamente de 4 kg, en el mes de agosto en horas de la mañana, y transportada en cajas de madera al distrito de Juliaca donde se procedió a seleccionar y limpiar las hojas con un escobillón eliminando los materiales extraños presentes en las hojas, ya que en el envés de las hojas presentan pelusas blanquecinas.

Una vez seleccionadas las hojas se procedió a estabilizar sobre papeles kraf en forma de bandejas a temperatura ambiente en un cuarto ventilado fuera del alcance del sol durante un mes y medio. Finalmente se procedió a pulverizar las hojas para poder guardarlo en un frasco ámbar en un lugar fresco libre de humedad y ser fácilmente transportado hasta la ciudad de Arequipa para realizar el presente estudio en la Universidad Católica de Santa María.

Para la identificación de la especie en estudio se envió una muestra representativa de la planta entera al laboratorio de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias “HERBARIUM AREQUIPENSE”, donde certificó que dicha especie pertenece a *Achyrocline alata* DC. (**Anexo 5**)

FIGURA N°: 5

ORILLAS DEL LAGO TITICACA, POMATA, “HUIRA- HUIRA”



FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Para la identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta “Huirá- Huirá” por cromatografía en capa fina se realizó extracciones por triplicado bajo las mismas condiciones, para lo cual se empleó el método de extracción por Soxhlet utilizando como solvente el metanol.

Finalmente para evaluar la capacidad antioxidante y la determinación de compuestos fenólicos totales por el método de *CUPRAC* y *FOLIN-CIOCALTEU* respectivamente, se realizó extracciones para lo cual se empleó dos métodos de extracción continua como el Soxhlet y percolación del mismo modo utilizando como solvente el metanol.

2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

2.1.1 EXTRACTO METANOLICO OBTENIDO POR EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOXHLET

Para la obtención de los extractos metanólicos por el método de Soxhlet se realizó 3 veces en las mismas condiciones durante 3 días consecutivos de manera independiente, en la que se utilizó 10 g de material vegetal pulverizado, que fue empaquetada en papel filtro para luego ser introducido en el equipo de digestión continua (Soxhlet), en el balón se colocó 150 mL de metanol como menstruo, la extracción hasta el agotamiento de la muestra duro un aproximado de 5 horas, obteniéndose al final un extracto metanólico de color verde intenso debido a la presencia de pigmentos como la clorofila que se ha extraído con el solvente metanol.

Para la obtención del extracto seco se llevó el extracto metanólico al rotavapor a una temperatura de 65°C (punto de ebullición del metanol) hasta obtener un volumen aproximado de 30 mL el cual posteriormente se transfirió a un vaso previamente tarado para llevarlo a baño maría para su desecación completa a peso constante y así poder calcular el porcentaje de rendimiento de cada una de las extracciones. (Tabla N° 6)

TABLA N°: 6

PORCENTAJES DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS SECO DE LAS HOJAS DE “HUIRA-HUIRA”. OBTENIDOS POR EL MÉTODO SOXHLET.

Peso del extracto (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
3.0804	30.90
2.7901	27.90
2.9532	29.53
Promedio	29.41

FUENTE: Elaboración propia, 2014

2.1.2 EXTRACTO METANOLICO OBTENIDO POR PERCOLACIÓN

Para la obtención de los extractos metanólicos por el método de percolación se realizó 3 veces en las mismas condiciones durante 3 días consecutivos de manera independiente, en la que se utilizó 40 g de material vegetal pulverizado, que fue introducido en el percolador donde se colocó una torunda de algodón en la punta. Luego con la llave cerrada se agregó metanol hasta que todo el material vegetal se encuentre humectado, obteniendo un sobrenadante de 2 cm. Se dejó reposar el material vegetal por 2 horas, transcurrido las 2 horas se procedió a agregar solvente por goteo por la parte superior y recibir el extracto por la parte inferior a la misma velocidad de goteo 25 gotas/minuto, hasta obtener un volumen de extracto de 200 mL. Finalmente se obtuvo un extracto metanólico de color verde intenso debido a la presencia de pigmentos como la clorofila que se ha extraído con el solvente metanol.

El proceso de extracción por el método de percolación duro un aproximado de 5 horas, incluido con las dos horas de humectación sería un total de 7 horas.

Para la obtención del extracto seco se llevó este al rotavapor a una temperatura de 65°C (punto de ebullición del metanol) hasta obtener un volumen aproximado de 30 mL el cual posteriormente se transfirió a un vaso previamente tarado para llevarlo a baño maría para su desecación completa a peso constante y así poder calcular el porcentaje de rendimiento de cada una de las extracciones trabajadas de manera independiente y bajo las mismas condiciones. (**Tabla N° 7**)

En la **Figura N° 6**, se muestra el valor promedio de los porcentajes de rendimiento de los extractos obtenidos por los métodos de extracción de Soxhlet y percolación, siendo de 29.41 % y 19.72 % respectivamente.

2.1.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ingresó los datos de % de rendimientos de los dos métodos de extracción (Soxhlet y percolación) en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel el cual se realizó una prueba T-Student para medias de las muestras emparejadas donde se obtuvo los siguientes resultados. (**ANEXO 1**)

Realizada la prueba T-Student, dio como resultado de que existe diferencia estadísticamente significativa, por lo que se rechaza la hipótesis nula lo que significa que las diferencias entre los % de rendimiento de ambos métodos de extracción (Soxhlet y percolación) son estadísticamente significativas.

TABLA N°: 7

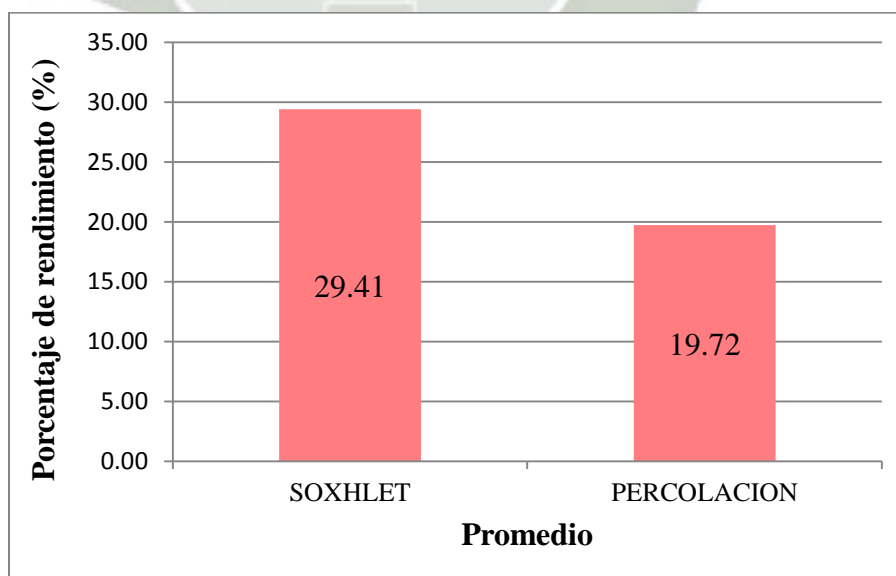
PORCENTAJES DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS SECO DE LAS HOJAS DE “HUIRA-HUIRA”. OBTENIDOS POR EL MÉTODO PERCOLACIÓN.

Peso del extracto (g.)	Porcentaje de rendimiento (%)
7,7906	19.48
7,8761	19.69
8,0002	20.00
Promedio	19.72

FUENTE: Elaboración propia, 2014.

FIGURA N°: 6

PORCENTAJES PROMEDIOS DE RENDIMIENTOS DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE *Achyrocline alata* DC.



FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

3. FRACCIONAMIENTO

Para la identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Achyrocline alata* DC. por cromatografía de capa fina se procedió a realizar fraccionamientos a partir del extracto metanólico obtenido por el método de extracción Soxhlet, las cuales nos ayuda a separar en fracciones o grupos de constituyentes de un extracto total por afinidad en diferentes solventes.

Se pesó 2.7901 g de extracto metanólico seco equivalente a 10 g de material vegetal, a partir de ello se procedió al fraccionamiento con solventes no miscibles en agua (hexano, acetato de etilo y n-butanol), para lo cual se procedió a agregar agua destilada al extracto metanólico seco con un total de 15 mL de agua con ayuda de un poco de fuego para ayudar a su solubilización, una vez que la fracción acuosa esté en la pera de decantación se agrega primero 8 mL de hexano la cual se agito fuertemente durante un tiempo prudente, se espera 20 min hasta observar la división de dos fases y se retira la fase superior de hexano con la ayuda de una pipeta y la dicha fracción se guarda en un vial de color ámbar, seguidamente se agregara por segunda vez 7 mL de hexano a la pera de decantación se agita y esperamos su separación y de nuevo sacamos con la ayuda de una pipeta la fase de hexano, de la misma manera se trabajó para la obtención de las fracciones acetato de etilo y hexano, tomando siempre las fases superior y finalmente dichas fracciones se conservaran en viales de color ámbar para su posterior análisis en cromatografía en capa fina.

Una vez obtenido las 3 fracciones (hexano, acetato de etilo y n- butanol) se pudo observar que la *fracción hexano* fue de color verde oscuro, ya que en esta fracción se solubilizaron los compuestos apolares como resinas, grasas, pigmentos (entre ellos la clorofila, de allí el color verde oscuro que tenía esta fracción), algunos compuestos esteroides, terpenoides, aceites volátiles, agliconas y sustancias no polares en general y el *fracción acetato de etilo* se observó un color verde claro, en esta se solubilizaron compuestos más o menos polares, que no lo hicieron en la fracción hexano y en la *fracción n-butanol* fue de un color verde más claro a la que se puedo observar en la fracción acetato de

etilo, en esta fracción se solubilizaron los compuestos polares, tales como taninos, glicósidos flavonólicos, polifenoles, glicósidos saponínicos.

Estas tres fracciones son utilizadas para la identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina, lo cual permiten la separación de los componentes de la planta extraídos por el metanol. Todo esto se visualizara más adelante en la cromatografía en capa fina.

4. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Se realizó la cromatografía en capa fina, con la finalidad de identificar algunos de los principales grupos de metanolitos secundarios que serias los posibles responsables del efecto antioxidante.

IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Primeramente se preparó la fase móvil, acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (10: 1.1: 1.1: 2.6), se transfirió y se dejó saturar dicha mezcla en la cuba cromatográfica, mientras tanto se procedió a sembrar las fracciones (hexano, acetato de etilo y n-butanol) en placas individuales de 2 x 10 cm, se dejan secar por unos minutos una vez sembradas, seguidamente se introdujo las placas a las cubas donde se encuentra la fase móvil, se deja ascender por capilaridad fase móvil hasta la línea superior marcada de la placa de sílica gel, se sacaron las placas de las cubas y se dejan secar, una vez secas las placas se revelaron con AlCl_3 al 1% en etanol donde se observó bajo luz UV a 366 nm, la separación de los componentes presentes en cada una de las fracciones evidenciándose manchas azul y amarillas. (Ver Figura N° 7) Se observa que en las fracciones n-butanol y acetato de etilo presentan gran similitud en sus componentes pues en ambos se revelaron 6 componentes que presentaron un color similar. En la fracción de hexano se observó 2 manchas de color azul a los que se evidencio tanto en la fracción n-butanol y acetato de etilo.

Según investigaciones realizadas en la tesis sobre el “Efecto Antioxidante in vitro de la *Cynara scolymus L.* (Alcachofa)” y teóricamente mencionados en el

atlas titulado “Plant Drug Analysis” cuyos autores son H. Wagner y S. Bladt, se puede decir que probablemente las manchas azul con Rfs 0.9, 0.51 Y 0.8 se traten de la presencia de componentes como ácidos fenólicos (ácido cafeíco, ácido clorogénico y ácido isoclorogenico respectivamente). **(Ver Tabla N° 8)** Las dos manchas amarillas restantes probablemente se traten de flavonoides (rutina con Rf de 0.41 y hiperoside con Rf 0.62) según bibliografía revisadas del atlas titulado “Plant Drug Analysis” donde utilizan la misma fase móvil.

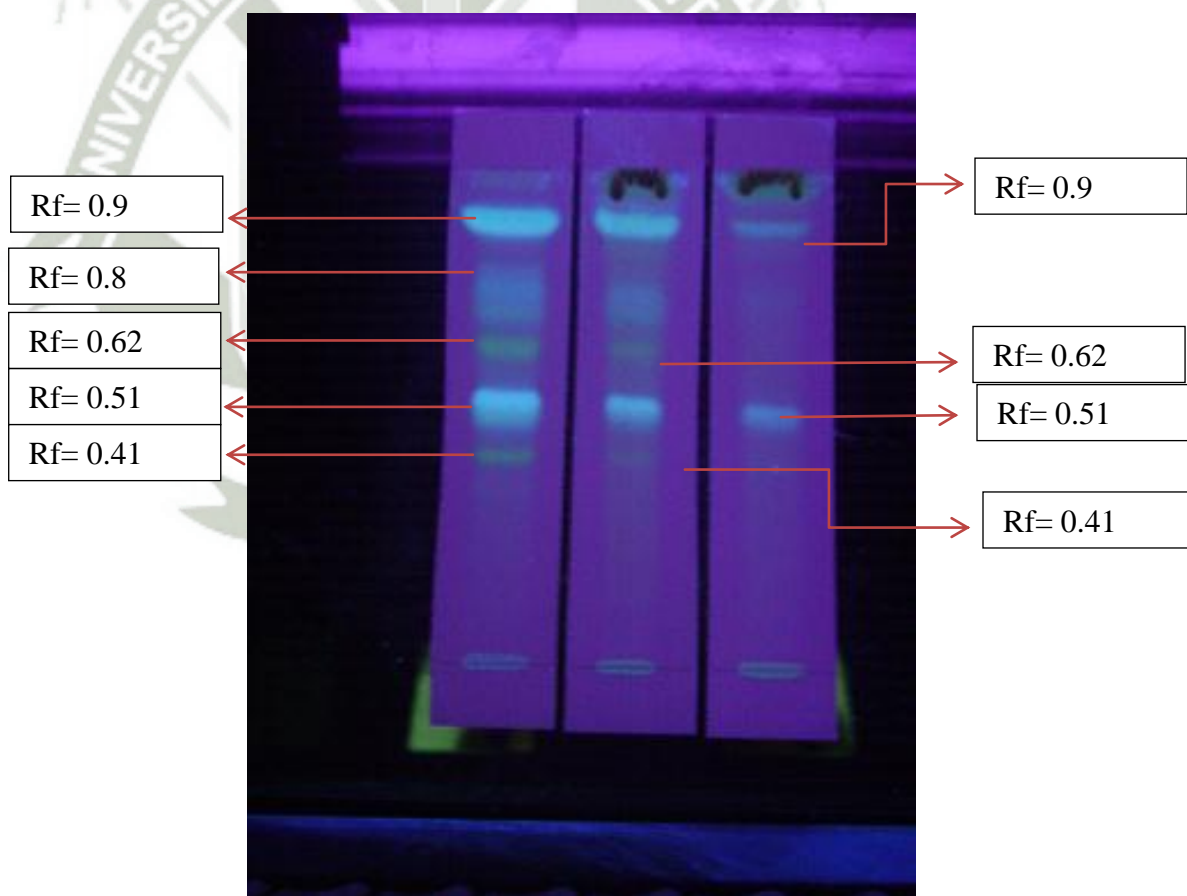
FIGURA N°: 7

IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDOS FENÓLICOS

Fase Móvil: Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua (10:1.1:1.1:2.6)

Revelador: $AlCl_3$ al 1% en etanol.

Manchas fluorescentes a la luz UV a 366nm.



FUENTE: Elaboración propia, 2014.

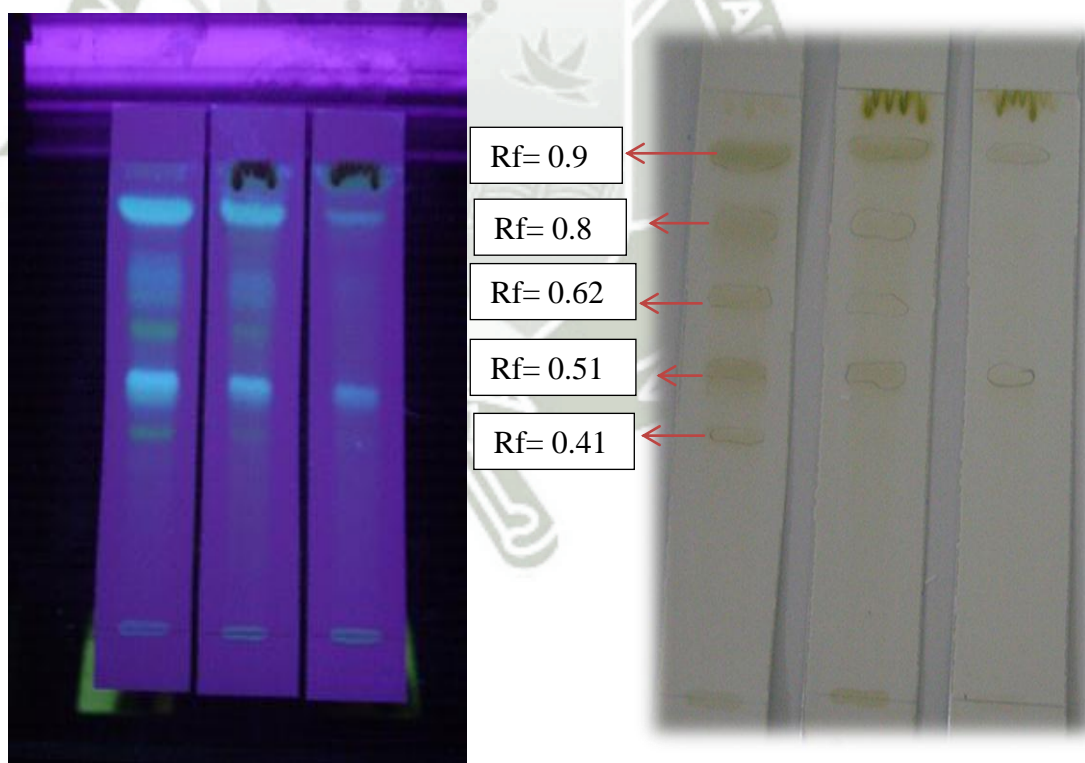
TABLA N°: 8
RESULTADO DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA
FLAVONOIDES Y ÁCIDOS FENÓLICOS

	F. N-butanol		F. Acetato de etilo		F. Hexano		
	Color	Rf	Color	Rf	Color	Rf	Metabolito
1	Azul	0.9	Azul	0.9	Azul	0.9	Acido fenólico
2	Azul	0.8	-----	-----	-----	-----	Ácido fenólico
3	Amarillo	0.62	Amarillo	0.62	-----	-----	Flavonoides
4	Azul	0.51	Azul	0.51	Azul	0.51	Acido fenólico
5	Amarillo	0.41	Amarillo	0.41	-----	-----	Flavonoides

FUENTE: Elaboración propia, 2014.

FIGURA N°: 8
IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDOS FENÓLICOS

Revelador: AlCl₃ 1%, Luz UV 366nm **Revelador:** NH₄OH, Luz Visible



FUENTE: Elaboración Propia, 2014. **FUENTE:** Elaboración Propia, 2014.

