

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antioxidante y contenido de compuestos
fenólicos y flavonoides de *Pernettya prostrata* (Cav.)
DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.

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

Presentado por el:

Bach. SURCO BELLIDO, Heber

AYACUCHO-PERÚ

2018

A mis padres y hermanos por inculcarme la fé en Dios y brindarme su apoyo incondicional Durante todos los años de vida Universitaria.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, alma mater, por su apoyo acogida durante los largos y fructíferos periodos que he desarrollado en ellos mi vida estudiantil, ocupar sus aulas y brindarme los instrumentos necesarios para lograr el objetivo de mi profesión.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, que me han facilitado las enseñanzas para desenvolverme como profesional Químico Farmacéutico.

A mi asesor, Mg Q.F. ARONES JARA, Marco Rolando, asesor del presente trabajo de investigación, por el apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación.

A todas las personas que me brindaron su apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación, cuyos esfuerzos se materializan en este informe.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. Aspectos botánicos de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha"	8
2.3. Composición Química	9
2.4. Relación estructura actividad de los metabolitos secundarios	9
2.5. Radicales Libres	12
2.6. Daño molecular inducido por radicales libres	13
2.7. Antioxidantes	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Ubicación	17
3.2. Población y muestra	17
3.3. Diseño metodologico para la recoleccion de datos	17
3.3.1. Procedimiento para la recolección de muestra	17
3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico	18
3.3.3. Tamizaje fitoquímico	18
3.3.4. Determinación del contenido de fenoles totales	18
3.3.5. Determinación del contenido de flavonoides totales	19
3.3.6. Determinación de la actividad antioxidante	29
3.4. Diseño experimental	22
3.5. Análisis estadístico	23
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Grupo característicos de compuestos fenólicos.	9
Tabla 2	Diseño de postprueba únicamente y grupo control	22
Tabla 3	Metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.	27
Tabla 4	Promedio de fenoles de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura básica de los flavonoides.	11
Figura 2	Tipos de estructuras de los flavonoides.	11
Figura 3	Variación del contenido de Fenoles y flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018	28
Figura 4	Actividad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico en comparación del estándar Trolox de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	29
Figura 5	Actividad antioxidante por el método ABTS del extracto hidroalcohólico en comparación del estándar Trolox de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	30

ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Certificado de clasificación taxonómica de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018	47
Anexo 2	Flujograma de procedimientos del extracto hidroalcohólico de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018	48
Anexo 3	Recolección de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018	49
Anexo 4	Pesado de los extractos hidroalcohólico de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018	50
Anexo 5	Determinación de la actividad antioxidantes con las concentraciones respectivas del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	51
Anexo 6	Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018	52
Anexo 7	Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu del extracto hidroalcohólico de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018	53
Anexo 8	Curva de calibración de la Rutina para la determinación de flavonoides totales por el método de Peixoto del extracto hidroalcohólico de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018	54
Anexo 9	Curva de calibración de DPPH utilizando trolox como estándar a 515 nm del extracto hidroalcohólico de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	55
Anexo 10	Promedio de fenoles de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los limites superior,	56

	inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	
Anexo 11	Promedio de flavonoides de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	57
Anexo 12	Porcentaje de actividad antioxidante de trolox en DPPH de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	58
Anexo 13	Porcentaje de actividad antioxidante de muestra en DPPH de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	59
Anexo 14	Análisis de varianza de la concentración de inhibición del radical libre DPPH (CI50) del extracto hidroalcohólico y del estándar (trolox) de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	60
Anexo 15	Comparaciones múltiples de la Prueba de Duncan de la CI 50 del extracto hidroalcohólico y del estándar (trolox) de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018	61
Anexo 16	T Student de actividad antioxidante DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	62
Anexo 17	T Student de actividad antioxidante DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	63
Anexo 18	Porcentaje de actividad antioxidante de trolox en ABTS de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del	64

	extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	
Anexo 19	Porcentaje de actividad antioxidante de muestra en ABTS de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	65
Anexo 20	Análisis de varianza de la concentración de inhibición del radical libre ABTS (CI 50) del extracto hidroalcohólico y Trolox de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	66
Anexo 21	Comparación múltiple de la prueba de Duncan para actividad antioxidante de ABTS según concentración del extracto hidroalcohólico y Trolox de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.	67
Anexo 22	Matriz de consistencia	68

RESÚMEN

El presente trabajo de investigación tiene el objetivo de cuantificar fenoles totales, flavonoides totales y determinar la actividad antioxidante de *pernettya prostrata* Cav.) DC “macha macha”, es de tipo básica experimental, se realizó en el laboratorio de Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de Abril a Agosto 2018. La muestra vegetal fue recolectada en el Centro Poblado Bosque de piedra, anexo de Anchahuasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho a 3500 msnm. La identificación fitoquímica se realizó según lo descrito por Miranda y Cuellar, la determinación de fenoles totales se realizó según el método colorímetro Folin- Ciocalteu, determinación de los flavonoides totales se realizó por el método de Peixoto y para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó el método del consumo de radical DPPH por las muestras, mediante la disminución de la absorbancia de las soluciones a diferentes concentraciones. Se dividieron ocho grupos con tres repeticiones cada una. Grupo I: blanco: 0,3 ml muestra + 2,7 mL Etanol 50°, Grupo II: reacción: 0,3 mL muestra + 2,7 mL DPPH, Grupo III, IV, V: extracto hidroalcohólico de 25, 50 y 100 µg/mL respectivamente, Grupo VI, VII y VIII: Trolox: 25, 50 y 100 µg/mL respectivamente y de la misma manera se determinó por el método de ABTS con una mínima variación de toma del reactivo (980 µL de la solución del ABTS) y de concentraciones 150, 200, y 250 µg/mL respectivamente. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico fueron taninos, flavonoides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, antocianinas, quinonas, esteroides. El contenido de fenoles totales y flavonoides fue: 255,1 mg Eq AG/g y 22,1 mg Eq a rutina/g del extracto respectivamente. La actividad antioxidante DPPH del extracto hidroalcohólico a la concentración de 100 µg/mL (36.78%) presenta mayor actividad antioxidante respecto a las demás concentraciones, pero esta es estadísticamente diferente ($p=0,008$) al Trolox 100 µg/mL (94.79%). Se concluye que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata*(Cav.) DC. “macha macha” presenta actividad antioxidante.

Palabras clave: *Pernettya prostrata*(Cav.) DC., Antioxidante, compuestos fenólicos y flavonoides.

I. INTRODUCCIÓN

Hay unas ocho mil plantas naturales con compuestos fenólicos y aproximadamente la mitad de este número son flavonoides¹. Los fenoles poseen un amplio espectro de actividades bioquímicas como antioxidantes, antimutagénica, anticancerígenos². Los compuestos fenólicos son el grupo más grande de los fitoquímicos que representan la mayor parte de la actividad antioxidante de las plantas³.

Los flavonoides son el grupo químico más grande de origen natural, que se producen en parte de diferentes plantas tanto en estado libre como glucósidos. Se encuentran al tener muchas actividades como, antiulcerosos, antiartríticos, anticancerígenas, etc⁴. Las flavonas y flavonoles son los más ampliamente distribuidos de todo los compuestos fenólicos⁵.

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de acción de defensa a condiciones de estrés; tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros⁶. El envejecimiento celular es cuando el oxígeno usado en el metabolismo de un organismo vivo, y también la causa del deterioro de los mismos organismos vivos. Este último término son denominados radicales libres, fragmentos atómicos o moleculares con un electrón desapareado de muy alta reactividad responsable de daños en la estructura celular⁷.

En condiciones normales existe un equilibrio entre la generación de los radicales libres y su neutralización por los sistemas de defensas antioxidantes; pero cuando este equilibrio se rompe. Se produce el estrés oxidativo o daño oxidativo, mecanismo general del daño celular que conduce a una alteración en el funcionamiento celular directamente relacionada como patogénesis de muchas enfermedades y finalmente a la muerte celular.⁸

Se considera radical libre (RL) a aquellas moléculas que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital extremo. Esta configuración espacial les hace muy inestable, con una enorme capacidad para combinarse con la mayoría de las biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos) provocando un daño en altas y en las membranas celulares.

Los antioxidantes son sustancias cuya acción consiste en inhibir la tasa de oxidación de los nocivos radicales libres. Existen antioxidantes naturales, presentes en nuestro organismo; dentro de un grupo los antioxidantes pueden ser enzimas que aumentan la velocidad de ruptura de radicales libres; otros que previenen la participación de iones de metales de transición en la generación de radicales libres y los inactivadores o barredores y de esta manera protegían de las infecciones, deterioro celular, del envejecimiento prematuro y probablemente del cáncer.^{9,10}

El antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformando en un radical libre débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y como en algunos casos como la vitamina E pueden generarse en una forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Los antioxidantes se clasifican en endógenas (glutación, coenzima Q, ácido tiotico, superoxidodismutasa (sod) catalasa, glutación peroxidasa), fabricados por la propia célula y oxígenos (vitamina E, vitamina C, betacaroteno, licopeno, flavonoides), que ingresan en el organismo través de la dieta o en suplementos con formulaciones antioxidantes.⁸ si el sistema antioxidante endógeno es insuficiente para protegerlos en acción dañina de los radicales libre, es necesario que ingiera sustancia exógenas.⁹

La especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", es usada ampliamente por su actividad antioxidante, por tal motivo se propuso realizar la presente investigación para determinar el contenido de fenoles, flavonoides que están estrechamente relacionado con la actividad antioxidante.

Por estas consideraciones, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron los siguientes:

Objetivos Generales

- Evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”.

Objetivos Específicos

- Determinar la composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”.
- Determinar la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”.
- Determinar la actividad antioxidante por el método DPPH, ABTS y equivalentes TROLOX, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Rincón, et al. ¹¹ en el año 2014 en su tesis titulada “Estudio químico preliminar y evaluación de la actividad antioxidante, antialimentaria y tóxica, de la especie *Pernettya prostrata* (Ericaceae)” Bogotá (Colombia). Los extractos etanólicos de parte aérea y frutos se les determinaron los posibles constituyentes mediante un análisis fitoquímico preliminar, y se evaluó la actividad antioxidante mediante la captación del radical libre DPPH, la actividad tóxica frente a *Artemia salina* y antialimentaria frente a *Sitophilus zeamais* y *Tribolium castaneum*. Las pruebas fitoquímicas preliminares sugieren la presencia de flavonoides, taninos triterpenos y/o esteroides en los extractos etanólicos de frutos y parte aérea, obtenidos de *P. prostrata*. Del estudio fitoquímico realizado sobre el extracto etanólico de frutos se aisló e identificó escualeno y β -1-Ometoxiglucopiranososa. Los extractos etanólico de frutos (72,8 ppm) y parte aérea (60,9 ppm) presentan similar actividad antioxidante. La fracción metanólica es la de mayor actividad antioxidante con CI50 ($86,2 \pm 8,8$ ppm) y PI (89,8 %), mayores a los del ácido ascórbico usado como patrón (CI50 = $49,3 \pm 0,2$ ppm), concluyo la actividad tóxica a *Artemia salina* presenta de CL50 expresada en ppm exhibida frente al microcrustáceo *Artemia salina* por los extractos etanólicos de frutos es mayor de 1000 ppm y parte aérea es 1000 ppm, fracciones de la parte aérea es 1000 ppm y compuestos puros A y B son mayores de 100 ppm, actividad antialimentaria frente a *S. Zeamais* y *T. castaneum* obtenidos con los extractos de frutos y parte aérea, fracciones de la parte aérea y compuestos puros obtenidos de *Pernettya prostrata*, a las dos concentraciones de 1000 y 500 ppm donde IDA < 20% (-) no presenta situación alimentaria, 50% > IDA \geq 20% (+) débil situación alimentaria, 70% > IDA \geq 50% (++) moderada situación alimentaria y IDA \geq 70% (+++) fuerte situación alimentaria concluyendo el trabajo de investigación mediante el aislamiento e identificación de dos sustancias nuevas que son escualeno y β -1-Ometoxiglucopiranososa y la

determinación de la actividad antioxidante de extractos y fracciones respectivamente CL 50 ($86,2 \pm 8,8$ ppm) y PI (89,8 %).

