

QAUNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

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

PRESENTADO POR LA:

Bach. TORRES DURAND VANESSA ROXANA

AYACUCHO – PERÚ

2018

A mis padres, esposo e hijo fuente de apoyo emocional constante.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de excelentes profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, en especial al “Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos”.

Al Mg. Q.F. Marco Rolando Arones Jara por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en la dirección de esta tesis.

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

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. familia melastomataceae	8
2.2.1. Genero <i>Brachyotum</i>	8
2.3. Estrés oxidativo	9
2.4. Radicales Libres	9
2.5. Compuestos fenólicos	10
a. Antioxidantes endógenos	14
b. Antioxidantes exógenos	14
2.7. Medición de la actividad antioxidante	14
2.7.1. Método DPPH	15
2.7.2. Método ABTS	16
2.7.3. Método FRAP	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	19
3.2.1. Población	19
3.2.2. Muestra	19
3.2.3. Unidad de análisis	19
3.3.2. Obtención del extracto hidroalcohólico	20
3.3.3. Identificación de compuestos químicos del extracto hidroalcohólico	20
3.3.4. Determinación del contenido de fenoles totales	20
3.3.5. Cuantificación de flavonoides totales	21
3.3.6. Determinación de la actividad antioxidante	22
3.3.6.1. Método de radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	22

3.3.6.2 Método del Radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)	23
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
IX. ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Clasificación taxonómica <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”	8
Tabla 2 Clasificación de los modelos de ensayo <i>in vitro</i> según su modo de reacción ET.	15
Tabla 3 Clasificación de los modelos de ensayo <i>in vitro</i> según su modo de reacción HAT	16
Tabla 4 Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	29
Tabla 5 Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Clasificación de los compuestos fenólicos. 11
Figura 2	Estructura básica del fenol 12
Figura 3	Núcleo básico de los flavonoides. 13
Figura 4	Estructura química de los flavonoides 13
Figura 5	Mecanismo de reacción del DPPH con sustancias antioxidantes (AH) 15
Figura 6	Mecanismo de reacción para el ensayo ABTS 16
Figura 7	Reacción involucrada en el ensayo FRAP 17
Figura 8	Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018. 30
Figura 9	Porcentaje de actividad antioxidante mediante el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018. 31
Figura 10	Porcentaje de actividad antioxidante mediante el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018 32
Figura 11	Porcentaje de actividad antioxidante mediante el método FRAP del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018. 33

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1 Certificado de identificación de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2017.	53
Anexo 2 Fotografía de las hojas y flores de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	54
Anexo 3 Flujograma de procedimientos a seguir para la determinación de la actividad antioxidante de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	55
Anexo 4 Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	56
Anexo 5 Resultados de la identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	57
Anexo 6 Metodología para cuantificación de fenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu del extracto hidroalcohólico de las hojas de de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	58
Anexo 7 Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho, 2018.	59
Anexo 8 Protocolo para la determinación del contenido de flavonoides totales en del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	60
Anexo 9 Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	61
Anexo 10 Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH del extracto	62

	hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	
Anexo 11	Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante, según el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	63
Anexo 12	Actividad antioxidante, según el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	64
Anexo 13	Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH	65
Anexo 14	Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	66
Anexo 15	Prueba de Levene de igualdad de varianzas del CI50, mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	67
Anexo 16	Comparación múltiple de DUNCAN de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	68
Anexo 17	Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS, del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	69
Anexo 18	Actividad antioxidante por el método ABTS, del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	70
Anexo 19	Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS.	71
Anexo 20	Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto	72

	hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	
Anexo 21	Prueba de Levene de igualdad de varianzas del CI50, mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	73
Anexo 22	Comparación múltiple de DUNCAN de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	74
Anexo 23	Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018	75
Anexo 24	Actividad antioxidante por el método la captación del ión férrico (Fe^{+3}) FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018	76
Anexo 25	Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del ión férrico (Fe^{+3}) FRAP.	77
Anexo 26	Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del ión férrico (Fe^{+3}) FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	78
Anexo 27	Prueba de Levene de igualdad de varianzas del CI50, mediante la captación del ión férrico (Fe^{+3}) FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	79
Anexo 28	Comparación múltiple de DUNCAN de la actividad antioxidante mediante la captación del ión férrico (Fe^{+3}) FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de de <i>Brachyotum naudinii</i> triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.	80
Anexo 29	Matriz de consistencia	81