Probablemente se trata de flavonoides tipo flavonol y flavonas ya que se realizó una corrida adicional con la misma fase móvil pero revelada con vapores de amoniaco, donde se observó manchas amarillas tanto en la fracción n- butanol y acetato de etilo. Según bibliografía, teóricamente mencionados en el libro de “Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales” cuyo autor es Olga Lock de Ugaz, donde se menciona que los flavonoides intensifican o cambian de color luego de la exposición con vapores de amoniaco, si se ponen amarillas es indicativo de la presencia de flavonas y/o flavonoles, si viran de amarillo a rojo hay presencia de chalconas y auronas. (Ver Figura N° 8)

IDENTIFICACIÓN DE TANINOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Primeramente se preparó la fase móvil, metanol: agua (9:1) se transfirió a la cuba cromatográfica donde se dejó saturar dicha mezcla por unos minutos, mientras tanto se procedió a sembrar las fracciones (hexano, acetato de etilo y n-butanol) en placas individuales de 2 x 10 cm, se dejan secar las placas por unos minutos una vez sembradas, seguidamente se introdujo las placas a las cubas donde se encuentra la fase móvil, se deja ascender por capilaridad fase móvil hasta la línea superior marcada de la placa de sílica gel, se sacaron las placas de las cubas y se deja secar, una vez secas las placas se observó bajo luz UV a 254 nm una mancha roja violácea presente solo en la fracción n-butanol. (Ver Figura N° 9)

Posteriormente la placa donde se observó la mancha se reveló con FeCl_3 al 1 % en etanol, se deja secar y a luz visible se observó una mancha de color azul negruzca, donde se calculó el R_f siendo de 0.86, cuya referencias tomadas por la tesis titulada “Evaluación del efecto antiinflamatorio tópico del extracto y gel de *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) en edema plantar inducido en animales de experimentación” y otros datos teóricos verificadas, se puede

decir que se trate probablemente de taninos hidrolizables, compuestos polifenólicos, solubles en solventes orgánicos polares. (Ver Figura N° 10)

FIGURA N°: 9
IDENTIFICACIÓN DE TANINOS

Fase móvil: Metanol: Agua (9:1)
Luz: UV 254nm



FUENTE: Elaboración propia, 2014

FIGURA N°: 10
IDENTIFICACIÓN DE TANINOS

Fase móvil: Metanol: Agua (9:1)
Revelador: FeCl₃ AL 1%
Luz: Visible



FUENTE: Elaboración propia, 2014.

Rf= 0.86

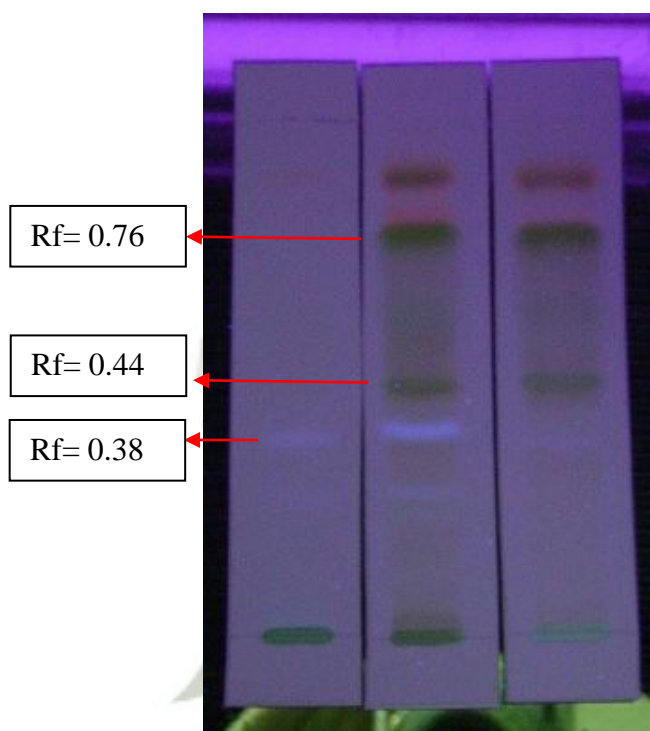
IDENTIFICACIÓN DE CUMARINAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Primeramente se preparó la fase móvil, tolueno: éter (10:10) saturado con 10 % de ácido acético, donde se procedió a preparar ácido acético al 10% utilizando 5 mL de ácido acético con 50 mL de agua destilada, seguidamente se hizo uso de una pera de decantación donde se agregó 10 mL de tolueno con 10 mL de éter se mezcla y se procede a agregar los 50 mL de ácido acético al 10 %, se agito todo en una pera de decantación, se procedió a eliminar la fase acuosa y la fase superior se deposita en la cuba de desarrollo cromatográfico donde se dejó saturar dicha mezcla por unos minutos,

mientras tanto se procedió a sembrar las fracciones (hexano, acetato de etilo y n-butanol) en placas individuales de sílica gel de 2 x 10 cm, se dejan secar por unos minutos una vez sembradas, seguidamente se introdujo las placas a las cubas donde se encuentra la fase móvil, se deja ascender por capilaridad fase móvil hasta la línea superior marcada de la placa de sílica gel, se sacaron las placas de las cubas de desarrollo cromatográfico y se dejan secar, una vez secas las placas se observa primeramente a luz visible sin ser reveladas donde se evidencia manchas de color amarillo opaco u ocre y verde. **(Ver Figura N° 11)** Las mismas placas fueron reveladas con KOH al 5 % en etanol y observadas bajo luz UV a 366 nm, donde se observó machas de colores azul adicional a las manchas encontradas en las placas anteriores antes de ser reveladas. **(Ver Figura N° 12)** En la fracción n-butanol y acetato de etilo se evidencio dos manchas azules con un mismo $R_f = 0.38$, según bibliografía encontrada en el libro de “Investigación Fitoquímica, Métodos de productos Naturales” cuyo autor es Olga Lock de Ugaz y teóricamente mencionados en el atlas titulado “Plant Drug Analysis” cuyo autores son H. Wagner y S. Bladt, es probable que se trate de la presencia de hidroxycumarinas ya que estas tienen la particularidad de dar resultados cromogénicos negativos pero dan intensa fluorescencia celeste al irradiarse con la luz UV a 366nm. En la fracción de hexano no se evidencio manchas celestes, esto probablemente se debe a que estos compuestos no son solubles en solventes apolares. En las fracciones de acetato de etilo y hexano se evidencia manchas amarillas opacas u ocre las cual probablemente se trate de la presencia de furanocumarinas que intensifican su color amarillo opaco u ocre por aspersion de las placas con solución de KOH al 5 % en etanol, a los que se diferencia de la fracción n- butanol la cual no se evidencio ninguna mancha amarilla opaca u ocre debido a que las furanocumarinas no son solubles en soluciones alcohólicas. Las manchas verdes observadas en la fracción de acetato de etilo y hexano probablemente podrían tratarse de los pigmentos presentes en las hojas de la planta como la clorofila ya que al observarse a la luz UV a 366 nm mostraron manchas rojas.

FIGURA N°: 11
IDENTIFICACIÓN DE
CUMARINAS

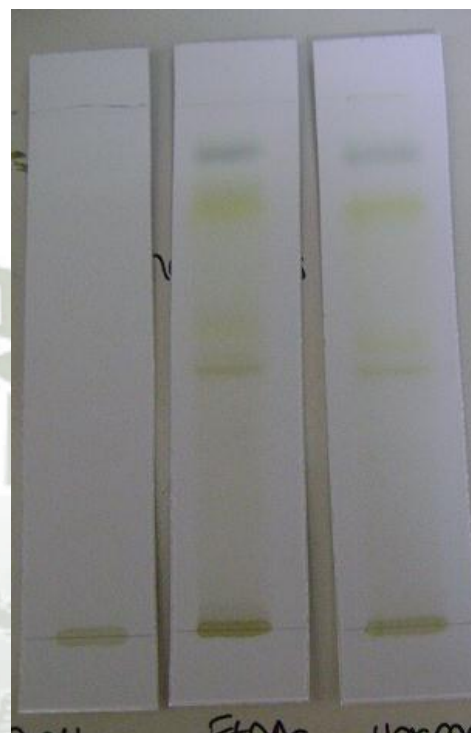
Fase móvil: Tolueno: Éter (10:10)
saturado con 10% de ácido acético
Revelador: KOH al 5% en etanol
Luz: U.V. 366nm



FUENTE: Elaboración propia, 2014.

FIGURA N°: 12
IDENTIFICACIÓN DE
CUMARINAS

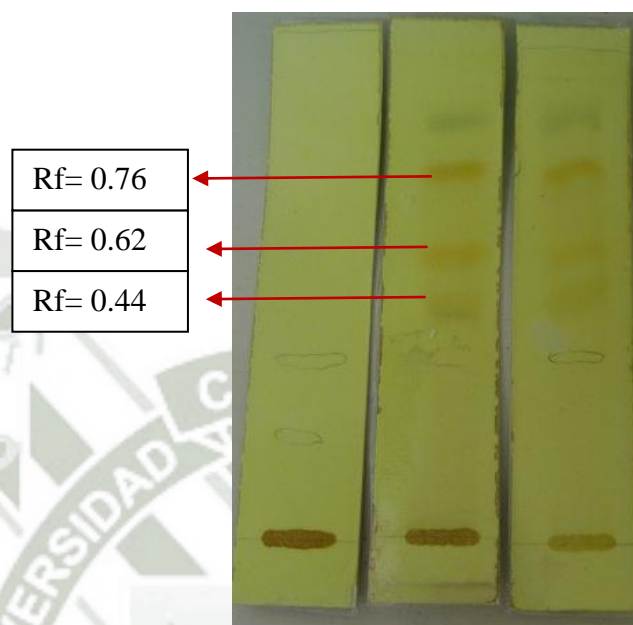
Fase móvil: Tolueno: Éter (10:10)
saturado con 10% de ácido acético
Revelador: KOH al 5% en etanol
Luz: VISIBLE



FUENTE: Elaboración propia, 2014.

Para poder aclarar la presencia de furanocumarinas en las fracciones acetato de etilo y hexano se hizo una corrida adicional con la misma fase móvil utilizada anteriormente pero con el revelador Beljet se evidencia claramente las macha anaranjadas en las fracciones acetato de etilo y hexano (**Ver Figura N° 13**), las que podrían corroborar la presencia de furanocumarinas ya que este revelador detecta los grupos lactonicos presentes en las cumarinas dando colores anaranjados. (*Olga Lock Ugaz*).

No se evidencia las manchas azules vistas anteriormente la cual presumíamos que se trate hidroxycumarinas porque comentamos que estos compuestos daban frecuentemente resultados cromogénicos negativos.