García et al,¹² en el año 2012 en su tesis titulada “compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante en las flores de *Crataegus spp*” México. Se determinó la actividad antioxidante con el método DPPH (2,2- difinil-1-picrilhidrazilo y los flavonoides se identificaron con HPLC (cromatografía líquida de alta performance), obteniendo como resultado la quercetina-3-O- glucósido y quercetina- 3-ramnosido, quercetina-3-O-ramnosil- 81,6)-glucósido. El contenido de fenólicos fue mayor que los flavonoides.

Cortes C, José Y.¹³ en el año 2009 en su tesis titulada “Estudio químico de frutos de *pernettya prostrata* (cavan) *sleumer* y su evaluación en la producción de hipercalcemia” España, se obtuvieron extractos acuosos y en cloroformo de fruto *Pernettya prostrata* los cuales se fraccionaron en cloroformo, acetato de etilo y butanol con el fin de encontrar sustancias del tipo andromedotoxina; también se suministró el fruto seco a ratas de experimentación, para evaluar su efecto en el aumento de calcio en sangre.¹² Se seleccionaron 18 ratas macho de la cepa wistar entre los cinco y seis meses de vida, con un peso aproximado entre 250 y 300 g. Se dividieron en tres grupos: al primer grupo se le suministró alimento para ratas (Rodentina) y Carbonato de calcio; al segundo grupo alimento para ratas (Rodentina) y fruto; y el tercer grupo se tuvo como control (Rodentina). Se tomaron 4 muestras de sangre por cuatro veces, durante un periodo de diez horas para cuantificarles el calcio por espectrofotometría de absorción atómica.¹³ Los frutos de *Pernettya prostrata* mostraron dos diterpenos que posiblemente son del tipo grayanotoxina y además produjo un aumento de calcio en 13.86 mg/100mL en suero sanguíneo lo que lleva a pensar que es efecto de la misma posible toxina.

Braúl E, Díaz D.¹⁴ en el año 2016 en su tesis titulada características farmacognósticas del fruto *pernettya prostrata* (Cav.) DC “macha macha” Perú (Trujillo). Las características farmacognósticas se realizaron de acuerdo a la metodología de Miranda, donde se determinaron las características macroscópicas, fisicoquímicas y el tamizaje fitoquímico de los frutos frescos. Los resultados mostraron que los frutos frescos presentan un diámetro y peso promedio de 10 mm \pm 0.776 y 10.1 g \pm 0.018 respectivamente. Asimismo estos frutos tienen color púrpura, textura camosa, superficie lisa, olor sugéneris, forman circular y consistencia blanda. Las características fisicoquímicas encontradas

fueron grado Brix ($9.8^{\circ} \pm 0.1$), índice de refracción (1.347 ± 0.001), Ph (5.24 ± 0.003). Peso seco ($0.02g \pm 0.077$), sólidos totales ($0.44g \pm 0.0027$), cenizas totales ($4.76\% \pm 0.076$), cenizas insolubles en agua ($2.44\% \pm 0.09$), cenizas ácido insoluble ($1.52\% \pm 0.062$) y humedad ($17.2\% \pm 1.19$). Los fitoconstituyentes encontrados fueron: aceites y grasa, lactonas, triterpenos y esteroides, compuestos fenólicos, antocianinas, flavonoides, catequinas, aminoácidos, azúcares reductores, saponinas y taninos.

Aguilar E,¹⁵ en el año 2007 en su tesis titulado “Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *smallanthus sonchifolius* (yacon) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora” Lima. Utilizó el método de aislamiento de flavonoides, primera extracción hidroalcohólica con etanol al 80% con doble extracción, desengrasado con éter de petróleo, y luego la extracción líquido-líquido con acetato de etilo lo cual se extrajeron los compuestos fenólicos.

Del Solar C,¹⁶ en el año 2012 en su tesis titulado “Estudio la actividad antioxidante de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “Wawillay” UNSCH Ayacucho, se encontró que la crema al 0.5% con concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ presentó mayor porcentaje de inhibición de radicales libres ($99,46 \pm 0.11\%$) respecto a las cremas al 1,0% y 2,0% que presentaron porcentajes de $99,10 \pm 0,46\%$ y $96,45 \pm 0,53\%$ respectivamente.

Mauricio F,¹⁷ en el año 2001 en su tesis titulado Tamizaje farmacológico de *Pernettya prostrata* “macha macha” UNSCH (Ayacucho). El tamizaje fitoquímico de las hojas y de los frutos reportó la presencia de taninos, flavonoides, quinonas, saponinas, catequinas, azúcares reductores triterpenoides y esteroides. En tamizaje farmacológico permitió determinar el efecto depresor de esta planta en fracción de dosis de 100, 300, y 1000 mg/kg, observándose los efectos con mayor precisión a la dosis de 300 mg/kg y el estudio toxicológico del extracto de la hoja permitió determinar la DL50 que es de 1088.383 mg/kg. Este trabajo de investigación se concluyó con la presencia de metabolitos esenciales que presenta en las hojas y frutos de la especie *Pernettya prostrata* “macha macha” y determinando el efecto depresor en fracciones de dosis mencionadas y su efecto toxicológico del extracto de las hojas de dicha planta.

2.2. Aspectos Botánicos de *Pernettya prostrata* (Cav) DC. “macha macha”

2.2.1 Descripción taxonómica

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: DILLENIIDAE
ORDEN	: ERICALES
FAMILIA	: ERICACEAE
GÉNERO	: <i>Pernettya</i>
ESPECIE	: <i>Pernettya prostrata</i> (Cav). DC.
NOMBRE VULGAR	: “macha macha”

Fuente: Constancia emitida por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

2.2.2. Descripción botánica

Es un arbusto pequeño, erecto o su postrado, de hasta 50cm de altura. Hojas simples, alternas, elípticas, coriáceas, con la margen crenada y ligeramente revoluta, con el haz lustroso, envés verde claro, base redonda a carneada, ápice obtuso a subagudo, a veces mucronado. Flores axilares, solitarias tendiendo a agruparse al final de las ramas, pequeñas, hermafroditas, tubulares, globosas y de color rosado encendido a rosado blanquecino, ovario supero, pedicelos glabrescentes o con pelos glandulares rojos. Caliz de 2-36 mm de largo, verde claro; corola 5.6- 6.8 mm de largo urceolada – cilíndrica. Tiene 10 estambres. Fruto baya, pequeña, subglobosa, carnosa y de color morado al madurar.^{7,8}

Cuando se consumen causan intoxicación a una cierta cantidad. Estudios realizados han sugerido que la toxicidad puede ser debida a la presencia de la andrometoxina o grayanotoxina, sustancias presentes en otras especies de la familia.¹⁸

2.2.3. Hábitat y distribución geográfica

El género *pernettya* está constituido por un total de 20 especies, 15 de ellas distribuidas en América y las otras cinco en Nueva Zelanda y están restringidas principalmente a bosques nubosos de altura. En Costa Rica *Pernettya prostrata* Cav. (DC) es mono específico y está representado por el “bejuco muela”, “arrayan” o “reventadera”, es común en zonas altas de la vertiente del pacifico y la vertiente del caribe, desde los 1000 a los 3820 msnm. En Colombia se conoce popularmente como “reventadera”, “borrachero”, “maíz de perro” o “mortiño

venenoso”, la cual es consumida por animales silvestres y domésticos, habitantes de la región.¹⁸

2.2.4. Propiedades y usos medicinales

La especie botánica de *pernettya prostrata* Cav.) DC. es una planta medicinal nativa, es utilizado por los pobladores de la zona para dolores osteomusculares y como somnífero, infusiones de hoja maduras para tratar los dolores fuertes de cabeza.¹⁸

2.3. Composición química

Rincón, et al¹¹ en el año 2014 en su tesis titulada “Estudio químico preliminar y evaluación de la actividad antioxidante, antialimentaria y tóxica, de la especie *Pernettya prostrata* (Ericaceae)” Bogotá (Colombia). Las pruebas fitoquímicas preliminares sugieren la presencia de flavonoides, taninos triterpenos y/o esteroides en los extractos etanólicos de frutos y parte aérea, obtenidos de *P. prostrata*. Del estudio fitoquímico realizado sobre el extracto etanólico de frutos se aisló e identificó escualeno y β -1-Ometoxiglucopiranososa.

2.4. Relación estructura actividad de los metabolitos secundarios.

2.4.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un conjunto heterogéneo de moléculas, que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por algunas de uso común por sus propiedades antioxidantes merecen mayor atención. Este grupo de compuestos posee propiedades: antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes plaquetarios, antimicrobianas, antirradicales libres, antimutagénicas, anticarcinogénicas y quimioprotectoras.¹⁹

Tabla 1. Grupo característico de compuestos fenólicos.

Unidad base:	Ácido gálico	Flavona	Ácido cinámico
Clase/Polímero:	Taninos hidrolizables	Flavonoide, Taninos condensados	Ligninas

Fuente: Leighton, F.; Urquiaga, I. Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y calidad de vida. 2000.¹⁹

Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, describiéndose a continuación aquellas con mayor interés nutricional.²⁰

2.4.1.1 Fenoles, ácidos fenólicos y fenil acéticos.

Dentro de este grupo se encuentran el fenol, cresol, timol y resorcinol distribuidos en todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainílico, p-hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos.²¹

2.4.1.2 Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles

Los ácidos cinámicos (caféico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general se haya presentes en forma de derivados.

Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido, mientras que los cromonoles son menos conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH del medio.²¹

2.4.1.3. Lignanós y neolignanós

Son metabolitos de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de p-hidroxifenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno. Son monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y alilbenceno. El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de aniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano.²¹

2.4.1.4. Flavonoides.

Son metabolitos secundarios muy numerosos y ampliamente distribuidos. Se conoce como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. Estos flavonoides suelen encontrarse bajo la forma de glicósido con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; es

frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones.²²

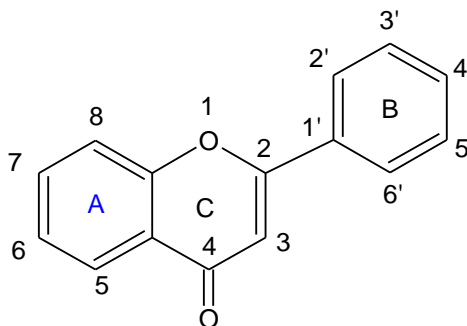


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides

a. Propiedades medicinales de los flavonoides

A un gran número de flavonoides se le ha encontrado diversas actividades a nivel biológico, tales como la prevención del cáncer, antibacteriana, antiinflamatoria, como reductores del riesgo de enfermedad cardiovascular, asociados a la prevención de neuropatologías, con potencial actividad antioxidante. La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradores de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas, lipooxigenasas, ciclooxigenasas, mieloperoxidasas y la xantina oxidasa, evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroperóxidos orgánicos. También inhiben enzimas como la fosfolipasa A₂, al mismo tiempo estimulan a la catalasa y el superóxido dismutasa. Asimismo, retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales, hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos, se ha corroborado la protección antioxidante en queratinocitos, fibroblastos dérmicos, ganglios sensoriales, endotelio y tejido nervioso.²³

b. Tipos de flavonoides

Como ya se ha señalado anteriormente, los flavonoides cuentan con diferentes clases de acuerdo con su estructura química.^{22,23}

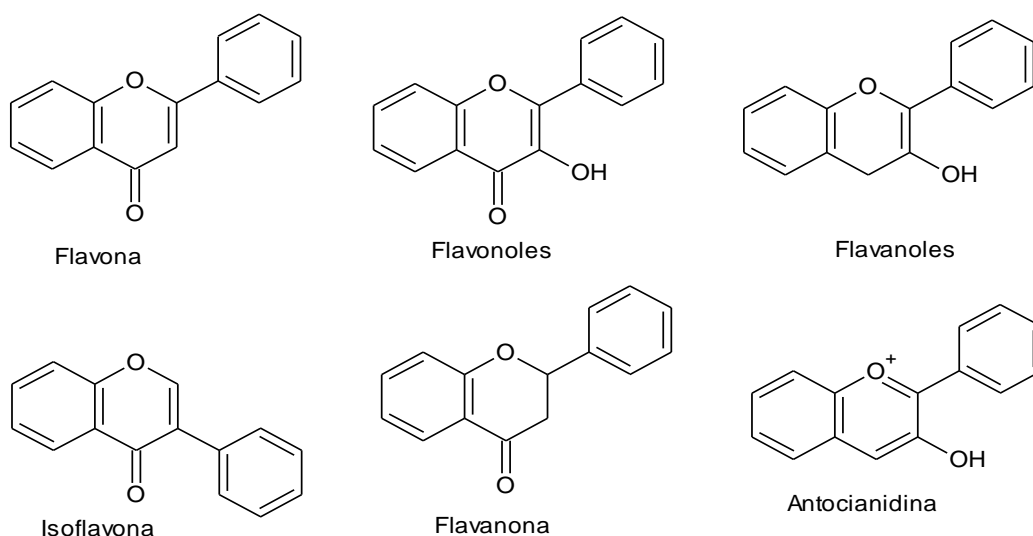


Figura. 2. Tipos de estructuras de Flavonoides.

e. Taninos

Son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 500D y 3000D. Estos compuestos contienen un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales (1 a 2 por 100D), siendo por tanto capaces de unirse a proteínas y a otras moléculas.^{22,23}

2.5 Radicales libres

Un radical libre es una molécula o fragmento molecular que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. También pueden ser radicales libres los iones metálicos y el átomo de hidrogeno.