RESUMEN

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones (agente reductor). El objetivo fue determinar el Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”. Ejecutado en los laboratorios del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los meses de enero – julio del 2018. El tipo de estudio es básico descriptivo. Las muestras fueron recolectadas al azar, durante el mes de enero de la comunidad de Huaraca, anexo de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó los métodos espectrofotométricos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), ABTS (2,2- Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico) y FRAP (poder antioxidante como reducción férrica), así mismo para la cuantificación de fenoles y flavonoides se utilizó el método de folin - ciocateau y cloruro de aluminio respectivamente. El método usado para la identificación fitoquímica fue el ensayo a la gota, donde se pudo evidenciar la presencia de taninos hidrolizables, flavonoides, saponinas, catequinas, cumarinas, quinonas y azúcares reductores. El contenido de fenoles y flavonoides totales fue de 396,8 mg EAG/g de extracto seco y 30,5 mg ERu/g de extracto seco respectivamente. La concentración media inhibitoria (CI_{50}) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha” sobre el radical DPPH, ABTS y FRAP fueron de 42,9; 136,2 y 38,2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Conclusiones: el extracto hidroalcohólico posee alta capacidad antioxidante cercana al estándar Trolox.

Palabras clave: *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, extracto hidroalcoholico, actividad antioxidante, fenoles totales, flavonoides totales,

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en vía de desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80 % de la población mundial utiliza diariamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades en la salud, y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos.¹

La familia melastomataceae es la séptima más diversa del reino vegetal, ha sido aplicada en la medicina tradicional para el tratamiento de afecciones respiratorias, dolencias del tracto genitourinario, infecciones y heridas en la piel, utilizándose las partes aéreas y raíces; estructuras donde se han encontrado flavonoides, triterpenos, taninos, antocianinas, flavan-3-oles, saponinas, glicósidos y compuestos fenólicos, asociados a actividades biológicas como antihemorrágica, antioxidante, analgésica, alelopática, colorante, leishmanicida, ictiotóxica, antiinflamatoria y antibacterial. La falta de conocimiento y reportes en la literatura de sus propiedades etnobotánicas y fitoquímicas contribuye a que sea considerado solo como ornamental.²

Lo anterior, evidencia la potencialidad del extracto de las hojas de la familia melastomataceae como un antioxidante, es decir una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, permitiendo que las células no sufran oxidación o que se mantengan en un equilibrio para los procesos de óxido-reducción que ocurren en forma natural dentro del organismo. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de las funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento.³

Estos hallazgos sugieren la utilidad del extracto de las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana como antioxidante natural en lugar de los antioxidantes sintéticos para la conservación de alimentos de origen graso y aceites, con la ventaja de que

al ser un producto natural no tendría efectos tóxicos que se observan con los compuestos sintéticos.³

Además, los antioxidantes naturales son apreciados porque pueden ser usados en el diseño de alimentos benéficos para la salud (funcionales o nutraceuticos), la importancia de los antioxidantes es crucial para la salud, debido a su capacidad de neutralizar radicales libres, que contienen uno o más electrones desapareados, siendo responsables de muchas enfermedades degenerativas, cataratas, arterioesclerosis, muerte celular y cáncer, asimismo por su capacidad de eliminar y atrapar potencialmente a los electrones dañados del ADN, metales tóxicos, hasta la inhibición de enzimas activadoras de precarcinógenos, hasta carcinógenos. El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico.³

Debido a que el rechazo es cada vez mayor por parte de los consumidores hacia el uso de antioxidantes sintéticos; como por ejemplo el BHA y el BHT y, además, dadas las restricciones legales levantadas hacia estos productos, se ha potenciado el empleo de antioxidantes naturales, libres de compuestos químicos sintéticos, como los ácidos fenólicos, los flavonoides y tocoferoles.³

Con el fin de contribuir al conocimiento de las propiedades de este género, se seleccionó a la especie *Brachyotum naudinii* Triana y así aumentar el conocimiento de sus propiedades, iniciándose con la determinación de la actividad antioxidante, como evaluación preliminar para detectar la presencia de sustancias bioactivas de la planta.

Los ensayos de actividad antioxidante constituyen una aproximación importante en la búsqueda de compuestos vegetales con potencial terapéutico, lo cual promueve estudios farmacológicos que pueden llevar a comprender ciertos mecanismos que aún no están elucidados.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

- Determinar el Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar la composición fitoquímica de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”
- Cuantificar el contenido de fenoles totales en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”.

- Cuantificar el contenido de flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”.
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En el trabajo de investigación Aguirre et al.², determinó la actividad ictiotóxica de extractos de dos especies colombianas del género *Meriania* Swartz (melastomataceae). En este estudio se realizó el análisis cualitativo preliminar de las especies *M. quintuplinervis* y *M. speciosa* pertenecientes a la familia melastomateceae, donde se pudo evidenciar que las dos especies presentan similitudes en los metabolitos secundarios de tipo terpenoide y esteroide con la prueba de *Salkowski* y *Lieberman-Bouchard*, en los extractos con hexano y metanol; hay presencia de fenoles con cloruro férrico y la prueba de *Folin-Ciocalteu* en los extractos metanólico, butanólico y acuoso para ambas especies; presencia de flavonoides con Shinoda en los extractos metanólico y butanólico de *M. quintuplinervis*; taninos condensados en los extractos butanólico y acuoso en el caso de *M. speciosa*; mientras que para *M. quintuplinervis* solo en el extracto acuoso; taninos hidrolizables en los extractos butanólico y acuoso en ambas especies.