FIGURA N°: 13**IDENTIFICACIÓN DE CUMARINAS****Fase móvil:** Tolueno: Éter (10:10) saturado con 10% de ácido acético**Revelador:** BALJET (Lactonas)**FUENTE:** Elaboración propia, 2014**IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

Para la identificación de alcaloides se empleó dos fases móviles la primera fue con metanol: hidróxido de amonio (10: 1.5) que es adecuada como un sistema de screening general para muchos alcaloides, al observar en la luz UV a 366 nm no se obtuvo una buena corrida utilizando dicha fase móvil así que se decidió trabajar con otra fase móvil la cual también es un sistema de screening general para alcaloides, acetato de etilo: metanol: agua (10: 1.35: 1) donde se obtuvo una buena resolución mostrándose bajo luz UV a 366nm manchas celestes y amarillas, luego estas placas fueron tratadas con un agente revelador de uso general para la identificación de alcaloides, reactivo de Dragendorff cuya aplicación produce manchas generalmente naranjas intensas a marrones, pero al momento de tratar las placas con el reactivo de Dragendorff no se

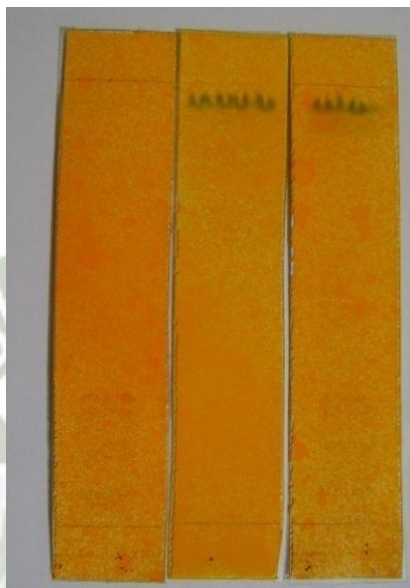
observó manchas en ninguna de las fracciones dando como prueba negativa a la presencia de alcaloides. (Ver Figura N ° 14)

FIGURA N°: 14

IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

Fase móvil: Acetato de etilo: Metanol: Agua (10:1.35:1)

Revelador: Dragendorff.



FUENTE: Elaboración propia, 2014

IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Primeramente se preparó la fase móvil, acetato de etilo: metanol: agua (10: 13.5: 11) se transfirió a la cuba cromatográfica donde se dejó saturar dicha mezcla por unos minutos, mientras tanto se procedió a sembrar las fracciones (hexano, acetato de etilo y n-butanol) en placas individuales de 2 x 10 cm, se dejan secar las placas por unos minutos una vez sembradas, seguidamente se introdujo las placas a las cubas donde se encuentra la fase móvil, se deja ascender por capilaridad fase móvil hasta la línea superior marcada de la placa de silica gel, posteriormente se revelo con el reactivo de Liebermann- Burchard se dejan secar nuevamente y en seguida se observó la presencia de manchas de color rojo oscuro y azul verdoso; lo cual según literatura revisada en el libro de “Farmacognosia, Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de origen Natural” cuyo autor es Claudia Kuklinski y el libro de “Investigación

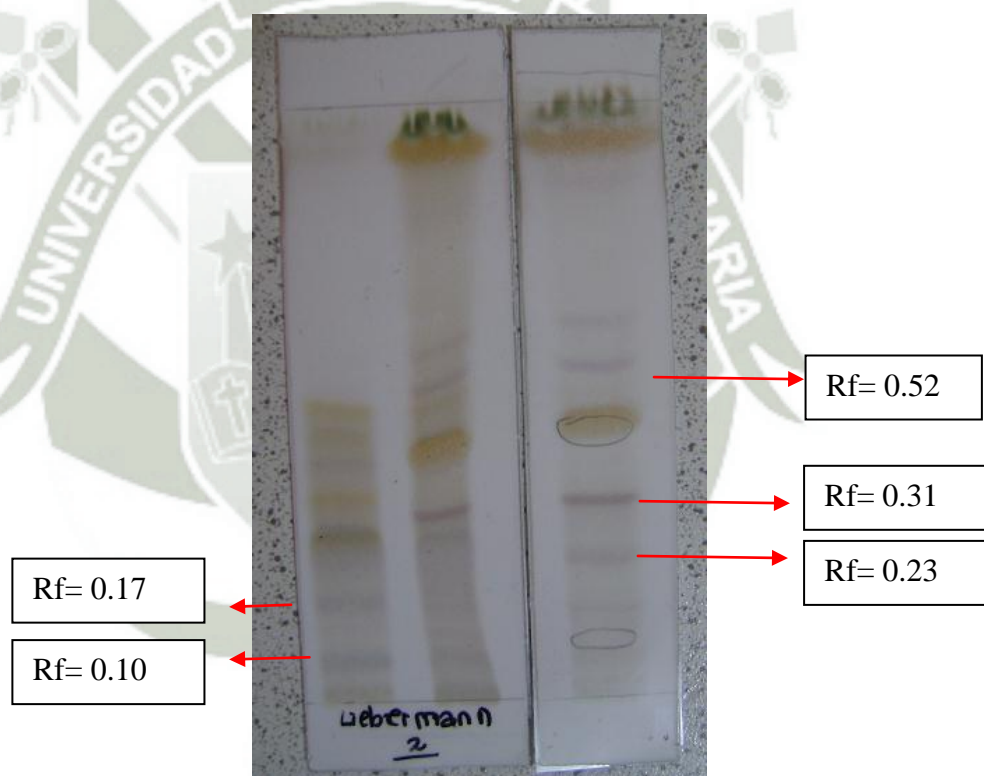
Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales” cuyo autor es Olga Lock de Ugaz, es probable que las manchas azul verdosas se trate de la presencia de saponinas esteroídicas (con Rfs de 0.10 y 0.17) las cuales se presentó en la fracción n-butanol y las manchas de color rojo oscuro presentes en las fracciones acetato de etilo y hexano se trate de saponinas triterpenicas. (Ver Figura N° 15)

FIGURA N°: 15

IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS

Fase móvil: Acetato de etilo: Metanol: Agua (10:13,5:11)

Revelador: Liebermann- Burchard.



En la **Tabla N° 9** se muestra los resultados por la intensidad de fluorescencia que presentan los metabolitos secundarios en el extracto metanólico de *Achyrocline alata* DC. Huira- Huira, donde se observa que mayor intensidad (+++) de fluorescencia presenta para flavonoides, ácidos fenólicos y taninos, fluorescencia regular (++) presenta para saponinas y cumarinas y negativo (-) para alcaloides.

TABLA N° 9

**PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN EL
EXTRACTO METANÓLICO DE *Achyrocline alata* DC.**

METABOLITOS SECUNDARIOS	RESULTADO
Flavonoides	++
Ácidos fenólicos	+++
Taninos	+
Cumarinas	++
Alcaloides	-
Saponinas	++

Fuente: Elaboración propia, 2014

5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES (CFT)

Debido a la identificación de diversos compuestos fenólicos por TLC se procedió a la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT), a través del ensayo de *FOLIN-CIOCALTEU*. Este método es uno de los más usados actualmente para la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el uso de una técnica espectrofotométrica, y fue previamente calibrado empleando ácido gálico como patrón.

Para la determinación de compuestos fenólicos totales primero se procedió a obtener nuestra curva de calibración de ácido gálico, para ello se utilizó 5 tubos de ensayo con tapa que se pusieron en una gradilla dentro de una caja para mantenerla en la oscuridad ya que es importante en este método, a cada uno de los tubos se le agregaron en forma ordenada primero ácido gálico, agua destilada, reactivo Folin-Ciocalteu y finalmente carbonato de sodio al 20 % obteniendo así un volumen final de 7.25 mL, más detallado se describió en el **Capítulo II**, una vez terminado el procedimiento, los tubos se dejaron reaccionar bajo oscuridad durante dos horas, transcurrida las dos horas se subió al laboratorio Proyecto Mercurio, Pabellón H-202, para ser leídas por el espectrofotómetro UV/V a 760 nm.

Dicho procedimiento se realizó por triplicado durante días consecutivos bajo las mismas condiciones realizadas a la primera vez.

En la **Tabla N° 10** se presenta los valores obtenidos de absorbancias en la curva de calibración de ácido gálico a 760 nm, las mediciones se realizaron por triplicado.

TABLA N°: 10
DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

N°	Concentración (mg/L)	Absorbancias a 760 nm			Absorbancia promedio	Desviación estándar
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
1	2	0.0292	0.0250	0.0271	0.0271	0.00210
2	4	0.0570	0.0577	0.0591	0.0579	0.00107
3	6	0.0893	0.0890	0.0851	0.0878	0.00234
4	8	0.1162	0.1159	0.1156	0.1159	0.00030
5	10	0.1472	0.1450	0.1417	0.1446	0.00277

FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

Los datos de la **Tabla N° 10** fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión lineal, con el objetivo de obtener una curva de calibración del método y la ecuación que vincule las dos variables. El análisis de la regresión permite obtener un modelo que relacione una variable dependiente “y” (Absorbancia) con una variable independiente “x” (concentración de ácido gálico mg/L). El coeficiente de determinación r^2 indica cual es el porcentaje de variabilidad en que la variable “y” puede ser explicada por la variable independiente “x”.

Se puede observar en la **Figura N° 16** que la respuesta es lineal ya que se obtiene un coeficiente de determinación cercano a la unidad, indicando que hay una relación directa entre la concentración de los compuestos fenólicos en el extracto de *Achyrocline alata* y la absorbancia.

