

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 *Berberis flexuosa* R. & P.
“tankar”, Ayacucho 2018.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR EL:

Bach. VASQUEZ GUILLEN, Jhonny Manuel

Ayacucho - Perú

2018

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
RDN° 017-2019-FCSA-UNSCH-D
BACHILLER: Jhonny Manuel Vásquez Guillén

En la ciudad de Ayacucho, el día 09 de enero del año 2019, a horas 10:15 am, en el auditorio de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, se constituyeron como jurados para recibir y calificar el acto de sustentación los siguientes docentes: Profesor José Alejandro Yarlequé Mujica como presidente por delegación del Decano, Profesor Edgar Cárdenas Landeo como miembro, Profesor Marco Rolando Aronés Jara como asesor y Profesor Hugo Roberto Luna Molero como cuarto jurado y secretario docente.

Seguidamente, el presidente del jurado de evaluación y calificación, indicó al secretario docente a dar lectura a la Resolución Decanal N° 017-2019-FCSA-UNSCH-D, realizado este acto, el presidente del jurado evaluador y calificador, indica al Bachiller Jhonny Manuel Vásquez Guillén a que de inicio a la sustentación de su tesis titulada: "Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de *Berberis Flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018", quien con este trabajo pretende obtener el título profesional de Químico Farmacéutico.


Culminado el proceso de exposición por parte del sustentante, el presidente del jurado de evaluación y calificación, invita a los miembros del jurado a realizar sus observaciones y plantear las preguntas correspondientes.

Terminado este proceso, el presidente del jurado evaluador y calificador, invita al sustentante y público asistente a abandonar momentáneamente el auditorio, a fin de realizar la calificación correspondiente, siendo esta:

Jurado	Texto	Exposición	Respuesta	Promedio
- José A. Yarlequé Mujica	18	18	17	18
- Edgar Cárdenas Landeo	17	16	15	16
- Marco R. Aronés Jara	17	17	17	17
- Hugo R. Luna Molero	17	16	15	16

PROMEDIO FINAL: 17 (Diecisiete)

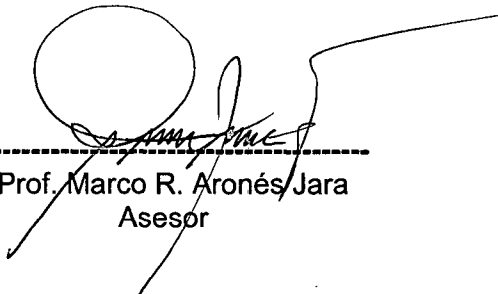
El promedio final alcanzado por el sustentante es de 17 (Diecisiete), dándose como aprobado el acto de sustentación de la mencionada tesis finaliza siendo las 11:40 am. del día miércoles 09 de enero de 2019, y en señal de conformidad, firman al pie de la presente los miembros del jurado calificador y evaluador:



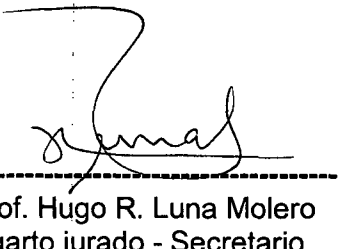
Prof. José A. Yarlequé Mujica
Presidente



Prof. Edgar Cárdenas Landeo
Miembro



Prof. Marco R. Aronés Jara
Asesor



Prof. Hugo R. Luna Molero
Cuarto jurado - Secretario

A mis queridos padres, quienes con su constante apoyo me supieron guiar por el camino del bien, éste es el producto de sus lecciones.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater*, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por acogerme en sus aulas durante mis estudios universitarios.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, y en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, a los excelentes docentes que en ella laboran, quienes contribuyeron con mi formación profesional por haberme dado sus conocimientos y experiencias profesionales.

Un reconocimiento especial a mi asesor, el Mg. Q.F. Aronés Jara Marco Rolando, por permitirme recurrir a su capacidad y experiencia para que sea posible realizar y culminar el presente trabajo de investigación.

Así mismo a todas las personas por el apoyo brindado en la ejecución de mi trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	2
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar"	6
2.3. Compuestos fenólicos	8
2.4. Radicales libres	13
2.5. Estrés oxidativo	13
2.6. Antioxidantes	14
2.7. Medición de la actividad antioxidante	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	21
3.2. Definición de la población y muestra	21
3.3. Metodología y recolección de datos	21
3.4. Tipo y diseño de investigación	31
3.5. Análisis de datos	31
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
IX. ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Ejemplo de clases de flavonoides, su estructura y parte de sustitución.	12
Tabla 2. Clasificación de los modelos de ensayo <i>in vitro</i> según su modo de reacción ET o HAT	17
Tabla 3. Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	35
Tabla 4. Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de los ácidos benzoicos.	10
Figura 2. Estructura de los ácidos cinámicos.	10
Figura 3. Núcleo básico de un flavonoide.	11
Figura 4. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno.	18
Figura 5. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.	19
Figura 6. Estructura del ABTS ^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante.	20
Figura 7. Contenido de fenoles totales y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico las hojas de <i>berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	36
Figura 8. Porcentaje de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", en comparación con el estándar Trolox, Ayacucho 2018.	37
Figura 9. Porcentaje de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", en comparación con el estándar Trolox, Ayacucho 2018.	38
Figura 10. Porcentaje de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método FRAP del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", en comparación con el estándar Trolox, Ayacucho 2018.	39

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Constancia de identificación botánica de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	59
Anexo 2. Recolección de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	60
Anexo 3. Diagrama de flujo de obtención del extracto seco de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	61
Anexo 4. Procedimiento para obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	62
Anexo 5. Procedimiento para obtención del extracto seco de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	63
Anexo 6. Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	64
Anexo 7. Protocolo para la determinación del contenido de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	65
Anexo 8. Protocolo para la determinación del contenido de flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	66
Anexo 9. Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	67
Anexo 10. Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	68
Anexo 11. Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	69
Anexo 12. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales, Ayacucho 2018.	70

Anexo 13.	Curva de calibración de rutina para la cuantificación de flavonoides, Ayacucho 2018.	71
Anexo 14.	Curva de calibración de Trolox para la evaluación de la actividad antioxidante, Ayacucho 2018.	72
Anexo 15.	Promedio de fenoles, desviación estándar, coeficiente de variación, límite superior y límite inferior del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	73
Anexo 16.	Promedio de flavonoides, desviación estándar, coeficiente de variación, límite superior y límite inferior del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	74
Anexo 17.	Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	75
Anexo 18.	Comparaciones múltiples de Duncan de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	76
Anexo 19.	Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	77
Anexo 20.	Comparaciones múltiples de Duncan de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	78
Anexo 21.	Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la reducción del ion férrico Fe ⁺³ a ferroso Fe ⁺² (FRAP) del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	79
Anexo 22.	Comparaciones múltiples de Duncan de la actividad antioxidante mediante la reducción del ion férrico Fe ⁺³ a	

	ferroso Fe^{+2} (FRAP) del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	80
Anexo 23.	Prueba t de Student de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	81
Anexo 24.	Prueba t de Student de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	82
Anexo 25.	Prueba t de Student de la actividad antioxidante mediante la reducción del ion férrico Fe^{+3} a ferroso Fe^{+2} (FRAP) del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.	83
Anexo 26.	Matriz de consistencia, Ayacucho 2018.	84

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", su ejecución se realizó en los ambientes del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) "Marco Antonio Garrido Malo", de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. El tipo de investigación es básico - descriptivo. El contenido de fenoles totales y flavonoides fueron determinados por los métodos de Folin-Ciocalteu y Cloruro de aluminio respectivamente; y la actividad antioxidante se determinó *in vitro* utilizando los métodos del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), método del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) y la potencia antioxidante reductora férrica (FRAP). El contenido de fenoles totales y flavonoides fueron: $163,8 \pm 0,98$ mg Eq AG/g de extracto seco y $21,6 \pm 0,20$ mg Eq Ru/g de extracto seco respectivamente. La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" sobre el radical DPPH, ABTS y FRAP fueron: para el DPPH mostró un CI₅₀: $291,16 \pm 1,40$ µg/mL, para ABTS mostró un CI₅₀: $561,53 \pm 12,82$ µg/mL y para FRAP mostró un CI₅₀: $309,73 \pm 15,30$ µg/mL. Concluyendo que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", presentó baja actividad antioxidante en comparación con los estándares utilizados.

Palabras clave: *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", actividad antioxidante, compuestos fenólicos, flavonoides.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, el empleo de productos naturales principalmente de origen vegetal se encuentra ampliamente difundido, debido a la existencia de una gran diversidad de flora en las distintas regiones del país.

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavonas, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas.¹

Las evidencias experimentales sugieren que los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno pueden estar relacionadas con un gran número de enfermedades.

Los radicales libres son moléculas inestables y muy reactivas que tienen electrones no apareados y que causan daños en el ADN, proteínas, lípidos, membranas celulares y estructurales. Para alcanzar la estabilidad modifican a las moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a muchas células y logra ser indefinida si los antioxidantes no intervienen.²

En los seres vivos existen sistemas de defensa antioxidante que tienen la propiedad de impedir la acción nociva de los radicales libres, habiéndose identificado compuestos con propiedades antioxidantes de naturaleza enzimática como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc., así como, sustancias no enzimáticas: ascorbato, ferritina, ceruloplasmina, polifenoles, antocianinas. Cuando la defensa antioxidante es insuficiente para proteger el organismo del efecto dañino de los radicales libres puede conducir al estrés oxidativo, condición que está estrechamente vinculado a una gran diversidad de

patologías como la psoriasis, cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, cataratas, hipertensión arterial, artritis reumatoidea, formas de anemia.³

La actividad antioxidante ha despertado en los últimos años un gran interés científico, ya que diversos estudios han demostrado que los antioxidantes son moléculas que poseen la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación ocasionada por las moléculas inestables conocidas como los radicales libres.²

El género *Berberis* posee una fuente rica de compuestos fitoquímicos biológicamente potentes, por ejemplo, fenoles ácidos, ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides, taninos, entre otros, lo que le confiere muchas propiedades medicinales.

La especie *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" no se ha explorado completamente. Debido a esto el interés principal es continuar con las investigaciones de la especie, ya que posee diversas propiedades medicinales y la gran mayoría de éstas no han sido estudiadas, es por tal motivo que se propuso realizar el presente trabajo de investigación para evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar". Por estas consideraciones, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron los siguientes.

Objetivo general.

Evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Objetivos específicos.

- Identificar los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar".
- Determinar la concentración de fenoles totales y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", utilizando como estándar el ácido gálico y rutina respectivamente.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", por los métodos DPPH, ABTS y FRAP con equivalente Trolox.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Meza K.⁴, en el año 2008, realizó un trabajo de investigación denominado: Química y actividad biológica de *Berberis rotundifolia*. Este trabajo de investigación se basó en la determinación de la composición alcaloidal de *Berberis rotundifolia* y la respuesta de extractos y fracciones frente a bioensayos. Los compuestos fueron aislados mediante la aplicación de técnicas cromatográficas y se identificaron utilizando diversos experimentos espectroscópicos: Espectroscopia de resonancia magnética nuclear-¹H y Espectroscopia de resonancia magnética nuclear-¹³C. Del estudio químico se puede informar la presencia de tres alcaloides del tipo bencilisoquinolínicos: pronuciferina, lambertina y berberina. Con el fin de evaluar la actividad biológica de extractos y metabolitos secundarios mayoritarios, se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH y bioensayos de toxicidad general sobre *Artemia salina* y citotoxicidad en huevos fecundados de *Loxechinus albus*, observándose una notable actividad tanto para el extracto, como para los metabolitos secundarios mayoritarios.

Silva C.⁵, en el año 2010, realizó un trabajo de investigación sobre la identificación y cuantificación de los alcaloides de *Berberis hallii*, mediante el estudio físico-químico, realizando Cromatografía de Capa Fina y aplicando metodologías cualitativas clásicas como el Tamizaje Fitoquímico; y técnicas modernas como Espectroscopia UV, se aisló tres compuestos de naturaleza alcaloidal a partir del extracto etanólico de las raíces de *Berberis hallii*. Resultando tres metabolitos secundarios cuantificados e identificados como Berberina, Lambertina y Calafatina, provenientes de una base bencilisoquinolínicos en común.

García *et al.*⁶, en el año 2012, realizaron un trabajo de investigación denominado: Compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante en las flores de

Cratagus spp de México. La actividad antioxidante, se midió con el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y los flavonoides se identificaron con HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Performance), la quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-ramnosido, quercetina-3-O-ramnosil-(1,6)-glucósido y quercetina-3-O-ramnosil-(1,2)-ramnosil-(1,6)-glucósido. El contenido de fenólicos fue mayor que los flavonoides.

Stankovic *et al.*⁷, en el año 2012, realizaron un trabajo de investigación denominado: Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium*. Subsp. *Polium*. Determinaron el contenido fenólico total, la concentración de flavonoides y la actividad antioxidante *in vitro* de veinte extractos diferentes de la planta entera y partes de la planta (hojas, flores y tallos) de *Teucrium polium*, El contenido total de fenoles osciló entre 14,57 y 157,84 mg de GAE/g de extracto. Las concentraciones de flavonoides variaron de 6,48 a 139,87 mg de Ru/g de extracto. La actividad antioxidante se determinó *in vitro* usando reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y se expresó como concentración de cada extracto requerido para inhibir el radical en valores del 50% (CI_{50}) que oscilaban entre 26,30 y 2190,75 $\mu\text{g/ml}$. El extracto de hojas metanólicas contiene la mayor concentración de compuestos fenólicos (157,84 mg de GaA/g) y mostró una fuerte actividad antioxidante ($CI_{50}=26,30 \mu\text{g/ml}$). Los extractos de Ginkgo y té verde se analizaron para comparación, y los resultados indicaron que algunos extractos de *Teucrium polium* eran iguales en actividad con el Ginkgo o té verde y algunos parecían tener mayor actividad. Los resultados obtenidos describen una fuerte actividad antioxidante y una gran contribución de análisis separado para la máxima explotación de compuestos fenólicos activos de *Teucrium polium*. Según esta información, las partes de las plantas de esta planta son fuentes naturales de sustancias antioxidantes de gran importancia.

Palomino *et al.*⁸, en el año 2009, realizaron un trabajo de investigación denominado: Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Se comparó la calidad del extracto etanólico de propóleos (EEP) provenientes de diferentes regiones de Antioquia (Colombia), mediante la determinación del contenido de flavonoides y fenoles totales, y la actividad antioxidante *in vitro*, la cual es establecida empleando las técnicas de captura de los radicales DPPH y ABTS^{•+} y la capacidad reductora de hierro (FRAP), se

determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales mediante métodos espectrofotométricos, y la actividad antioxidante. Se concluyó que los extractos etanólicos de los propóleos (EEP) provenientes de los municipios de Betania BR, y Caldas CT, exhibieron un mayor contenido de compuestos fenólicos, los cuales podrían estar relacionados con la capacidad antioxidante de los mismos. En BR también se detectó el mayor contenido de flavonoides. En general, los propóleos con actividad antioxidante FRAP también exhibieron la mayor actividad captadora de los radicales DPPH y ABTS; se encontró una buena correlación entre estas actividades y el contenido de fenoles de los extractos.

Doroteo *et al.*⁹, en el año 2013, realizaron un trabajo de investigación denominado: Compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* de 6 plantas peruanas. En dicho estudio evaluaron el efecto antioxidante de seis extractos hidroalcohólicos de *Uncaria tomentosa* (uña de gato), *Zea mays* (maíz morado), *Smallantus sonchifolius* (yacón), *Lepidium meyenii* (maca), *Krameria triandra* (ratania) y *Physallis peruviana* (aguaymanto). La actividad antioxidante *in vitro* de dichos extractos fue determinada por medio de los ensayos de inhibición de radicales DPPH, superóxido e hidroxilo; como también a través de la medición de su poder reductor y actividad antioxidante total. Los extractos con mayor actividad antioxidante fueron los de uña de gato y ratania, lo cual puede deberse a sus altos contenidos de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales.

Valdez R.¹⁰, en el año 2014, realizó un trabajo de investigación denominado: Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Baccharis salicifolia* R&P "chilca" y *Piper elongatum* Vahl "matico". El extracto hidroalcohólico se obtuvo mediante el método Soxhlet. Se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos mediante reacciones de coloración y precipitación según el procedimiento descrito por Miranda y Cuellar. El contenido de flavonoides totales y fenoles totales se realizó mediante los métodos de Zhishen *et al* y Singletón y Rossi. Es así que se compara el contenido de fenoles y flavonoides totales de las tres muestras, en equivalentes de ácido caféico y quercetina. *Baccharis salicifolia* R.&P. "chilca", presentó 12,62%, *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu" 6,42% y *Piper elongatum* Vahl "matico" 3,88% de fenoles totales. El contenido de flavonoides fue *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu" 8,32%, *Piper elongatum* Vahl "matico" 6,21% y *Baccharis salicifolia* R&P "chilca" 9,96%. Se concluye que *Baccharis salicifolia* R.&P. "chilca" presentó

cantidades superiores de fenoles y flavonoides totales frente a *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu” y *Piper elongatum* Vahl “matico”.

2.2. *Berberis flexuosa* R. & P. “tankar”

2.2.1. Clasificación taxonómica según el sistema de Cronquist. A. 1988.

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	:	MAGNOLIIDAE
ORDEN	:	RANUNCULALES
FAMILIA	:	BERBERIDACEAE
GÉNERO	:	<i>Berberis</i>
ESPECIE	:	<i>Berberis flexuosa</i> R. & P.
N.V.	:	“tankar”

Fuente: Constancia emitida por el Herbario San Marcos (USM) del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (Anexo 1)

2.2.2. Descripción botánica

Las especies del género *Berberis* son arbustos perennes o de hoja caduca, que crecen entre 1 y 5 metros de altura. Presentan hojas que varían en forma y tamaño, dependiendo de la especie.⁵

Arbusto espinoso de hasta cuatro metros de altura. El tallo cilíndrico ramificado; estructuralmente consta de los siguientes tejidos: peridermis, corteza con abundante materia colorante de color amarillo; madera o xilema dura y médula.¹¹

Las hojas son ovoides alargadas, pequeñas de cuatro centímetros de longitud en promedio, color verde pálido, provisto de espinas apicales, reunidos en grupos alternos de 5 a 9 unidades por nudo acompañado en su base por tres espinas.¹¹

Las flores son bisexuales amarillas, pedunculadas, pentámeras, heteroclamídeas y actinomorfas, agrupadas en racimos axilares. El cáliz, con cinco sépalos libres de color amarillo pálido. Androceo, cinco estambres libres. Gineceo unicapilar de ovario súpero.¹¹

Los frutos son bayas de 6 a 8 milímetros de diámetro aproximadamente, ligeramente alargadas, cuyo mesocarpio y endocarpio carnosos poseen abundante materia colorante negro azulado a rojo violáceo. Contiene 4-5 semillas negras de 4 mm de largo.¹¹

2.2.3. Características botánicas

Una de las características botánicas importantes es la presencia de espinas en las hojas y tallos de los arbustos, las cuales varían en su morfología. Las flores y frutos se pueden encontrar solos o en agrupaciones de racimos o umbelas. Las flores usualmente son de color amarillo, naranja o rojo anaranjado. El perianto típicamente presenta 5 a 6 verticilos de 3 tépalos, los dos verticilos internos presentan dos glándulas nectaríferas en la superficie interna más baja, él o los verticilos restantes se encuentran hacia el exterior y son algo más grandes. Los frutos son de color púrpura oscuro, azulado o negros y a veces están cubiertos de una capa cerosa.⁵

2.2.4. Distribución geográfica.

El género *Berberis* comprende cerca de 500 especies de arbustos y árboles de distribución cosmopolita con la notable ausencia de especies en el continente australiano y Nueva Zelanda. En Sudamérica se encuentran unas 178 especies de *Berberis* distribuidas principalmente en los andes desde Chile hasta Venezuela, con algunas especies presentes en las pampas del Sur Este Sudamericano. En los páramos, la *Berberis* ha sufrido una notable diversificación con un elevado número de especies descritas y aun por describir.¹²

La mayor parte de los arbustos del género *Berberis*, se encuentran localizadas en la parte andina del Perú; entre los límites altitudinales de 2150 hasta 4000 m.s.n.m., tanto en el Este como en el Oeste de los andes, y de Cora Cora al Sur de las vertientes occidentales es muy escasa la presencia de estos arbustos. En las áreas naturales de los cultivos vive asociada con *Shinua molle*, *Opuntia sp.*, *Agave americana*, *Piqueria peruviana*, *Caesalpinia spinosa*, *Pennissetum weberbaueri* y *Salpichroa glandulosa*.¹³

2.2.5. Composición química.

El género *Berberis* posee una posición única dentro de la familia Berberidaceae, debido al gran número de especies que lo componen, siendo muchas de ellas estudiadas por sus propiedades medicinales. Se encuentra caracterizado por la presencia de alcaloides, a los que se les atribuyen muchas de las propiedades medicinales que presentan estas especies.⁵

Las especies del género *berberis* producen un ordenamiento muy especial de alcaloides isoquinolínicos, todos los cuales derivan biogenéticamente del amino-

ácido tirosina. Los ordenamientos que se mencionan se pueden clasificar en berbina, aporfina, bencilisoquinolina, proaporfina, protopina, pavina, (bis) benciltetrahydroisoquinolina y dímeros (bis) bencilisoquinolínicos (BBI), entre otros.¹⁴

Los alcaloides pertenecientes a los grupos bencilisoquinolínicos (BBI) y protoberberinas permanecen como los constituyentes predominantes en las *Berberis*. Los alcaloides protoberberínicos existen en el género *Berberis* como sales cuaternarias o como tetrahydroprotoberberinas, siendo berberina el principal representante de este grupo de alcaloides y el constituyente común de todas las especies de *Berberis*.⁵

Por otro lado, los alcaloides bencilisoquinolínicos (BBI) constituyen el mayor grupo de alcaloides del reino vegetal, conociéndose aproximadamente 250 dímeros de este tipo. La mayoría de los alcaloides bencilisoquinolínicos (BBI) están formados por la condensación de dos unidades de N-metilcoclaurina (coclaurina), mientras que un número menor se origina por la condensación de una unidad de N-metilcoclaurina con una unidad de reticulina.⁵

2.2.6. Uso en medicina tradicional

Las especies del género *Berberis* se caracterizan por presentar una morfología variada con una coloración amarilla característica en su madera, raíz y corteza; tradicionalmente usada para dar coloración a los textiles; sus frutos son comestibles fermentados para producir bebidas alcohólicas y en culinaria.¹⁵

En medicina tradicional se emplea para el tratamiento de enfermedades del sistema circulatorio, especialmente la raíz como hemostático y febrífugo.¹⁵

La infusión de las flores se utiliza para tratar la anemia y sus síntomas. Para el sistema linfático como diurético, tónico y diaforético. Para el sistema Digestivo en el tratamiento de disentería amebiana, como purgante y analgésico.¹⁵

2.3. Compuestos fenólicos

Son metabolitos secundarios producidos por todas las plantas, son un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que ocurren frecuentemente como glucósidos, combinados con unidades de azúcar, son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro, que producen cuando se les agrega cloruro férrico.^{16, 17}

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural, según su estructura química tenemos dos grandes grupos.¹⁶

a) No flavonoides

- **Fenoles no carboxílicos:** C₆, C₆-C₁, C₆-C₃
- **Ácidos fenoles:** derivados del ácido benzoico C₆-C₁ y derivados del ácido cinámico C₆-C₃.

b) Flavonoides (C₆-C₃-C₆)

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado.