El trabajo de investigación realizado por Ocampo et al.⁴, se estudiaron las hojas de las especies *Meriania speciosa* y *Meriania nobilis*, obteniendo extractos de diferente polaridad, a los que se les realizaron diversas pruebas cualitativas. Se determinó el contenido de fenoles totales y se evaluó la actividad captadora de radicales con DPPH (FRS₅₀: capacidad captadora de radicales que reduce en un 50% al radical DPPH) en microplacas de 96 pozos. Este estudio determinó que las dos especies presentan una buena actividad antioxidante. Los extractos que mayor actividad antioxidante mostraron fueron: butanol con FRS₅₀ de $7,6 \pm 0,8$ y $23,4 \pm 2,4$; acuoso con FRS₅₀ de $28,5 \pm 2,9$ y $63,0 \pm 2,6$ y hexano 2 con FRS₅₀ de $17,0 \pm 2,6$ y $18,2 \pm 2,5$ mg/L, para las especies *M. speciosa* y *M. nobilis* respectivamente. Los extractos que presentaron un alto contenido de fenoles totales fueron: metanol 2 con valor de $0,47 \pm 0,06$ y $0,40 \pm 0,03$ mg equivalentes

de ácido gálico (EAG)/g extracto seco (ES) y el extracto acuoso: $0,16 \pm 0,06$ y $0,12 \pm 0,03$ mg EAG/g ES para las especies *M. speciosa* y *M. nobilis* respectivamente. El extracto butanólico de la especie *M. speciosa* mostró la mayor actividad antioxidante con un FRS_{50} de $7,6 \text{ mg/L} \pm 0,8$, este valor es comparable con el valor hallado para la quercetina FRS_{50} : $4,2 \text{ mg/L} \pm 0,4$, lo que indica que este extracto es promisorio en el contenido de metabolitos secundarios.

La investigación realizada por Sousa et al.⁵, titulado fenoles totales y actividad antioxidante de cinco plantas medicinales. En este estudio se cuantificaron los fenoles totales y actividad antioxidante mediante el método espectrofotométrico 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) contenido en el extracto etanólico de hojas, raíces y corteza de cinco plantas medicinales: *Terminalia brasiliensis* Camb, *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc., *Copernicia cerifera* (Miller) HE Moore, *cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire y *Qualea grandiflora* Mart. El total fenólico contenido en los extractos fue determinado por el método de Folin – Ciocalteu, varía desde $250.0 \pm 8,2$ hasta $763,63 \pm 13.03$ mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco. Se utilizó el agente antioxidante 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). El extracto de corteza de *T. brasiliensis* fue el más activo, con un valor de EC_{50} de $27,59 \pm 0,82 \mu\text{g} / \text{ml}$, fue comparable a la rutina ($EC_{50} = 27,80 \pm 1,38$) y ácido gálico ($EC_{50} = 24,27 \pm 0,31$), utilizado como los controles positivos. La relación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante fue significativa y positiva para *T. brasiliensis*, *C. macrophyllum* y *C. cerifera*.

En su trabajo de tesis Zaquinaula⁶, en el año 2016 determinó la capacidad antioxidante en alimentos tradicionales, determinó la capacidad antioxidante mediante los métodos espectrofotométricos de poder antioxidante reductor del hierro (FRAP), ácido 2,2´azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{*+}) y 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). En esta investigación se trabajó con tres especies vegetales las cuales incluyeron 2 legumbres distintas: *Vigna unguiculata* “Firiguelo” y *Dolichos lablab* “Zarandaja”; y un pseudocereal: *Amaranthus spp* “Amaranto”. Se analizó muestras de distinto lugar de procedencia. Se realizaron extracciones secuenciales con metanol/agua (50:50 v/v) y acetona/agua (70:30 v/v) y ambas extracciones se combinaron, y a partir de ésta se cuantifico la capacidad antioxidante. Las muestras de firiguelo provenientes del cantón Macará de la ciudad de Loja presentaron el mayor potencial antioxidante según los métodos ABTS ($27,5 \mu\text{mol ET/g BS}$), DPPH ($27,8 \mu\text{mol ET/g BS}$), FRAP ($18,3 \mu\text{mol ET/g BS}$) y contenido de fenoles totales ($288\text{mg EAG}/100\text{g BS}$). Todas las

muestras estudiadas demostraron ser fuentes importantes de antioxidantes, sin embargo, varía la capacidad antioxidante dependiendo del lugar de procedencia de la muestra,