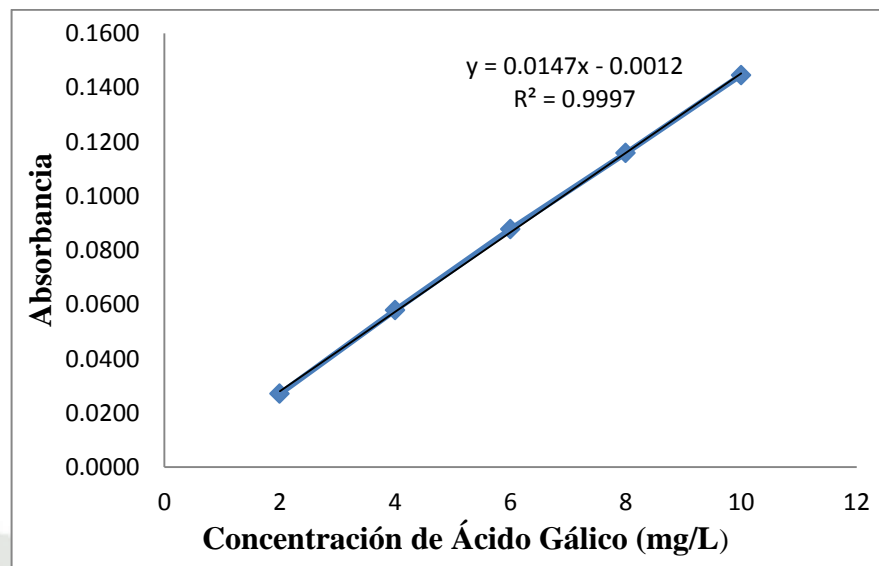
Se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) igual a 0.9997, una pendiente (b) de 0.0147 y un intercepto (α) de -0.0012.

Esto indica un buen ajuste de los datos por lo que la ecuación de regresión queda de la siguiente manera:

$$Y = a + b(x)$$

$$Y = 0.0147(x) - 0.0012$$

FIGURA N°: 16
CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO



FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se procedió de la siguiente manera:

Calculo de la respuesta a la concentración 0:

$$Y = 0.0147 (0) - 0.0012$$

$$\text{Entonces } Y_{bl} = 0.0012$$

Calculo de la desviación estándar de la absorbancia a la concentración 0:

$$a = 0.0015$$

$$b = 0.00003$$

$$Y = 0.00003 (0) + 0.0015$$

$$\text{Entonces } S_{bl} = 0.0015$$

Límites de detección para fenoles totales:

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n_1}}$$

$$LDD = \frac{0.0012 + (3 \times 0.0015)}{0.0147} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

$$LDD = 0.17 \text{ ppm}$$

Límites de cuantificación para fenoles totales:

$$LDQ = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$LDQ = \frac{0.0012 + (10 \times 0.0015)}{0.0147} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

$$LDQ = 0.49 \text{ ppm}$$

La curva de calibración obtenida (**Figura N° 16**) para la cuantificación de fenoles totales muestra un límite de detección de 0.17 ppm y un límite de cuantificación de 0.49 ppm, lo que indica que los valores por debajo de estas concentraciones no son detectables ni cuantificables con el método utilizado.

Como se puede observar en las **tablas N° 11 y N° 12**, las concentraciones de fenoles totales hallada en los extractos metanólicos de los dos métodos de extracción (Soxhlet y percolación) demuestran que son detectables y cuantificables en su totalidad por el método empleado.

El contenido de compuestos fenólicos totales encontrados en los extractos metanólicos obtenidos por dos métodos de extracción continua como Soxhlet y percolación serán expresadas como miligramos (mg) de ácido gálico equivalente (GAE)/100 g de extracto de *Achyrocline alata DC*.

En la **tablas N° 11 y N° 12**, se muestra los resultados de las absorbancias y las concentraciones finales encontradas en los extractos metanólicos de “Huirá-Huirá”, encontrándose a la vez el contenido de compuesto fenólicos totales, presentando valores que oscilan desde 154.83 a 156.04 mg GAE/100 g de extracto metanólico

obtenido por el método de Soxhlet y valores que oscilan desde 222.51 a 230.19 mg GAE/100 g de extracto metanólico obtenido por el método de percolación.

TABLA N°: 11

**CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN EL
EXTRACTO METANÓLICO DE *Achyrocline alata* DC. POR EL MÉTODO
SOXHLET**

SOXHLET			
Muestra	Absorbancias	Concentración (mg/L)	mg GAE/100 g
1	0.0628	4.35	156.04
2	0.0628	4.35	156.04
3	0.0623	4.32	154.83
Promedio			155.64±0.70

En la **Figura N° 17** se muestran el valor promedio del contenido de compuestos fenólicos totales en el extracto metanólico de *Achyrocline alata* DC. por el método de Soxhlet y Percolación, siendo el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de **155.64** y **225.88 mg GAE/100 g** de extracto respectivamente, pudiéndose observar que el extracto metanólico obtenido por el método de percolación presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos.

TABLA N°: 12

**CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN EL
EXTRACTO METANÓLICO DE *Achyrocline alata* DC. POR EL MÉTODO
PERCOLACIÓN**

PERCOLACIÓN			
Muestra	Absorbancias	Concentración (mg/L)	mg GAE/100 g
1	0.0625	4.33	222.51
2	0.0632	4.38	224.95
3	0.0647	4.48	230.19
Promedio			225.88±3.92

Cálculos para encontrar la cantidad de compuestos fenólicos en mi muestra:***Extracto metanolico obtenido por el método de Soxhlet:***

- Despejamos x de la ecuación de la recta de ácido gálico:

$$Y = B X + A$$

$$0.0626 = 0.0147(X) - 0.0012$$

$$x = 4.34 \text{ ppm}$$

- Ahora calculamos la concentración con respecto a las diluciones realizadas:

$$(4.34 \text{ ppm})(50\text{ml}) = (C2)(0.5 \text{ ml})$$

$$C2 = 434.24 \text{ ppm}$$

- Calculamos la cantidad de compuestos fenólicos totales en miligramos de ácido gálico equivalente/ 100 gramos de extracto

$$\left(0.43 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) \times \left(\frac{10 \text{ ml}}{2.79 \text{ g}}\right)$$

155.64 mg de ácido gálico equivalente / 100 gramos de extracto

Extracto metanolico obtenido por el método de percolación:

- Despejamos x de la ecuación de la recta de ácido gálico:

$$Y = B X + A$$

$$0.0635 = 0.0147(X) - 0.0012$$

$$x = 4.39 \text{ ppm}$$

- Ahora calculamos la concentración con respecto a las diluciones realizadas:

$$(4.39 \text{ ppm})(50\text{ml}) = (C2)(0.5 \text{ ml})$$

$$C2 = 439.91 \text{ ppm}$$

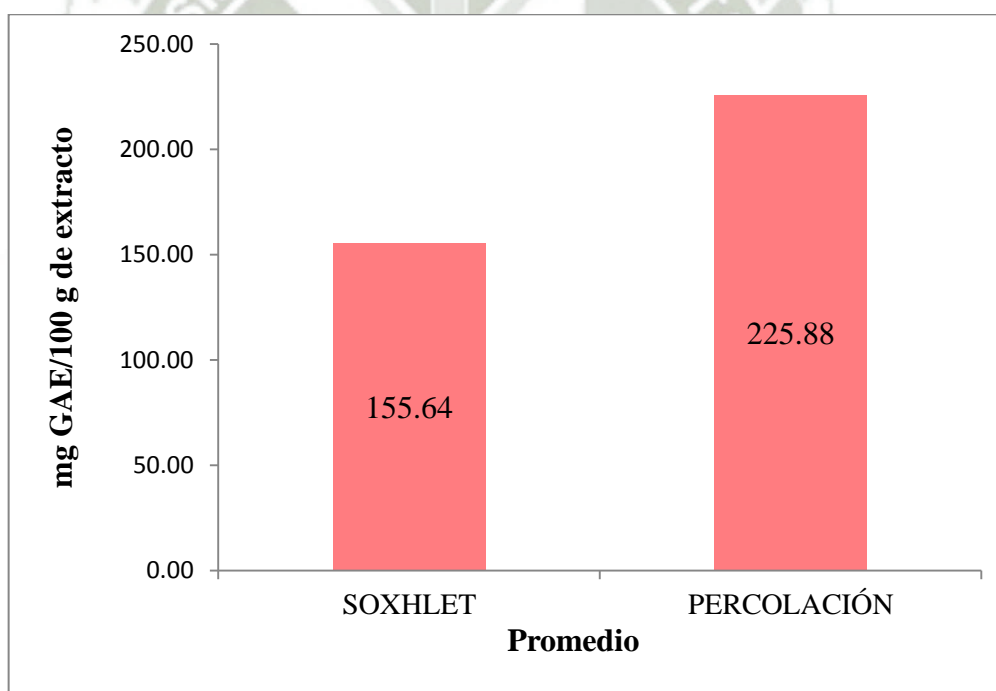
- Calculamos la cantidad de compuestos fenólicos totales en miligramos de ácido gálico equivalente/ 100 gramos de extracto.

$$\left(0.44 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) \times \left(\frac{40 \text{ ml}}{7.79 \text{ g}}\right)$$

225.88 mg de ácido gálico equivalente/ 100 gramos de extracto

FIGURA N°: 17

CONTENIDO PROMEDIO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE *Achyrocline alata* DC. POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN SOXHLET Y PERCOLACIÓN.



FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

El contenido de sustancias fenólicas es un indicativo de la actividad antioxidante de una muestra, por ello es de importancia poder determinar la capacidad antioxidante presente en las hojas de *Achyrocline alata* DC.

5.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ingresó los datos de mg GAE/100 g de extracto de los dos métodos de extracción (Soxhlet y percolación) en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel el cual se realiza una prueba T-Student para medias de las muestras emparejadas donde se obtuvo los siguientes resultados. (ANEXO 2)

Realizada la prueba T-Student, dio como resultado de que existe diferencia estadísticamente significativa, por lo que se rechazó la hipótesis nula lo que significa que las diferencias entre los mg GAE/100 g de extracto de ambos métodos de extracción (Soxhlet y percolación) son estadísticamente significativas.

6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE POR EL METODO CUPRAC

Para la determinación de la capacidad antioxidante de las hojas de *Achyrocline alata* DC. mediante la técnica de CUPRAC, se realizaron por triplicado.

Para la construcción de la curva de calibración de ácido ascórbico se dispuso de una serie de 6 tubos (incluyendo al blanco) cuyas absorbancias se leen en el espectrofotómetro a 450 nm. Todos estos tubos contienen una solución de acetato de amonio 1M, Neocuproína 7.5×10^{-3} M, cloruro de cobre II 1.2×10^{-2} M y ácido ascórbico 2.0×10^{-4} M (el blanco no contiene ácido ascórbico) y finalmente se le agrega agua destilada respectivamente, más detalladamente se explicó en el **Capítulo II**, estos tubos se disponen en una gradilla dentro de una caja oscura, se deja reaccionar por 30 minutos, dichos tubos presentan una coloración anaranjado claro muy suave que fueron leídas en el espectrofotómetro UV/V del laboratorio Proyecto Mercurio, Pabellón H-202.