Subgrupos:

- Antocianos.
- Flavonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Flavanoles, taninos condensados y lignanos

2.3.1. Ácidos fenólicos

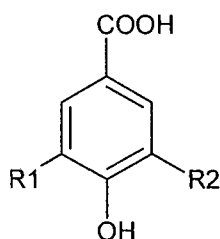
Los ácidos fenólicos constituyen un amplio grupo de compuestos orgánicos, distribuidos en la naturaleza y muestran un amplio espectro de actividades farmacológicas; estos han reportado propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antitumorales y anticarcinogénicas.¹⁸

Las estructuras fenólicas son metabolitos secundarios que pueden proceder de la ruta del ácido shikímico o de la ruta del acetato.

- Proceden de la ruta del ácido shikímico: fenoles sencillos, ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos, etc.), cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianos y taninos.¹⁹
- Proceden de la ruta de los acetatos o ruta del ácido mevalónico, los siguientes derivados fenólicos: antraquinonas y heterósidos antracénicos.¹⁹

Los ácidos fenólicos tienen una función carboxílica y un grupo hidroxílico fenólico, derivan del ácido benzoico (anisaldehído, vanillina, ácido verátrico, ácido anísico, ácido gálico) y del ácido cinámico (clorogénico, cafeico, ferúlico y sináptico, p-cumarico, elágico).¹⁶

- **Ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico**



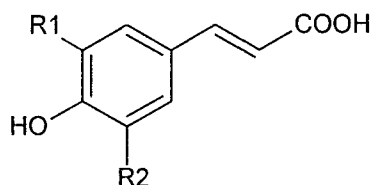
R ₁	R ₂	
H	H	ácido p-hidroxibenzoico
OCH ₃	H	ácido vinílico
OH	OH	ácido gálico
OCH ₃	OCH ₃	ácido siríngico

Acido p-hidroxibenzoico

Figura 1. Estructura de los ácidos benzoicos

Fuente: Gimeno E. Compuestos fenólicos. 2004.

- **Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico**



R ₁	R ₂	
O	H	ácido p-cumarico
OH	H	ácido cafeico
OCH ₃	H	ácido ferulico
OCH ₃	OCH ₃	ácido sinápico

Acido p-hidroxicinámico

Figura 2. Estructura de los ácidos cinámicos

Fuente: Gimeno E. Compuestos fenólicos. 2004

2.3.2. Flavonoides

Los flavonoides fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.¹⁷ Estos pigmentos naturales presentes en los vegetales protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.^{20, 21}

2.3.2.1. Distribución

Están distribuidos ubicuamente entre los vegetales superiores vasculares, siendo las rutáceas, poligonáceas, compuestas y umbelíferas las principales familias que

los contienen. Abundan, sobre todo, en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como las hojas, los frutos y las flores, ya que la luz solar favorece su síntesis. Se encuentran generalmente en mezclas como, agliconas y/o glicósidos, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas.¹⁷

2.3.2.2. Estructura química

Los flavonoides contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglado 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. Se forman biogenéticamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, y a partir de la cual se derivan las otras clases por posteriores modificaciones que ocurren en varias etapas. Cada una de las clases de flavonoides, suele encontrarse bajo la forma de glicósidos 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.¹⁷

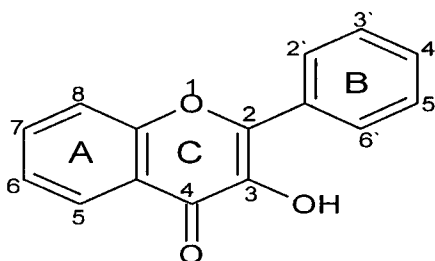


Figura 3. Núcleo básico de un flavonoide
Fuente: Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica.1994.

2.3.2.3. Clasificación

Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales, modificaciones como pueden ser: adicionar (o reducir) grupos hidroxilos, la metilación de grupos hidroxilos o del núcleo del flavonoide, metilación de grupos hidroxilos en posición orto, dimerización (para producir biflavonoides), formación de bisulfatos y la más importante, glicosilación de grupos hidroxilos (para producir flavonoides O-glicósidos) o del núcleo del flavonoide (para producir flavonoides C-glicósidos)¹⁷. Las amplias gamas de flavonoides incluyen: flavanonas, flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianinas, flavanonoles, isoflavonas, chalconas, dihidrochalconas, auronas y neoflavonas.²²

Tabla 1. Ejemplo de clases de flavonoides, su estructura, y parte de sustitución.

Clase de flavonoide	Estructura anillo C	Parte de sustitución
Flavanona	Naringina	5,4'-OH;7-O-Neo ^a
	Hesperidina	5,3'-OH;4'-OMe ^a
	Eriodictiol	5,7,3',4'-OH
Flavona	Tangeritina	5,6,7,8,4'-OMe ^a
	Luteolina	5,7,3',4'-OH
	Apigenina	5,7,4'-OH
Flavonol	Kaemferol	5,7,3,4'-OH
	Guercetina	5,7,3,3',4'-OH
	Rutina	5,7,3',4'-OH;3-o-Rut ^a
Isoflavonoides	Genisteina	5,7,4'-OH
	Diadzeina	7,4'-OH
	Orobol	5,7,3',4'-OH
Antocianidinas	Apigenidina	5,7,4'-OH
	Luteolinidina	5,7,3,4'-OH
	Cianidina	3,5,7,3',4'-OH
Auronas	Sulfuretina	
	Leptosidina	

Neo^a: neohesperidosa; Me^a: metilo; rut^a: rutinosa

Fuente: Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica.1994.

2.3.2.4. Efectos farmacológicos

Los flavonoides actúan en las plantas como antioxidantes, antimicrobianas, fotorreceptores, atractores visuales, repelentes de alimentación, y para la detección de la luz. Son compuestos polifenólicos de importancia farmacológica por exhibir actividad antioxidante, antialérgica, antitumoral, antimicrobiana y hormonal.²³

Se reportó la actividad inhibitoria de TNF- α en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, otro estudio demostró que los flavonoides también tienen propiedades de inhibir la producción de NO y la expresión de iNOS.²⁴

Presentan una rápida absorción y pueden sufrir oxidación y reacciones de reducción, así como la metilación, la glucuronidación y sulfatación, y tienen excreción biliar.²⁵

Las diferentes especies que contienen flavonoides poseen actividad farmacológica muy variada: acción vitamina P, antihemorrágico, antiarrítmico, protectores de la pared vascular o capilar, antiinflamatorios, antirradicales libres, antihepatotóxicos, antibacterianos, antivíricos y antifúngicos, diuréticos y antiurémico, antiespasmódicos.¹⁹

2.4. Radicales libres

Los radicales libres se definen como cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura, por lo tanto, son altamente reactivos; también son conocidos como especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno. Éstos pueden producir daño oxidativo en macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas. Estos participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares o procesos neurodegenerativos. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador y otros.²⁶

Los radicales libres son sustancias químicamente estructuradas con uno o varios electrones, que poseen la propiedad de formar una reacción en cadena que conforman más radicales libres, producto de que sus electrones no están apareados y, al no tener carga eléctrica o iones pueden, al unirse con otros elementos químicos, reaccionan a grandes velocidades. Los radicales libres están clasificados para su estudio como: Especies reactivas de Oxígeno (ERO_2), y se determinan como H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), O_2 (anión superóxido), RO (peroxilo), HClO (ácido hipocloroso).²⁷

Situaciones que aumentan la producción de radicales libres son:²⁸

- Contaminación ambiental.
- Tabaquismo.
- Dietas ricas en grasas.
- Exposición excesiva a las radiaciones solares.
- Ingesta de aceites "vegetales" que fueron refinados, ya que estos contienen radicales libres al ser sometidos a altas temperaturas.

2.5. Estrés oxidativo

No hay que confundir este mecanismo celular con el estrés cotidiano derivado de las problemáticas que enfrenta el organismo humano en su vida diaria (trabajo, familia, trámites, entre otras). El estrés oxidativo es un término asociado a las células y a la acción de un radical libre que le afecta, así en condiciones normales

se da un equilibrio entre la producción de radicales libres u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes (exógeno y endógeno). Este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación sea menor y con menos daño celular. Cuando se rompe el equilibrio, éste se podrá asociar con un déficit en el sistema antioxidante o por la proliferación descontrolada de los radicales libres.²⁹

Es un estado generado por el desequilibrio entre la producción de radicales libres, especies prooxidantes y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente las especies reactivas intermedias o reparar el daño resultante. El estrés oxidativo está involucrado en el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas, como el cáncer, artritis, envejecimiento, desordenes autoinmune, enfermedades cardiovascular y neurodegenerativa.³⁰

2.6. Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. La oxidación de dichos sustratos podrá ser iniciada por dos tipos de especies reactivas: los radicales libres, y aquellas sustancias que, sin ser radicales libres, son sustancias suficientemente reactivas para inducir la oxidación de dichos sustratos.³¹

Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan los radicales libres. La función y efecto que tienen los antioxidantes en la salud es evitar la oxidación de sustancias que puedan provocar alteraciones fisiológicas. Estudios recientes demuestran que la expresión antioxidante enzimática y su actividad se ven drásticamente reducidas en la mayoría de las enfermedades cutáneas. Sin embargo, los antioxidantes endógenos pueden ser inducidos por fuentes exógenas, dando como resultado un efecto protector contra el daño oxidativo. Los tratamientos con antioxidantes prolongan la vida en los seres vivos.³²

2.6.1. Sistema de defensas antioxidantes

Como seres humanos estamos expuestos cada instante de nuestras vidas a moléculas tóxicas y altamente reactivas llamadas especies de oxígeno reactivo o también conocidas como radicales libres, moléculas que dañan nuestro organismo. Desde el momento en que somos concebidos hasta el día que

morimos, la oxidación (reacciones químicas que conllevan consumo de oxígeno) de proteínas críticas, lípidos, ácidos nucleicos y azúcares se produce en cada célula de nuestro cuerpo produciendo radicales libres. Es por ello que los organismos evolutivamente desarrollaron sistemas de defensa antioxidante, para poder neutralizar a las especies reactivas de cualquier elemento. Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen radicales libres. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los radicales libres. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un radical libre.³³

El antioxidante al colisionar con él, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un radical libre débil no tóxico. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los radicales libres.³⁴

Un antioxidante, es cualquier sustancia que presente en bajas concentraciones, retrasa o inhibe la oxidación. Pueden actuar en las formas siguientes:

- Disminuyendo la concentración de oxidantes.
- Evitando la iniciación de la reacción en cadena al "barrer" (cubrir o detener una reactividad química muy alta), los primeros radicales libres que se forman.
- Uniéndose a iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas.
- Transformando los peróxidos en productos menos reactivos.
- Deteniendo la propagación y el aumento de radicales libres.

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN.³⁵

Estos sistemas antioxidantes disminuyen con la edad, en ciertos procesos patológicos y bajo condiciones ambientales como la contaminación atmosférica.

2.6.2. Tipos de sistemas de defensa antioxidante

Los mecanismos antioxidantes suelen actuar de forma coordinada, ejercen su función en localizaciones subcelulares concretas, y se agrupan en dos sistemas de defensa antioxidante: sistema enzimático y sistema no enzimático.

a) Sistema antioxidante enzimático o endógeno

Son los sistemas antioxidantes que se producen dentro del organismo para combatir la acción de los radicales libres.³⁶

Constituye la primera y mejor línea de defensa contra los radicales libres. Está integrado por tres enzimas principales que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres: superóxido dismutasa, (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); otras tres enzimas, glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST) y r-glutamil cisteinil sintetasa (GCS), sin ser estrictamente enzimas antioxidantes, estas colaboran indirectamente con la GPx ya que contribuyen a regular el pool intracelular de glutatión reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos.³⁷

b) Sistema antioxidante no enzimático o exógeno

Útiles cuando el sistema endógeno se satura, capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena, este proceso se obtiene mediante la dieta.³⁶

Está integrado por una serie de sustancias que, aun estando presentes a bajas concentraciones, en presencia de compuestos oxidables (como ADN, proteínas o lípidos), se oxidan antes que éstos, y retrasan, inhiben, amortiguan o previenen su oxidación, la producción de radicales libres o los efectos deletéreos de éstos. El sistema antioxidante no enzimático incluye una larga serie de compuestos de bajo peso molecular, siendo los más importantes el glutatión reducido, la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina A (trans-retinol/ β -caroteno). Además, los flavonoides, ácidos fenólicos, ácido α -lipóico, ácido úrico, bilirrubina, algunos azúcares y aminoácidos, coenzima Q o ubiquinona y varios derivados de ésta y una hormona, la melatonina, también forman parte de los antioxidantes no enzimáticos. El manganeso, selenio, cobre, hierro y otros minerales, al ser parte del sitio activo de las enzimas antioxidantes, juegan un papel importante en la defensa mediada por enzimas, sin ser verdaderos antioxidantes.³⁸

2.7. Medición de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test *in vitro* (tabla 2) para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presenten diferentes variaciones puede dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método y otro. Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: (1) Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y (2) Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET).³⁹

Tabla 2. Clasificación de los modelos de ensayo *in vitro* según su modo de reacción ET o HAT

Ensayos	Categoría
<ul style="list-style-type: none">- Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)- 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)- Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)- N,N- dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)- Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
<ul style="list-style-type: none">- Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)- Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)- Inhibición de la oxidación del ácido linoleico- Inhibición de la oxidación de lípido de baja densidad (LDL)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra. En la figura 4 se muestran las reacciones específicas para los ensayos basados en la transferencia de electrones y en la transferencia de átomos de hidrógeno.³⁹

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH• es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS•+ se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados.³⁹

a) Ensayos ET



b) Ensayos HAT



Figura 4. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno.

2.7.1. Ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en etanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción

de 20-30 minutos en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox.³⁹

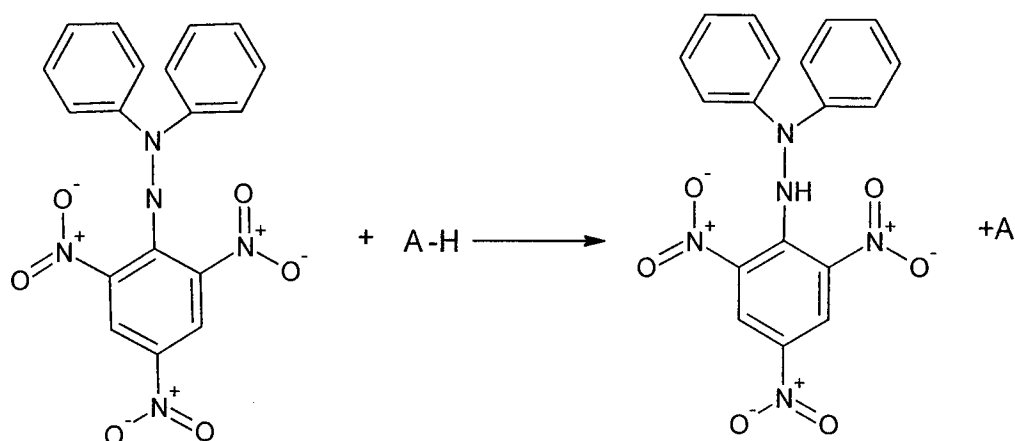


Figura 5. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.

Los resultados del ensayo DPPH se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC₅₀), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC₅₀ cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH usado.³⁹

2.7.2. Ensayo ABTS^{•+} (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico)

La generación del radical ABTS^{•+} constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS^{•+} estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes.³⁹

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS^{•+}, implica la producción directa del cromóforo ABTS^{•+} verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Este presenta tres máximos de

absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^{•+}$ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.³⁹

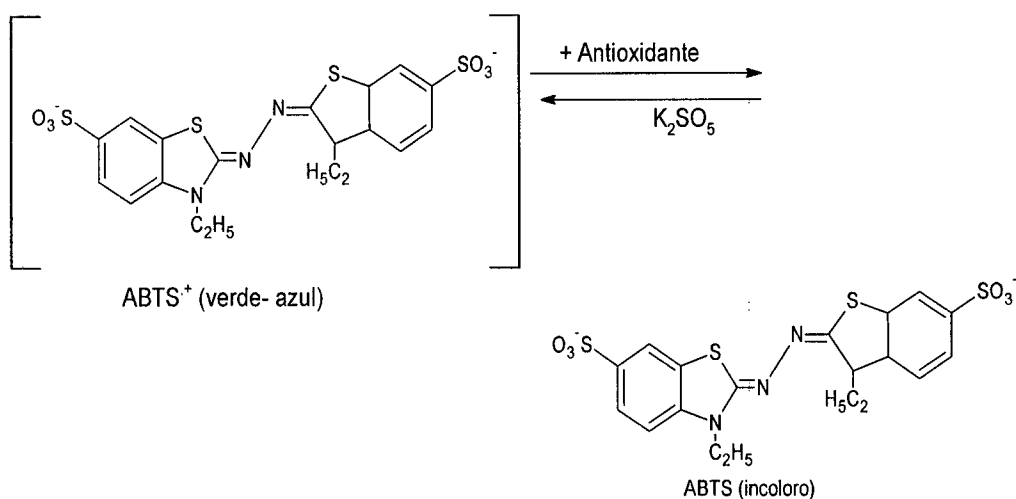


Figura 6. Estructura del $ABTS^{•+}$ antes y después de la reacción con el antioxidante.

2.7.3. Ensayo FRAP (Potencia antioxidante reductora férrica)

El ensayo FRAP fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain, para medir el poder reductor en muestras de plasma, sin embargo, también se ha adaptado y utilizado para el ensayo de antioxidantes en productos botánicos. La reacción mide la reducción del complejo férrico-2,4,6, tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico (Fe^{3+} -TPTZ) se reduce a ión ferroso a bajo pH, causando la formación de un complejo ferroso-tripiridiltriiazina coloreado (Fe^{2+} -TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593 nm.⁴⁰

Debido a que el potencial redox del Fe^{3+} -TPTZ es comparable con el del ABTS se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos, aunque las condiciones de la reacción sean distintas. El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, a diferencia de otros métodos donde se produce captura de radicales libres, según esto, el FRAP puede ser útil, en combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes.⁴¹

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los ambientes del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) "Marco Antonio Garrido Malo", de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de abril a agosto de 2018, ubicado en la ciudad Universitaria Av. Independencia s/n Huamanga.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población: Hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar", que crecen en el centro poblado de Huaraca, anexo Anchac Wasi, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho.