Ese o esos electrones generan un campo eléctrico que no es anulado, lo que ocasiona que las especies químicas sean paramagnéticas y por ende altamente reactivas, capaces de actuar en los sistemas biológicos con gran avidez, lo que les conduciría a interactuar rápidamente con otras moléculas con las que entren en contacto, produciendo cambios en la conformación química o en la estructura de los elementos celulares que los hace incompatibles con la vida.²⁴

a).- Producción de radicales libres de oxígeno

Se forman de manera ilimitada durante el metabolismo celular normal, por lo que entre las fuentes endógenas de radicales libres del oxígeno se pueden mencionar

las cadenas de transporte de electrones mitocondrial y microsomal, reacciones catalizadas por oxidasas y oxigenasas, reacciones de auto oxidación de metales, actividad de células fagocíticas (granulocitos, macrófagos, células endoteliales) y transporte de oxígeno por la hemoglobina.²⁵

b).- Reactividad de los radicales libres y estrés oxidativo

La reactividad de los radicales libres es muy diferente, algunos son relativamente estables, pero la mayoría de los que tienen interés biológico son extremadamente reactivos e inestables y, como resultado tienen una vida media muy corta. El radical hidroxilo es el más reactivo de los radicales oxigenados y por su corta vida media (pocos microsegundos) su radio de acción efectivo en la célula es de aproximadamente 30 Å. Los radicales libres pueden actuar como oxidantes o reductores. Cuando reaccionan con un compuesto se pueden formar otros radicales libres, es decir se producen reacciones en cadena, por ejemplo, la peroxidación lipídica.²⁶

Aunque la radical libre inicial origina solamente efectos locales, los radicales secundarios derivados y los productos de degradación formados pueden tener efectos biológicos distantes del sitio donde se generó el primer radical. Cuando dos radicales actúan entre sí, se puede formar una molécula estable, con lo cual se terminan las reacciones en cadena.

El radical superóxido (O_2^-) no es particularmente reactivo, pero es potencialmente tóxico. Puede influir directamente en la homeostasis local, por ejemplo, oxidando catecolaminas, y lo que es más importante, puede transformarse en el radical hidroxilo (OH) que es muy peligroso.

El H_2O_2 no es especialmente tóxico para las células, pero puede atravesar membranas y esto es importante, porque el medio extracelular posee muy pocos mecanismos de defensa antioxidante. En presencia de trazas de iones metálicos de transición se forman radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno (Reacción de Fenton) y también por interacción entre el radical superóxido y H_2O_2 (reacción Haber-Weiss).²⁶

2.6. Daño molecular inducido por radicales libres

Los radicales libres ejercen efectos útiles y nocivos. Entre los útiles se puede mencionar el papel de defensa que cumplen los producidos por los fagocitos en la destrucción de organismos invasores; además, algunas reacciones enzimáticas

transcurren posiblemente por mecanismos radicales (caso de la ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa). En cambio, los efectos nocivos son numerosos, por dañar lípidos, proteínas, carbohidratos, entre otros.²⁶

2.7. Antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que neutralizan los radicales libres o sus acciones. La naturaleza ha dotado a cada célula con adecuados mecanismos de protección contra cualquier efecto perjudicial de los radicales libres: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, tiorredoxina, enlaces tiol y disulfuro son sistemas amortiguadores de cada célula. El alfa tocoferol (vitamina E) es un nutriente esencial el cual funciona como antioxidante rompedor de cadenas, el cual previene la propagación de las reacciones de radicales libres en todas las membranas celulares. El ácido ascórbico (vitamina C) es también parte del mecanismo normal de protección. Otros antioxidantes no enzimáticos incluyen a los carotenoides, flavonoides, y polifenoles relacionados, ácido lipoico, el glutatión entre otros.²⁷

Existen dos tipos de antioxidantes como son los naturales y los sintéticos.

a. Naturales

- Superóxido dismutasas (SOD): enzima que se encuentra dentro de las células remueve los radicales superóxidos.
- Catalasa: esta enzima remueve el peróxido de hidrogena, formando por la acción de las deshidrogenas. Se encuentra en sangre, medula ósea, mucosas, riñón e hígado.
- Glutatión per oxidasa: Esta enzima intracelular contiene selenio, remueve el radical peróxido y los hidroperóxidos lipídicos por el glutatión reducido protegiendo a los lípidos de la membrana de la hemoglobina contra la oxidación de estos radicales.²⁷

b. Sintéticos:

- Ácido ascórbico (vitamina C): Antioxidante soluble en agua, figura en primera línea en la defensa antioxidante del plasma; es un poderoso inhibidor de la oxidación de los lípidos.

- Citroflavonoides: Su uso es eficaz en conjunción con la vitamina C a la que aumenta su capacidad antioxidante. La hesperidina y la rutina son dos de ellos.
- Tocoferol (vitamina E): Principal antioxidante soluble en lípidos previene la oxidación de grasas; aumenta su acción en presencia de zinc.
- Beta caroteno (provitamina A) y Vitamina A, el beta caroteno se convierte en nuestro organismo en la vitamina A, es un poderoso antioxidante liposoluble.
- Selenio: Es uno de los antioxidantes más importantes.²⁷

2.8. Actividad secuestradora de radicales libre

Existen muchos métodos para evaluar la actividad antioxidante en fuentes vegetales, como plantas medicinales y en frutos. Uno de ellos es el método neutralización del radical libre 2,2-difenildipicrilhidracil (DPPH). El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. La solución del reactivo de DPPH es de color violeta y presenta una absorbancia de 515 nm, La reacción consiste en la sustancia de un átomo de hidrogeno proveniente de un donador (compuesto puro o extracto) por el radical libre DPPH, desarrollando un cambio de color violeta a amarillo a medida que disminuye la concentración del radical libre; el que se lee en el espectrofotómetro después de cinco minutos de reacción.²⁷

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El presente trabajo de investigación se ejecutó en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Región Ayacucho, Perú

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”, que crecen en zonas áridas, del Centro Poblado de Bosque de Piedra, Anexo Anchachuasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho.

3.2.2. Muestra

2 Kg de hojas desecadas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”, recolectadas durante el mes de Abril, a partir de los cuales se realizó el extracto hidroalcohólico.

3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1. Procedimiento para la recolección de muestra.

Se recolectó al azar las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”, en horas de la mañana. Las hojas se lavaron y se secó a temperatura de ambiente, en un lugar con buena ventilación, cambiando el papel de soporte y removiendo el vegetal para evitar su descomposición, por un periodo de cinco a ocho días según las directrices de la OMS.²⁸

3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico

Una vez separado las hojas desecadas, se redujo el tamaño utilizando el mortero hasta obtener pulverizado uniforme, luego se pesó 20 g aproximadamente de muestra seca pulverizada, el cual fue llevado a un frasco ámbar para su percolado, cubriendo con alcohol de 50° hasta una altura de 1-2cm por encima de la muestra se colocó en un percolador durante 24 horas adicionales, posteriormente se dejó salir a razón de 20 gotas por minuto (agregando continuamente el solvente) y posteriormente fue filtrada para evitar polvillos. Luego se procedió a secar el extracto empleando una estufa a una temperatura de 40°C. El producto obtenido se envaso en un recipiente ambar, de cual se hicieron posteriores diluciones hasta encontrar una dilución óptima que contenga ácidos fenólicos y flavonoides en cantidades considerables para el desarrollo de la determinación de la capacidad antioxidante.

3.3.3. Tamizaje fitoquímico

Una vez obtenido el extracto hidroalcohólico se realizó las pruebas pertinentes para la identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios, se tomó un mL de extracto de la planta a la cual se le agregaron los reactivos correspondientes para generar reacciones simples específicas de coloración y espuma.²⁹

3.3.4. Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por el método colorímetro Folin-Ciocalteu (FC)³⁰, con algunas modificaciones.

Preparación de la curva de calibración de ácido gálico:

Se pesó 20 mg de ácido gálico, se disolvió con agua bidestilada y enrazó a un volumen de 25 mL para obtener una solución stock de 800 µg/mL. De esta solución madre se preparó soluciones estándares de 10, 20, 40, 60 µg/mL a partir de los estándares se tomó alícuotas de 100 µL, 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 400 µL de Na₂CO₃ 7.5%. Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV Visible a 765 nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco y se diluyó el reactivo Folin 1/10 con agua bidestilada.

Preparación de la muestra:

Se pesó 100mg del extracto seco y llevó a diluciones de 10 mL, 25 mL y 5 mL

aforando con etanol de 50° (solución muestra). A partir del último dilución se tomó alícuotas de 100 µL de la muestra, 400 µL reactivo de Folin-Ciocalteu 1/10 y 500 µL de Na₂CO₃ 7.5%. Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

La cantidad de compuestos fenólicos en el extracto se determinó en miligramos de contenido fenólico equivalentes de ácido gálico/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración del ácido gálico.

3.3.5. Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales en los extractos acuosos se determinó por el método de Peixoto M.³¹, con algunas modificaciones.

Construcción de la curva de calibración:

Se pesó 1mg de rutina, se llevó a un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió con 2,5 mL de metanol luego se aforó con etanol al 50 %. De esta solución stock se tomó directamente alícuotas de 1, 1.5, 2, 2.5, 3 ,3.5 y 4 mL, 0,5 mL de tricloruro de aluminio y etanol al 50° cantidad suficiente para 5 mL. El blanco se preparó de igual forma sin la muestra. Se dejó reposar por 30 minutos y luego realizó las lecturas en el espectrofotómetro UV visible a una longitud de onda de 415 nm.

Preparación de la muestra:

Se pesó 100mg del extracto seco y se llevó diluciones de 10 mL y 25 mL aforando con etanol de 50° (solución muestra). A partir de la última dilución se tomó alícuotas de 100 µL de la muestra, 0.5 mL del reactivo tricloruro de aluminio y 2.5mL de etanol de 50°. Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 415 nm. Utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco. La cantidad de flavonoides en el extracto se determinó en miligramos de contenido de flavonoides equivalentes de rutina/mg de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración del ácido gálico.

3.3.6. Determinación de la actividad antioxidante

a. Método del radical 2, 2-difenil-1- picrilhidracilo (DPPH).

Se hizo la evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante siguiendo la metodología de Suárez S.³² con algunas modificaciones menores.