Dicho procedimiento se realizó por triplicado durante días consecutivos bajo las mismas condiciones realizadas a la primera vez.

En la **Tabla N° 13** se muestran los valores obtenidos de absorbancia por triplicado, de modo que obtenidos las absorbancias promedio, podemos someter a estos datos a un análisis estadístico de regresión lineal.

TABLA N°: 13

ABSORBANCIAS POR TRIPLICADO PARA LA CURVA DE
CALIBRACIÓN

St.	CC. (μM)	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Promedio	Desviación estándar
1	10	0.1723	0.1701	0.1790	0.1738	0.00464
2	20	0.3322	0.3300	0.3217	0.3280	0.00554
3	40	0.6666	0.7052	0.6606	0.6775	0.02420
4	60	1.0200	1.0199	1.0111	1.0170	0.00511
5	80	1.3771	1.3666	1.3000	1.3479	0.04181

Estos datos al ser graficados (**Figura N° 18**) y luego procesados en Microsoft Excel utilizando el método de los mínimos cuadrados se obtienen los siguientes parámetros:

$$a = -0.0005$$

$$b = 0.0169$$

$$r^2 = 0.9998$$

Esto indica un buen ajuste de los datos por lo que la ecuación de regresión queda de la siguiente manera:

$$y = a + b(x)$$

$$y = 0.0169x - 0.0005$$

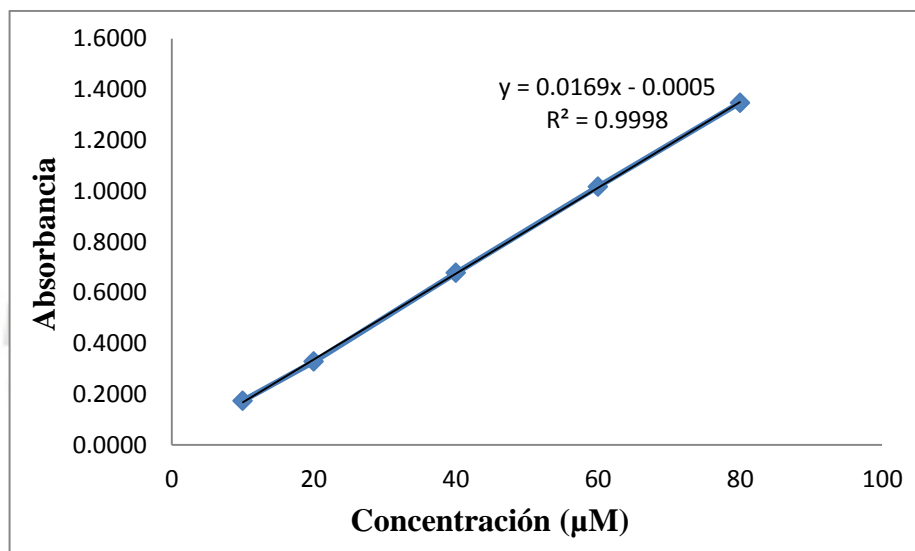
Posteriormente se graficó la curva de calibración, utilizando como estándar soluciones de ácido ascórbico a diferentes concentraciones.

En la **Figura N° 18** se puede observar que la curva de calibración de ácido ascórbico obtenida, presenta un valor de $R^2=0.9998$, muy cercano a la unidad, indicando que hay relación directa entre la concentración de ácido ascórbico y la absorbancia, por lo tanto la ecuación obtenida es adecuada para servir de referencia al realizar los

cálculos respectivos para determinar la capacidad antioxidante de las diferentes muestras.

FIGURA N°: 18

**CURVA DE CALIBRACIÓN USANDO COMO ESTÁNDAR ÁCIDO
ASCÓRBICO.**



FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se procedió de la siguiente manera:

Calculo de la respuesta a la concentración 0:

$$Y = 0.0169 (0) - 0.0005$$

$$\text{Entonces } Y_{bl} = 0.0005$$

Calculo de la desviación estándar de la absorbancia a la concentración 0:

$$a = 0.0012$$

$$b = 0.0004$$

$$y = 0.0004 (0) - 0.0012$$

$$\text{Entonces } S_{bl} = 0.0012$$

Límites de detección:

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$LDD = \frac{0.0005 + (3 \times 0.0012)}{0.0169} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

$$LDD = 0.11 \mu M$$

Límites de cuantificación:

$$LDQ = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$LDQ = \frac{0.0005 + (10 \times 0.0012)}{0.0169} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

$$LDQ = 0.33 \mu M$$

La curva de calibración (Ver **Figura N° 18**), obtenida para la determinación de la capacidad antioxidante muestra un límite de detección de $0.11 \mu M$ y un límite de cuantificación de $0.33 \mu M$, lo que indica que los valores por debajo de estas concentraciones no son detectables ni cuantificables con el método utilizado.

Como se puede observar en las **tablas N° 14 y N° 15**, las concentraciones de ácido ascórbico hallada en los extractos metanólicos de los dos métodos de extracción (Soxhlet y percolación) demuestran que son detectables y cuantificables en su totalidad por el método empleado.

Los resultados por el método de *CUPRAC* serán expresados como la capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico, que se reporta como μmol de *Ácido Ascórbico/100 g de extracto*.

En la **tablas N° 14 y N° 15**, se muestra los resultados de las absorbancias y las concentraciones finales encontradas en *Achyrocline alata DC.*, y a su vez observa los valores de la capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico, que oscilan desde 278.21 a 285.36 μmol Ácido Ascórbico/100 g de extracto metanólico obtenido

por el método de Soxhlet y valores que oscilan desde 413.50 a 410.90 μmol Ácido Ascórbico/100 gramos de extracto metanólico obtenido por el método de percolación.

TABLA N°: 14

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
Achyrocline alata DC. POR MÉTODO DE SOXHLET.**

SOXHLET			
Muestra	Absorbancias	Concentración (μM)	μmol Ácido Ascórbico/100g de extracto
1	0.4156	24.62	278.21
2	0.4263	25.25	285.36
3	0.4215	24.97	282.15
Promedio			281.91 \pm 3.58

TABLA N°: 15

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
Achyrocline alata DC. POR MÉTODO DE PERCOLACIÓN.**

PERCOLACIÓN			
Muestra	Absorbancias	Concentración (μM)	μmol Ácido Ascórbico/100g de extracto
1	0.4124	24.43	413.40
2	0.4125	24.44	413.50
3	0.4099	24.28	410.90
Promedio			412.60 \pm 1.47

Cálculos para la determinación de la capacidad antioxidante:

Extracto metanolico obtenido por el método de soxhlet:

- Despejamos x de la ecuación de la recta de ácido ascórbico:

$$Y = B X + A$$

$$0.4211 = 0.0169(X) - 0.0005$$

$$x = 24.95 \mu M$$

- Ahora calculamos la concentración con respecto a las diluciones realizadas:

$$(24.95 \mu M)(50ml) = (C2)(1.5 ml)$$

$$C2 = 831.62 \mu M$$

- Calculamos la capacidad antioxidante expresada por μmol ácido ascórbico equivalente/100 gramos de extracto.

$$\left(0.83 \frac{\mu mol}{ml}\right) \times \left(\frac{10 ml}{2.95 g}\right)$$

281.91 μmol de ácido ascórbico equivalente/ 100 gramos de extracto

Extracto metanólico obtenido por el método de percolación:

- Despejamos x de la ecuación de la recta de ácido ascórbico:

$$Y = B X + A$$

$$0.4116 = 0.0169(X) - 0.0005$$

$$x = 24.38 \mu M$$

- Ahora calculamos la concentración con respecto a las diluciones realizadas:

$$(24.38 \mu M)(50ml) = (C2)(1.5 ml)$$

$$C2 = 812.82 \mu M$$

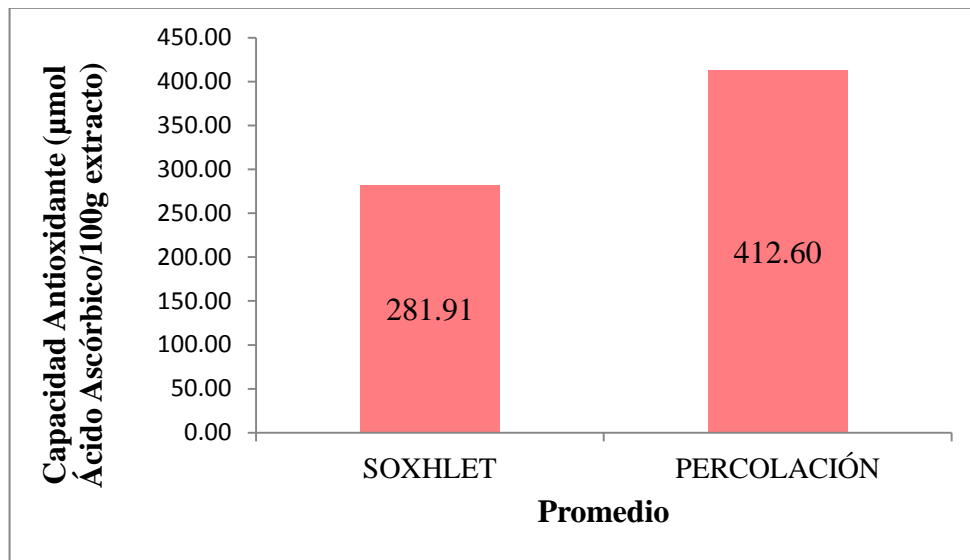
- Calculamos la cantidad de μmol de ácido ascórbico equivalente/ 100 gramos de extracto.

$$\left(0.81 \frac{\mu mol}{ml}\right) \times \left(\frac{40 ml}{7.87 g}\right)$$

412.60 μmol de ácido ascórbico equivalente/ 100 gramos de extracto

FIGURA N°: 19

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
Achyrocline alta DC. POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN SOXHLET Y
PERCOLACIÓN.**



FUENTE: Elaboración Propia, 2014.