3.2.2. Muestra: Dos kilogramos de hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar", que se recolectó en el centro poblado de Huaraca, anexo Anchac Wasi, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, ubicado a una altura de 3800 m.s.n.m.

a. Unidad de análisis: Veinte gramos de muestra seca obtenida de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar"

b. Sistema de muestreo: Libre por conveniencia

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Recolección de la muestra

La muestra de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" se recolectó en horas de la mañana y transportada en bolsas a los ambientes del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) "Marco Antonio Garrido Malo", de la Escuela Profesional de

Farmacia y Bioquímica. Se secaron a temperatura ambiente, en un lugar con buena ventilación, cambiando el papel de soporte y removiendo el vegetal cada 24 horas para evitar su descomposición, por un período de cinco a ocho días según las directrices de la OMS.⁴²

Una parte de la planta recolectada fue llevada al Herbario San Marcos (USM) del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su identificación y su clasificación taxonómica.

3.3.2. Preparación de la muestra

Luego del secado de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", se procedió a reducir el tamaño de la muestra utilizando molino de cuchilla, hasta obtener un pulverizado uniforme. Luego se pesó 20 g de muestra seca pulverizada, el cuál fue vertido en un frasco ámbar de boca ancha con 200 mL de etanol 50°GL.

El método extractivo que se utilizó es la maceración con agitación, en este procedimiento se agitó intensamente el material en maceración con un agitador mecánico, de esta forma no se mejora el resultado de extracción, pero se reduce el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de concentraciones, acortando el tiempo total de extracción.⁴³ Luego se dejó en reposo por 24 horas. Transcurrido el tiempo de humectación se transfirió la muestra a un percolador, se cubrió el orificio de salida con gasa y algodón. Posteriormente se percoló a razón de 20 gotas por minuto, se recibió el percolado en un recipiente limpio y se filtró. Se percoló por tres veces repitiendo el mismo procedimiento.⁴³ luego el extracto obtenido fue concentrado a sequedad empleando una estufa a una temperatura de 40° C. El producto obtenido se envasó en un recipiente de color ámbar.

3.3.3. Identificación fitoquímica

La identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", fueron realizadas mediante reacciones de coloración y precipitación según el procedimiento descrito por Miranda y Cuéllar.⁴⁴ También se realizó la identificación fitoquímica empleando el método de análisis cualitativo de ensayo a la gota, el cual consistió en someter al extracto vegetal, según la polaridad, a reactivos específicos que generan compuestos coloreados o precipitados, según el tipo de metabolito secundario presente. Se realizó siguiendo el procedimiento descrito en Pérez, F. *et al*,⁴⁵ "Estudio fitoquímica preliminar de plantas medicinales del norte del Perú".

3.3.4. Determinación de la concentración de fenoles totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología de Sousa *et al.*⁴⁶, con algunas modificaciones.

a. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico

• Solución madre de ácido gálico

Se pesó 20 mg ácido gálico, se disuelve en H₂O destilada y se enrasa a un volumen de 25 mL para obtener una solución stock con una concentración de 800 µg/mL. Se tomó directamente de la solución stock 100 µL, se transfiere a una fiola y se adicionó 1850 uL de H₂O destilada (C.S.P. 2 mL) para obtener una solución con una concentración de 60 µg/mL. De esta solución madre se tomó alícuotas de 100, 200 y 400 uL, se agregó H₂O destilada C.S.P. 600 µL, obteniéndose soluciones estándares de 10, 20, 40, 60 µg/mL.

A partir de los estándares se toman alícuotas de 100 µL, se transfiere a una fiola, adicionar a continuación 500 µL del reactivo Folin - Ciocalteu, previa dilución 1/10 (v/v) con H₂O destilada y 400 µL de carbonato de sodio al 7,5%. Luego se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente y se realizó la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra.

b. Preparación de la muestra

Se pesó 100 mg del extracto seco, luego aforar a 10 mL con etanol 50° G.L, se tomará de ésta 2 mL y aforar a 25 mL con etanol 50° G.L, posteriormente se tomará de ésta 2 mL y aforar a 5 mL con etanol 50° G.L, con esta última dilución se trabaja.

Se tomó directamente de la última dilución 100 µL, se transfiere a una fiola, adicionar a continuación 500 µL de Folin - Ciocalteu 1/10 (v/v) y 400 µL de carbonato de sodio al 7,5%. Se dejó reaccionar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente y se realizó la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra.

La cantidad de compuestos fenólicos en cada extracto se determina en miligramos de contenido fenólico equivalentes de ácido gálico/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración del ácido gálico.⁴⁶

3.3.5. Determinación de la concentración de flavonoides

Se utilizó el método de Cloruro de aluminio, siguiendo la metodología de Peixoto *et al.*⁴⁷, con algunas modificaciones.

a. Preparación de la curva de calibración de rutina

Se pesó 1 mg de rutina, llevar a un matraz volumétrico de 25 mL y diluir con 2,5 mL de metanol, luego aforar con etanol 50°GL para obtener una solución stock con una concentración de 40 µg/mL. De esta solución stock se tomó directamente alícuotas de 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 0,5 mL de cloruro de aluminio al 2 % y etanol 50°GL C.S.P. 5 mL respectivamente. El blanco se prepara de igual forma sin la muestra. Luego se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizó las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm.

b. Preparación de la muestra

Se pesó 100 mg del extracto seco, luego aforar a 10 mL con etanol 50°GL, se tomará de ésta 2 mL y aforar a 25 mL con etanol 50°GL, con esta última dilución se trabaja. Se tomó directamente de la última dilución 2 mL, se transfiere a una fiola, adicionar a continuación 0,5 mL de cloruro de aluminio al 2% y 2,5 mL de etanol 50°GL. Luego se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente y se realizó las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm. Utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

La cantidad de flavonoides en el extracto se determina en miligramos de contenido de flavonoides equivalentes de rutina/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración de rutina.

3.3.6. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

3.3.6.1. Método del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).

Se hizo la evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante siguiendo la metodología de Sousa *et al.*⁴⁶, con algunas modificaciones.

a. Preparación de la solución madre

Se pesó 4 mg de DPPH, se diluye con etanol 96°GL y se enrasó a un volumen de 100 mL para obtener una solución madre con una concentración de 40 µg/mL. Luego almacenar en el refrigerador y proteger de la luz.

b. Preparación de la solución de trabajo

De la solución madre se tomó alícuotas de 0,25; 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25; 7,5 y 8,75 mL, se agregó etanol 96°GL C.S.P. 10 mL, obteniéndose soluciones estándares de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 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 96°GL. Las medidas de absorbancia se realizaron por triplicado a los 30 minutos.

c. Preparación de la curva estándar de Trolox

Se pesó 5 mg de Trolox, se diluye con etanol 96°GL, y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución con una concentración de 500 µg/mL. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones estándares de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones estándares se toman alícuotas de 0,3 mL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 2,7 mL de la solución madre a una concentración de 40 µg/mL. Una mezcla de 2,7 mL de etanol 96°GL y 0,3 mL de la solución estándar, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego se agita y se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 515 nm.

d. Determinación de la actividad antioxidante de la muestra

Se preparó una solución del extracto seco de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" equivalente a concentración de 500 µg/mL. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL. C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones de las muestras de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones de las muestras se toman alícuotas de 0,3 mL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 2,7 mL de la solución madre a una concentración de 40 µg/mL. Una mezcla de 2,7 mL de etanol 96°GL y 0,3 mL de la solución de muestra, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego se agita y se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 515 nm.

e. Cálculo del porcentaje de actividad antioxidante

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 determinará el porcentaje de DPPH restante (%DPPH_{REM}), de acuerdo con la ecuación:

- 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 las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar"

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

- 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

- Los valores de absorbancia a todas las concentraciones ensayadas se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (%AA), que se determinó por la ecuación: ⁴⁶

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

Dónde:

AA : actividad antioxidante (%)

Abs_{control} : absorbancia inicial de la solución metanólica de DPPH.

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

Abs_{blanco} : absorbancia de blanco

- 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}.

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

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

3.3.6.2. Método del radical ácido radical ácido 2,2'-azino-bis-3- etilbenzotiazolín-6-sulfónico (ABTS)

a. Preparación de la solución madre de ABTS

- **Preparación del ABTS 7 mM**

Se preparó una solución madre de ABTS 7 mM, para ello se pesó exactamente 19,202 mg de ABTS y se disolvió con 5 mL de H₂O destilada.

- **Preparación de la solución de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) 2,45 mM**

Se pesó 3,3 mg de persulfato de potasio y se disolvió con 5 mL de H₂O destilada.

- **Preparación del radical ABTS****

En un frasco ámbar se colocó 5 mL de solución madre de ABTS 7 mM y 5 mL de la solución de persulfato de potasio 2,45 mM, luego se homogenizó y se cubrió con papel aluminio. La solución se incubó de 12 a 16 horas a T° ambiente (± 25 °C) antes de su utilización. La solución tiene un período de uso de 2 días en refrigeración.

b. Preparación de la solución de trabajo diario

Se diluyó aproximadamente 1,5 mL del radical formado con 50 mL de etanol 96°GL, hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (±0,2) a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción)

c. Preparación de la curva estándar de Trolox

Se pesó 5 mg de Trolox, se diluye con etanol 96°GL y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución con una concentración de 500 µg/mL. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones estándares de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones estándares se toman alícuotas de 20 µL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 980 µL de la solución de trabajo ABTS. Dejar reposar durante 7 minutos. Una mezcla de 980 µL de etanol

96°GL y 20 µL de la solución estándar, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego incubar durante 6 minutos en la oscuridad a T° ambiente. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 734 nm.

d. Determinación de la actividad antioxidante de la muestra

Se preparó una solución del extracto seco de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" equivalente a concentración de 500 µg/mL. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfirió a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones de las muestras de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones de las muestras se toman alícuotas de 20 µL, se transfirió a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 980 µL de la solución de trabajo ABTS. Dejar reposar durante 7 minutos. Una mezcla de 2,7 mL de etanol 96°GL y 0,3 mL de la solución de muestra, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego incubar durante 6 minutos en la oscuridad a T° ambiente. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 734 nm.

Los resultados se expresan en mM Trolox/g muestra.²

e. Cálculo del porcentaje de actividad antioxidante

- Los valores de absorbancia a todas las concentraciones ensayadas se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (%AA), que se determinó por la ecuación:⁴⁶

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

Dónde:

AA : actividad antioxidante (%)

Abs_{control} : absorbancia inicial de la solución metanólica de ABTS.

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

Abs_{blanco} : absorbancia de blanco

- La concentración requerida para el 50% de inhibición del radical libre ABTS (CI₅₀) será calculada mediante la ecuación exponencial de la concentración del extracto (µg/mL) vs AA (%).

$$y = b \cdot x + a$$

$$CI50 = \frac{(50 - a)}{(b)}$$

3.3.6.3. Método FRAP (Potencia antioxidante reductora férrica)

a. Preparación de reactivos.⁴¹

- **Buffer acetato de sodio 0,3 mM (pH 3.6)**

Se pesó 6,15 mg de acetato de sodio, luego se adicionó 2 mL de ácido acético glacial. Posteriormente aforar la solución a 250 mL con H₂O destilada y ajustar el pH si es necesario.

- **Solución complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ 10 Mm)**

Se pesó 78 mg del reactivo complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), luego se aforó a 25 mL con ácido clorhídrico (HCl 40 mM)

- **Solución de hexahidrato de cloruro férrico (FeCl₃ – 6H₂O 20 mM)**

Se pesó 135,2 mg de cloruro férrico (FeCl₃), luego se aforó a 25 mL con H₂O destilada.

- **Ácido clorhídrico (HCl) 40 mM.**

Diluir 535 µl de ácido clorhídrico HCl (37%) en 100 ml de H₂O destilada.

b. Preparación de la solución de trabajo diario

Esta solución de trabajo deberá de prepararse a diario. Mezclar 2,5 mL de solución complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) con 2,5 ml de la solución hexahidrato de cloruro férrico (FeCl₃ - 6H₂O 20 mM) y 25 ml de buffer acetato. Esta preparación debe mantenerse durante todo el proceso en el baño a 37 °C.

c. Preparación de la curva estándar de Trolox

Se pesó 5 mg de Trolox, se diluye con etanol 96°GL y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución con una concentración de 500 µg/mL. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones estándares de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones estándares se toman alícuotas de 20 µL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 980 µL de la solución de trabajo FRAP. Una mezcla de 980 µL de etanol 96°GL y 20 µL de la solución

estándar, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego incubar en la oscuridad a T° ambiente durante 30 minutos. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 593 nm.

d. Determinación de la actividad antioxidante de la muestra

Se preparó una solución del extracto seco de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" equivalente a concentración de 500 µg/mL. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones de las muestras de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones de las muestras se toman alícuotas de 20 µL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 980 µL de la solución de trabajo FRAP. Una mezcla de 2,7 mL de etanol 96°GL y 0,3 mL de la solución de muestra, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego incubar en la oscuridad a T° ambiente durante 30 minutos. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 593 nm.

e. Cálculo del porcentaje de actividad antioxidante

- Los valores de absorbancia a todas las concentraciones ensayadas se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (%AA), que se determinó por la ecuación:⁴⁶

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

Dónde:

AA : actividad antioxidante (%).

Abs_{control} : absorbancia inicial de la solución metanólica de FRAP.

Abs_{muestra} : absorbancia de la reacción del FRAP con la muestra

Abs_{blanco} : absorbancia de blanco.

- La concentración requerida para el 50% de inhibición del poder reductor del FRAP (CI₅₀) será calculada mediante la ecuación exponencial de la concentración del extracto (µg/mL) vs AA (%)

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

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

3.4. Tipo y diseño de investigación

3.4.1. Tipo de investigación

Descriptivo.⁴⁸

3.4.2. Diseño de investigación

El diseño que se empleó, es un diseño con posprueba únicamente y grupo de control.⁴⁸ Simbólicamente y de forma abreviada corresponde a:

RG1	X	O₁
RG2	-	O₂

R: Asignación al azar o aleatoria

G: Grupo de muestra (G1, grupo 1; G2, grupo 2; etc.)

X: Tratamiento, estímulo o condición experimental.

O: Medición experimental.

- : Ausencia de estímulo. Indica grupo control o testigo.

3.5. Análisis de datos

Los datos que se obtuvieron fueron procesados en una base de datos con el paquete estadístico SPSS versión 23. Se determinaron en forma de medias y desviación estándar, y se representaron mediante gráficos en forma de histogramas y barras de error. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas en los diferentes ensayos a un nivel de significancia de 95% ($p < 0.05$) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde oscuro
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración naranja intensa
	Dragendorff	+++	Precipitado naranja rojizo
Alcaloides	Wagner	+++	Precipitado marrón
	Mayer	++	Precipitado blanco crema
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado rojo
Azúcares reductores	Fehling	++	Precipitado rojo
Saponinas	Espuma	++	Persistencia de espuma
Quinonas	Borntrager	++	Coloración roja en la fase alcalina

LEYENDA:

(+) : Leve
 (++) : Moderada
 (+++) : Intenso

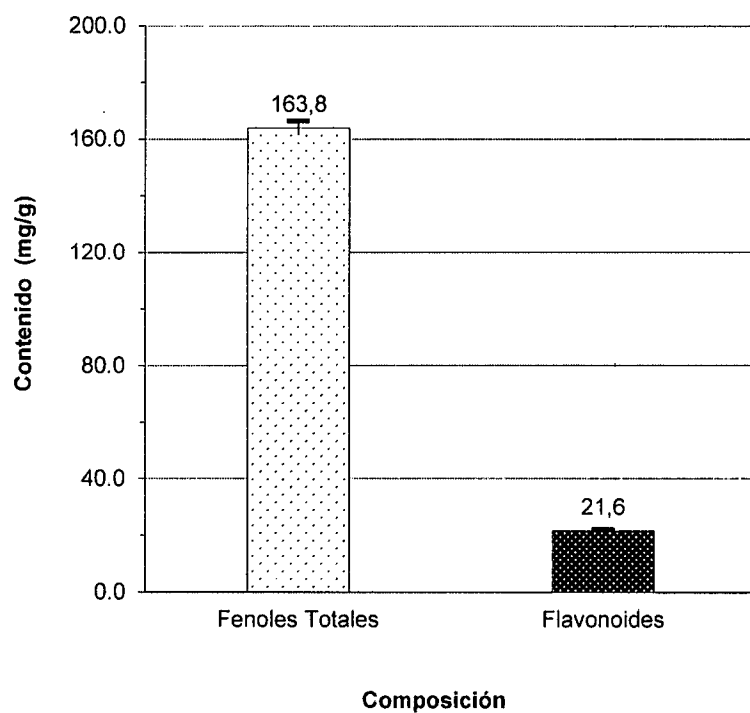


Figura 7. Contenido de fenoles totales y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

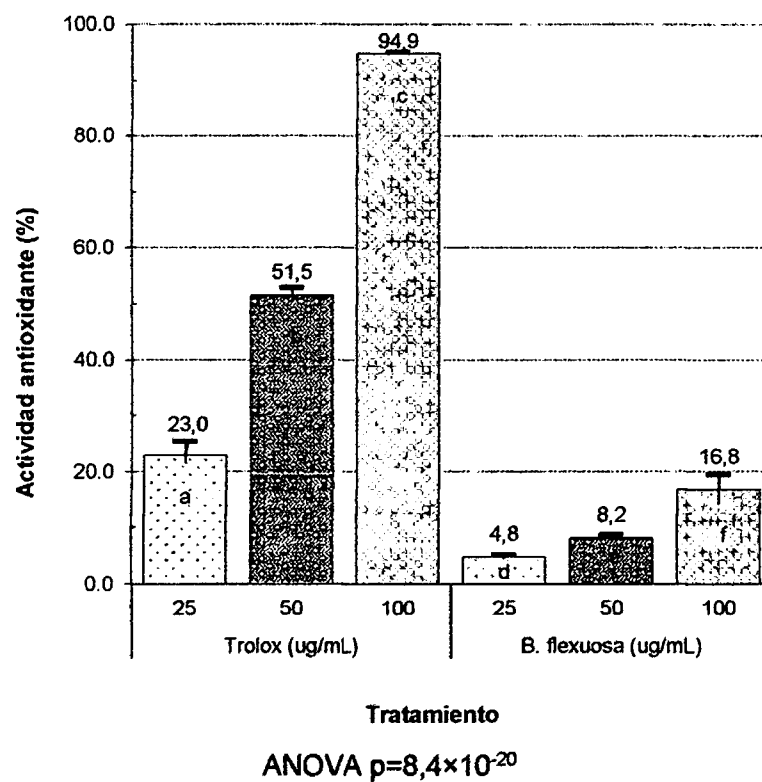


Figura 8. Porcentaje de la actividad antioxidante *in vitro* por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R.& P. "tankar", en comparación con el estándar Trolox, Ayacucho 2018.

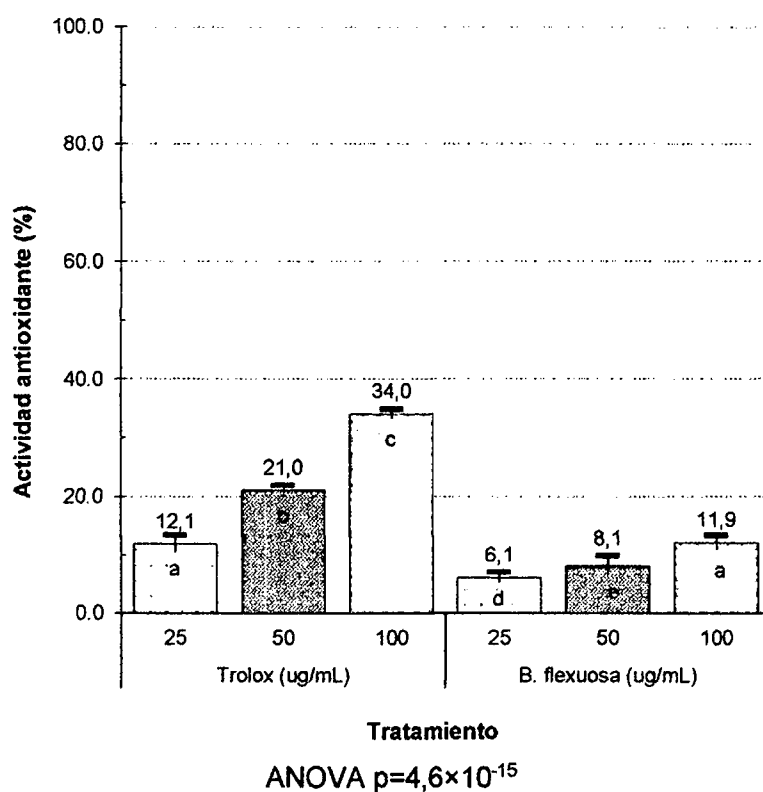


Figura 9. Porcentaje de la actividad antioxidante *in vitro* por el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", en comparación con el estándar Trolox, Ayacucho 2018.