Construcción de la curva de calibración DPPH:

Se procedió a preparar 50 mL de la solución madre DPPH en etanol a una concentración de 40 µg/mL, se almacenó en el refrigerador y protegido de la luz. Se realizó diluciones 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 y 1 µg/mL. La curva de calibración se construyó a partir de los valores de absorbancias a 515 nm de todas las soluciones (1 a 40 µg/mL), medida en cubeta de vidrio 1 cm y teniendo como blanco el etanol. Las medidas de absorbancia se realizaron por triplicado a los 30 minutos, luego se procedió las mediciones de absorbancias de las muestras de extractos de Etanol (500 µg/mL) y controles positivos (trolox) en etanol se diluyeron a concentraciones de 250, 200, 150, 100, 50 y 25 mg/mL. Las medidas de absorbancia de las mezclas de reacción (0,3 mL de la solución de muestra o control positivo y 2,7 mL de la solución madre de DPPH a la concentración de 40 µg/mL) se hicieron a 515 nm en el espectrofotómetro UV Visible, luego de transcurrir los 30 minutos. Una mezcla de etanol (2,7 mL) y la solución extracto etanólico (0,3 mL) se utilizó como blanco. A partir de la curva de calibración de la ecuación y los valores de tiempo de absorbancia de 30 min para cada concentración de prueba. Se determinó el porcentaje de DPPH restante (%DPPH_{REM}), de acuerdo con la ecuación:

1. A partir de la curva de calibración de la ecuación y los valores de tiempo absorbancia de 30 minutos se determinó la concentración de DPPH (µg/mL) para el trolox y los extractos de “macha macha”

$$x = \frac{(y - b) - a}{b}$$

2. Se determinó el porcentaje de DPPH restante (%DPPH_{REM}), de acuerdo a la ecuación:

$$\%DPPH_{REM} = \left[\frac{DPPH_{T=30}}{DPPH_{T=t_0}} \right] \times 100$$

Dónde:

DPPH_{T=30} : Concentración de DPPH en el medio después de la reacción con el extracto.

DPPH_{T=t₀} : Concentración inicial de DPPH

3. Los valores de absorbancia a todas las concentraciones ensayadas se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (%AA), que se determinó por la ecuación:

$$\%AA = \frac{[Abs_{control} - (Abs_{muestra} - Abs_{blanco})]}{Abs_{control}} \times 100$$

Dónde:

Abs_{control}: absorbancia inicial de la solución etanol de DPPH,

Abs_{muestra}: absorbancia de la reacción del DPPH con la muestra.

4. La concentración requerida para el 50% de inhibición del radical libre DPPH (CI50) será calculada mediante la ecuación exponencial de la concentración del extracto y trolox vs %DPPH_{REM}.

$$y = y_0 + Ae^{R_0x}$$

$$CI50 = \frac{(\ln \frac{50 - y_0}{A})}{R}$$

b. Método del radical 2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)³³

Preparación de reactivos:

ABTS 7 mM. Para 10 mL se disolvió 0,0384 g de sal amónica cristalizada de ABTS en 10 ml de agua destilada.

Solución persulfato potásico 2,45 mM. Para 100 ml se disolvió 0,0662 g del reactivo en 100 mL de agua destilada.

Preparación del radical:

Preparación radical ABTS. Se mezcló a partes iguales la solución de ABTS 7 mM y la de persulfato potásico 2,45 mM. La mezcla se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical. Esta solución es estable durante dos días. La solución de ABTS se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ 730 nm. Esto se consigue mezclando 2,5 mL de la solución del radical con aproximadamente 100 mL de etanol.

Se preparó una solución madre de estándar trolox a una concentración inicial de 500 µg/mL (se pesó 5 mg de estándar y se enrasó con etanol 96° en fiola de 10 mL), a partir de esta solución se prepararon diferentes diluciones dando concentraciones finales de 25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL.

Se preparó una solución madre de extracto de *Brachyotum naudinii* Triana en agua destilada, a una concentración inicial de 500 µg/mL, a partir de esta solución se prepararon diferentes diluciones con etanol dando concentraciones finales de

25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL, luego se procedió a preparar la muestra en un tubo con 20 µL de solución del extracto y 980 µL de la solución del ABTS+. Dejó reposar por 7 minutos en la oscuridad luego se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV Visible a 734 nm. El porcentaje de actividad antioxidante se determina siguiendo la ecuación que se presenta a continuación.

$$\%CA = \frac{[A_{control} - (A_{muestra\ con\ ABTS} - A_{blanco\ de\ la\ muestra})]}{A_{del\ ABTS}} \times 100$$

Donde:

$A_{control}$: es la absorbancia inicial de la solución de etanol ABTS.

$A_{muestra}$: es la absorbancia de la mezcla de reacción (ABTS + muestra).

3.4. Diseño experimental

El diseño que se empleó, es el diseño de postprueba únicamente y grupo control. Simbólicamente y de forma abreviada corresponde a:

RG_n	X_n	O_n
RG_c	----	O_c

Donde **RG** corresponde a los tratamientos, **X**, es el experimento, **O**, es la observación y (----) el blanco.³⁴

Tabla 2. Diseño de postprueba únicamente y grupo control.

Grupo	Repeticiones	Tratamiento
I	3	Blanco: 0,3 mL muestra + 2,7 mL Etanol 50°
II	3	Reacción: 0,3 mL muestra + 2,7 mL DPPH
III	3	Extracto hidroalcohólico 150 µg/mL
IV	3	Extracto hidroalcohólico 200 µg/mL
V	3	Extracto hidroalcohólico 250 µg/mL
VI	3	Trolox 150 µg/mL
VII	3	Trolox 200 µg/mL
VIII	3	Trolox 250 µg/mL

Fuente: Hernández S., Fernández C., Baptista L. metodología de la investigación. 2006.³⁴

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan en cuadros y gráficos. La diferencia significativa que existe entre los tratamientos son evaluados a través del Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia estadística de 0,05. Las comparaciones entre cada tratamiento se hicieron a través de la prueba de Duncan (para ello se utilizó el programa SPSS versión 21).

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.

Metabolitos secundarios	Reactivos y/o reacciones	Resultados	Observaciones
Taninos del tipo pirocatecolicos	Tricloruro férrico	+++	Coloración verde intensa
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración carmelita o rojo
Saponinas	Espuma	+	Formación de espuma por más de dos minutos
Cardiotónicos	Kedde	++	Coloración Azul violeta
Antocianinas	Antocianidinas	++	Coloración roja en la fase amílica
Esteroides	Lieberman-Burchard	+++	Coloración verde oscuro
Quinonas	Borntrager	++	Coloración roja en la fase alcalina

Leyenda:

Leve : (+)

Moderado: (++)

Intensa : (+++)

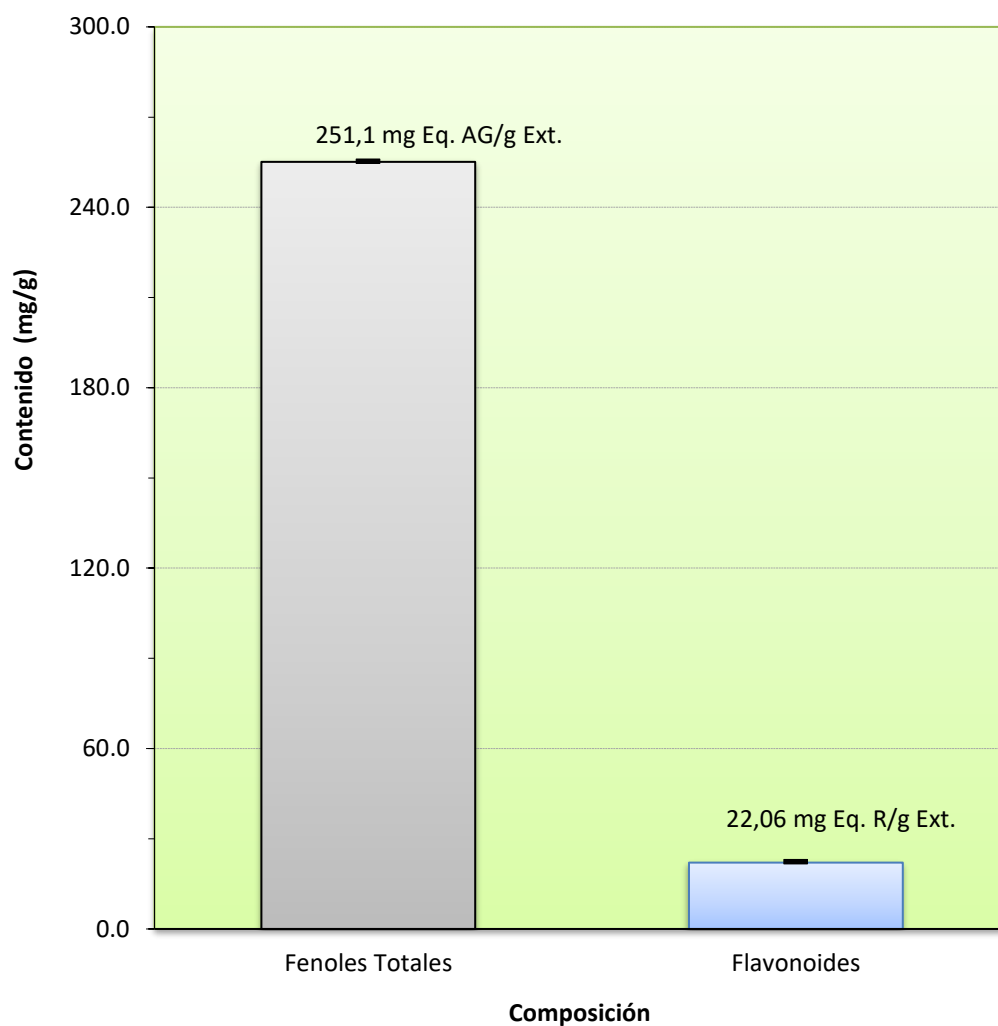


Figura 3. Variación del contenido de Fenoles y flavonoides totales del extracto hidroalcoholico de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.

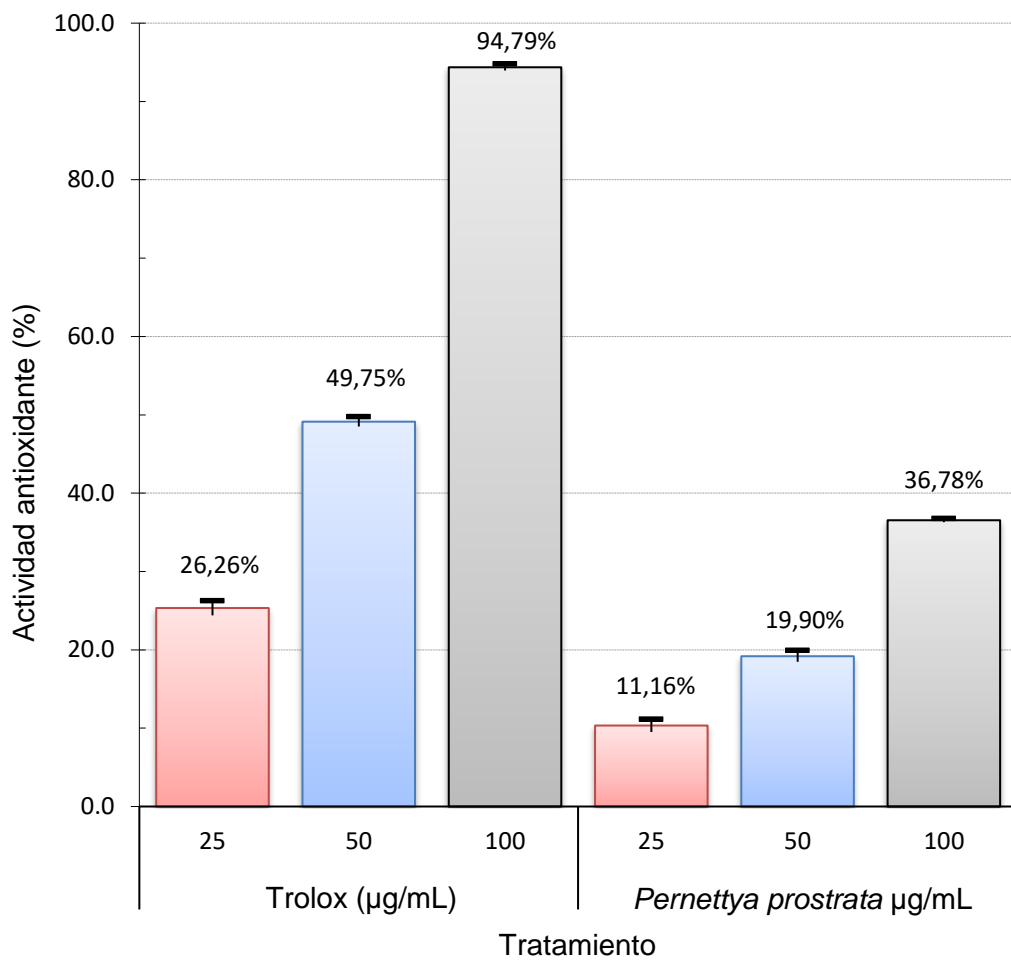


Figura 4. Actividad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”. En comparación del estándar Trolox Ayacucho 2018.