La investigación realizada por Alarcón⁷, titulado actividad antioxidante y biológica de extractos de maíz azul (*zea mays L.*). En este estudio se determinó la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles y antocianinas en 16 muestras de maíz azul provenientes de la Mixteca Oaxaqueña. La actividad antioxidante, el contenido de antocianinas y la concentración de fenoles totales fueron determinados por el método de DPPH, FRAP, Folin y Ciocalteu, y pH diferencial. La actividad antioxidante, mediante el método de DPPH, osciló entre 18.1 a 27.8 $\mu\text{mol ET/g}$ y mediante el método de FRAP entre 6.5 a 11.8 $\mu\text{mol ET/g}$. El contenido de polifenoles totales se encontró en un intervalo de 142.8 a 203.2 mg de EAG/100g de muestra. El total de antocianinas osciló entre 21.4 a 66.9 mg cianidina 3-glucósido/100 g de muestra.

El trabajo de tesis realizada por Vintimilla⁸, titulado actividad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos agroindustriales de mango. Determinó la actividad antioxidante in vitro de subproductos agroindustriales de mango: piel y pulpa adherida a la piel, para así poder comparar el aporte de las fracciones hidrofílicas y lipofílicas; para esto primero se realizó la obtención de diferentes extractos, variando tamaños de partícula y tiempos de extracción, luego de ello se determinó la actividad antioxidante de cada uno utilizando los métodos DPPH, ABTS y FRAP, así como el contenido de fenoles totales, encontrando una relación directamente proporcional entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos. La actividad antioxidante más favorable de la fracción lipofílicas se obtuvo a 24 horas con un tamaño de partícula $>125<250 \mu\text{m}$, los valores fueron: DPPH 4,649 $\mu\text{mol TE/g MS}$, ABTS 4,979 $\mu\text{mol TE/g MS}$, FRAP 3,589 $\mu\text{mol TE/g MS}$; y fenoles totales 50,8 mg GAE/100 g MS. La mayor actividad antioxidante de la fracción hidrofílica correspondió a la extraída con etanol, se obtuvo a 3 horas con un tamaño de partícula $>355<500 \mu\text{m}$, para DPPH 162,4 $\mu\text{mol TE/g MS}$, ABTS 181,9 $\mu\text{mol TE/g MS}$, FRAP 71,5 $\mu\text{mol TE/g MS}$ y fenoles totales 1727,31 mg GAE/100 g MS.

2.2. familia melastomataceae

Melastomataceae es una familia muy diversa en el bosque tropical húmedo, presente también en sabanas y bosque de alta montaña, que cuenta con cerca de 4500 especies, presenta su mayor diversidad en el neotrópico (3000 especies), seguida por el sureste asiático (1000), África (240) y Madagascar (225). Aunque la circunscripción y monofilia de la familia Melastomataceae han sido claramente establecidas, la definición de taxones en su interior, así como las relaciones taxonómicas y/o filogenéticas, entre estos han dado lugar a varias propuestas de clasificación en los últimos 130 años.⁹

2.2.1. Genero *Brachyotum*

Brachyotum es un género arbustivo de 58 especies, 21 de las cuales ocurren en el Ecuador, en donde se distribuyen únicamente en los Andes. Cinco especies, *Brachyotum alpinum*, *B. azuayense*, *B. ledifolium*, *B. rostratum* y *B. trichocalyx* son utilizadas para curar el catarro en los pollos, teñir, construir, así como para leña y escobas. Este género puede ser también utilizado como cercas vivas. Algunas especies de *Brachyotum* tienen potencial como ornamental ya que sus flores presentan generalmente cálices de un color rojo vivo y corolas morado oscuras (e.g. *Brachyotum andreanum* Cogn.) o amarillas (e.g. *B. ledifolium*); sin embargo, las plantas tendrían que ser sembradas especialmente en lugares fríos ya que el género es típicamente de páramo. *Brachyotum ledifolium* es utilizada medicinalmente por los Kichwas andinos, también es usada como combustible y para escobas.¹⁰

2.2.1.1. *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”

Tabla 1. Clasificación taxonómica *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”

DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	ROSIDAE
ORDEN	MYRTALES
FAMILIA	MELASTOMATACEAE
GÉNERO	<i>Brachyotum</i>
ESPECIE	<i>Brachyotum naudinii triana</i>
N. V.	“qihwncha”

Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis*, UNSCH 2017. **(Anexo 01)**

- **Descripción botánica**

Arbustos de hasta 1.5 m de alto, con follaje ralo, usualmente con varios tallos generados desde la base. Hojas simples y opuestas, de tamaño pequeño, características por tener tres nervios paralelos e impresos; también, pelos diminutos. Flores solitarias o en pequeños grupos, pero muy vistosas, de color rojo vivo hasta morado, con la corola grande y llamativa; son péndulas y tubulares. Frutos globosos, pequeños, de color rojo oscuro a morado o negruzco, con varias semillas diminutas.¹¹