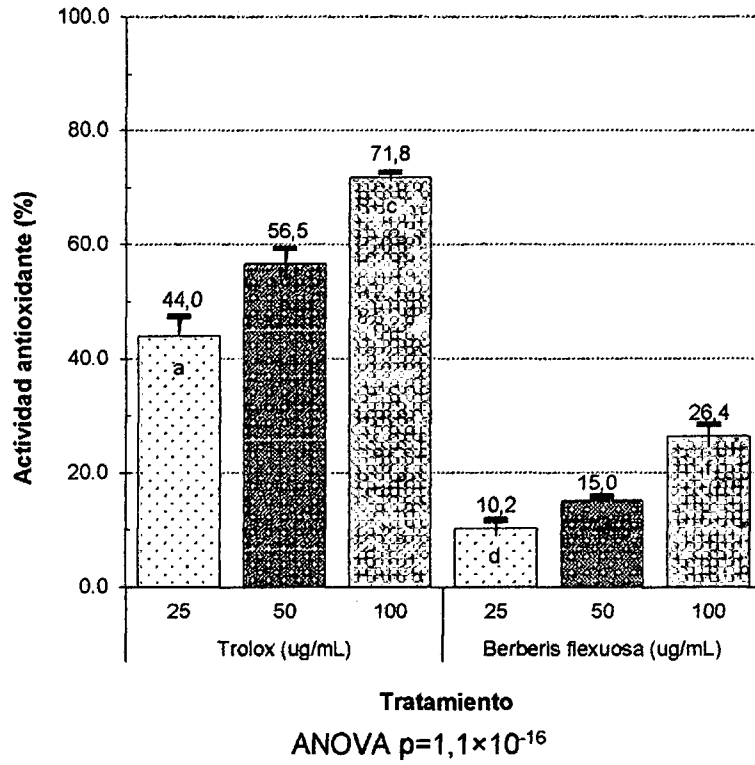


Figura 10. Porcentaje de la actividad antioxidante *in vitro* por el método FRAP del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R.& P. “tankar”, en comparación con el estándar Trolox, Ayacucho 2018.

Tabla 4. Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Tratamiento	CI ₅₀		
	DPPH	ABTS°	FRAP
<i>Berberis flexuosa</i>	291,16 ± 1,40	561,53 ± 12,82	309,73 ± 15,30
Trolox	38,44 ± 0,28	156,74 ± 1,21	35,81 ± 0,30

Los valores representan la media de tres repeticiones ± la desviación estándar de al menos, n=3. (p<0,05).

V. DISCUSIÓN

Las plantas, gracias a su maravilloso y complejo metabolismo, constituyen un verdadero arsenal químico, del cual sólo se conoce con éxito un tercio, considerando la variedad de especies existentes a nivel mundial y aquellas inexploradas hasta hoy, sin considerar aquellas especies ya extintas.⁴⁹

Una gran variedad de plantas en todo el planeta y sus extractos respectivos contienen diferentes compuestos químicos con actividad biológica, que pueden producir efectos terapéuticos variados; por lo que hoy día la evidencia científica está llamada a validar el uso popular, por un lado.⁵⁰

En el Perú, el empleo de productos naturales principalmente de origen vegetal se encuentra ampliamente difundido, debido a la existencia de una gran diversidad de flora en las distintas regiones del país.

La actividad antioxidante ha despertado en los últimos años un gran interés científico, ya que diversos estudios han demostrado que los antioxidantes son moléculas que poseen la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación ocasionada por las moléculas inestables conocidas como los radicales libres.²

La especie *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" no se ha explorado completamente. Debido a esto el interés principal es continuar con las investigaciones de la especie, ya que posee diversas propiedades medicinales y la gran mayoría de éstas no han sido estudiadas, es por tal motivo que se propuso realizar el presente trabajo de investigación para evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", con el propósito de poder darle una aplicabilidad y contribuir con la sociedad.

Las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", fueron recolectadas en el centro poblado de Huaraca, anexo Anchac Wasi, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, ubicado a una altura de 3800 m.s.n.m.

La identificación y clasificación taxonómica se realizó en el Herbario San Marcos (USM) del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Para obtener el extracto hidroalcohólico se realizó mediante el proceso de extracción con etanol 50°GL por medio de percolación. Se utilizó como disolvente de extracción etanol 50°GL, después de realizada la prueba del mejor solvente, debido a que la diferencia en la concentración del solvente delimita el tipo de metabolito secundario a extraer, dependiendo de la polaridad del mismo, ya que a una concentración de etanol 96°GL se extraerán metabolitos con menor polaridad que los extraídos con etanol 50°GL.⁵¹

La identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" se realizó mediante reacciones de coloración y precipitación según el procedimiento descrito por Miranda y Cuéllar.⁴⁴ También se realizó la identificación fitoquímica empleando el método de análisis cualitativo de ensayo a la gota, el cual consistió en someter al extracto vegetal, según la polaridad, a reactivos específicos que generan compuestos coloreados o precipitados, según el tipo de metabolito secundario presente, se realizó siguiendo el procedimiento descrito en Pérez, F. *et al*,⁴⁵ "Estudio fitoquímica preliminar de plantas medicinales del norte del Perú".

En la tabla 3, se presentan los metabolitos secundarios identificados del extracto hidroalcohólicos de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" siendo estos fenoles y/o taninos, flavonoides, alcaloides, lactonas y/o cumarinas, azúcares reductores, saponinas y quinonas.

Quispe L.¹¹ reportó la presencia de catequinas, azúcares reductores, antocianinas, fenoles, flavonoides, lactonas, cumarinas, triterpenos, alcaloides, gomas y mucilagos del fruto de *berberis weberbaueri* C. Scheneider "airampu".

Acuña y Cusi.⁵² reportaron la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, cumarinas, quinonas, lactonas, glicósidos, aminoácidos, saponinas, flavonoides y resinas del extracto acuoso de las partes aéreas de *berberis boliviana lechler* (ch'eqche).

La cantidad de metabolitos secundarios que existan en una planta pueden ser afectados por diversos factores, que pueden ser tanto extrínsecos como intrínsecos: Los factores extrínsecos son el clima y la temperatura, la humedad, o las condiciones del suelo; y los factores intrínsecos son de tipo genético (mutaciones, otras alteraciones), interacción con las enzimas para sufrir transformaciones, o variaciones diurnas, ontogénicas o estacionales.

Por otro lado, Carocho M. y Ferreira I.⁵³ manifiestan que los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, esteroides, catequinas, antocianinas y proantocianinas, los cuales debido a sus propiedades pueden actuar como antioxidantes y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas.

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de ocho mil compuestos distintos. Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres.¹⁰

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.⁵⁴

Los fenoles como: taninos condensados, flavonoides, ácidos fenólicos como el clorogénico, cumárico y elágico; 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).⁵⁴

En la figura 7, se observan los resultados de la cuantificación del contenido de fenoles totales presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", la cual fue de $163,8 \pm 0,98$ mg Eq AG/g de extracto seco. Se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, con algunas modificaciones. Se realizó la curva de calibración del ácido gálico, con un coeficiente de correlación de 0,9998 (anexo 12); la cual permitió determinar el contenido de fenoles totales.

Quispe, L.¹¹ reportó el contenido total de fenoles del fruto de *berberis weberbaueri* C. Scheneider "airampu", la cual fue 5869,968 mg Eq de ácido clorogénico/100 g de muestra. Llegando a una conclusión que existe una eleva concentración de compuestos fenólicos en el fruto de airampu frente a los otros frutos que tradicionalmente son considerados por su alto contenido en compuestos fenólicos.

En nuestro estudio, podemos observar bajo contenido de fenoles totales, esto debido a que están influenciados o sufren alguna variación por la técnica de extracción, uso de solvente, tiempo de sonicación, cantidad de reactivo, muestra utilizado, tiempo de incubación, estrés abiótico y otros.

En la figura 7, se observan los resultados de la cuantificación del contenido de flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", la cual fue de $21,6 \pm 0,20$ mg Eq Ru/g de extracto seco. Se determinó por el método de Cloruro de aluminio, con algunas modificaciones. Se realizó la curva de calibración de rutina, con un coeficiente de correlación de 0,9986 (anexo 13); la cual permitió determinar el contenido de flavonoides totales.

En nuestro estudio, podemos observar bajo contenido de flavonoides totales, esto debido a que están influenciados o sufren alguna variación por la técnica de extracción, uso de solvente, tiempo de sonicación, cantidad de reactivo, muestra utilizado, tiempo de incubación, estrés abiótico y otros.

En la figura 8, se observan los porcentajes de la actividad antioxidante *in vitro* por el método del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", en comparación con el estándar Trolox. Se realizó la curva de calibración con Trolox para el ensayo DPPH, con un coeficiente de correlación de 0,9996 (anexo 14); a partir de las cuales fue posible expresar la actividad antioxidante de la especie *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", son expresados en porcentaje, la cual se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ obteniendo los siguientes resultados: 4,8%; 8,2% y 16,8% de actividad antioxidante respectivamente. Asimismo, con el estándar Trolox se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ obteniendo los siguientes resultados: 23,0%; 51,5% y 94,9% de actividad antioxidante respectivamente. Estadísticamente por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto. ($p=8,4 \times 10^{-20}$).

No existe referencia alguna de porcentaje de actividad antioxidante de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar" con el ensayo DPPH, pero se reporta estudios de otras especies del género *Berberis* de diferentes partes del mundo.

Quispe, L.¹¹ reportó el contenido de actividad antioxidante del fruto de *berberis weberbaueri* C. Scheneider "airampu", la cual fue 20801,094 µg. Equivalente trolox/g. tejido. Para la determinación de la actividad antioxidante utilizó el método DPPH y realizó la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 515 nm. Llegando a una conclusión que el fruto del airampu posee un alto contenido de actividad antioxidante (20801,094 µg. Equivalente trolox/g. tejido), comparado con los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante de la guinda, mora, higo, uva negra, ciruela y granada.

Shalaby y col.⁵⁵ menciona que el DPPH es un método simple, rápido y económico para estudiar los perfiles de capacidad antioxidante de extractos de plantas, alimentos, etc. Se puede usar para muestras sólidas o líquidas y no es específico de ningún componente antioxidante en particular.

En la figura 9, se observan los porcentajes de la actividad antioxidante *in vitro* por el método del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", en comparación con el estándar Trolox. Se realizó la curva de calibración con Trolox para el ensayo ABTS, con un coeficiente de correlación de 0,9996 (anexo 14); a partir de las cuales fue posible expresar la actividad antioxidante de la especie *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", son expresados en porcentaje, la cual se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL obteniendo los siguientes resultados: 6,1%; 8,1% y 11,9% de actividad antioxidante respectivamente. Asimismo, con el estándar Trolox se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL obteniendo los siguientes resultados: 12,1%; 21,0% y 34,0% de actividad antioxidante respectivamente. Estadísticamente por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto. ($p=4,6 \times 10^{-15}$).

No existe referencia alguna de porcentaje de actividad antioxidante de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar" con el ensayo ABTS, pero se reporta estudios de otras especies del género *Berberis* de diferentes partes del mundo.

Shalaby y col.⁵⁵ menciona que el ABTS ha sido utilizado para examinar la capacidad relativa de captación de radicales de flavonoides y fenoles. El ABTS es

soluble en disolventes acuosos y orgánicos y es una mejor opción que DPPH y más sensible que DPPH. Desventaja el precio del reactivo ABTS es alto.

En la figura 10, se observan los porcentajes de la actividad antioxidante *in vitro* por el método de la capacidad reductora del hierro (FRAP) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa R. & P.* "tankar", en comparación con el estándar Trolox. Se realizó la curva de calibración con Trolox para el ensayo FRAP, con un coeficiente de correlación de 0,9996 (anexo 14); a partir de las cuales fue posible expresar la actividad antioxidante de la especie *berberis flexuosa R. & P.* "tankar", son expresados en porcentaje, la cual se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL obteniendo los siguientes resultados: 10,2%; 15,0% y 26,4% de actividad antioxidante respectivamente. Asimismo, con el estándar Trolox se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL obteniendo los siguientes resultados: 44,0%; 56,5% y 71,8% de actividad antioxidante respectivamente. Estadísticamente por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto. ($p=1,1 \times 10^{-16}$).

No existe referencia alguna de porcentaje de actividad antioxidante de *berberis flexuosa R. & P.* "tankar" con el ensayo FRAP, pero se reporta estudios de otras especies del género *Berberis* de diferentes partes del mundo.

Shalaby y col.⁵⁵ menciona que el ensayo FRAP es simple, rápido, económico y no requiere equipo especializado. Desventaja el reactivo FRAP no puede detectar especies que actúen mediante transferencia de H, antioxidantes del grupo sulfhidrilo que contiene tioles como el glutatión y las proteínas.

En la tabla 4, se observa la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" sobre el radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) y la potencia antioxidante reductora férrica (FRAP). Obteniendo los siguientes resultados: para el DPPH mostró un CI_{50} : $291,16 \pm 1,40^*$ µg/mL, para ABTS mostró un CI_{50} : $561,53 \pm 12,82^*$ µg/mL y para FRAP mostró un CI_{50} : $309,73 \pm 15,30^*$ µg/mL. Donde a menor concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) mayor capacidad antioxidante. Concluyendo que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" presentó baja actividad antioxidante en comparación con los estándares utilizados.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", presentó baja actividad antioxidante, fenoles totales y flavonoides.
2. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" fueron: fenoles y/o taninos, flavonoides, alcaloides, lactonas y/o cumarinas, azúcares reductores, saponinas y quinonas.
3. El contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" fueron: $163,8 \pm 0,98$ mg Eq AG/g de extracto seco y $21,6 \pm 0,20$ mg Eq Ru/g de extracto seco respectivamente.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", presentó baja actividad antioxidante frente al radical DPPH, ABTS y FRAP con una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de $291,16 \pm 1,40^*$ µg/mL; $561,53 \pm 12,82^*$ µg/mL y $309,73 \pm 15,30^*$ µg/mL respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

1. Preparar diferentes tipos de extractos de los frutos y/o corteza de la planta *berberis flexuosa R. & P.* "tankar" con otros solventes y otras técnicas. Para determinar si la distribución de metabolitos secundarios es la misma y comparar su potencial antioxidante.
2. Caracterizar mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) los compuestos fenólicos presentes en la especie *berberis flexuosa R. & P.* "tankar".
3. Realizar estudios de toxicidad de los diferentes tipos de extractos, de las diferentes partes de la planta *berberis flexuosa R. & P.* "tankar" para dar un conocimiento más profundo y mejor uso de dicha planta por la población.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marwah R., Fatope M., Mahrooqi R., Varma G., Abadi H., Khamis S., Burtamani-Al. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. Food Chemistry. [revista en Internet] 2007 junio; [acceso 14 de junio de 2018]; Vol. 101(2):465-470. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606001099>
2. Carvajal M. Evaluación de la actividad antioxidante de las hojas y frutos de la feijoa "*Acca sellowiana*". Tesis para obtener el título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador; 2015.
3. Guija E., Inocente M., Ponce J. y Zarzosa E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. Horizonte Médico. Revista oficial de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres [revista en internet] 2015; [acceso 15 de junio de 2018]; Vol 15(1): 57-60 disponible en: <http://www.horizontemedicina.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/148/159>
4. Meza K. Química y actividad biológica de *Berberis rotundifolia*. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile; 2018.
5. Silva C. Cuantificación de los alcaloides de *Berberis hallii* "Carrasquilla" Sector la Josefina San Isidro del Cantón Guano Provincia de Chimborazo. Tesis para obtener el título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador; 2010.
6. García R., Aguilar L., Soto M., Nieto R., Kite G. Compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante en las flores de *Crataegus spp.* de México. Revista Agrociencia [revista en internet] 2012; [acceso 10 de junio de 2018]; vol 46. n° 7. Pp 65. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n7/v46n7a2.pdf>
7. Stankovic M., Niciforovic N., Mihailovic V., Topuzovic M., Solujic S. Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae [revista en internet] 2012; [acceso 10 de junio de 2018]; Vol. 81 (2) pp 117-122. Disponible en: <https://pbsociety.org.pl/journals/index.php/asbp/article/view/asbp.2012.010/589>
8. Palomino L., García C., Gil J., Rojano B., Durango D. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. [revista en internet] 2009; [acceso 11 de junio de 2018]; 16(3): 388-395. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042009000300013&script=sci_abstract&lng=es
9. Doroteo V., Díaz C., Terry. C., Rojas. R. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* de 6 plantas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú. [revista en internet] 2013; [acceso 12 de junio de 2018]; 79 (1): 13-20. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000100003
10. Valdez R. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Baccharis salicifolia* R&P "chilca" y *Piper elongatum*

- Vahl "matico". Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho; 2014.
11. Quispe L. Actividad antioxidante, fenoles totales y antocianinas en el fruto y néctar de airampu (*Berberis weberbaueri* C. Scheneider) Tesis para obtener el título profesional de Ingeniera en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho; 2007.
 12. Arena M., Cabana J. *Berberis* usos y conservación, Santa Cruz-Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2005.
 13. Quispe H. Extracción de colorantes de la raíz de la *Berberis lutea* "Tankar Quichka". Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho; 1985.
 14. Araya M. Estudio Químico de *Berberis Coletioides* Lechl. Tesis para obtener el título de Ingeniero de Ejecución en Química, Mención Industria y Medio Ambiente. Universidad de Magallanes, Punta Arenas. [Revista en internet] 2016; [acceso 20 de junio de 2018]; disponible en: http://www.umag.cl/biblioteca/tesis/araya_rojas_2006.pdf
 15. Nuñez L. Estudio Fitoquímico del extracto alcaloidal de la especie nativa *Berberis tabiensis* (LAC) BERBERIDACEAE. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá; 2010.
 16. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. OFFARM. Ámbito Farmacéutico nutrición. [Revista en internet] 2004; [acceso 22 de junio de 2018]; Vol. 23 Núm. 6 pp. 9-155. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>.
 17. Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales 2da edición. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
 18. Tarnawski M., Depta K., Grejciun D., Szelepin, B. HPLC Determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. [Revista en internet] 2006; [acceso 22 de junio de 2018]; vol. 41(1): Pág. 182-188. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708505007144?via%3Dihub>
 19. Kuklinski C. Farmacognosia. Primera reimpresión. Barcelona: ediciones Omega S.A.; 2003.
 20. Martínez S., González J., Culebras M., Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* [Artículo en internet] 2002; [acceso 23 de junio de 2018]; 17(6): 271-278. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
 21. Aherne S. O'Brien N. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. [Revista en internet] 2002; [acceso 10 de julio de 2018]; 18(1): 75-81. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900701006955>
 22. Cartaya O., Reynaldo I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos. Cultivos Tropicales. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. [Revista en internet] 2001; [acceso 10 de julio de 2018]; 22(2): 5-14. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/1932/193215009001/>
 23. Drago M. Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. [Revista en internet] 2007; [acceso 11

- de julio de 2018]; 38(4): 42-47. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57938407>
24. Gómez H., González K., Domingo J. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. [Revista en internet] 2011; [acceso 11 de julio de 2018]; 10 (3): 182-217. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85618379003.pdf>
 25. Middleton E., Kandaswami C. Theoharides T. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. Pharmacological Reviews. [Revista en internet] 2000; [acceso 12 de julio de 2018]; 52(4): 673-751. Disponible en: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/52/4/673>
 26. Rivas C., Oranday M., Verde M. Investigación en plantas de importancia médica. Universidad Autónoma de Nuevo León. Ediciones OmniaScience, México; 2016.
 27. Márquez M., Vázquez G. Stop radicales libres: 150 recetas antioxidantes. 1ra edición. Madrid: Editorial EDAF, S.L.U; 2016.
 28. Cruz J., Valverde M. Efecto del extracto acuoso de *Tropaeolum tuberosum* "Mashua" sobre lipoperoxidación inducida con fluoxetina en hígado en *Rattus rattus* var. albinus ooferectomizadas. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. Cajamarca; 2016.
 29. Coronado M., y col. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Rev. Chil. Nutr. [Revista en Internet] 2015 junio; [acceso 14 de julio de 2018]; Vol. 42(2): 206-212. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
 30. Béjar E. Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (dc.) A. Gray "matico serrano" en un modelo de daño gástrico en ratas inducido por etanol 70%. Tesis para obtener Grado de Magister. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2016.
 31. Corfo – Chile, Antioxidantes: definición, clasificación y conceptos generales, [En línea]. Chile: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). 2009; [acceso 14 de julio de 2018]; Disponible en: <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes/>
 32. López A, Lazarova Z, Bañuelos R, Fernando C, Sánchez S. Antioxidants, a paradigm for diseases treatment. Revista Anacem. [Revista en Internet] 2012; [acceso 15 de julio de 2018]; 6 (1): 48-53. Disponible en: <https://issuu.com/revistaanacem/docs/15-18-pb>
 33. Martínez C, Rugerio C, Rivas S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM. [Revista en Internet] 2003; [acceso 15 de julio de 2018]; 46(6): 229-35. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2003/un036f.pdf>
 34. Mayor R. Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. Rev. Inst. Med. Trop. [Artículo en Internet] 2010; [acceso 18 de julio de 2018]; 5 (2): 23 -29. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>
 35. Venereo J. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. Rev. Cubana Med Milit [Revista en Internet] 2002; [acceso 20 de julio de 2018]; 31 (2): 126-33. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf
 36. Velásquez M, Prieto B, Contreras R. El envejecimiento y los radicales libres. Revista Ciencias de la UNAM. [Revista en internet]. Julio-setiembre 2004; [acceso 05 de agosto de 2018]; Vol. 75(1): 36-43. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/644/64407506.pdf>