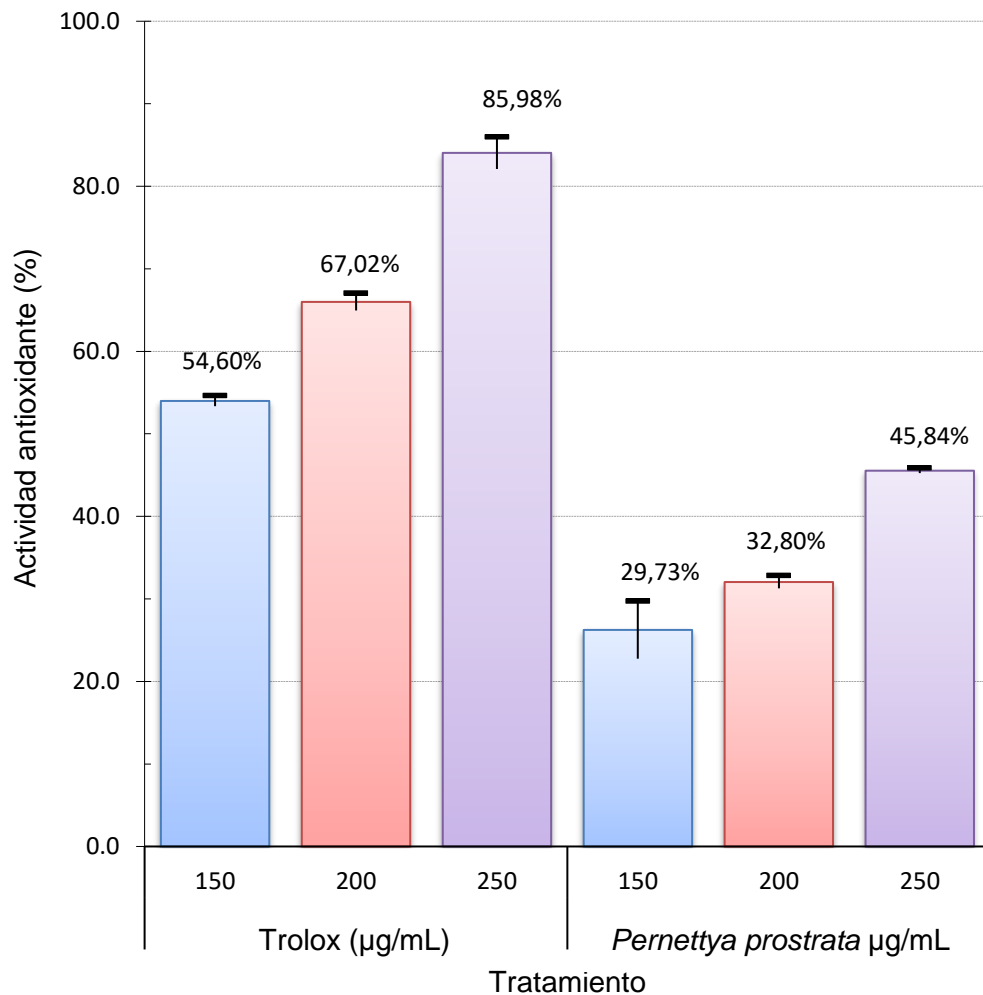


Figura 5. Actividad antioxidante por el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”. En comparación del estándar Trolox Ayacucho 2018.

Tabla 4. Promedio de fenoles de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha”, Ayacucho 2018.

Resultado	CI50			
	DPPH		ABTS	
	Trolox	<i>P. prostrata</i>	Trolox	<i>P. prostrata</i>
X	38,5*	120,3*	148,1*	285,1*
S	0,186	1,059	0,393	2,021
+/-	0,46	2,63	0,98	5,02

V. DISCUSIÓN

El uso de las plantas medicinales data desde la antigüedad ya que consta en diversos testimonios históricos pertenecientes a diversas civilizaciones y culturas. Estos recursos curativos vegetales están agrupados por categorías terapéuticos, de acuerdo a sus efectos farmacológicos.³⁵

Mediante un informe de la organización mundial de la salud, se estima que más de la mitad de habitantes de la tierra confían en las medicinas tradicionales para resolver sus principales necesidades de salud como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales.³⁶

En el Perú la medicina tradicional, es el resultado de lo que antiguamente los expertos la dividían en medicina popular, medicina folclórica y medicina ancestral, donde se agrupa a todo un conjunto de conocimientos y saber cuál ha sido la manera de curar y prevenir las enfermedades, rescatándose a través de los tiempos y que cada pueblo o cultura ha sabido guardar y conserva.³⁷

La tabla 3, muestra los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha". Esta nos muestra la presencia de taninos del tipo pirocatecólicos, flavonoides, saponinas, cardiotónicos, antocianinas, esteroides y quinonas. Braul y Diaz.³⁷ determinaron la presencia de lactonas, triterpenos y esteroides, compuestos fenólicos, antocianidinas, flavonoides, catequinas, aminoácidos, azúcares reductores, saponinas y taninos, ratificando los metabolitos encontrados en la investigación: Características farmacognósticas del fruto de *Pernettya prostrata* (cav.) dc. (macha macha) procedente de la región Ayacucho.

Lo que más destaca del tamizaje fitoquímico es la presencia de antocianinas por la presencia de la coloración roja en la fase amílica. También la presencia de quinonas por la coloración roja en la fase alcalina.

Los metabolitos secundarios más representativos en la familia Ericaceae son: flavonoides, taninos y terpenos. Algunos extractos y compuestos aislados de las especies que la conforman, han presentado propiedades biológicas promisorias como antioxidante, antiinflamatoria, insecticida, antiescabiótica, antimicótica, y actividad anti-VIH.³⁷

El consumo de polifenoles, antocianinas, flavonoides se ha vinculado con la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas. La labor antioxidante que tienen estos componentes es primordial ante el estrés oxidativo, cuando los sistemas antioxidantes (enzimático y no enzimático) no son suficientes para proteger de la acción dañina de los radicales libres.³⁸

Los fenoles como: taninos condensados, flavonoides, ácidos fenólicos como el clorogénico, cumárico y elálgico; han sido declaradas como potentes neutralizadores de sustancias reactivas de oxígeno (EROS); estos están presentes en frutas como la mora, uchuva, lulo, el mortiño entre otros; además de inhibir algunas enzimas oxidantes (xantina oxidasa).³⁸

La figura 3, nos muestra la concentración de fenoles totales y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha". Nos muestra los valores del contenido de fenoles totales que fue 255,1 mg/g y el contenido de flavonoide totales 22,06 mg/g.

Braul y Diaz.³⁷ determinaron las características fisicoquímicas: grado Brix ($9.8^{\circ} \pm 0.1$), índice de refracción (1.347 ± 0.001), pH (5.24 ± 0.003), peso seco ($3.02 \text{ g} \pm 0.077$), sólidos totales ($0.44 \text{ g} \pm 0.0027$), cenizas totales ($4.76\% \pm 0.076$), cenizas insolubles en agua ($2.44\% \pm 0.09$), cenizas ácido insolubles ($1.52\% \pm 0.062$) y humedad ($17.2\% \pm 1.19$). En la investigación: Características farmacognósticas del fruto de *Pernettya prostrata* (cav.) dc. (macha macha) procedente de la región Ayacucho.

Por su parte Llimpe³⁹ determinó las características fisicoquímicas del fruto de macha macha en estado maduro presentando un: pH 4.67, humedad 84.760%, acidez (expresado como ácido cítrico) 0,028, grasa 0.536%, proteína 0.897%, cenizas 0.478%, carbohidratos totales 13.329%. Estos resultados revelan al fruto de macha macha como promisorio, para su aprovechamiento agroindustrial como fuente importante de antocianinas y antioxidantes. En la investigación: Estudio del contenido de antocianinas y capacidad antioxidante del fruto de macha macha (*Vaccinium floribundum kunth*) durante la maduración.

Para la determinación del contenido de fenoles totales se utilizó el método colorímetro Folin-Ciocalteu (FC), con algunas modificaciones y para la determinación del contenido de flavonoides totales determinó por el método de Peixoto, M., con algunas modificaciones.

La figura 4, nos muestra los valores de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha". Esta nos muestra que el extracto hidroalcohólico a la concentración de 100 µg/mL (36,78%) presenta mayor actividad antioxidante respecto a las demás concentraciones, pero esta es estadísticamente diferente ($p=0,008$) al Trolox 100 µg/mL (94,79%). Diaz y col.³⁴ determinaron la actividad antioxidante de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. Utilizando el método de captación del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Respecto a la capacidad antioxidante del extracto crudo del fruto fresco a las concentraciones de 10, 50, 100, 200 µg/mL, presentó un porcentaje de captura de radicales libres de 73,2% a la mayor concentración y un IC50 de 85,09 µg/mL, indicando que si existe diferencia estadística con respecto al estándar 40,15 µg/mL con ($p<0,05$), en la investigación: Cuantificación de vitamina C y evaluación de la capacidad antioxidante del fruto *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. (macha macha) frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidralizado.

Cuenca⁴⁰, nos menciona que el IC50 es el índice de concentración necesario para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH, con el fin de tener un parámetro de referencia para comparar las capacidades de diferentes antioxidantes. Existe una concentración constante de DPPH por lo cual aunque se incrementa la concentración del extracto habrá un límite de decoloración.

La preferencia por las propiedades antioxidantes y secuestradoras de radicales libres de las plantas medicinales y sus extractos ha crecido enormemente; por su eficacia en la prevención de afecciones relacionadas con el daño oxidativo. En el último quinquenio, se ha hecho énfasis en los estudios relacionados a la investigación de nuevos antioxidantes de origen natural.³⁸

La evidencia científica revela que la excesiva oxidación de las biomoléculas y los tejidos, deterioran el organismo; declarando que: el oxígeno activo y sus mediadores (los radicales libres), son los culpables. Esto se ha visto relacionado con un aumento en la incidencia de las principales enfermedades degenerativas

(cáncer), padecimientos cardiovasculares, artrosis, disfunción cerebral, diabetes entre otras.³⁸

La figura 5, nos muestra los valores de la actividad antioxidante por el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha". Esta nos muestra que el extracto hidroalcohólico 250 µg/mL (45,84%) presenta mayor actividad antioxidante respecto a las demás concentraciones, pero esta difiere estadísticamente ($p= 5,5 \times 10^{-17}$) del Trolox 250 µg/mL (85,98%). Llimpe³⁶ evaluó la actividad antioxidante mediante el método radical DPPH, obtuvo valores de 569,3637; 550,1427; y 323,9630 µmol TE/g muestra en estado verde, pintón y maduro, respectivamente. El verde presentó una mayor capacidad antioxidante en la investigación: Estudio del contenido de antocianinas y capacidad antioxidante del fruto de macha macha (*vaccinium floribundum kunth*) durante la maduración.