2.3. Estrés oxidativo

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen un desbalance entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos.¹²

2.4. Radicales Libres

Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen uno o más electrones desapareados lo cual los hace altamente inestables y reactivos. Estos radicales recorren nuestro organismo deseando robar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica por medio de reacciones de óxido-reducción.¹³

Una vez que el RL ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un nuevo RL, por quedar con un electrón desapareado; iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células; estas reacciones en cadena se combate con la acción de los antioxidantes, los cuales neutralizan los átomos de oxígeno. La vida biológica media del RL es de microsegundos; pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un estrés oxidativo que puede conducir a diversas enfermedades, tales como envejecimiento, problemas del sistema cardiovascular (arterosclerosis), problemas en el sistema nervioso, daño genético (mutaciones y cánceres).¹³

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente: ¹²

2.4.1. Radicales libres inorgánicos o primarios.

Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico. ^{12, 13}

2.4.2. Radicales libres orgánicos o secundarios.

Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas que actúan como radicales son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. ^{12,13}

2.4.3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.

Se incluye un grupo de especies químicas que, sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, los hidroperóxidos orgánicos, etc. ^{12, 13}

2.5. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo amplio de sustancias químicas, con estructuras, propiedades químicas y actividad biológica diferente, englobando más de 8000 compuestos distintos. ¹⁴

Los compuestos fenólicos es el grupo más numeroso y ampliamente distribuido en la naturaleza. Además de su comprobada actividad antioxidante, se les han atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónicas, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial, entre otros. Químicamente, estos compuestos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo. ^{14, 15} Los compuestos fenólicos o polifenoles son sustancias orgánicas que constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Poseen un anillo benceno hidroxilado, los cuales agrupan un amplio intervalo de sustancias que difieren en el número de átomos de carbono, que las constituyen en conjunto con el esqueleto fenólico básico, además del número y

posición de los sustituyentes hidroxilo. Su clasificación se observa en la Figura 1.^{15, 16}

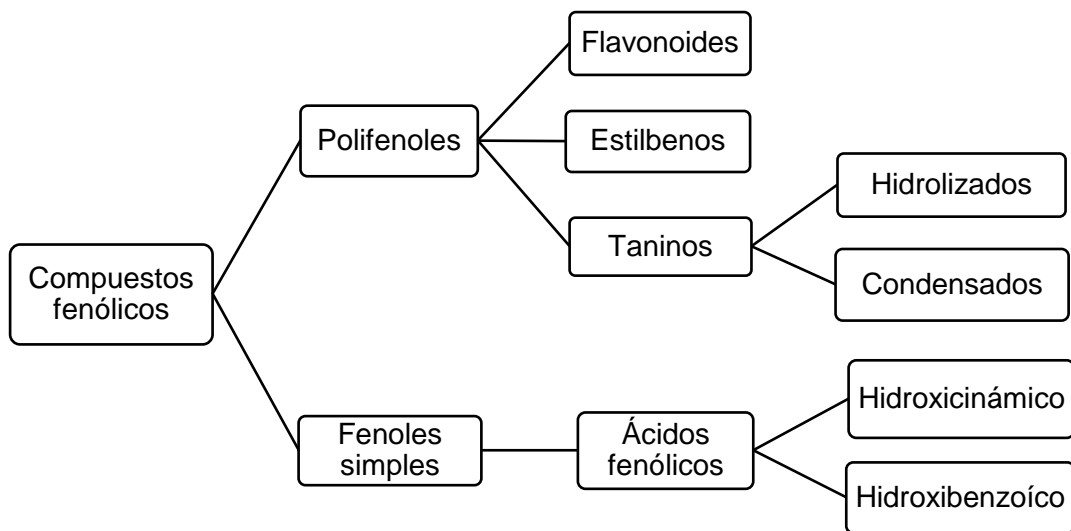


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos.^{15, 16}

La actividad antioxidante se debe a la presencia del ortodiol o catecol en la estructura de los diversos compuestos, esto les da la capacidad de quelar metales, interceptar radicales libres y modular la actividad enzimática.¹⁶

Algunos de los principales efectos biológicos que les confieren actividad antioxidante son:

- Suprimen la oxidación de lipoproteínas de baja densidad.
- Presentan antagonismo hacia receptores carcinogénicos.
- Modulan la secreción de las citocinas, así como la expresión de las cinasas proteicas en la proliferación de tumores.
- Inducen la expresión de enzimas anticarcinogénicas o inhiben la inducción de enzimas promotoras de cáncer
- Tienen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas.

La mayoría de los polifenoles presentes en alimentos están en sus formas conjugadas, los fenoles libres se encuentran únicamente en tejidos muertos.