En la **Figura N° 19** se muestran los valores promedios de la capacidad antioxidante expresada en μmol Ácido Ascórbico equivalente/100 g de extracto metanólicos de *Achyrocline alta* DC. por los dos métodos de extracción continua, Soxhlet y percolación, siendo de **281.91** y **412.60** μmol de Ácido Ascórbico/100 g de extracto respectivamente, donde se observa que la mayor capacidad antioxidante se presenta en el extracto metanólico obtenido por el método de percolación con respecto al método de Soxhlet.

6.1 ANALISIS ESTADISTICO

Se ingresó los datos de μmol de ácido ascórbico/100 g de extracto de los dos métodos de extracción (Soxhlet y percolación) en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel el cual se realizó una prueba T-Student para medias de las muestras emparejadas donde se obtuvo los siguientes resultados. **(ANEXO 3)**

Realizada la prueba T-Student, dio como resultado de que existe diferencia estadísticamente significativa, por lo que se rechaza la hipótesis nula lo que significa que las diferencias entre los μmol de ácido ascórbico/100 g de extracto de ambos métodos de extracción (Soxhlet y percolación) son estadísticamente significativas.

En el presente trabajo, que fue estudio de investigación, fue las hojas de *Achyrocline alata* DC. Huira- Huira, que debido a la carencia de información científica de la planta y a su uso de manera empírica es que se decidió investigar primeramente los posibles metabolitos secundarios presentes a las cuales se les puede atribuir ciertos efectos terapéuticos en dicha planta, en las que se encontró gran cantidad de compuestos fenólicos, a lo cual se procedió a cuantificar la cantidad de compuestos fenólicos y determinar su capacidad antioxidante, de manera poder contribuir a la investigación científica de la flora del Perú como también incentivar a la población al consumo de dicha planta, así prevenir enfermedades causadas por los procesos oxidativos.

Al concluir el presente trabajo de investigación donde tuvo como una de las finalidades identificar los posibles metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina, donde resultados mostraron la presencia de una gran cantidad de compuestos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y cumarinas así mismo se identificó la presencia de saponinas, como bien se sabe mediante investigaciones científicas que los flavonoides y ácidos fenólicos y taninos tienen actividad antioxidante, pero entre los compuestos fenólicos más importantes se encuentran los flavonoides los cuales, además de su comprobada actividad antioxidante, se le ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desórdenes cardíacos derivados de su poderosa actividad antioxidante. De aquí la importancia del estudio de sus propiedades antioxidantes de dicha planta.

Debido a la identificación de diversos compuestos fenólicos por cromatografía en capa fina es que se procedió a la cuantificación de compuestos fenólicos totales por el método de *FOLIN- CIOCALTEU* y a la determinación de la actividad antioxidante por el método de *CUPRAC*, siendo uno de los métodos más sencillos que nos

permite determinar la capacidad antioxidante de manera rápida y sencilla frente a otros métodos, este método ofrece ventajas sobre otros ensayos basados en la transferencia de electrones, es decir, la selección del pH de trabajo a pH fisiológico (en comparación con el método de métodos *FRAP*, que funciona en un medio ácido), aplicabilidad a ambos antioxidantes hidrófilos y lipófilos (a diferencia *DPPH*), es relativamente insensible a parámetros adversos con el aire, luz solar, tipo de solvente y pH, los cuales afectan a reactivos como *DPPH*.

Finalmente, se puede observar que el extracto metanólico obtenido por el método de percolación presentó mayor capacidad antioxidante y cantidad de compuestos fenólicos totales en comparación con el extracto metanólico obtenido por el método de Soxhlet, debido a que el método de percolación realiza la extracción a temperatura ambiente a diferencia del método Soxhlet que trabaja a temperatura de ebullición del solvente en este caso metanol (65°C), pudiendo así tener efectos negativos en la extracción de metabolitos secundarios termolábiles, ya que algunos estudios reportan que a temperaturas altas pueden destruir a los compuestos fenólicos ya que estos son de suma importancia como metabolitos secundarios responsables de dicha actividad antioxidante.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el porcentaje rendimiento de dos métodos de extracción, Soxhlet y percolación, obteniéndose un mejor porcentaje de rendimiento por el método Soxhlet, siendo de 29.41%.
2. Se logró determinar la presencia de taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas y saponinas a partir del extracto metanólico de *Achyrocline alata* DC. por cromatografía de capa fina.
3. El contenido de compuestos fenólicos totales por el método de *FOLIN-CIOCALTEU* fue mayor en el extracto metanólico obtenidos por el método de percolación siendo de 223.30 mg GAE/100 g de extracto.
4. La capacidad antioxidante por el método de *CUPRAC* se realizó con los extractos metanólicos donde la mayor capacidad antioxidante se dio en el extracto metanólico obtenidos por el método de percolación siendo de 412.60 μ mol equivalente de ácido ascórbico/100 g de extracto.
5. La mayor cantidad de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante se observa en la extracción metanólica obtenida por el método de percolación.

SUGERENCIAS

1. Se sugiere realizar estudios de la capacidad antioxidante de otro cultivo silvestre de *Achyrocline alata* ubicado en una zona diferente de la sierra para así poder comparar los resultados y ver si las condiciones climáticas afectan la capacidad antioxidante.
2. Realizar una comparación de la cantidad de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de la especie utilizando otras partes de la planta como por ejemplo sus flores y ver que parte de la planta tiene mayor cantidad de compuestos fenólicos y mejor capacidad antioxidante.
3. Evaluar efectos terapéuticos atribuibles en la medicina tradicional de las hojas y otras partes de *Achyrocline alata* DC. “Huirá -Huirá”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prof. Reynel Rodriguez, Carlos; Proyecto “PLANTAS PARA LEÑA EN EL SUR OCCIDENTE DE PUNO”, Facultad De Ciencias Forestales De La Universidad Nacional Agraria-La Molina, 1988.
2. Retta Daiana, Dellacassa Eduardo, Villamill Jose, Suarez Susana, Valdoni Arnaldo; Industrial Crops and Products “MARCELA, A PROMISING MEDICINAL AND AROMATIC PLANT FROM LATIN AMERICA: A REVIEW”, 2012.
3. Zampieron Rafaela, Franka Leonardo, Carollo Carlos, Viera Maria Do Carmo, Oliveros Alberto, Siquerira Joao; “PERFILES COMPARATIVOS DE ACHYROCLINE ALATA DC. Y A. SATUREOIDES DC., ASTERACEAE, APLICANDO HPLC DAD-MS”, Universide Federal Do Parana, Laboratorio De Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharcognosy, 2002.
4. Diaz Claudia, Heinzen Horacio; “VARIACIONES EN PERFIL DE FLAVONOIDES Y EN LA CANTIDAD DE QUERCETINA LIBRE EN DIFERENTES EXTRACTOS DE ACYROCLINE SATUREOIDES”, Facultad De Química, Udelar; Montevideo, Uruguay, 2006.
5. Fuhrman Blanca, Volkoba Nina, Suraski Amram, Aviram Michael; White Wine Red Wine – Like Properties: “INCREASED EXTRACTION OF GRAPE SKIN POLYPHENOLS IMPROVES ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE DERIVED WHITE WINE”, Rambam Medical Center, Haifa, Israel, 2001.
6. Camones Miguel Angel, Ruiton Cesar, Furado Bertha, Mondragon Iris, Taype Evelyng, Ostos Henry; “ESTUDIO FARMACOGNOSTICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD A DOSIS LIMITE DE TRIPLARIS AMERICANA L. (TANGARANA COLORADA)”, Rev. Soc. Quim. Perú, 2010.
7. Gracia Nava Manuel Alejandro; “CUANTIFICACION DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTOS NATURALES”, Universidad Autónoma De Querétaro, México, 2001.
8. Brand- Williams W., Cuvelier M. and Berset C. USE OF FREE RADICAL METHOD TO EVALUATE ANTIOXIDANT ACTIVITY. LebensmWiss Technology, 1995.

9. Castañeda C., Ramos E., Ibañez V. "EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE SIETE PLANTAS MEICINALES PERUANAS". Revista Horizonte Medico, Julio 2008.
10. Alvares-Castro E. y Orallo-Cambeiro F., ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS FLAVONOIDES. ACCION FRENTE AL CANCER. Departamento de Farmacología. Facultad Farmacia. Universidad De Santiago, 2003.
11. Ames B. N., Shigenasa M.K., and Hagen T.M. OXIDANTS, ANTIOXIDANTS, AND THE DEGENERATIVE DISEASES OF AGING. Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of California, Berkeley 94720.
12. Garcia A.M., De Palcual S., Santos C., Rivas J.C. EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF FRUIT. Food Chemistry, 2004.
13. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., Mcdonald S., Robards R. METHODS FOR TESTING ANTIOXIDANT ACTIVITY. Analyst 2002.
14. Aruoma O.I., FREE RADICALS, ANTIOXIDANTS AND INTERNATIONAL NUTRITION. Asia and Pacific Journal of Clinical Nutrition, 1999.
15. Brand- Williams W., Cuvelier M. and Berset C. USE OF FREE RADICAL METHOD TO EVALUATE ANTIOXIDANT ACTIVITY. LebensmWiss Technology, 1995.
16. Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C., TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY IS A TOOL TO ASSESS REDOX STATUS: CRITICAL VIEW AND ESPERIMENTAL DATA. Free RadicBiol Med, 2000.
17. Halliwell B. REACTIVE OXYGEN SPECIES IN LIVING SYSTEMS: Source, Biochemistry, and role in Human Disease. The American Journal of Medicine, September -1991.
18. HalliwellB., and Gutteridge J.M.C., FREE RADICALS IN BIOLOGY AND MEDICINE. Oxford, U.K: Oxford University Press, 1999.
19. Huanqui C. OXIDANTES- ANTIOXIDANTES EN REUMATOLOGIA. Revista peruana de reumatología. Lima – Perú, 1997.
20. Kahkoren M.P., Hopia A.I., Vucrela H.J., Rauha J.P., Kujala T.S., Heinonen M. ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS CONTAINING PHENOLIC COMPOUNDS. J Agric Food Chem, 1999.