Cuando se provoca la ruptura del equilibrio que debe existir entre los agentes pro oxidantes y los mecanismos antioxidantes, causado por múltiples fuentes tales como: déficit de estas defensas o por el incremento exagerado de la producción de ROS; expone a la materia viva a sufrir muerte celular desproporcionada y acelerar el envejecimiento.³⁸

La Organización Mundial de la Salud definió en 1978 el concepto de planta medicinal como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica. Es aquella especie silvestre, semisilvestre, cultivada o manejada, que tiene propiedades que ayudan en el tratamiento o prevención de una enfermedad y que en uno más de sus órganos contienen una o más sustancias o principios activos que actúan sobre los organismos vivos y son empleadas como medicamentos o como materia prima para elaborar productos fitoterapéuticos o medicamentos homeopáticos.³⁶

En los últimos años se ha acrecentado el interés en estudiar las plantas, especialmente las usadas como medicinales, como fuente de compuestos novedosos y farmacológicamente activos.

Se logró determinar que el extracto hidroalcohólico de las hojas *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha" presenta una mínima cantidad de actividad antioxidante.

VI. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha” son: taninos, flavonoides, saponinas, cardiotónicos, antocianinas, esteroides y quinonas.
2. El contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha” fueron 255,1 mg Eq AG/g ext. y 22,06 mg Eq Rutina/g.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha” por el método DPPH se determinó la actividad antioxidante a la concentración de 100 µg/mL es 36,78%; la cual presenta mayor actividad antioxidante respecto a las demás concentraciones, pero esta es estadísticamente diferente ($p=0,008$) al Trolox 100 µg/mL es 94,79%.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha” por el método ABTS se determinó la actividad antioxidante a la concentración de 250 µg/mL es 45,84%; la cual presenta mayor actividad antioxidante respecto a las demás concentraciones, pero esta difiere estadísticamente ($p= 5,5 \times 10^{-17}$) del Trolox 250 µg/mL es 85,98%.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio del presente trabajo de investigación, determinando y cuantificando específicamente cuál de los principios activos que contiene *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha” es el principal responsable de la actividad antioxidante y otros estudios farmacológicos diferentes al investigado.
2. Evaluar la posibilidad de realizar formulaciones galénicas a base de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha” debido a que estudios recientes confirman su propiedad antioxidante.
3. Realizar estudios de toxicidad, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. “macha macha” para dar un conocimiento más profundo y mejor uso de dicha planta por la población.
4. Se recomienda seguir investigando plantas con actividad antioxidante como una alternativa en el tratamiento de las células cancerígenas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harbone. J B, Herbert H. Phytochemical Dictionary, Taylor & Francia London, 1993.
2. Marinova. D, Ribanova. F, Atanassova. M. Total phenolica and total Flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables, Journal of the University of chemical technology and metallurgy. [revista en internet] 2005. [acceso enero 2014]; 40,(3): 255- 260. Disponible en: <http://www.researchgate.net/publication/258769164>.
3. Sulaiman. C. T, Sadashiva. C.T, Satheesh, George, Gophakrishnan. V. K, Indira Balachandran. Chromatographic studies and in vitro screening for acetyl cholinesterase inhibition and antioxidant activity of three acacia species from south India. Analytical Chemistry Letters. [revista en internet] 2013. [acceso enero 2014]; 3,2, 111-118. Disponible en: <http://www.Tandfonline.Com/doi/abs/10.1080/22297928.2013.806405#.VFgEKvmG9ws>.
4. Sulaiman, C T, and Indira Balachandran. Total phenolics and total flavonoids in selected Indian medicinal plants. Indian J. Pharm. Sci. [revista en internet] 2012. [acceso febrero 2014]; 74(3), 258-260. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3674537/>.
5. Peter. B, Kaufman, Leland. J, Warber CS, James A, Harry DL, Brielmann, natural products from plants, CRC Press London, 1999.
6. Soler Cantero A. Capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenolicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional [tesis doctoral]. Universidad de Lleida, España 2009.
7. Eunok Choe y David B. Mechanisms of antioxidants PUCP2004. Foods, New York, N. Y.[Articulo en internet]. Publicado el 16 de setiembre de 2009.[Acceso 25 de Junio 2014]. Disponible en: <http://onlinelibrary.Wiley.Com/doi/10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x/full>.
8. Criado C, Moya M. Vitaminas y antioxidants. Ed. Sanidad y Ediciones. S.L. Barcelona. Actuaciones el médico 2009.
9. Ugartondo V. caracterizacion de derivados polifenolicos obtenidos de Fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente al estres oxidative en modelos celulares. [Tesis pregrado]. España. Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia; 2009.
10. Villar M. Farmacognosia general: Sintesis, España; 1999.
11. Rincón CM, Patiño OJ, Plazas EA, Bulla ME, Rozo G, Puyana M. "Estudio químico preliminar y evaluación de la actividad antioxidante, antialimentaria y tóxica, de la especie *Pernettya prostrata* (Ericaceae)" Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá- Colombia 2014.
12. García, R. Aguilar, L. Soto, M. compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante en las flores de *Crataegus* spp. De Mexico 2012.
13. Cortes J. José Y. "Estudio químico de *pernettya prostrata* (cavan) sleumer y su evaluación en la producción de hipercalcemia" [internet [. Pontificia Universidad Javeriana; Colombia 2014[cited 2016 apr 15]. Available from:<http://repositorio.javeriana.edu.co/bitstream/10554/14588/1/CortesCasasJoseYesid2009.pdf>
14. Braul P, Diaz P. Estudio sobre característica farmacognostica del fruto de *pernettya prostrata* (Cav.) DC. "Macha macha" (2016). Universidad Nacional de Trujillo de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.


15. Aguilar E, "Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *smallanthus sonchifolius* (yacon) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora"[tesis de maestría]- Lima UNMSM -2017.
16. Del Solar C. Actividad antioxidante de la crema elaborada a base del extracto de las hojas de *calceolaria engleriana* Kraenzl "Wawillay" [tesis]. Ayacucho: UNSCH; 2012.
17. Mauricio F, (2001) tesis titulado Tamizaje farmacológico de *pernettya prostrata* "macha macha" Perú (Ayacucho). UNSCH-2001.
18. Revista Cubana de Plantas Medicinales. "Estudio químico preliminar y evaluación de la actividad antioxidante, antialimentaria y tóxica, de la especie *Pernettya prostrata* (Ericaceae). Cuba, 2014; 19(2):138-150.
19. Universidad Nacional del Noreste. Diversidad Vegetal Biotaxonomía de Espermatofitas[Internet]Argentina;2010.http:passthrough.fwnotify.net/download/750357.pdf].
20. Eighton F, Urquiaga, I. Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y calidad de vida. 2000. Editores Bogota. 401p.
21. Martínez I, Periago M, ROS G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch. Latin. Nutric. Brazil, 2007; 50:5-18
22. Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. Flavonoid antioxidants:chemistry , metabolism and structure- activity relationships. The Journal of nutritional biochemistry. USA EE.UU 2002; 13(10): 572-84.
23. Escamilla C, Guevara J, flavonoides y sus acciones. Revista Facultad Medicina UNAM. México; 2009.
24. Venero J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cub. Med. Milit. Cuba; 2002; 31(2):126-136.
25. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades producidas por radicales libres. Revista. Panamericana. Salud. Publica. 1997; 1(5):399-400.
26. Ferrer Y, Martinez G, Leroy D. El estrés oxidativo y su impacto en las cataratas. Rev. Cub. Farm. Cuba, 2009; 43(3):1-5.
27. Puertas M, Gomez L, Saenz J. Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *piper peltatum* L. Revista Cubana Plantas Medicinales Cuba, 2009; 14(2): 1-3.
28. Organización Mundial de la Salud. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales. Ginebra. 2003.
29. Miranda, M. Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y productos naturales. Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos, Cuba 2000.
30. Marcos S, Hilris R, Gerardo M, Mariane C, Maricela S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, Departamento de Química, Universidad Federal do Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brasil 2007.
31. Peixoto M. Validación de metodología espectrofotométrica para la cuantificación de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard). Revista Brasileña Vol. 44, nº 4 4, out./dez; Brazil, 2008.
32. Suárez S. Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del *Allium sativum* var. hualalino (ajo) en modelos in vitro. [Tesis de doctorado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2014.
33. Aparcona L. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanolicos del fruto de *physalis peruviana* "aguaymanto de diferentes lugares geográficos del Perú. 2015.
34. Hernández S., Fernández C., Baptista L. Metodología de la investigación. Cuarta edición. México DF. McGraw-Hill interamericana, 2006.

35. Angulo P. La medicina tradicional en el desarrollo de Fitomedicamentos. Primera edición. Editorial del mar EIRL. 2004.
36. OMS. Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2002 – 2005, Organización Mundial de la Salud Ginebra. Suiza. 2002. [Acceso el 10 diciembre de 2016]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf
37. Braul E., Díaz D. Características farmacognósticas del fruto de *Pernettya prostrata* (cav.) dc. (macha macha) procedente de la región Ayacucho. Universidad Nacional de Trujillo. Biblioteca digital-dirección de sistemas de informática y comunicación. Trujillo, Perú. 2016. [Acceso 15 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3475/Braul%20Porras%20Edgard%20Gilmer.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
38. Díaz L., Braul E. Cuantificación de vitamina C y evaluación de la capacidad antioxidante del fruto *Pernettya prostrata* (Cav.). DC. (macha macha) frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidralizado. Universidad Nacional de Trujillo. Biblioteca digital-dirección de sistemas de informática y comunicación. Trujillo, Perú. 2018. [Acceso el 15 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10648/Diaz%20Paico%20Lynda%20Yoriani.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
39. Llimpe P. Estudio del contenido de antocianinas y capacidad antioxidante del fruto de macha macha (*Vaccinium floribundum* kunth) durante la maduración. Universidad Nacional de Huancavelica. Facultad de Ciencias Agrarias. Huancavelica, 2017. [Acceso el 15 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/1694/TESIS%20LLIMPE%20REZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
40. Cuenca M. Determinación de la actividad antioxidante de especies medicinales de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe. Universidad Técnica particular de Loja. Ecuador, 2015. [Acceso el 25 de junio de 2018]. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/11569/1/Cuenca%20Alvarado%20Marco%20Inicio.pdf>.

ANEXOS

Anexo 1

Certificado de clasificación taxonómica *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.



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

C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. Heber, SURCO BELLIDO, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988 y es como sigue :

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	DILLENIIDAE
ORDEN	:	ERICALES
FAMILIA	:	ERICACEAE
GENERO	:	<i>Pernettya</i>
ESPECIE	:	<i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC.
N.V.	:	"macha macha"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 2 de Junio del 2017