Los flavonoides que incluyen a las flavanonas, flavonoles y taninos condensados, funcionan como quelantes de metales, atrapan radicales libres, inhiben la xantina-oxidasa asociada a la formación de especies reactivas del oxígeno y la proliferación de células cancerígenas en pulmones, estómago y colon, además, previenen enfermedades coronarias. Los flavonoles se distribuyen en sus formas sin conjugar lo que les da una significancia metabólica.¹⁶

2.5.1. Estructura química de los fenoles

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.⁴²

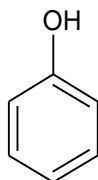


Figura 2: Estructura básica del fenol

2.5.2. Flavonoides

Son pigmentos naturales presentes en los vegetales, responsables de la coloración de flores y frutos, están ampliamente extendidos en todo el reino vegetal constituyen la mayoría de los pigmentos amarillos (flavonas, flavonoles, chalconas, auronas), rojos y azules (antocianos). Los flavonoides comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6 - C_3 - C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano. Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6', contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que tienen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante, poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales.^{38,39}

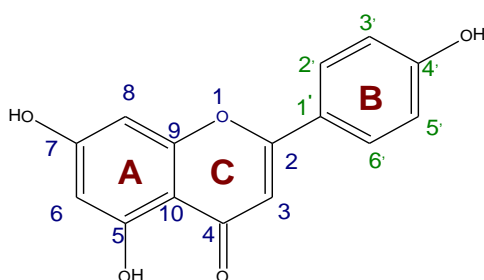


Figura 3: Núcleo básico de los flavonoides.⁴⁰

2.5.2.1. Clasificación de flavonoides

Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a los flavonoides en seis subclases: flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas, flavanoles.⁴¹

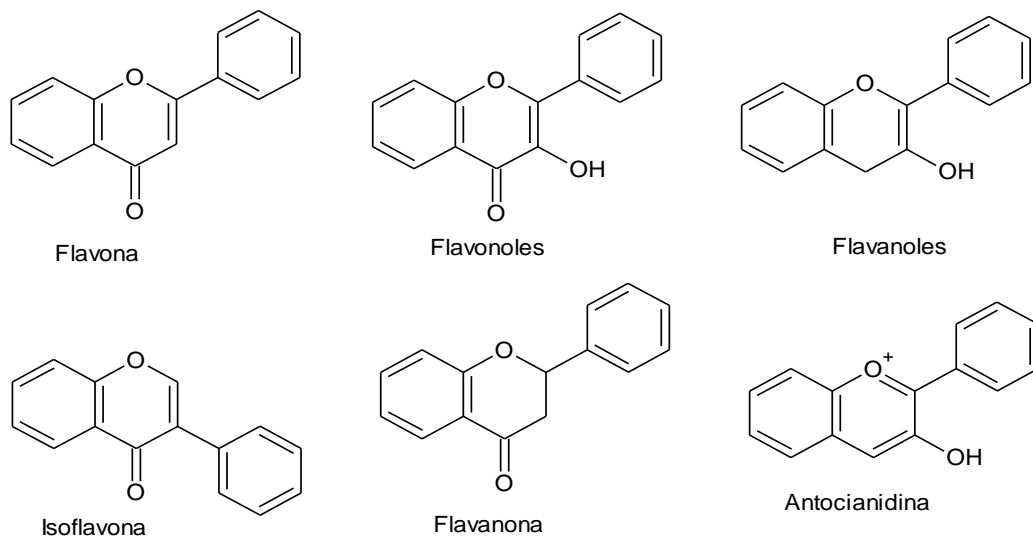


Figura 4: Estructura química de los flavonoides.³⁸

2.6. Antioxidantes

Una sustancia que encontrándose a bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable, actúa antes o durante una reacción en cadena de los radicales libres, ya sea en la etapa de iniciación, propagación, terminación, descomposición o en la subsecuente oxidación de los productos. Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos; previenen el daño derivado del estrés oxidativo generado por diferentes sustancias que ingresan al cuerpo liberando radicales libres que afectan el comportamiento celular. Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas. En los últimos años el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado notoriamente, debido principalmente a tres razones: 1) la baja seguridad que ofrece el consumo de antioxidantes sintéticos, 2) la eficacia antioxidante de una variedad de agentes fitoquímicos, y 3) la idea generalizada de que el consumo de ciertos agentes fitoquímicos pueden afectar de manera positiva la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento; además, la creencia de que los compuestos naturales son innatamente más seguros que los compuestos sintéticos y por consiguiente son comercialmente más aceptados.¹

Dentro de este tipo de compuestos antioxidantes se encuentran los compuestos fenólicos que son compuestos asociados al color, a las características sensoriales

(sabor, astringencia, dureza), características nutritivas de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol.¹⁷