37. Molina E. El papel de los antioxidantes como desaceleradores del envejecimiento. ReNut. [Artículo en Internet]. 2012; [acceso 22 de julio de 2018]; 6 (3): 1109-1119. Disponible en: [http://www.iidenut.org/pronj/kaslos/solidos/pdf_revista_tec/Renut%2021/Renut_21_\(2012\)_7_El_papel_de_los_antioxidantes_como_desaceleradores_de_l_envejecimiento.pdf](http://www.iidenut.org/pronj/kaslos/solidos/pdf_revista_tec/Renut%2021/Renut_21_(2012)_7_El_papel_de_los_antioxidantes_como_desaceleradores_de_l_envejecimiento.pdf)
38. Jiménez R. Antioxidantes: radicales libres y sistemas de defensa antioxidante, [En línea]. España: Fundación Alimentum. [acceso 08 de agosto de 2018]; Disponible en: http://infoalimenta.com/expertosopinan/28/78/Antioxidantes-radicales-libres-y-sistemas-de-defensaantioxidante/detail_templateSample/
39. Tovar J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. Tesis para optar título de Químico Industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia; 2013.
40. Valenzuela P. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *ugni molinae turcz.* Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutica. Universidad de Chile. Chile; 2015.
41. Agudo L. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos [Revista online] 2010, [acceso 15 de junio de 2018] SSN: 1989-9041, Autodidacta ©. disponible en: http://www.academia.edu/13924487/T%C3%A9cnicas_para_la_determinaci%C3%B3n_de_compuestos_antioxidante_en_alimentos._Laura_Agudo_Medina_ISSN_1989-9041_Autodidacta.
42. Organización Mundial de la Salud. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales. Ginebra; 2003.
43. Voigt R, Bornschein M. Tratado de tecnología farmacéutica. 3ra. Ed. Zaragoza: Acribia; 1982.
44. Miranda M. y Cuellar A. Manual de prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Edit. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Habana-Cuba; 2000.
45. Pérez F., León G., Rodríguez F. y Vásquez L. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del Norte del Perú. [revista en internet] 2011; [acceso 10 de junio de 2018]; 22(2): pp. 421-426. Disponible en: <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/435/400>
46. Sousa C., Rocha H., Magela G., Cruz M., Da costa L., Sérvulo D. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova [revista en internet] 2007; [acceso 10 de junio de 2018]; 30(2): pp. 351-355. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/20.pdf>
47. Peixoto T., Tabosa C., Eudes J., Marcelino J., Paulino U., Cavalcanti E. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel [revista en internet] 2008; [acceso 10 de junio de 2018]; Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 44, n. 4, out./dez. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v44n4/v44n4a15.pdf>
48. Hernández R., Fernández C., Baptista P. Metodología de la investigación. 5ta edición. México: Editorial McGraw-Hill; 1991.
49. Avello M., Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Med Chile. [Revista en internet] 2010; [acceso 10 de agosto de 2018]; 138: 1288-1293. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v138n10/art%2014.pdf>
50. Prieto S., Garrido G., González J., Molina J. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba. [Revista en



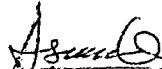
internet] enero-abril, 2004; [acceso 12 de agosto de 2018]; vol. 35, núm. 1
pp.19-36. Disponible en:

<https://www.redalyc.org/pdf/1812/181226086004.pdf>

51. Flores I. Evaluación de la actividad antioxidante y caracterización fitoquímica del extracto de hojas de matilisguate (*Tabebuia rosea*). Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutica. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala; 2017.
52. Acuña D., Cusi B. Estudio fitoquímico cualitativo, actividad anticonvulsivante del extracto acuoso de las partes aéreas de *berberis boliviana lechler* (ch'eqche), en un modelo experimental inducido químicamente por pentilentetrazol en animales de experimentación. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco; 2013.
53. Caroch M., Ferreira I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association. [Revista en internet] 2013; [acceso 15 de setiembre de 2018]; 51, pp.15-25. Disponible en: <http://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
54. Díaz L., Brul 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. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo; 2018.
55. Shalaby E., Shanab S. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. [Revista en internet] 2013; [acceso 20 de setiembre de 2018]; vol. 7 (10): pp. 528-539. Disponible en: http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380812855_Shaly%20and%20Shanab.pdf

IX. ANEXOS

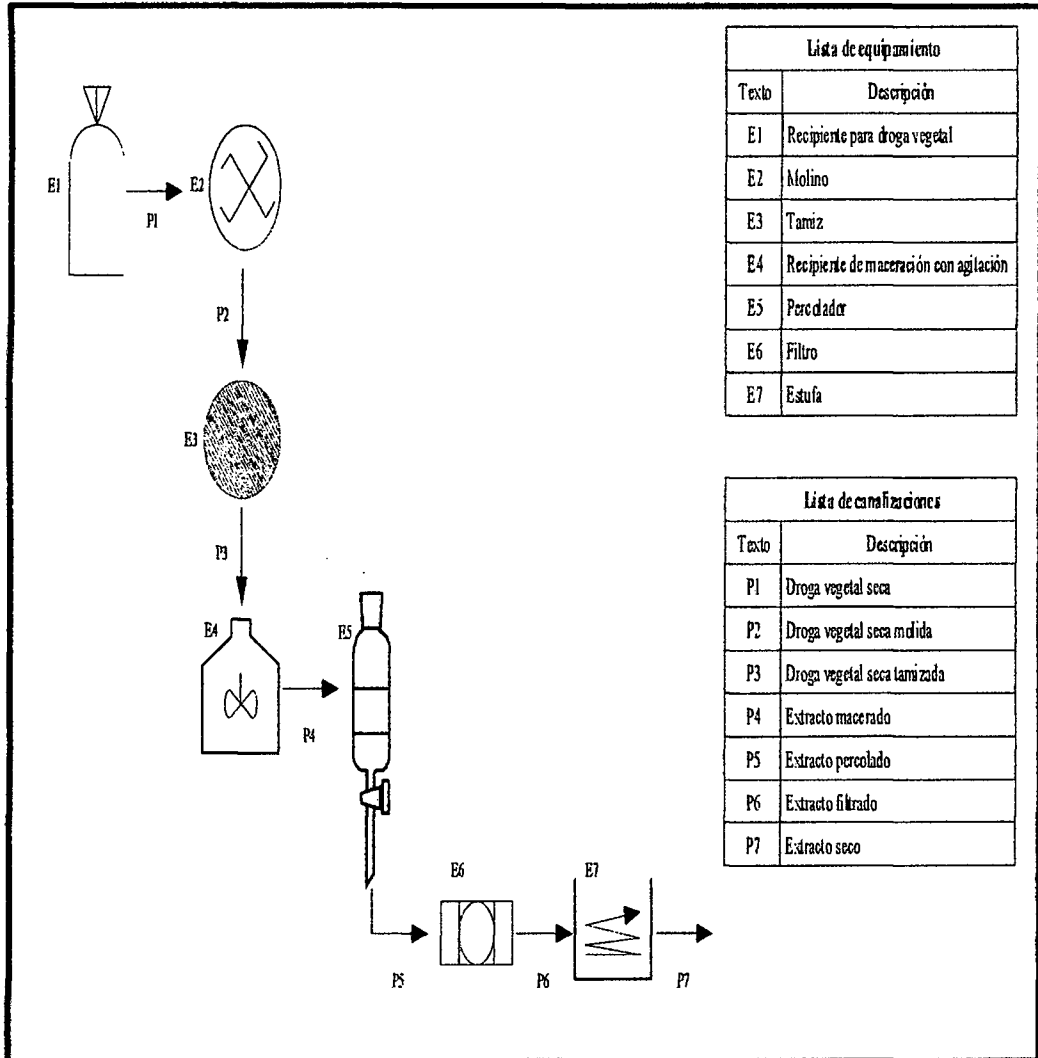
Anexo 1. Constancia de identificación botánica de *Berberis flexuosa* R. & P.
"tankar". Ayacucho 2018.

	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS <small>Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA</small> VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO MUSEO DE HISTORIA NATURAL	
"Año del Buen Servicio al Ciudadano"		
 CONSTANCIA N° 183-USM-2017 		
<p>EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p><i>La muestra vegetal (rama estéril) recibida del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos "Marco Antonio Garrido Malo", de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; ha sido estudiada y clasificada como: Berberis flexuosa R. & P., y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).</i></p>		
<p>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA</p>		
<p>CLASE: MAGNOLIOPSIDA</p>		
<p>SUBCLASE: MAGNOLIIDAE</p>		
<p>ORDEN: RANUNCULALES</p>		
<p>FAMILIA: BERBERIDACEAE</p>		
<p>GENERO: <i>Berberis</i></p>		
<p>ESPECIE: <i>Berberis flexuosa</i> R. & P.</p>		
<p><i>Determinado por Blgo. Severo Baldeón Malpartida.</i></p>		
<p><i>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere pertinente.</i></p>		
<p>Lima, 11 de setiembre de 2015</p>		
<p> Mag. ASUNCIÓN A. CAÑO ECHEVARRÍA JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</p>		
<p>ACE/1818</p>		

Anexo 2. Recolección de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar".
Ayacucho 2018.



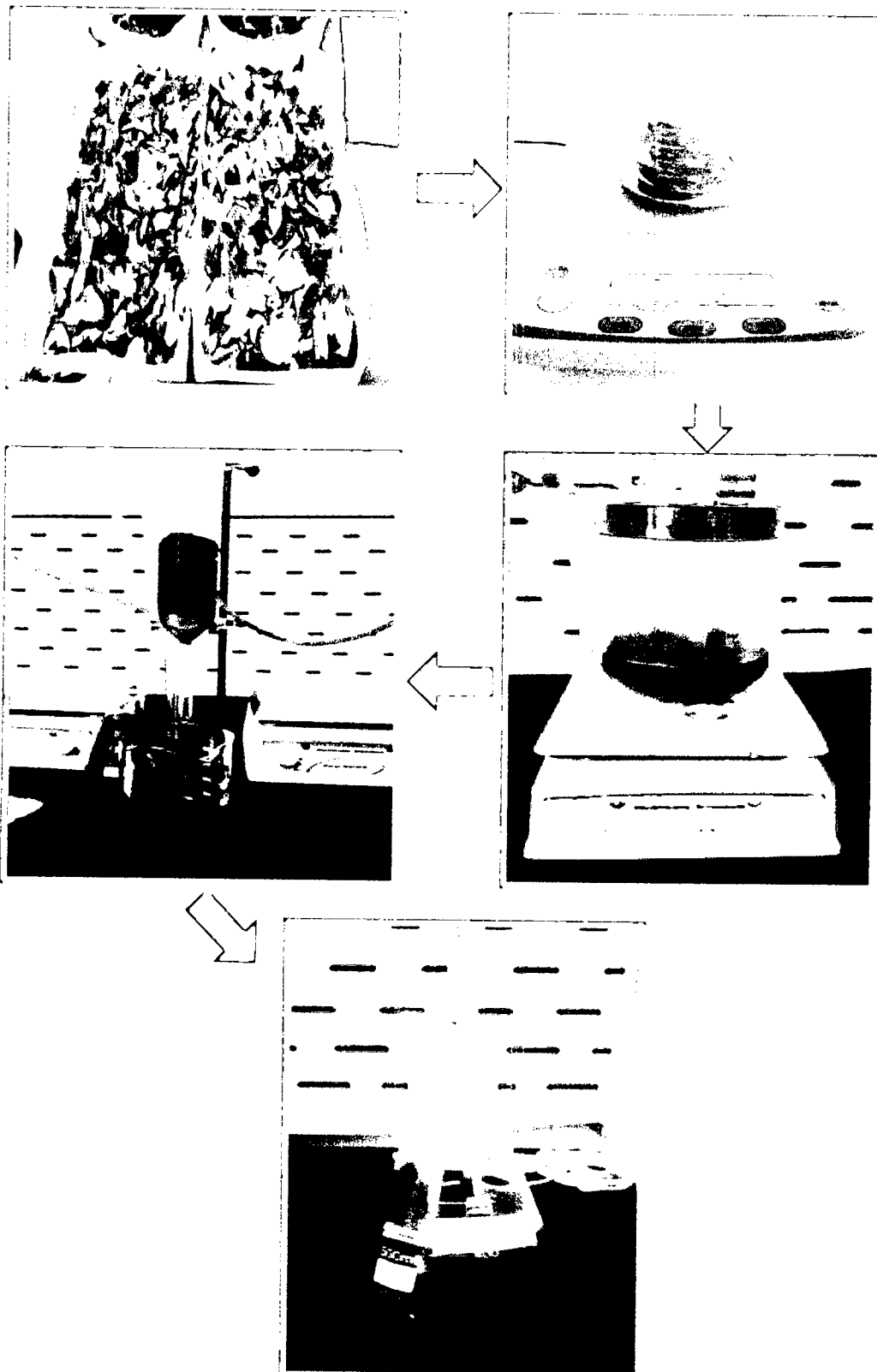
Anexo 3. Diagrama de flujo de obtención del extracto seco de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.



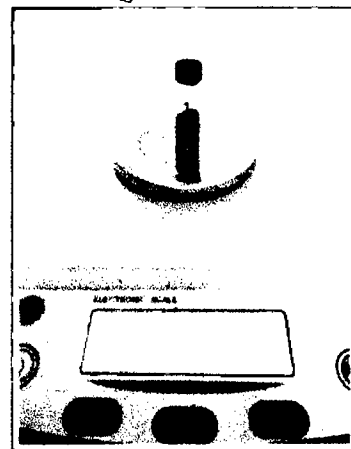
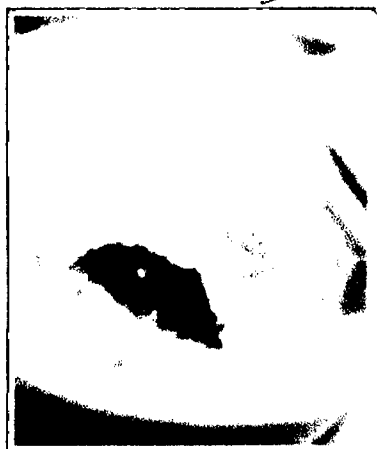
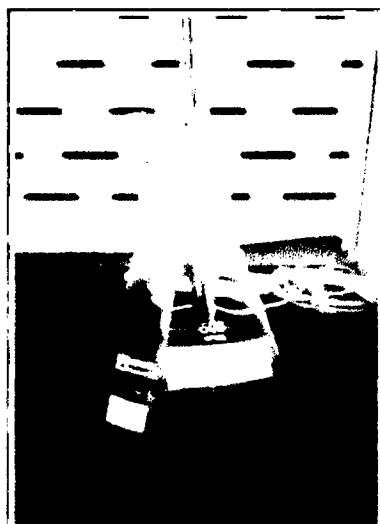
Lista de equipamiento	
Texto	Descripción
E1	Recipiente para droga vegetal
E2	Molino
E3	Tamiz
E4	Recipiente de maceración con agitación
E5	Percolador
E6	Filtro
E7	Estufa

Lista de canalizaciones	
Texto	Descripción
P1	Droga vegetal seca
P2	Droga vegetal seca molido
P3	Droga vegetal seca tamizada
P4	Extracto macerado
P5	Extracto percolado
P6	Extracto filtrado
P7	Extracto seco

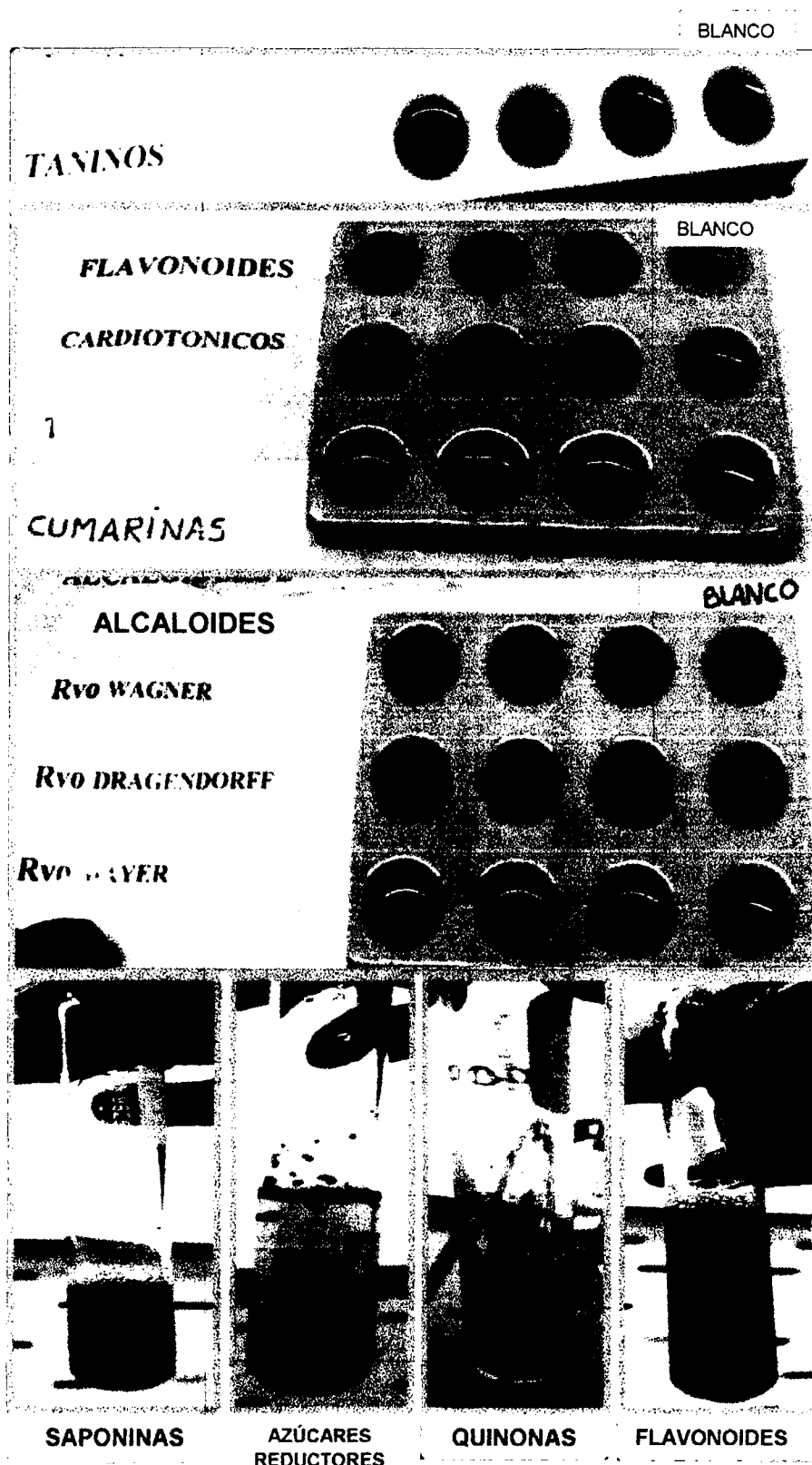
Anexo 4. Procedimiento para la obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.



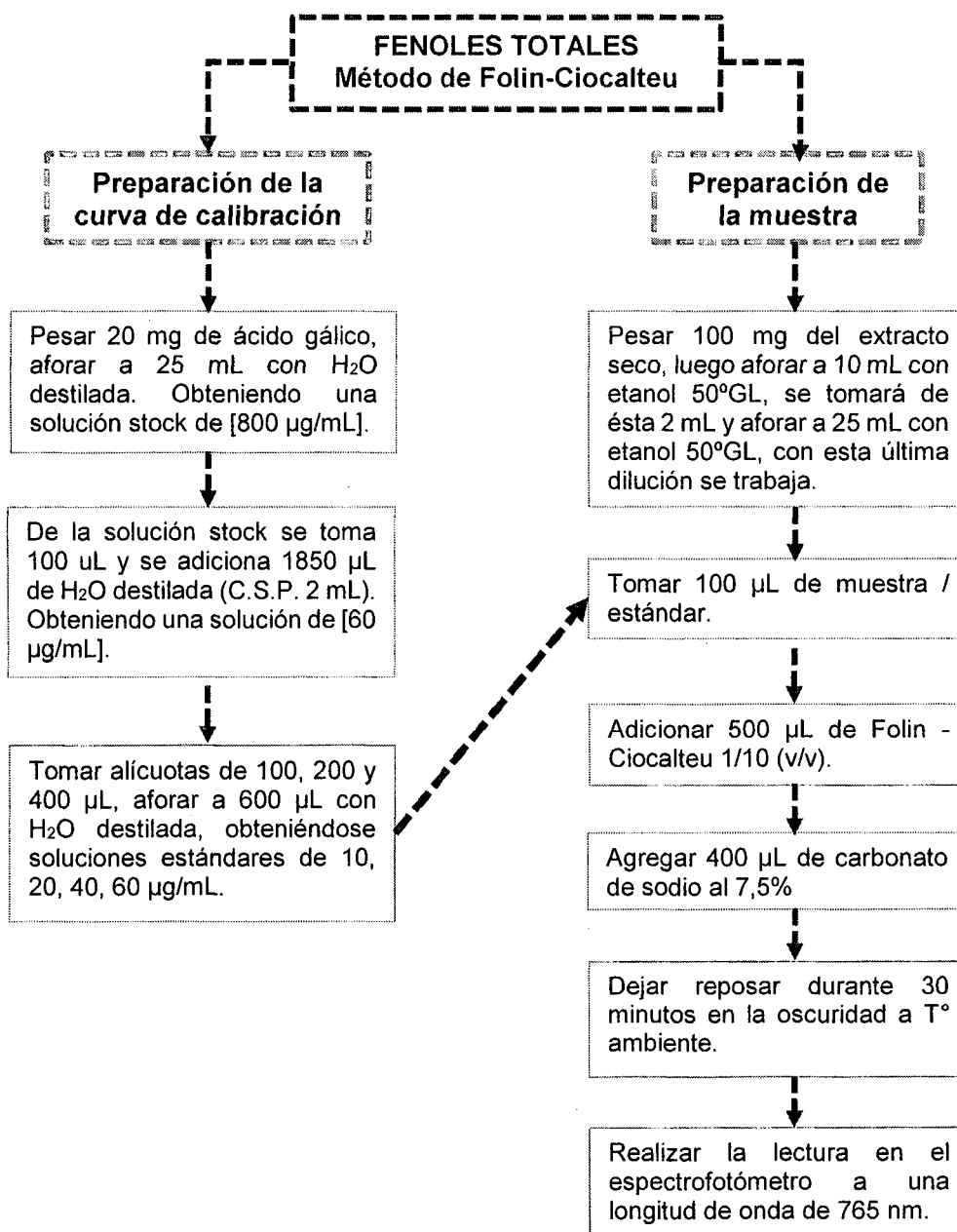
Anexo 5. Procedimiento para obtención del extracto seco de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.