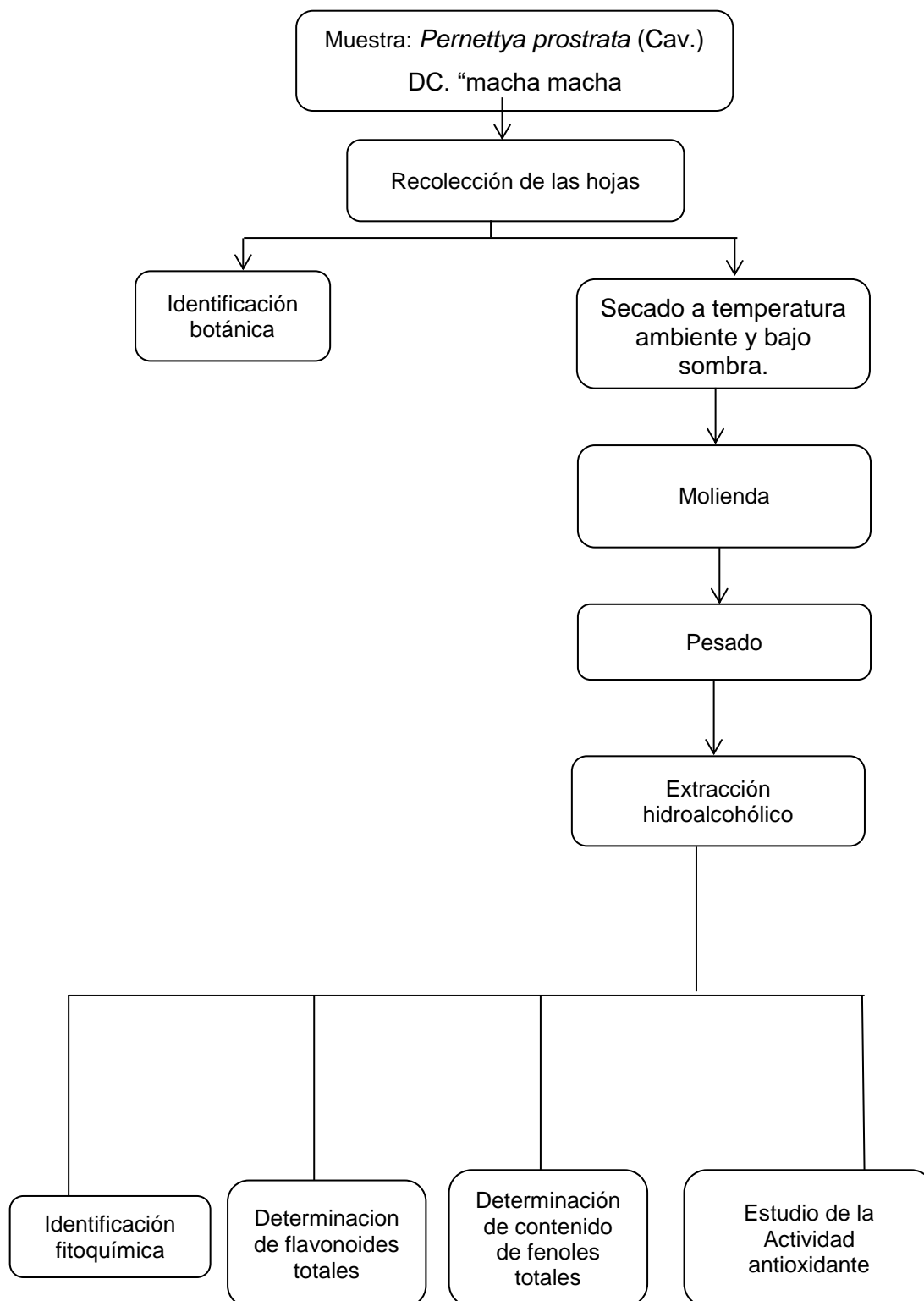
UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS



Bjga. Laila Aucostare Medina
JEFE

Anexo 2.

Flujograma de procedimientos del extracto hidroalcohólico de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.



Anexo 3



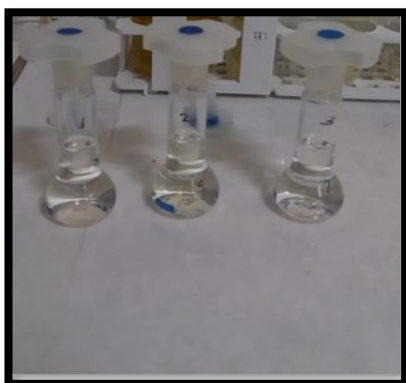
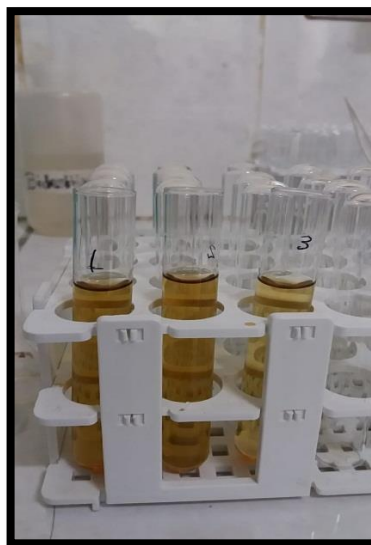
Recolección de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018

Anexo 4



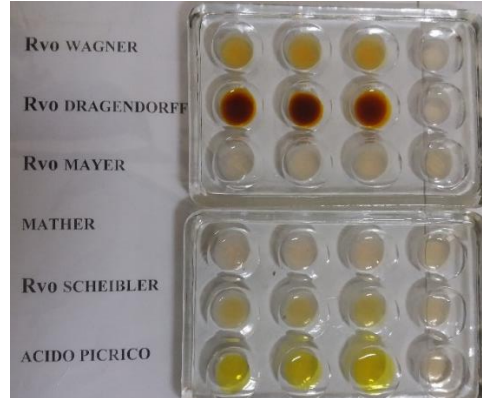
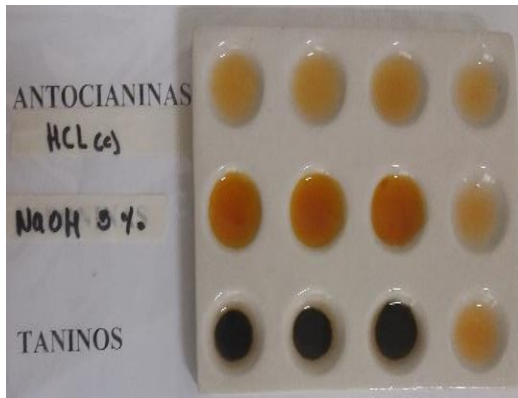
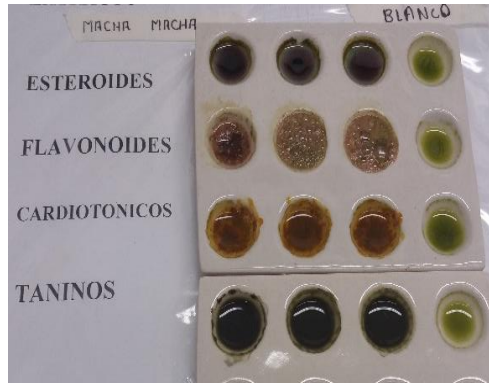
Pesado de los extracto hidroalcohólico de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018

Anexo 5



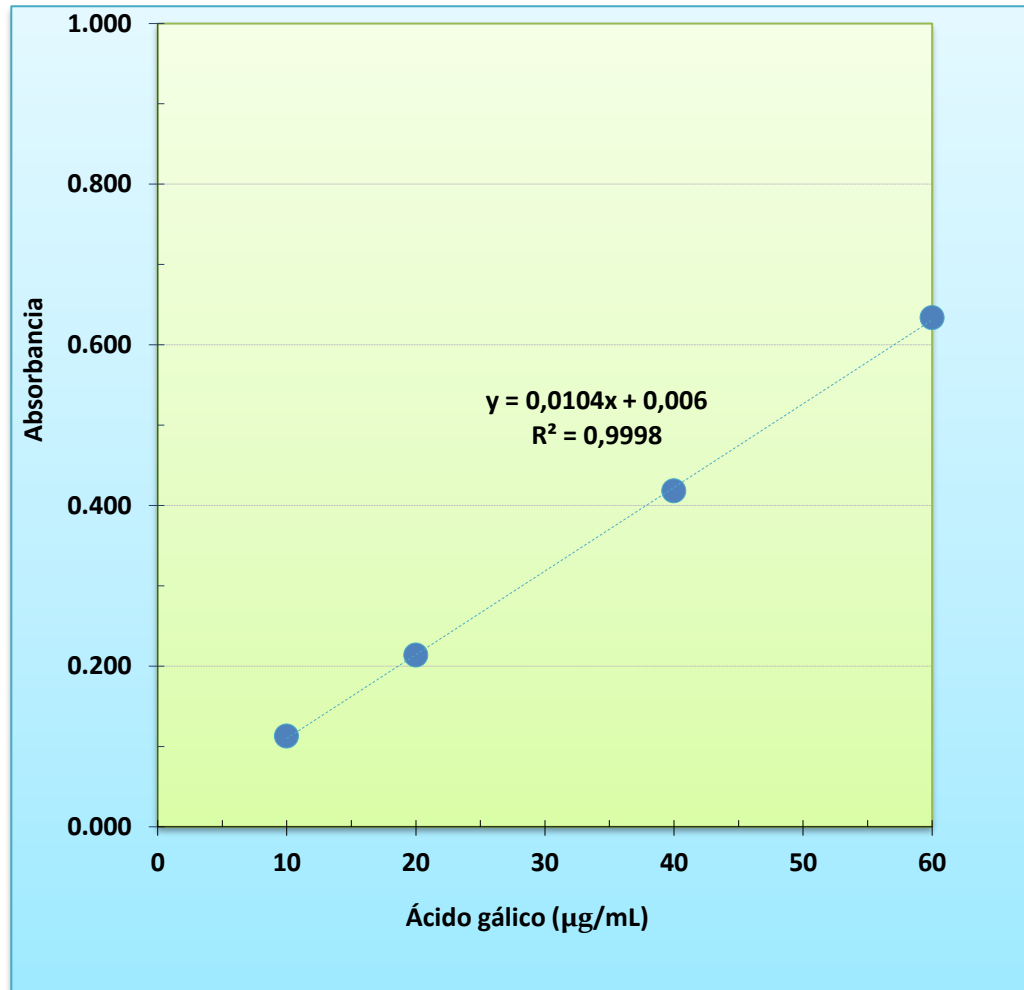
Determinación de la actividad antioxidante con las concentraciones respectivas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

Anexo 6



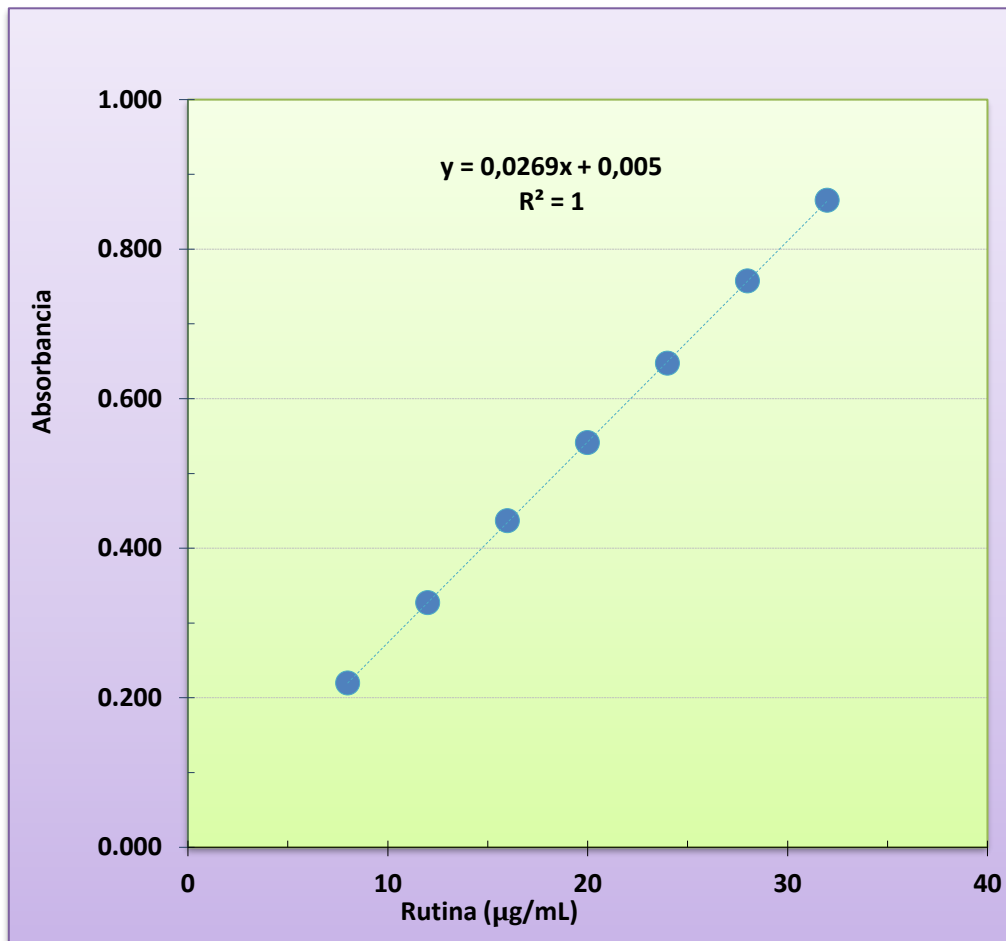
Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018