En particular, los antioxidantes naturales (hidrosolubles y liposolubles) pueden funcionar como compuestos reductores, interrumpen la formación de radicales libres, inhiben la formación de oxígenos libres e inactivan los metales pro-oxidativos. Los radicales libres se forman en el organismo mediante la respiración aeróbica y existen en diferentes formas como: anión superóxido, hidroxilos, peróxidos, y alcóxilos.¹⁶

a. Antioxidantes endógenos

Normalmente son bio-sintetizados por el organismo, son las enzimas (proteínas) con capacidad antioxidante que no se consumen al reaccionar con los radicales libres y son dependientes de sus cofactores tales como el cobre, el hierro, el zinc, el magnesio y selenio.⁷

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 Γ -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 enzimáticos¹¹

b. Antioxidantes exógenos

Son introducidos por la dieta y a diferencia de las enzimas se consumen al reaccionar con los radicales libres, y deben ser reemplazados y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación (vitaminas E y C y del caroteno).

Los antioxidantes exógenos están determinados por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, los mismos que intervienen logrando retrasar la generación y acción de los radicales libres.⁷

2.7. Medición de la actividad antioxidante

Existen numerosos métodos para medir la capacidad antioxidante de los compuestos, los que se clasifican en dos categorías:

La primera, mide la inhibición de la oxidación en un sistema modelo por monitoreo a los cambios asociados usando medios físicos, químicos o instrumentales.¹⁸

La segunda, involucra a los ensayos captadores de radicales, los cuales incluyen métodos basados en mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o transferencia de electrones (ET). Los ensayos ORAC (capacidad de absorber radical oxígeno) y TRAP (parámetro antioxidante que atrapan los radicales totales), son los mejores métodos utilizados para medir el HAT. Los ensayos TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox), FRAP (poder antioxidante reductor férrico) y el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) representan a los métodos basados en ET.¹⁸

ENSAYO	CATEGORÍA
ácido 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 (DMPB) Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
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 los lípidos de baja densidad (LDL)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

Tabla 2. Clasificación de los modelos de ensayo *in vitro* según su modo de reacción ET y HAT.¹⁹

2.7.1. Método DPPH

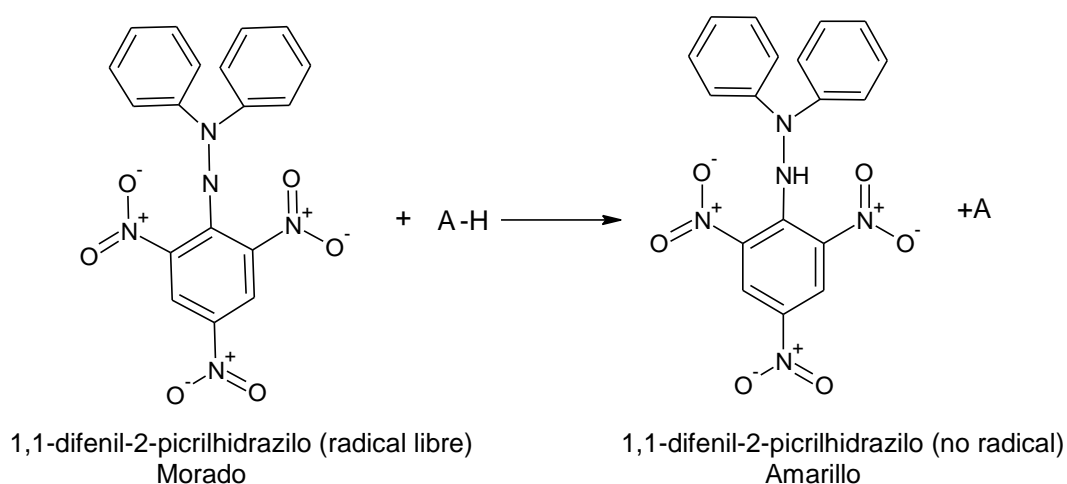


Figura 5. Mecanismo de reacción del DPPH con sustancias antioxidantes (AH)^{16,19}

El método DPPH es el método de neutralización del radical libre 2,2-difenildipicrilhidracil. El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la

capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. Este método es empleado para sustancias liposolubles o hidrosolubles ^{17,20}

La solución del reactivo de DPPH es de color violeta y con una absorción de 515 nm. La reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (antioxidante) por el radical libre DPPH, desarrollando un cambio del color violeta a amarillo, al disminuir la concentración del radical libre. El grado de este decoloramiento indica la habilidad del antioxidante de secuestrar al radical libre; el que se lee en el espectrofotómetro después de veinte a treinta minutos de reacción.^{17,18}

El dato se expresa normalmente como valor EC50, es decir, la concentración del antioxidante necesaria para inhibir el 50% de los radicales DPPH en un periodo de tiempo determinado.²⁰