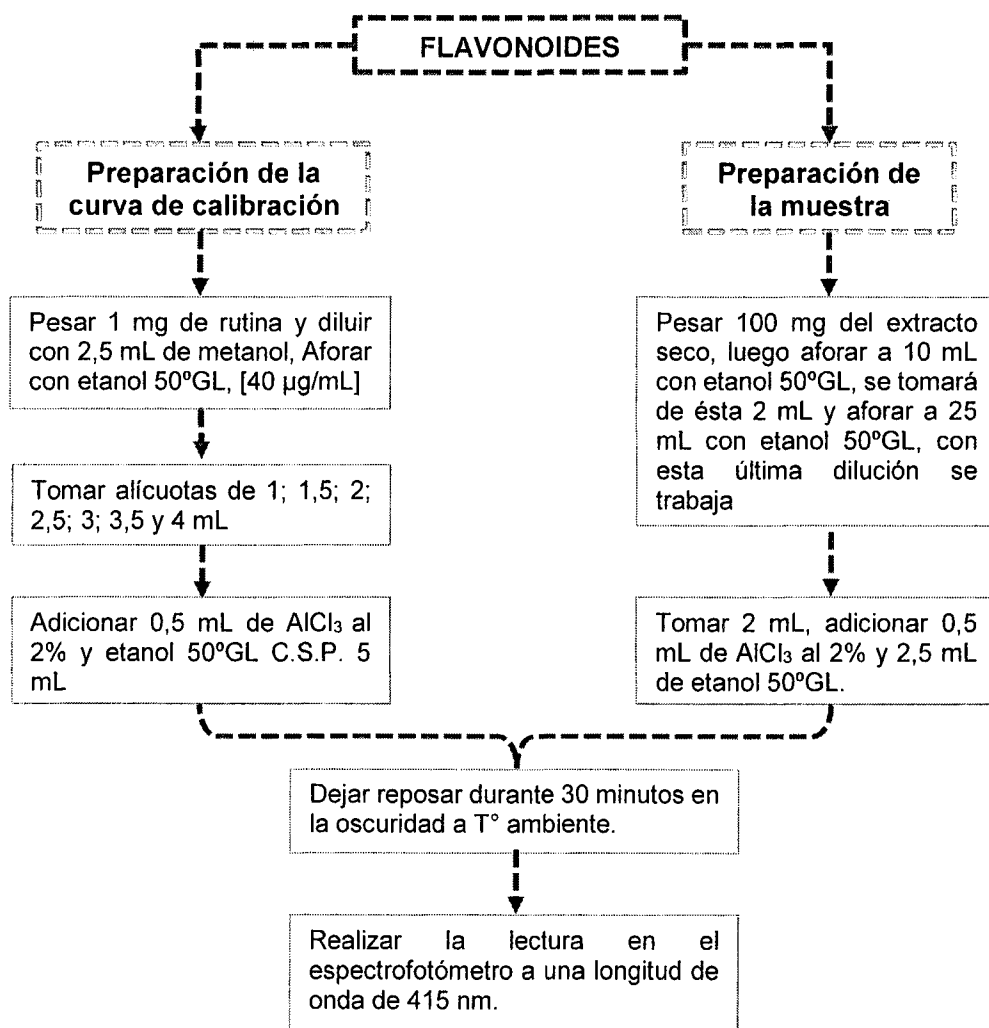
Anexo 6. Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.



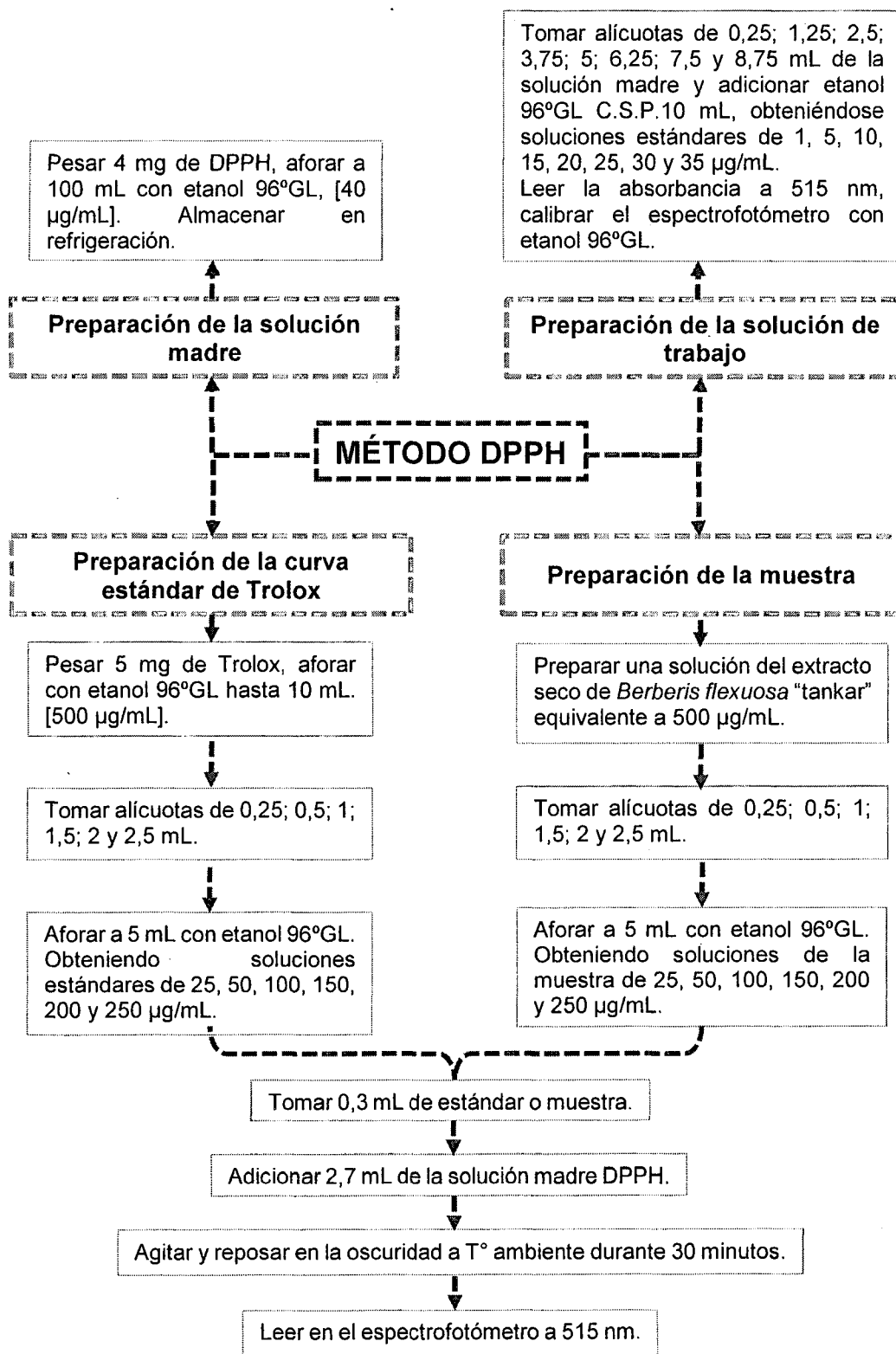
Anexo 7. Protocolo para la determinación del contenido de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.



Anexo 8. Protocolo para la determinación del contenido de flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.



Anexo 9. Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.



Anexo 15. Promedio de fenoles, desviación estándar, coeficiente de variación, límite superior y límite inferior del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Muestra	X	S	%CV	+/-	LI	LS
M1	164,5	1,735	1,05	4,31	160,22	168,84
M2	166,7	3,953	2,37	9,82	156,91	176,55
M3	160,2	3,652	2,28	9,07	151,17	169,31
X	163,8	0,982	0,60	2,44	161,39	166,27

Anexo 16. Promedio de flavonoides, desviación estándar, coeficiente de variación, límite superior y límite inferior del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Muestra	X	S	%CV	+/-	LI	LS
M1	21,6	0,301	1,39	0,75	20,89	22,39
M2	21,3	0,079	0,37	0,20	21,15	21,54
M3	21,7	0,545	2,51	1,35	20,32	23,02
X	21,6	0,2	0,88	0,47	21,08	22,02

Anexo 17. Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	17830,0	5,0	3566,0	5675,4	8,4 x 10 ⁻²⁰
Dentro de grupos	7,5	12,0	0,6		
Total	17837,5	17			

Si: Sig. > 0,05; todos los tratamientos son estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0,05; por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto.

Anexo 18. Comparaciones múltiples de Duncan de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA					
		1	2	3	4	5	6
<i>B. flexuosa</i> 25 µg/mL	3	4,8					
<i>B. flexuosa</i> 50 µg/mL	3		8,2				
<i>B. flexuosa</i> 100 µg/mL	3			16,8			
Trolox 25 µg/mL	3				23,0		
Trolox 50 µg/mL	3					51,5	
Trolox 100 µg/mL	3						94,9
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 19. Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1623,5	5,0	324,7	917,8	4,6 x 10 ⁻¹⁵
Dentro de grupos	4,2	12,0	0,4		
Total	1627,7	17			

Si: Sig. > 0,05; todos los tratamientos son estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0,05; por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto.

Anexo 20. Comparaciones múltiples de Duncan de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA				
		1	2	3	4	5
<i>B. flexuosa</i> 25 µg/mL	3	6,1				
<i>B. flexuosa</i> 50 µg/mL	3		8,1			
<i>B. flexuosa</i> 100 µg/mL	3			11,9		
Trolox 25 µg/mL	3			12,1		
Trolox 50 µg/mL	3				21,0	
Trolox 100 µg/mL	3					34,0
Sig.		1,00	1,00	0,61	1,00	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 21. Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la reducción del ion férrico Fe⁺³ a ferroso Fe⁺² (FRAP) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	8857,3	5,0	1771,5	1707,6	1,1 x 10 ⁻¹⁶
Dentro de grupos	12,4	12,0	1,0		
Total	8869,7	17			

Si: Sig. > 0,05; todos los tratamientos son estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0,05; por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto.

Anexo 22. Comparaciones múltiples de Duncan de la actividad antioxidante mediante la reducción del ion férrico Fe⁺³ a ferroso Fe⁺² (FRAP) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA					
		1	2	3	4	5	6
<i>B. flexuosa</i> 25 µg/mL	3	10,2					
<i>B. flexuosa</i> 50 µg/mL	3		15,0				
<i>B. flexuosa</i> 100 µg/mL	3			26,4			
Trolox 25 µg/mL	3				44,0		
Trolox 50 µg/mL	3					56,5	
Trolox 100 µg/mL	3						71,8
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 23. Prueba t de Student de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

DPPH	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	8,98	0,0401	-176,72	4	6,15011E-09	-252,7233333	1,43	-256,69	-248,75
No se asumen varianzas iguales			-176,72	2,160	0,0000	-252,7233333	1,43	-258,46	-246,99

Anexo 24. Prueba t de Student de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

ABTS	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 25. Prueba t de Student de la actividad antioxidante mediante la reducción del ion férrico Fe⁺³ a ferroso Fe⁺² (FRAP) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

FRAP	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 26. Matriz de consistencia. Ayacucho 2018.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P., Ayacucho 2018.	¿Cuál será el contenido de fenoles totales y flavonoides de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar"? ¿Tendrá actividad antioxidante el <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar"?	<p>OBJETIVO GENERAL:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar". <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Identificar los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar". • Determinar la concentración de fenoles totales y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", utilizando como estándar el ácido gálico y rutina respectivamente. • Determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", por los métodos DPPH, ABTS y FRAP con equivalente Trolox. 	<p>Descripción botánica de la especie <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar"</p> <p>Arbusto espinoso. El tallo cilíndrico ramificado. Las hojas son ovoides alargadas, pequeñas, color verde pálido, provisto de espinas apicales. Las flores son bisexuales amarillas, pedunculadas, pentámeras, heteroclamideas y actinomorfas, agrupadas en racimos axilares. El cáliz, con cinco sépalos libres de color amarillo pálido. Androceo, cinco estambres libres. Gineceo unicapilar de ovario súpero. Los frutos son bayas.</p> <p>RADICALES LIBRES</p> <p>Un radical libre 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 hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", presenta actividad antioxidante y elevadas concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides.	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar". <p>INDICADORES:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Concentración de extractos: 250, 200, 150, 100, 50 y 25 µg/mL. <p>VARIABLE DEPENDIENTE:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Actividad antioxidante <i>in vitro</i> • Fenoles totales • Flavonoides <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje de capacidad secuestradora de radicales libres. • Concentración de fenoles totales (mg de ácido gálico/g de extracto seco). • Concentración de flavonoides (mg de rutina/g de extracto seco). 	<p>POBLACIÓN:</p> <p>Hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", que crecen en el centro poblado de Huaraca, anexo Anchac Wasi, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho.</p> <p>MUESTRA:</p> <p>Dos kilogramos de hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar", recolectadas durante el mes de abril, siguiendo las recomendaciones establecidas para estos casos.</p> <p>DISEÑO METODOLÓGICO:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se recolectará y se secará las hojas de <i>Berberis flexuosa</i> R. & P. "tankar" • La obtención del extracto hidroalcohólico se realizará mediante el proceso de extracción con etanol 50°GL por medio de percolación. • La identificación fitoquímica se realizará siguiendo el procedimiento descrito en Miranda y Cuellar. También siguiendo el procedimiento descrito en Pérez <i>et al</i>, • El contenido de fenoles totales y flavonoides se determinará por los métodos de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente. • La evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> se determinará por los métodos DPPH, ABTS y FRAP. <p>ANÁLISIS DE DATOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95% (p<0,05) y la prueba de Duncan.

Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

VASQUEZ GUILLEN, Jhonny Manuel¹ y ARONES JARA, Marco Rolando¹

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho-Perú.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", su ejecución se realizó en los ambientes del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) "Marco Antonio Garrido Malo", de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. El tipo de investigación es básico - descriptivo. El contenido de fenoles totales y flavonoides fueron determinados por los métodos de Folin-Ciocalteu y Cloruro de aluminio respectivamente; y la actividad antioxidante se determinó *in vitro* utilizando los métodos del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), método del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) y la potencia antioxidante reductora férrica (FRAP). El contenido de fenoles totales y flavonoides fueron: $163,8 \pm 0,98$ mg Eq AG/g de extracto seco y $21,6 \pm 0,20$ mg Eq Ru/g de extracto seco respectivamente. La concentración inhibitoria 50 (CI50) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" sobre el radical DPPH, ABTS y FRAP fueron: para el DPPH mostró un CI50: $291,16 \pm 1,40^*$ µg/mL, para ABTS mostró un CI50: $561,53 \pm 12,82^*$ µg/mL y para FRAP mostró un CI50: $309,73 \pm 15,30^*$ µg/mL. Concluyendo que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", presentó baja actividad antioxidante en comparación con los estándares utilizados.

Palabras clave: *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", actividad antioxidante, compuestos fenólicos, flavonoides.

SUMMARY

The present research work was carried out with the objective of evaluating the antioxidant activity and the content of phenolic compounds and flavonoids of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", its execution was carried out in the environments of the Center of Development, Analysis and Quality Control of Medicines and Phytomedicines (CEDACMEF) "Marco Antonio Garrido Malo", of the Professional School of Pharmacy and Biochemistry of the Faculty of Health Sciences of the National University of San Cristóbal de Huamanga. The type of research is basic - descriptive. The content of total phenols and flavonoids were determined by the methods of Folin-Ciocalteu and Aluminum Chloride respectively; and the antioxidant activity was determined *in vitro* using the free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) methods, the 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic acid radical (ABTS) and the iron-reducing antioxidant potency (FRAP). The content of total phenols and flavonoids were: 163.8 ± 0.98 mg Eq AG / g dry extract and 21.6 ± 0.20 mg Eq Ru / g dry extract respectively. The inhibitory concentration 50 (IC50) of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" on the DPPH radical, ABTS and FRAP were: for the DPPH showed an IC50: $291.16 \pm 1.40^*$ µg / mL, for ABTS showed an IC50: $561.53 \pm 12.82^*$ µg / mL and for FRAP it showed an IC50: $309.73 \pm 15.30^*$ µg / mL. Concluding that the hydroalcoholic extract of the leaves of *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", presented low antioxidant activity in comparison with the standards used.

Key words: *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", antioxidant activity, phenolic compounds, flavonoids.

I. Introducción

En el Perú, el empleo de productos naturales principalmente de origen vegetal se encuentra ampliamente difundido, debido a la existencia de una gran diversidad de flora en las distintas regiones del país.

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavonas, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas.¹

Las evidencias experimentales sugieren que los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno pueden estar relacionadas con un gran número de enfermedades.

Los radicales libres son moléculas inestables y muy reactivas que tienen electrones no apareados y que causan daños en el ADN, proteínas, lípidos, membranas celulares y estructurales. Para alcanzar la estabilidad modifican a las moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a muchas células y logra ser indefinida si los antioxidantes no intervienen.²

En los seres vivos existen sistemas de defensa antioxidante que tienen la propiedad de impedir la acción nociva de los radicales libres, habiéndose identificado compuestos con propiedades antioxidantes de naturaleza enzimática como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc., así como, sustancias no enzimáticas: ascorbato, ferritina, ceruloplasmina, polifenoles, antocianinas. Cuando la defensa antioxidante es insuficiente para proteger el organismo del efecto dañino de los radicales libres puede conducirlo al estrés oxidativo, condición que está estrechamente vinculado a una gran diversidad de patologías como la psoriasis, cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, cataratas, hipertensión arterial, artritis reumatoidea, formas de anemia.³

La actividad antioxidante ha despertado en los últimos años un gran interés científico, ya que diversos estudios han demostrado que los antioxidantes son moléculas que poseen la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación ocasionada por las moléculas inestables conocidas como los radicales libres.²

El género *Berberis* posee una fuente rica de compuestos fitoquímicos biológicamente potentes, por ejemplo, fenoles ácidos, ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides, taninos, entre otros, lo que le confiere muchas propiedades medicinales.

La especie *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" no se ha explorado completamente. Debido a esto el interés principal es continuar con las investigaciones de la especie, ya que posee diversas propiedades medicinales y la gran mayoría de éstas no han sido estudiadas, es por tal motivo que se propuso realizar el presente trabajo de investigación para evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar". Por estas consideraciones, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron los siguientes.

Objetivo general.

Evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Objetivos específicos.

- Identificar los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar".
- Determinar la concentración de fenoles totales y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", utilizando como estándar el ácido gálico y rutina respectivamente.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", por los métodos DPPH, ABTS y FRAP con equivalente Trolox.

II. Materiales y métodos

2.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los ambientes del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) "Marco Antonio Garrido Malo", de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de

Huamanga, durante los meses de abril a agosto de 2018, ubicado en la ciudad Universitaria Av. Independencia s/n Huamanga.

2.2. Definición de la población y muestra

2.2.1. Población: Hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", que crecen en el centro poblado de Huaraca, anexo Anchac Wasi, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho.

2.2.2. Muestra: Dos kilogramos de hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", que se recolectó en el centro poblado de Huaraca, anexo Anchac Wasi, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, ubicado a una altura de 3800 m.s.n.m.

a. Unidad de análisis: Veinte gramos de muestra seca obtenida de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar"

b. Sistema de muestreo: Libre por conveniencia.

2.3. Metodología y recolección de datos

2.3.1. Recolección de la muestra

La muestra de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" se recolectó en horas de la mañana y transportada en bolsas a los ambientes del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) "Marco Antonio Garrido Malo", de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Se secaron a temperatura ambiente, en un lugar con buena ventilación, cambiando el papel de soporte y removiendo el vegetal cada 24 horas para evitar su descomposición, por un período de cinco a ocho días según las directrices de la OMS.⁴²

Una parte de la planta recolectada fue llevada al Herbario San Marcos (USM) del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su identificación y su clasificación taxonómica.