21. Kuskoski E., ET AL COL. APLICACIÓN DE DIVERSOS MÉTODOS QUÍMICOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PULPA DE FRUTOS. Cienc. Technol. Aliment., Campinas, 2005.
22. Lee J.W., Koo N., Min D.B., REACTIVE OXYGEN ESPECIES, AGING, AND ANTIOXIDATIVE NUTRACEUTICALS. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2004.
23. Leighton F. y Urquiaga I., POLIFENOLES DEL VINO Y SALUD HUMANA, ANTIOXIDANTES Y CALIDAD DE VIDA, Revista antioxidantes y calidad de vida online, Pontificia Universidad Católica de Chile, 2011.
24. Martínez-Velarde I., Periago J. and Ros G., SIGNIFICADO NUTRICIONAL DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA DIETA. Caracas, 2000.
25. Paladino S.C., ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS CONTENIDOS EN LAS SEMILLAS DE LA VID (VITIS VINIFERA). Tesis presentada para acceder al grado académico de Magister en Alimentos del Posgrado Regional Cooperativo en Alimentos. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis.
26. Young I. y Woodside J., ANTIOXIDANTS IN HEALTH AND DISEASE. J. Clin. Pathol, 2001.
27. Cardenas, Packer, HANDBOOK OF AXIDANTS AND ANTIOXIDANTS, Second Edition, Marcel Dekker, USA, 2002.
28. Criado Dabrowska C. y Moya Mir M. VITAMINAS Y ANTIOXIDANTE. Servicios de Medicina interna y urgencias. Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda. Madrid, 2009.
29. Hassimotto, N.M.A., Da Mota, R.V., Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M. PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOACTIVE COMPOUNDS OF BLACKBERRY FRUIT (*Rubus spp.*) grown in Brazil. Cienc. Technol. Aliment. Campinas, 2008
30. Apak R., et al, COMPARATIVE EVALUATIONS OF VARIOUS TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY ASSAYS APPLIED TO PHENOLIC COMPOUND WITH THE CUPRAC ASSAY. 2007.

31. Guija E.: “RADICALES LIBRES Y ENVEJECIMIENTO”. Boletín de la Sociedad Química del Perú. Perú, 2000.
32. Prior R., Wu X. y Schaich K. STANDARDIZED METHODS FOR THE DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY AND PHENOLIC IN FOODS AND DIETARY SUPPLEMENTS. J. Agric. Food Chem, 2005.
33. Ramos Llica E., Castañeda Castañeda B. y Ibáñez Vásquez L. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINALES PERUANAS NATIVAS E INTRODUCIDAS. Rev. Acad. Perú Salud, 2008.
34. Venereo Gutiérrez J. DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”, Cuba, 2002.
35. Leighton.: DAÑO OXIDATIVO DEL ADN EN EL DESARROLLO DEL CANCER. Boletín Ciencia, Vino y Salud. Pontificia Universidad Católica de Chile, 1999.
36. Valls J., Lampreave M., Nadal M. y Arola L. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA CALIDAD DE LOS VINOS TINTOS DE CRIANZA. Revista Alimentación Calidad y Tecnología, 2000.
37. Chasquibol N., Lengua L., Rivera D., Bazan D., Aguirre R. y Bravo M. ALIMENTOS FUNCIONALES FITOQUÍMICOS: Clasificación e Importancia. Rev. Per. Quim.2003.
38. Leyva D, “DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS, FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LICORES Y FRUTOS DE MORA”. Tesis para optar el título de ing. en Alimentos Universidad Tecnológica de la Mixteca, México.
39. Muñoz Jáuregui A. y Ramos Escudero F., COMPONENTES FENÓLICOS DE LA DIETA Y SUS PROPIEDADES BIOMEDICINALES. Revista Horizonte Medico, 2007.
40. Yapuchura Mamani R. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES ANTIOXIDANTES DE LAS HOJAS DE MUÑA (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) E INCA MUÑA (*Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze). Tesis presentada para optar el grado de Magister Scientiae en Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, 2010.

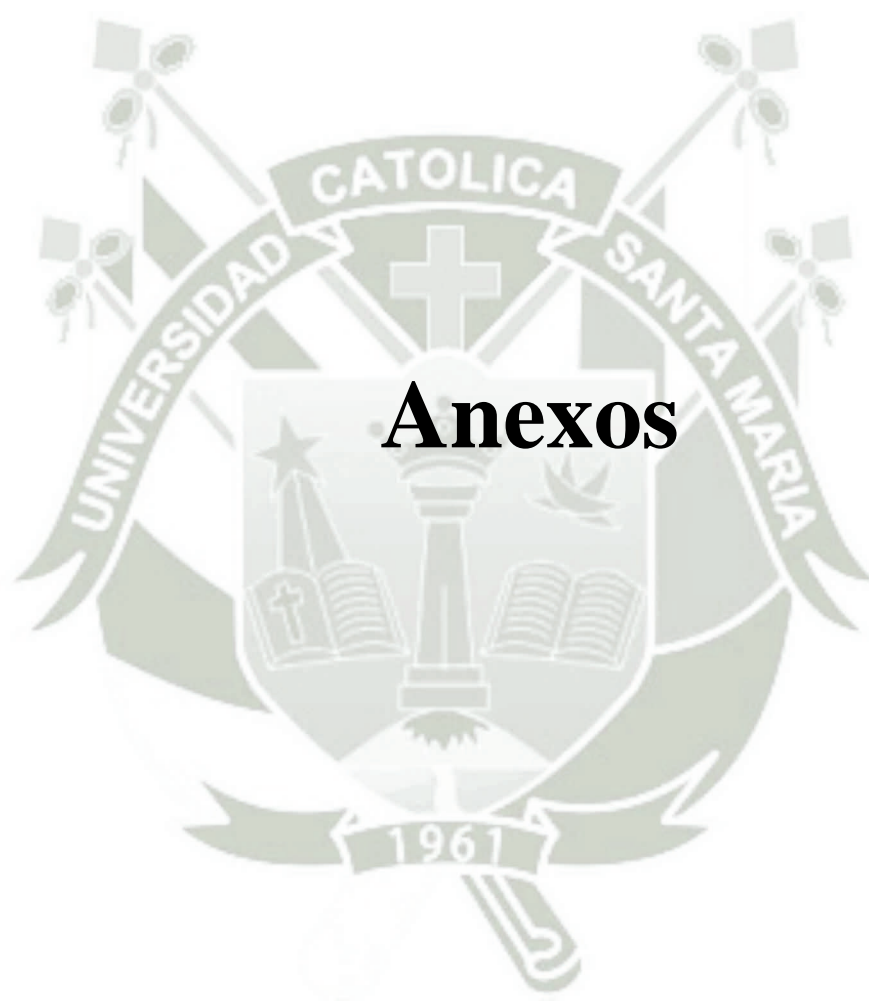
41. Jiménez López P. y Girbes Tomas J. RADICALES LIBRES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DIETARIOS. ÍNDICE DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL MEDIANTE EL MÉTODO *CUPRAC*. Nutrición y Bromatología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, 2013.
42. Bruneton Jean; PHARMACOGNOSIE – PHYTOCHIMIE- PLANTAS MEDICINALES 2DA EDICION, Editorial Acribia S.A.; Zaragoza, España, 2001.
43. Kuklinski Claudia; FARMACOGNOSIA “ESTUDIO DE LAS DROGAS Y SUSTANCIAS MEDICINALES DE ORIGEN NATURAL”, Editorial Omega S.A.; Barcelona, 2000.
44. Caldas Ávila A.P. “OPTIMIZACIÓN, ESCALAMIENTO Y DISEÑO DE UNA PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN SOLIDO LIQUIDO”. Tesis Previa a la Obtención del Título de Ingeniera Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, 20012.
45. Villar Del Fresno Ángel M.; “FARMACOGNOSIA GENERAL”; Editorial Síntesis S.A.; Madrid, España, 1999.
46. “MÉTODOS GENERALES DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE P.A. DE DROGAS”. Disponible en internet.

<http://es.scribd.com/doc/164139697/Metodos-generales-de-extraccion-y-purificacion-de-principios-activos-de-drogas-vegetales>
47. Hildebert W. y Sabine B. A THIN LAYER CHROMATOGRAPHY ATLAS, PLANT GRUG ANALYSIS. Second Edition.
48. “CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA”. Disponible en internet:
<http://es.scribd.com/doc/14172689/5-Cromatografia-en-Capa-Fina>
49. CROMATOGRFIA EN CAPA FINA. Disponible en internet:
<http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/capa-fina>
50. Lock de Ugaz, Olga. “INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA”. Editorial de la Pontificia Universidad Católica. Lima, 1988.
51. Gálvez Tapia H. “DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS COMERCIALES A BASE DE TÉ QUE SE COMERCIALIZA EN LA CIUDAD DE AREQUIPA”. Tesis

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico, UCSM, Arequipa, 2013.

52. Avalos Huaricalla M. y Gallegos Rodrigues Y. “EFECTO ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LA *Cynarascolymus L.* (Alcachofa)” Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico, UCSM, Arequipa, 2005.





Anexos

Anexo 1

PRUEBA ESTADÍSTICA DE T-STUDENT PARA % DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

	Variable 1	Variable 2
Media	29.41	19.7233
Varianza	2.1133	0.0684
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	0.465829226	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	12.4112125	
P(T<=t) una cola	0.003214678	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.006429356	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

Fuente. Elaboración Propia

Anexo 2

PRUEBA ESTADÍSTICA DET-STUDENT PARA COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

	Variable 1	Variable 2
Media	155.636667	225.883333
Varianza	0.48803333	15.3989333
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.95044408	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-26.4889877	
P(T<=t) una cola	0.00071107	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.00142214	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

Fuente: Elaboración Propia.

Anexo 3

PRUEBA ESTADÍSTICA DE T-STUDENT PARA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

	Variable 1	Variable 2
Media	281.9066667	412.6
Varianza	12.82503333	2.17
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.024926806	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-57.95151346	
P(T<=t) una cola	0.000148815	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.00029763	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 4

Achyrocline alata DC “Huirá-Huirá”