Anexo 7



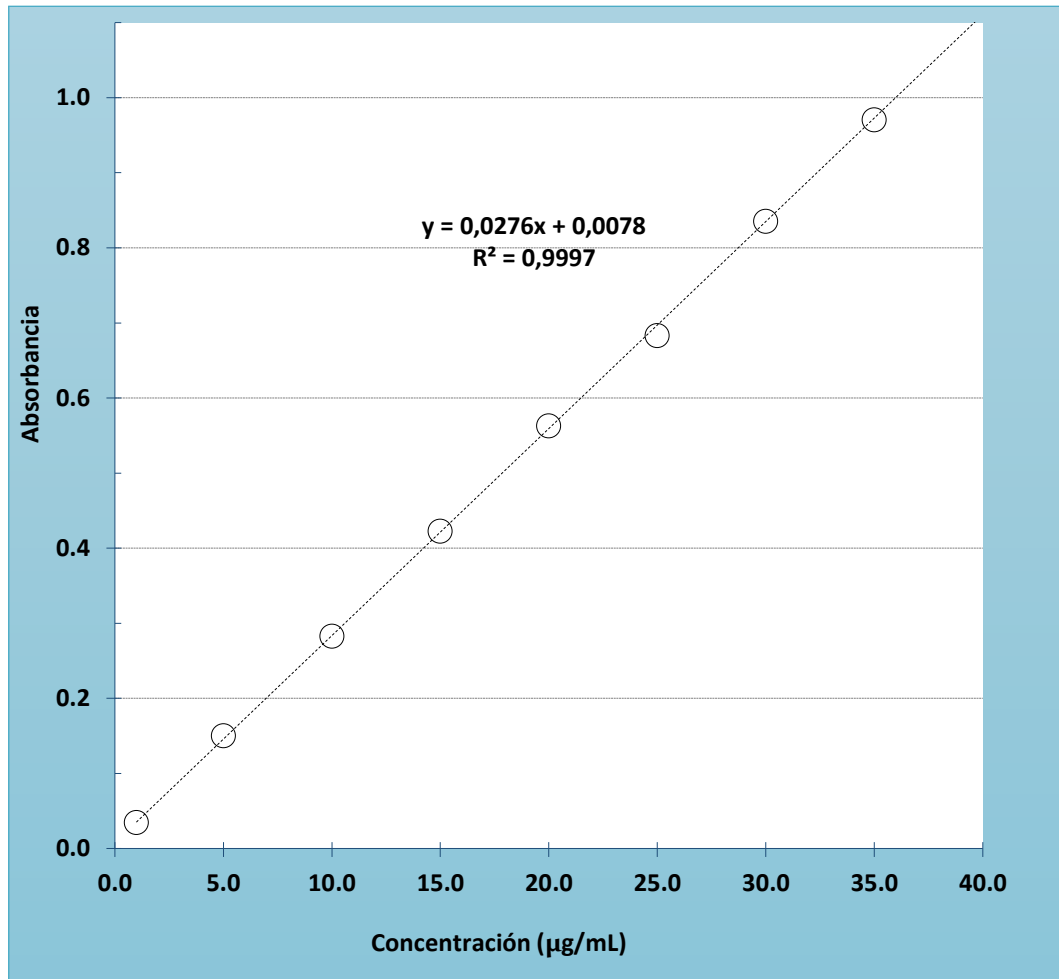
Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu del extracto hidroalcohólico de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

Anexo 8



Curva de calibración de la Rutina para la determinación de flavonoides totales por el método de Peixoto del extracto hidroalcohólico de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018

Anexo 9



Curva de calibración de DPPH utilizando trolox como estándar a 515 nm del extracto hidroalcohólico de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

Anexo 10

Promedio de fenoles de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

Muestra	X	S	%CV	+/-	LI	LS
M1	263,8	1,043	0,40	2,59	261,18	266,36
M2	251,2	0,991	0,39	2,46	248,73	253,65
M3	250,4	1,003	0,40	2,49	247,90	252,88
X	255,1	0,022	0,01	0,06	255,06	255,17

Anexo 11

Promedio de flavonoides de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

Muestra	x	S	%CV	+/-	LI	LS
M1	21,7	0,283	1,30	0,70	20,97	22,37
M2	21,7	0,097	0,45	0,24	21,43	21,91
M3	22,8	0,058	0,25	0,14	22,69	22,98
X	22,1	0,1	0,44	0,24	21,82	22,30

Anexo 12

Porcentaje de actividad antioxidante de trolox en DPPH de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

E.A. [µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	25,34	0,373	1,471	0,93	26,26	24,41
50	49,12	0,252	0,514	0,63	49,75	48,50
100	94,37	0,172	0,182	0,43	94,79	93,94
150	97,00	0,172	0,177	0,43	97,42	96,57
200	96,49	0,126	0,131	0,31	96,80	96,18
250	96,63	0,208	0,215	0,52	97,14	96,11

Anexo 13

Porcentaje de actividad antioxidante de muestra en DPPH de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

E.A. [µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	10,33	0,331	3,202	0,82	11,16	9,51
50	19,18	0,291	1,514	0,72	19,90	18,46
100	36,54	0,096	0,261	0,24	36,78	36,30
150	52,65	0,456	0,865	1,13	53,78	51,52
200	65,79	0,266	0,404	0,66	66,45	65,13
250	77,47	0,382	0,493	0,95	78,42	76,52

Anexo 14

Análisis de varianza de la concentración de inhibición del radical libre DPPH (CI50) del extracto hidroalcohólico y del estándar (trolox) de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	9422,1	5,0	1884,4	5,4	0,008
Dentro de grupos	4172,2	12,0	347,7		
Total	13594,4	17			

Si: sig. < 0,05: por lo menos uno de los tratamientos es diferente al resto.

Anexo 15

Comparaciones múltiples de la Prueba de Duncan de la CI 50 del extracto hidroalcohólico y del estandar (trolox) de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA		
		1	2	3
<i>P prostrata</i> 25 µg/mL	3	10,3		
<i>P prostrata</i> 50 µg/mL	3	19,2		
<i>P prostrata</i> 100 µg/mL	3	36,5	36,5	
Trolox 25 µg/mL	3	41,2	41,2	
Trolox 100 µg/mL	3		56,6	56,6
Trolox 50 µg/mL	3		0,0	79,3
Sig.	0	0,084	0,234	0,162

Anexo 16

T Student de actividad antioxidante DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	3,18	0,1490	-107,57	4	4,47811E-08	-81,81333333	0,76	-83,92	-79,70
No se asumen varianzas iguales			-107,57	2,126	0,0001	-81,81333333	0,76	-84,91	-78,72

Anexo 17

T Student de actividad antioxidante de ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	3,35	0,1413	-31,45	4	6,09337E-06	-404,7866667	12,87	-440,52	-369,05
No se asumen varianzas iguales			-31,45	2,035	0,0009	-404,7866667	12,87	-459,26	-350,32

Anexo 18

Porcentaje de actividad antioxidante de trolox en ABTS de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

E.A. [µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	9,96	0,182	1,825	0,45	10,41	9,51
50	15,40	0,248	1,609	0,62	16,02	14,79
100	32,51	0,206	0,634	0,51	33,02	32,00
150	53,98	0,248	0,459	0,62	54,60	53,37
200	65,99	0,418	0,633	1,04	67,02	64,95
250	84,04	0,777	0,925	1,93	85,98	82,11

Anexo 19

Porcentaje de actividad antioxidante de muestra en ABTS de cada lectura, desviación estándar, coeficiente de variación, los límites superior, inferior y los promedios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

E.A. [µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	3,92	0,391	9,967	0,97	4,89	2,95
50	7,74	0,530	6,844	1,32	9,05	6,42
100	17,46	0,306	1,751	0,76	18,22	16,70
150	26,24	1,403	5,347	3,49	29,73	22,75
200	32,04	0,306	0,954	0,76	32,80	31,28
250	45,54	0,122	0,267	0,30	45,84	45,23

Anexo 20

Análisis de varianza de la concentración de inhibición del radical libre ABTS (CI 50) del extracto hidroalcohólico y trolox de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6980,9	5,0	1396,2	1920,7	5,5 x 10 ⁻¹⁷
Dentro de grupos	8,7	12,0	0,7		
Total	6989,6	17			

Anexo 21

Comparación múltiples de la prueba de Duncan para actividad antioxidante de ABTS según concentración del extracto hidroalcohólico y Trolox de las hojas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA					
		1	2	3	4	5	6
P_prostrata 150µg/mL	3	26,2					
P_prostrata 200 µg/mL	3		32,0				
P_prostrata 250 µg/mL	3			45,5			
Trolox 150 µg/mL	3				54,0		
Trolox 200 µg/mL	3					66,0	
Trolox 250 µg/mL	3						84,0
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Anexo 22

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018.	¿Cuál es la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC "macha macha"?	<p>OBJETIVOS GENERALES</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto acuoso de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha", Ayacucho 2018. <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar la composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico. • Determinar la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha", utilizando como estándar el ácido gálico. • Determinar la actividad antioxidante por el método DPPH, ABTS y equivalentes TROLOX. 	<p>DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha".</p> <p>Es un arbusto pequeño, erecto, de hasta 50cm de altura. Hojas simples, alternas, elípticas, coriáceas, con la margen crenada y ligeramente revoluta, con el haz lustroso, envés verde claro, ápice obtuso a subagudo, a veces mucronado. Flores axilares, solitarias tendiendo a agruparse al final de las ramas, pequeñas de color rosado encendido, ovario supero.</p> <p>COMPUESTOS FENÓLICOS</p> <p>Son un conjunto heterogéneo de moléculas, que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por algunas de uso común por sus propiedades antioxidantes merecen mayor atención.</p> <p>RADICALES LIBRES</p> <p>Un radical libre (RL) es cualquier especie química ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados en el orbital más externo.</p> <p>ANTIOXIDANTES</p> <p>Son sustancias cuya acción consiste en inhibir las tasas de oxidación de los nocivos radicales libres (disminuyen las defensas, producen daño celular con la posibilidad de producir cáncer, aterosclerosis y envejecimiento).</p>	El extracto acuoso de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha", presenta actividad antioxidante y elevadas concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides.	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE:</p> <p>Extracto acuoso de las hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha"</p> <p>Indicadores:</p> <p>Concentraciones de extractos: 250, 200, 150, 100, 50, 25 µg/mL,</p> <p>VARIABLE DEPENDIENTE:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Actividad antioxidante. • Compuestos fenólicos totales • Flavonoides totales <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje (%) de capacidad secuestradora de radicales libres. • Concentración de compuestos fenólicos (mg de ácido gálico/g de extracto) • Concentración de flavonoides (mg de rutina/g de extracto). 	<p>DISEÑO DE INVESTIGACIÓN</p> <p>TIPO DE INVESTIGACIÓN</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tipo de estudio: Básico • Nivel de estudio: Experimental <p>DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA</p> <p>POBLACIÓN: Hojas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha", que crecen en zonas áridas, del Centro Poblado de Bosque de Piedra, Anexo Anchachuasi provincia de Vinchos del Departamento de Ayacucho.</p> <p>MUESTRA:</p> <p>2 Kg de hojas desecadas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha", recolectadas durante el mes de octubre, a partir de los cuales se realizará el extracto acuoso.</p> <p>METODOLOGÍA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se recolectará y se secará la muestra de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. "macha macha". • se obtendrá el extracto seco con etanol de 50%. • Se procederá a evaluar tamizaje fitoquímicos del extracto seco por el método de Miranda C y Cuellar A. • Se determinará los fenoles totales usando el método de Folin-Ciocalteu. • Se determinará los Flavonoides totales en extracto seco por el método Peixoto, et. al. • Se determinará la actividad antioxidante se por el método de DPPH y ABTS por espectrofotometría. <p>ANÁLISIS DE DATOS</p> <p>Los resultados se expresan en cuadros y gráficos. La diferencia significativa que existe entre los tratamientos son evaluados a través del Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia estadística de 0,05. Las comparaciones entre cada tratamiento se hicieron a través de la prueba de Duncan (para ello se utilizó el programa SPSS versión 21).</p>