2.3.2. Preparación de la muestra

Luego del secado de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", se procedió a reducir el tamaño de la muestra utilizando molino de cuchilla, hasta obtener un pulverizado uniforme. Luego se pesó 20 g de muestra seca pulverizada, el cuál fue vertido en un frasco ámbar de boca ancha con 200 mL de etanol 50°GL.

El método extractivo que se utilizó es la maceración con agitación, en este procedimiento se agitó intensamente el material

en maceración con un agitador mecánico, de esta forma no se mejora el resultado de extracción, pero se reduce el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de concentraciones, acortando el tiempo total de extracción.⁴³ Luego se dejó en reposo por 24 horas. Transcurrido el tiempo de humectación se transfirió la muestra a un percolador, se cubrió el orificio de salida con gasa y algodón. Posteriormente se percoló a razón de 20 gotas por minuto, se recibió el percolado en un recipiente limpio y se filtró. Se percoló por tres veces repitiendo el mismo procedimiento.⁴³ Luego el extracto obtenido fue concentrado a sequedad empleando una estufa a una temperatura de 40° C. El producto obtenido se envasó en un recipiente de color ámbar.

2.3.3. Identificación fitoquímica

La identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", fueron realizadas mediante reacciones de coloración y precipitación según el procedimiento descrito por Miranda y Cuéllar.⁴⁴ También se realizó la identificación fitoquímica empleando el método de análisis cualitativo de ensayo a la gota, el cual consistió en someter al extracto vegetal, según la polaridad, a reactivos específicos que generan compuestos coloreados o precipitados, según el tipo de metabolito secundario presente. Se realizó siguiendo el procedimiento descrito en Pérez, F. *et al.*,⁴⁵ "Estudio fitoquímica preliminar de plantas medicinales del norte del Perú".

2.3.4. Determinación de la concentración de fenoles totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología de Sousa *et al.*,⁴⁶ con algunas modificaciones.

a. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico

• Solución madre de ácido gálico

Se pesó 20 mg ácido gálico, se disuelve en H₂O destilada y se enrasa a un volumen de 25 mL para obtener una solución stock con una concentración de 800 µg/mL. Se tomó directamente de la solución stock 100 µL, se transfiere a una fiola y se adicionó 1850 µL de H₂O destilada (C.S.P. 2 mL) para obtener una solución con una concentración de 60 µg/mL. De esta solución madre se tomó alícuotas de 100, 200 y 400 µL, se agregó H₂O destilada C.S.P. 600 µL, obteniéndose soluciones estándares de 10, 20, 40, 60 µg/mL.

A partir de los estándares se toman alícuotas de

100 µL, se transfiere a una fiola, adicionar a continuación 500 µL del reactivo Folin - Ciocalteu, previa dilución 1/10 (v/v) con H₂O destilada y 400 µL de carbonato de sodio al 7,5%. Luego se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente y se realizó la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra.

b. Preparación de la muestra

Se pesó 100 mg del extracto seco, luego aforar a 10 mL con etanol 50° G.L, se tomará de ésta 2 mL y aforar a 25 mL con etanol 50° G.L, posteriormente se tomará de ésta 2 mL y aforar a 5 mL con etanol 50° G.L, con esta última dilución se trabaja.

Se tomó directamente de la última dilución 100 µL, se transfiere a una fiola, adicionar a continuación 500 µL de Folin - Ciocalteu 1/10 (v/v) y 400 µL de carbonato de sodio al 7,5%. Se dejó reaccionar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente y se realizó la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra. La cantidad de compuestos fenólicos en cada extracto se determina en miligramos de contenido fenólico equivalentes de ácido gálico/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración del ácido gálico.⁴⁶

2.3.5. Determinación de la concentración de flavonoides

Se utilizó el método de Cloruro de aluminio, siguiendo la metodología de Peixoto *et al.*⁴⁷, con algunas modificaciones.

a. Preparación de la curva de calibración de rutina

Se pesó 1 mg de rutina, llevar a un matraz volumétrico de 25 mL y diluir con 2,5 mL de metanol, luego aforar con etanol 50°GL para obtener una solución stock con una concentración de 40 µg/mL. De esta solución stock se tomó directamente alícuotas de 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 0,5 mL de cloruro de aluminio al 2 % y etanol 50°GL C.S.P. 5 mL respectivamente. El blanco se prepara de igual forma sin la muestra. Luego se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizó las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm.

b. Preparación de la muestra

Se pesó 100 mg del extracto seco, luego aforar a

10 mL con etanol 50°GL, se tomará de ésta 2 mL y aforar a 25 mL con etanol 50°GL, con esta última dilución se trabaja. Se tomó directamente de la última dilución 2 mL, se transfiere a una fiola, adicionar a continuación 0,5 mL de cloruro de aluminio al 2% y 2,5 mL de etanol 50°GL. Luego se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente y se realizó las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm. Utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

La cantidad de flavonoides en el extracto se determina en miligramos de contenido de flavonoides equivalentes de rutina/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración de rutina.

2.3.6. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

2.3.6.1. Método del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).

Se hizo la evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante siguiendo la metodología de Sousa *et al.*⁴⁶, con algunas modificaciones.

a. Preparación de la solución madre

Se pesó 4 mg de DPPH, se diluye con etanol 96°GL y se enrasó a un volumen de 100 mL para obtener una solución madre con una concentración de 40 µg/mL. Luego almacenar en el refrigerador y proteger de la luz.

b. Preparación de la solución de trabajo

De la solución madre se tomó alícuotas de 0,25; 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25; 7,5 y 8,75 mL, se agregó etanol 96°GL C.S.P. 10 mL, obteniéndose soluciones estándares de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 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 96°GL. Las medidas de absorbancia se realizaron por triplicado a los 30 minutos.

c. Preparación de la curva estándar de Trolox

Se pesó 5 mg de Trolox, se diluye con etanol 96°GL, y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución con una concentración de 500 µg/mL. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones estándares de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones estándares se toman alícuotas de 0,3 mL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 2,7 mL de la solución madre a una concentración de 40 µg/mL. Una mezcla de 2,7 mL de etanol 96°GL y 0,3 mL de la solución estándar, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego se agita y se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 515 nm.

d. Determinación de la actividad antioxidante de la muestra

Se preparó una solución del extracto seco de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" equivalente a concentración de 500 µg/mL De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL. C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones de las muestras de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones de las muestras se toman alícuotas de 0,3 mL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 2,7 mL de la solución madre a una concentración de 40 µg/mL. Una mezcla de 2,7 mL de etanol 96°GL y 0,3 mL de la solución de muestra, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego se agita y se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad a T° ambiente. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 515 nm.

e. Cálculo del porcentaje de actividad antioxidante

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 determinará el porcentaje de DPPH restante (%DPPH_{REM}), de acuerdo con la ecuación:

- 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 las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar"

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

- 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

- Los valores de absorbancia a todas las concentraciones ensayadas se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (%AA), que se determinó por la ecuación:⁴⁶

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

Dónde:

AA : actividad antioxidante (%)

Abs_{control} : absorbancia inicial de la solución metanólica de DPPH.

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

Abs_{blanco} : absorbancia de blanco

- 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}.

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

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

2.3.6.2. Método del radical ácido radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)

a. Preparación de la solución madre de ABTS

• Preparación del ABTS 7 mM

Se preparó una solución madre de ABTS 7 mM, para ello se pesó exactamente 19,202 mg de ABTS y se disolvió con 5 mL de H₂O destilada.

• Preparación de la solución de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) 2,45 mM

Se pesó 3,3 mg de persulfato de potasio y se disolvió con 5 mL de H₂O destilada.

• Preparación del radical ABTS^{•+}

En un frasco ámbar se colocó 5 mL de solución madre de ABTS 7 mM y 5 mL de la solución de persulfato de potasio 2,45 mM, luego se homogenizó y se cubrió con papel aluminio. La

solución se incubó de 12 a 16 horas a T° ambiente (± 25 °C) antes de su utilización. La solución tiene un período de uso de 2 días en refrigeración.

b. Preparación de la solución de trabajo diario

Se diluyó aproximadamente 1,5 mL del radical formado con 50 mL de etanol 96°GL, hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,2$) a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción)

c. Preparación de la curva estándar de Trolox

Se pesó 5 mg de Trolox, se diluye con etanol 96°GL y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución con una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones estándares de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$.

A partir de las soluciones estándares se toman alícuotas de 20 μL , se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 980 μL de la solución de trabajo ABTS. Dejar reposar durante 7 minutos. Una mezcla de 980 μL de etanol 96°GL y 20 μL de la solución estándar, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego incubar durante 6 minutos en la oscuridad a T° ambiente. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 734 nm.

d. Determinación de la actividad antioxidante de la muestra

Se preparó una solución del extracto seco de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" equivalente a concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones de las muestras de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$.

A partir de las soluciones de las muestras se toman alícuotas de 20 μL , se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 980 μL de la solución de trabajo ABTS. Dejar reposar durante 7 minutos. Una mezcla de 2,7 mL de etanol 96°GL y 0,3 mL de la solución de muestra, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego incubar durante 6 minutos en la oscuridad a T° ambiente. Finalmente se lee en el

espectrofotómetro a 734 nm.

Los resultados se expresan en mM Trolox/g muestra.²

e. Cálculo del porcentaje de actividad antioxidante

- Los valores de absorbancia a todas las concentraciones ensayadas se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (%AA), que se determinó por la ecuación:⁴⁶

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

Dónde:

AA : actividad antioxidante (%)

Abs_{control} : absorbancia inicial de la solución metanólica de ABTS.

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

Abs_{blanco} : absorbancia de blanco

- La concentración requerida para el 50% de inhibición del radical libre ABTS (CI₅₀) será calculada mediante la ecuación exponencial de la concentración del extracto ($\mu\text{g/mL}$) vs AA (%).

$$y = b \cdot x + a$$

$$CI_{50} = \frac{(50 - a)}{(b)}$$

2.3.6.3. Método FRAP (Potencia antioxidante reductora férrica)

a. Preparación de reactivos.⁴¹

- Buffer acetato de sodio 0,3 mM (pH 3.6)**

Se pesó 6,15 mg de acetato de sodio, luego se adicionó 2 mL de ácido acético glacial. Posteriormente aforar la solución a 250 mL con H₂O destilada y ajustar el pH si es necesario.

- Solución complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ 10 Mm)**

Se pesó 78 mg del reactivo complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), luego se aforó a 25 mL con ácido clorhídrico (HCl 40 mM)

- Solución de hexahidrato de cloruro férrico (FeCl₃ - 6H₂O 20 mM)**

Se pesó 135,2 mg de cloruro férrico (FeCl₃), luego se aforó a 25 mL con H₂O destilada.

- Ácido clorhídrico (HCl) 40 mM.**

Diluir 535 μL de ácido clorhídrico HCl (37%) en 100 ml de H₂O destilada.

b. Preparación de la solución de trabajo diario

Esta solución de trabajo deberá de prepararse a

diario. Mezclar 2,5 mL de solución complejo férrico 2, 4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) con 2,5 ml de la solución hexahidrato de cloruro férrico (FeCl₃ · 6H₂O 20 mM) y 25 ml de buffer acetato. Esta preparación debe mantenerse durante todo el proceso en el baño a 37 °C.

c. Preparación de la curva estándar de Trolox

Se pesó 5 mg de Trolox, se diluye con etanol 96°GL y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución con una concentración de 500 µg/mL. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones estándares de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones estándares se toman alícuotas de 20 µL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 980 µL de la solución de trabajo FRAP. Una mezcla de 980 µL de etanol 96°GL y 20 µL de la solución estándar, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego incubar en la oscuridad a T° ambiente durante 30 minutos. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 593 nm.

d. Determinación de la actividad antioxidante de la muestra

Se preparó una solución del extracto seco de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" equivalente a concentración de 500 µg/mL. De esta solución se tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL, se transfiere a una fiola respectivamente y se agregó etanol 96°GL C.S.P. 5 mL a cada fiola, obteniéndose soluciones de las muestras de 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

A partir de las soluciones de las muestras se toman alícuotas de 20 µL, se transfiere a una fiola respectivamente, adicionar a continuación 980 µL de la solución de trabajo FRAP. Una mezcla de 2,7 mL de etanol 96°GL y 0,3 mL de la solución de muestra, se utilizó como blanco, se debe preparar para cada concentración. Luego incubar en la oscuridad a T° ambiente durante 30 minutos. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 593 nm.

e. Cálculo del porcentaje de actividad antioxidante

- Los valores de absorbancia a todas las concentraciones ensayadas se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (%AA), que se determinó por la ecuación:⁴⁶

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

Dónde:

AA : actividad antioxidante (%).

Abs_{control} : absorbancia inicial de la solución metanólica de FRAP.

Abs_{muestra} : absorbancia de la reacción del FRAP con la muestra

Abs_{blanco} : absorbancia de blanco.

- La concentración requerida para el 50% de inhibición del poder reductor del FRAP (CI₅₀) será calculada mediante la ecuación exponencial de la concentración del extracto (µg/mL) vs AA (%)

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

$$CI_{50} = \frac{\left(\ln \frac{(50 - y_0)}{A} \right)}{(R)}$$

2.4. Tipo y diseño de investigación

2.4.1. Tipo de investigación

Descriptivo.⁴⁸

2.4.2. Diseño de investigación

El diseño que se empleó, es un diseño con posprueba únicamente y grupo de control.⁴⁸ Simbólicamente y de forma abreviada corresponde a:

RG1	X	O₁
RG2	-	O₂

R: Asignación al azar o aleatoria

G: Grupo de muestra (G1, grupo 1; G2, grupo 2; etc.)

X: Tratamiento, estímulo o condición experimental.

O: Medición experimental.

- : Ausencia de estímulo. Indica grupo control o testigo.

2.5. Análisis de datos

Los datos que se obtuvieron fueron procesados en una base de datos con el paquete estadístico SPSS versión 23. Se determinaron en forma de medias y desviación estándar, y se representaron mediante gráficos en forma de histogramas y barras de error. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas en los diferentes ensayos a un nivel de significancia de 95% (p<0.05) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

III. Resultados

Tabla 3. Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde oscuro
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración naranja intensa
	Dragendorff	+++	Precipitado naranja rojizo
Alcaloides	Wagner	+++	Precipitado marrón
	Mayer	++	Precipitado blanco crema
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado rojo
Azúcares reductores	Fehling	++	Precipitado rojo
Saponinas	Espuma	++	Persistencia de espuma
Quinonas	Borntrager	++	Coloración roja en la fase alcalina

LEYENDA:

- (+) : Leve
- (++) : Moderada
- (+++): Intenso

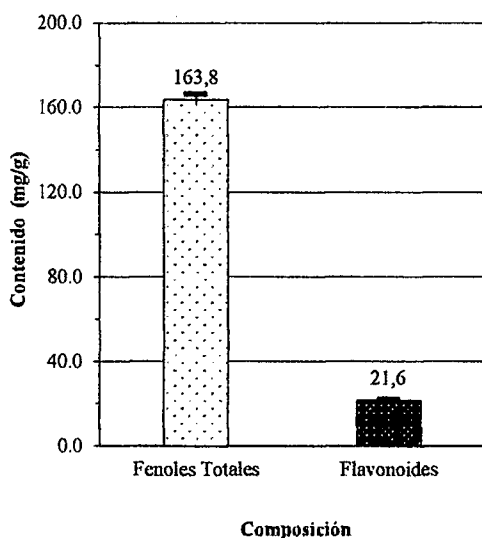


Figura 7. Contenido de fenoles totales y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", Ayacucho 2018.

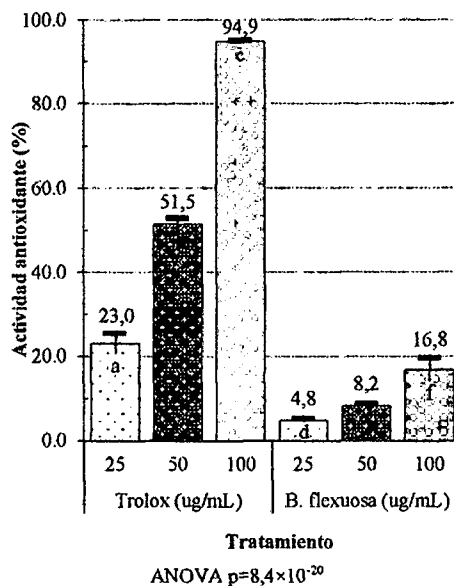


Figura 8. Porcentaje de la actividad antioxidante *in vitro* por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", en comparación con el estándar Trolox, Ayacucho 2018.

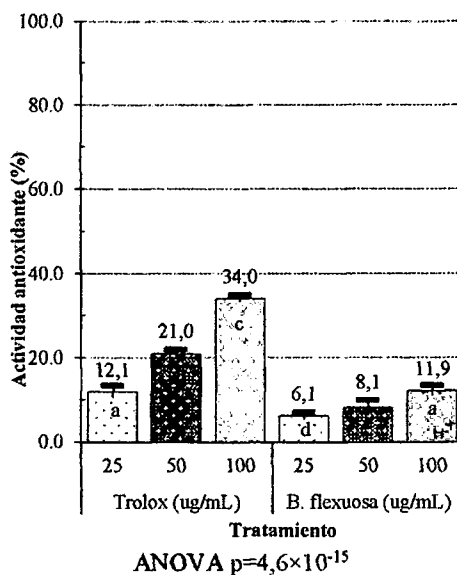


Figura 9. Porcentaje de la actividad antioxidante *in vitro* por el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", en comparación con el estándar Trolox, Ayacucho 2018.

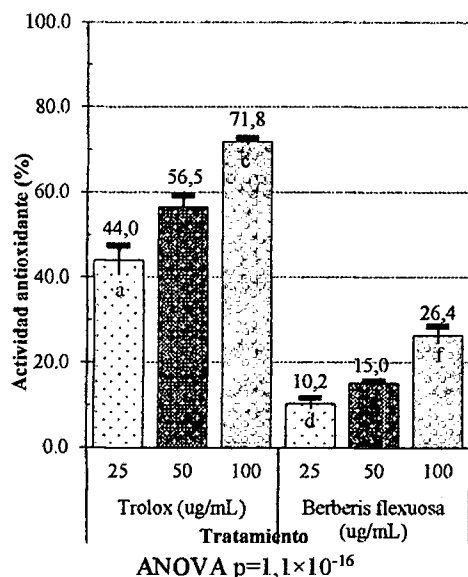


Figura 10. Porcentaje de la actividad antioxidante *in vitro* por el método FRAP del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. “tankar”, en comparación con el estándar Trolox, Ayacucho 2018.

Tabla 4. Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. “tankar”, Ayacucho 2018.

Tratamiento	CI ₅₀		
	DPPH	ABTS ^o	FRAP
<i>Berberis flexuosa</i>	291,16 ± 1,40*	561,53 ± 12,82*	309,73 ± 15,30*
Trolox	38,44 ± 0,28*	156,74 ± 1,21*	35,81 ± 0,30*

IV. Discusión

Las plantas, gracias a su maravilloso y complejo metabolismo, constituyen un verdadero arsenal químico, del cual sólo se conoce con éxito un tercio, considerando la variedad de especies existentes a nivel mundial y aquellas inexploradas hasta hoy, sin considerar aquellas especies ya extintas.⁴⁹

Una gran variedad de plantas en todo el planeta y sus extractos respectivos contienen diferentes compuestos químicos con actividad biológica, que pueden producir efectos terapéuticos variados; por lo que hoy día la evidencia

científica está llamada a validar el uso popular, por un lado.⁵⁰

En el Perú, el empleo de productos naturales principalmente de origen vegetal se encuentra ampliamente difundido, debido a la existencia de una gran diversidad de flora en las distintas regiones del país.

La actividad antioxidante ha despertado en los últimos años un gran interés científico, ya que diversos estudios han demostrado que los antioxidantes son moléculas que poseen la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación ocasionada por las moléculas inestables conocidas como los radicales libres.²

La especie *Berberis flexuosa* R. & P. “tankar” no se ha explorado completamente. Debido a esto el interés principal es continuar con las investigaciones de la especie, ya que posee diversas propiedades medicinales y la gran mayoría de éstas no han sido estudiadas, es por tal motivo que se propuso realizar el presente trabajo de investigación para evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. “tankar”, con el propósito de poder darle una aplicabilidad y contribuir con la sociedad.

Las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. “tankar”, fueron recolectadas en el centro poblado de Huaraca, anexo Anchac Wasi, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, ubicado a una altura de 3800 m.s.n.m.

La identificación y clasificación taxonómica se realizó en el Herbario San Marcos (USM) del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Para obtener el extracto hidroalcohólico se realizó mediante el proceso de extracción con etanol 50°GL por medio de percolación. Se utilizó como disolvente de extracción etanol 50°GL, después de realizada la prueba del mejor solvente, debido a que la diferencia en la concentración del solvente delimita el tipo de metabolito secundario a extraer, dependiendo de la polaridad del mismo, ya que a una concentración de etanol 96°GL se extraerán metabolitos con menor polaridad que los extraídos con etanol 50°GL.⁵¹

La identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. “tankar” se realizó mediante reacciones de coloración y precipitación según el procedimiento descrito por Miranda y

Cuellar.⁴⁴ También se realizó la identificación fitoquímica empleando el método de análisis cualitativo de ensayo a la gota, el cual consistió en someter al extracto vegetal, según la polaridad, a reactivos específicos que generan compuestos coloreados o precipitados, según el tipo de metabolito secundario presente, se realizó siguiendo el procedimiento descrito en Pérez, F. *et al*,⁴⁵ "Estudio fitoquímica preliminar de plantas medicinales del norte del Perú".

En la tabla 3, se presentan los metabolitos secundarios identificados del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa* R. & P. "tankar" siendo estos fenoles y/o taninos, flavonoides, alcaloides, lactonas y/o cumarinas, azúcares reductores, saponinas y quinonas.

Quispe L.¹¹ reportó la presencia de catequinas, azúcares reductores, antocianinas, fenoles, flavonoides, lactonas, cumarinas, triterpenos, alcaloides, gomas y mucilagos del fruto de *berberis weberbaueri* C. Schneider "airampu". Acuña y Cusi.⁵² reportaron la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, cumarinas, quinonas, lactonas, glicósidos, aminoácidos, saponinas, flavonoides y resinas del extracto acuoso de las partes aéreas de *berberis boliviana lechler* (ch'eqche).

La cantidad de metabolitos secundarios que existan en una planta pueden ser afectados por diversos factores, que pueden ser tanto extrínsecos como intrínsecos. Los factores extrínsecos son el clima y la temperatura, la humedad, o las condiciones del suelo; y los factores intrínsecos son de tipo genético (mutaciones, otras alteraciones), interacción con las enzimas para sufrir transformaciones, o variaciones diurnas, ontogénicas o estacionales. Por otro lado, Carocho M. y Ferreira I.⁵³ manifiestan que los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, esteroides, catequinas, antocianinas y proantocianinas, los cuales debido a sus propiedades pueden actuar como antioxidantes y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas.

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de ocho mil compuestos distintos. Como antioxidantes, los polifenoles

pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres.¹⁰

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.⁵⁴

Los fenoles como: taninos condensados, flavonoides, ácidos fenólicos como el clorogénico, cumárico y elágico; 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).⁵⁴

En la figura 7, se observan los resultados de la cuantificación del contenido de fenoles totales presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", la cual fue de $163,8 \pm 0,98$ mg Eq AG/g de extracto seco. Se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, con algunas modificaciones. Se realizó la curva de calibración del ácido gálico, con un coeficiente de correlación de 0,9998 (anexo 12); la cual permitió determinar el contenido de fenoles totales.

Quispe, L.¹¹ reportó el contenido total de fenoles del fruto de *berberis weberbaueri* C. Schneider "airampu", la cual fue 5869,968 mg Eq de ácido clorogénico/100 g de muestra. Llegando a una conclusión que existe una eleva concentración de compuestos fenólicos en el fruto de airampu frente a los otros frutos que tradicionalmente son considerados por su alto contenido en compuestos fenólicos.

En nuestro estudio, podemos observar bajo contenido de fenoles totales, esto debido a que están influenciados o sufren alguna variación por la técnica de extracción, uso de solvente, tiempo de sonicación, cantidad de reactivo, muestra utilizado, tiempo de incubación, estrés abiótico y otros.

En la figura 7, se observan los resultados de la cuantificación del contenido de flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa* R. & P. "tankar", la cual fue de $21,6 \pm 0,20$ mg Eq Ru/g de extracto seco. Se determinó por el método de Cloruro de

aluminio, con algunas modificaciones. Se realizó la curva de calibración de rutina, con un coeficiente de correlación de 0,9986 (anexo 13); la cual permitió determinar el contenido de flavonoides totales.

En nuestro estudio, podemos observar bajo contenido de flavonoides totales, esto debido a que están influenciados o sufren alguna variación por la técnica de extracción, uso de solvente, tiempo de sonicación, cantidad de reactivo, muestra utilizado, tiempo de incubación, estrés abiótico y otros.

En la figura 8, se observan los porcentajes de la actividad antioxidante *in vitro* por el método del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa R. & P.* "tankar", en comparación con el estándar Trolox. Se realizó la curva de calibración con Trolox para el ensayo DPPH, con un coeficiente de correlación de 0,9996 (anexo 14); a partir de las cuales fue posible expresar la actividad antioxidante de la especie *berberis flexuosa R. & P.* "tankar", son expresados en porcentaje, la cual se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL obteniendo los siguientes resultados: 4,8%; 8,2% y 16,8% de actividad antioxidante respectivamente. Asimismo, con el estándar Trolox se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL obteniendo los siguientes resultados: 23,0%; 51,5% y 94,9% de actividad antioxidante respectivamente. Estadísticamente por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto. ($p=8,4 \times 10^{-20}$).

No existe referencia alguna de porcentaje de actividad antioxidante de *berberis flexuosa R. & P.* "tankar" con el ensayo DPPH, pero se reporta estudios de otras especies del género *Berberis* de diferentes partes del mundo.

Quispe, L.¹¹ reportó el contenido de actividad antioxidante del fruto de *berberis weberbaueri C. Schneider* "airampu", la cual fue 20801,094 µg. Equivalente trolox/g. tejido. Para la determinación de la actividad antioxidante utilizó el método DPPH y realizó la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 515 nm. Llegando a una conclusión que el fruto del airampu posee un alto contenido de actividad antioxidante (20801,094 µg. Equivalente trolox/g. tejido), comparado con los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante de la guinda, mora, higo, uva negra, ciruela y granada.

Shalaby y col.⁵⁵ menciona que el DPPH es un

método simple, rápido y económico para estudiar los perfiles de capacidad antioxidante de extractos de plantas, alimentos, etc. Se puede usar para muestras sólidas o líquidas y no es específico de ningún componente antioxidante en particular.

En la figura 9, se observan los porcentajes de la actividad antioxidante *in vitro* por el método del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa R. & P.* "tankar", en comparación con el estándar Trolox. Se realizó la curva de calibración con Trolox para el ensayo ABTS, con un coeficiente de correlación de 0,9996 (anexo 14); a partir de las cuales fue posible expresar la actividad antioxidante de la especie *berberis flexuosa R. & P.* "tankar", son expresados en porcentaje, la cual se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL obteniendo los siguientes resultados: 6,1%; 8,1% y 11,9% de actividad antioxidante respectivamente. Asimismo, con el estándar Trolox se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL obteniendo los siguientes resultados: 12,1%; 21,0% y 34,0% de actividad antioxidante respectivamente. Estadísticamente por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto. ($p=4,6 \times 10^{-15}$).

No existe referencia alguna de porcentaje de actividad antioxidante de *berberis flexuosa R. & P.* "tankar" con el ensayo ABTS, pero se reporta estudios de otras especies del género *Berberis* de diferentes partes del mundo.

Shalaby y col.⁵⁵ menciona que el ABTS ha sido utilizado para examinar la capacidad relativa de captación de radicales de flavonoides y fenoles. El ABTS es soluble en disolventes acuosos y orgánicos y es una mejor opción que DPPH y más sensible que DPPH. Desventaja el precio del reactivo ABTS es alto.

En la figura 10, se observan los porcentajes de la actividad antioxidante *in vitro* por el método de la capacidad reductora del hierro (FRAP) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis flexuosa R. & P.* "tankar", en comparación con el estándar Trolox. Se realizó la curva de calibración con Trolox para el ensayo FRAP, con un coeficiente de correlación de 0,9996 (anexo 14); a partir de las cuales fue posible expresar la actividad antioxidante de la especie *berberis flexuosa R. & P.* "tankar", son expresados en porcentaje, la cual se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL

obteniendo los siguientes resultados: 10,2%; 15,0% y 26,4% de actividad antioxidante respectivamente. Asimismo, con el estándar Trolox se trabajó a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL obteniendo los siguientes resultados: 44,0%; 56,5% y 71,8% de actividad antioxidante respectivamente. Estadísticamente por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto. ($p=1,1 \times 10^{-16}$).

No existe referencia alguna de porcentaje de actividad antioxidante de *berberis flexuosa R. & P.* "tankar" con el ensayo FRAP, pero se reporta estudios de otras especies del género *Berberis* de diferentes partes del mundo.

Shalaby y col.⁵⁵ menciona que el ensayo FRAP es simple, rápido, económico y no requiere equipo especializado. Desventaja el reactivo FRAP no puede detectar especies que actúen mediante transferencia de H, antioxidantes del grupo sulfhidrilo que contiene tioles como el glutatión y las proteínas.

En la tabla 4, se observa la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" sobre el radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) y la potencia antioxidante reductora férrica (FRAP). Obteniendo los siguientes resultados: para el DPPH mostró un CI₅₀: 291,16 ± 1,40* µg/mL, para ABTS mostró un CI₅₀: 561,53 ± 12,82* µg/mL y para FRAP mostró un CI₅₀: 309,73 ± 15,30* µg/mL. Donde a menor concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) mayor capacidad antioxidante. Concluyendo que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" presentó baja actividad antioxidante en comparación con los estándares utilizados.

V. Conclusiones

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar", presentó baja actividad antioxidante, fenoles totales y flavonoides.
2. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" fueron: fenoles y/o taninos, flavonoides, alcaloides, lactonas y/o cumarinas, azúcares reductores, saponinas y quinonas.
3. El contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar" fueron: 163,8 ± 0,98 mg Eq AG/g de extracto seco y 21,6 ± 0,20 mg Eq Ru/g de extracto seco respectivamente.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis flexuosa R. & P.* "tankar", presentó baja actividad antioxidante frente al radical DPPH, ABTS y FRAP con una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 291,16 ± 1,40* µg/mL; 561,53 ± 12,82* µg/mL y 309,73 ± 15,30* µg/mL respectivamente.

VI. Referencias bibliográficas

1. Marwah R., Fatope M., Mahrooqi R., Varma G., Abadi H., Khamis S., Burtamani-Al. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. Food Chemistry. [revista en Internet] 2007 junio; [acceso 14 de junio de 2018]; Vol. 101(2):465-470. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606001099>
2. Carvajal M. Evaluación de la actividad antioxidante de las hojas y frutos de la feijoa "*Acca sellowiana*". Tesis para obtener el título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador; 2015.
3. Guija E., Inocente M., Ponce J. y Zarzosa E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. Horizonte Médico. Revista oficial de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres [revista en internet] 2015; [acceso 15 de junio de 2018]; Vol 15(1): 57-60 disponible en: <http://www.horizontemedicina.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/148/159>
4. Meza K. Química y actividad biológica de *Berberis rotundifolia*. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile; 2018.
5. Silva C. Cuantificación de los alcaloides de *Berberis hallii* "Carrasquilla" Sector la Josefina San Isidro del Cantón Guano Provincia de Chimborazo. Tesis para obtener el título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador; 2010.
6. García R., Aguilar L., Soto M., Nieto R., Kite G. Compuestos fenólicos totales,

- flavonoides y actividad antioxidante en las flores de *Crataegus spp.* de México. *Revista Agrociencia* [revista en internet] 2012; [acceso 10 de junio de 2018]; vol 46. n° 7. Pp 65. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n7/v46n7a2.pdf>
7. Stankovic M., Niciforovic N., Mihailovic V., Topuzovic M., Solujic S. Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* [revista en internet] 2012; [acceso 10 de junio de 2018]; Vol. 81 (2) pp 117-122. Disponible en: <https://pbsociety.org.pl/journals/index.php/asbp/article/view/asbp.2012.010/589>
 8. Palomino L., García C., Gil J., Rojano B., Durango D. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.* [revista en internet] 2009; [acceso 11 de junio de 2018]; 16(3): 388-395. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042009000300013&script=sci_abstract&tlng=es
 9. Doroteo V., Díaz C., Terry. C., Rojas. R. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* de 6 plantas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú.* [revista en internet] 2013; [acceso 12 de junio de 2018]; 79 (1): 13-20. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000100003
 10. Valdez R. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en *Oenothera rosea* Ait “yawar suqu”, *Baccharis salicifolia* R&P “chilca” y *Piper elongatum* Vahl “matico”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho; 2014.
 11. Quispe L. Actividad antioxidante, fenoles totales y antocianinas en el fruto y néctar de airampu (*Berberis weberbaueri* C. Scheneider) Tesis para obtener el título profesional de Ingeniera en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho; 2007.
 12. Arena M., Cabana J. *Berberis* usos y conservación, Santa Cruz-Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2005.
 13. Quispe H. Extracción de colorantes de la raíz de la *Berberis lutea* “Tankar Quichka”. Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho; 1985.
 14. Araya M. Estudio Químico de *Berberis Coletioides* Lechl. Tesis para obtener el título de Ingeniero de Ejecución en Química, Mención Industria y Medio Ambiente. Universidad de Magallanes, Punta Arenas. [Revista en internet] 2016; [acceso 20 de junio de 2018]; disponible en: http://www.umag.cl/biblioteca/tesis/araya_r_ojas_2006.pdf
 15. Nuñez L. Estudio Fitoquímico del extracto alcaloidal de la especie nativa *Berberis tabiensis* (LAC) BERBERIDACEAE. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá; 2010.
 16. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. OFFARM. Ámbito Farmacéutico nutrición. [Revista en internet] 2004; [acceso 22 de junio de 2018]; Vol. 23 Núm. 6 pp. 9-155. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>.
 17. Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales 2da edición. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
 18. Tarnawski M., Depta K., Grejciun D., Szelepin, B. HPLC Determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* [Revista en internet] 2006; [acceso 22 de junio de 2018]; vol. 41(1): Pág. 182-188. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708505007144?via%3Dihub>
 19. Kuklinski C. Farmacognosia. Primera reimpresión. Barcelona: ediciones Omega S.A.; 2003.

20. Martínez S., González J., Culebras M., Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. [Artículo en internet] 2002; [acceso 23 de junio de 2018]; 17(6): 271-278. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
21. Aherne S. O'Brien N. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutrition. [Revista en internet] 2002; [acceso 10 de julio de 2018]; 18(1): 75-81. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900701006955>
22. Cartaya O., Reynaldo I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos. Cultivos Tropicales. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. [Revista en internet] 2001; [acceso 10 de julio de 2018]; 22(2): 5-14. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/1932/193215009001/>
23. Drago M. Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. [Revista en internet] 2007; [acceso 11 de julio de 2018]; 38(4): 42-47. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57938407>
24. Gómez H., González K., Domingo J. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. [Revista en internet] 2011; [acceso 11 de julio de 2018]; 10 (3): 182-217. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85618379003.pdf>
25. Middleton E., Kandaswami C. Theoharides T. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. Pharmacological Reviews. [Revista en internet] 2000; [acceso 12 de julio de 2018]; 52(4): 673-751. Disponible en: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/52/4/673>
26. Rivas C., Oranday M., Verde M. Investigación en plantas de importancia médica. Universidad Autónoma de Nuevo León. Ediciones OmniaScience, México; 2016.
27. Márquez M., Vázquez G. Stop radicales libres: 150 recetas antioxidantes. 1ra edición. Madrid: Editorial EDAF, S.L.U; 2016.
28. Cruz J., Valverde M. Efecto del extracto acuoso de *Tropaeolum tuberosum* "Mashua" sobre lipoperoxidación inducida con fluoxetina en hígado en *Rattus rattus* var. albinus ooferectomizadas. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. Cajamarca; 2016.
29. Coronado M., y col. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Rev. Chil. Nutr. [Revista en Internet] 2015 junio; [acceso 14 de julio de 2018]; Vol. 42(2): 206-212. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
30. Béjar E. Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (dc.) A. Gray "matico serrano" en un modelo de daño gástrico en ratas inducido por etanol 70%. Tesis para obtener Grado de Magister. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2016.
31. Corfo – Chile, Antioxidantes: definición, clasificación y conceptos generales, [En línea]. Chile: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). 2009; [acceso 14 de julio de 2018]; Disponible en: <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes/>
32. López A, Lazarova Z, Bañuelos R, Fernando C, Sánchez S. Antioxidants, a paradigm for diseases treatment. Revista Anacem. [Revista en Internet] 2012; [acceso 15 de julio de 2018]; 6 (1): 48-53. Disponible en: <https://issuu.com/revistaanacem/docs/15-18-pb>
33. Martínez C, Rugerio C, Rivas S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM. [Revista en Internet] 2003; [acceso 15 de julio de 2018]; 46(6): 229-35. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2003/un036f.pdf>
34. Mayor R. Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. Rev. Inst. Med. Trop. [Artículo en Internet] 2010; [acceso 18 de julio de 2018]; 5 (2): 23 -29. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>

35. Venereo J. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. Rev. Cubana Med Milit [Revista en Internet] 2002; [acceso 20 de julio de 2018]; 31 (2): 126-33. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf
36. Velásquez M, Prieto B, Contreras R. El envejecimiento y los radicales libres. Revista Ciencias de la UNAM. [Revista en internet]. Julio-setiembre 2004; [acceso 05 de agosto de 2018]; Vol. 75(1): 36-43. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/644/64407506.pdf>
37. Molina E. El papel de los antioxidantes como desaceleradores del envejecimiento. ReNut. [Artículo en Internet]. 2012; [acceso 22 de julio de 2018]; 6 (3): 1109-1119. Disponible en: [http://www.iidenut.org/pronj/kaslos/solidos/pdf_revista_tec/Renut%2021/Renut_21_\(2012\)_7_El_papel_de_los_antioxidantes_como_desaceleradores_del_envejecimiento.pdf](http://www.iidenut.org/pronj/kaslos/solidos/pdf_revista_tec/Renut%2021/Renut_21_(2012)_7_El_papel_de_los_antioxidantes_como_desaceleradores_del_envejecimiento.pdf)
38. Jiménez R. Antioxidantes: radicales libres y sistemas de defensa antioxidante, [En línea]. España: Fundación Alimentum. [acceso 08 de agosto de 2018]; Disponible en: http://infoalimenta.com/expertosopinan/28/78/Antioxidantes-radicales-libres-y-sistemas-de-defensaantioxidante/detail_templateSample/
39. Tovar J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. Tesis para optar título de Químico Industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia; 2013.
40. Valenzuela P. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *ugni molinae turcz*. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutica. Universidad de Chile. Chile; 2015.
41. Agudo L. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos [Revista online] 2010, [acceso 15 de junio de 2018] SSN: 1989-9041, Autodidacta ©. disponible en: http://www.academia.edu/13924487/T%C3%A9cnicas_para_la_determinaci%C3%B3n_de_compuestos_antioxidante_en_alimento_s_Laura_Agudo_Medina_ISSN_1989-9041_Autodidacta.
42. Organización Mundial de la Salud. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales. Ginebra; 2003.
43. Voigt R, Bornschein M. Tratado de tecnología farmacéutica. 3ra. Ed. Zaragoza: Acribia; 1982.
44. Miranda M. y Cuellar A. Manual de prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Edit. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Habana-Cuba; 2000.
45. Pérez F., León G., Rodríguez F. y Vásquez L. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del Norte del Perú. [revista en internet] 2011; [acceso 10 de junio de 2018]; 22(2): pp. 421-426. Disponible en: <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinent/article/view/435/400>
46. Sousa C., Rocha H., Magela G., Cruz M., Da costa L., Sérvulo D. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova [revista en internet] 2007; [acceso 10 de junio de 2018]; 30(2): pp. 351-355. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/20.pdf>
47. Peixoto T., Tabosa C., Eudes J., Marcelino J., Paulino U., Cavalcanti E. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel [revista en internet] 2008; [acceso 10 de junio de 2018]; Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 44, n. 4, out./dez. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v44n4/v44n4a15.pdf>
48. Hernández R., Fernández C., Baptista P. Metodología de la investigación. 5ta edición. México: Editorial McGraw-Hill; 1991.
49. Avello M., Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Med Chile. [Revista en internet] 2010; [acceso 10 de agosto de 2018]; 138: 1288-1293. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v138n10/art%2014.pdf>
50. Prieto S., Garrido G., González J., Molina J. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. Revista CENIC. Ciencias

- Biológicas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba. [Revista en internet] enero-abril, 2004; [acceso 12 de agosto de 2018]; vol. 35, núm. 1 pp.19-36. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181226086004.pdf>
51. Flores I. Evaluación de la actividad antioxidante y caracterización fitoquímica del extracto de hojas de matiliguete (*Tabebuia rosea*). Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutica. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala; 2017.
52. Acuña D., Cusi B. Estudio fitoquímico cualitativo, actividad anticonvulsivante del extracto acuoso de las partes aéreas de *berberis boliviana lechler* (ch'eqche), en un modelo experimental inducido químicamente por pentilentetrazol en animales de experimentación. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco; 2013.
53. Carocho M., Ferreira I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association. [Revista en internet] 2013; [acceso 15 de setiembre de 2018]; 51, pp.15-25. Disponible en: <http://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
54. 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. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo; 2018.
55. Shalaby E., Shanab S. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. [Revista en internet] 2013; [acceso 20 de setiembre de 2018]; vol. 7 (10): pp. 528-539. Disponible en: http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380812855_Shalaby%20and%20Shanab.pdf