2.7.2. Método ABTS

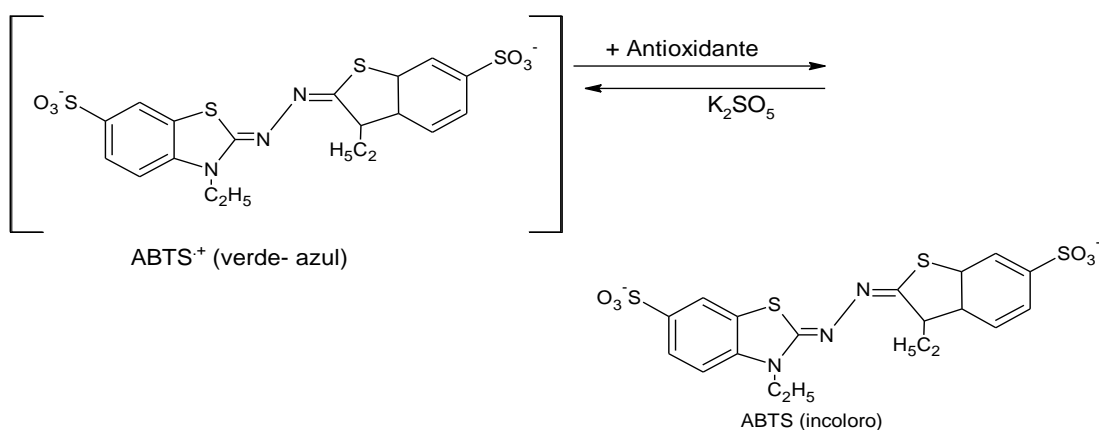


Figura 6. Mecanismo de reacción para el ensayo ABTS.²²

El método ABTS se basa en la capacidad de captura que tiene el anión radical ABTS^{•+} [del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] de vida larga. El ABTS^{•+} es oxidado por los radicales peroxilo u otros oxidantes a su forma de radical catión ABTS^{•+} de color intenso. La capacidad antioxidante de los compuestos de prueba se mide como inhibición óptica complementaria a la absorbancia (disminución del color), al reaccionar directamente con el radical ABTS^{•+}. Los resultados de los compuestos analizados se expresan como equivalentes de trolox.²¹

El método permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para donar un hidrogeno y estabilizar al radical ABTS. La

decoloración que la solución de ABTS experimenta en la reacción, se compara con la decoloración hecha por un antioxidante patrón derivado de la vitamina e conocido como trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-acido carboxílico), mediante una curva de calibración. Por esta razón el resultado se expresa como capacidad antioxidante en equivalentes trolox o TEAC (del inglés: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).²⁰

2.7.3. Método FRAP

Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} que es menos antioxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.²³

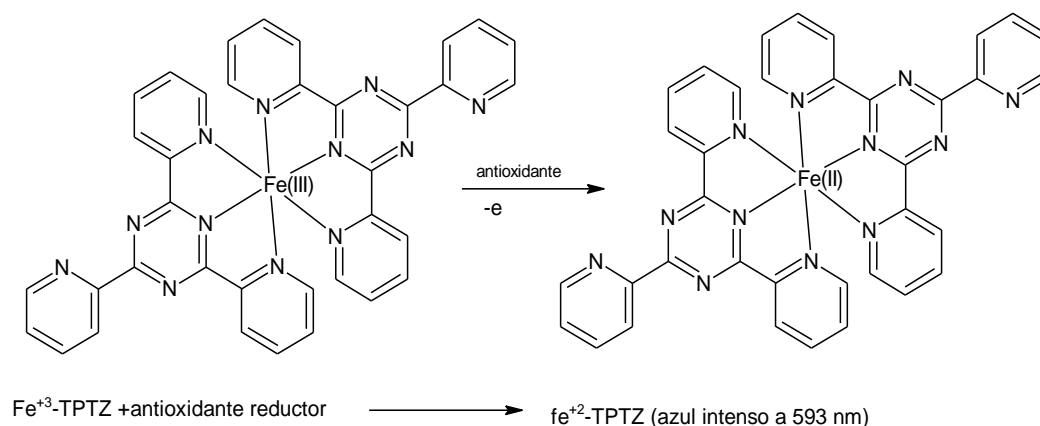


Figura 7. Reacción involucrada en el ensayo FRAP. ^{14,22,24}

Se mide la densidad óptica (DO) del ión ferroso (Fe^{2+}). Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor concentración de ión ferroso (Fe^{2+}) y más alta la señal de absorbancia. El complejo va a poder ser reducido por productos con potenciales redox menores a 0.7 V (potencial redox del ión férrico (Fe^{3+})).²³

Debido a que el potencial redox del ión férrico (Fe^{3+}), 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.²³

La reacción mide la reducción del complejo férrico-2,4,6, tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico (Fe^{3+}), se reduce a ión ferroso a PH ácido, causando la

formación de un complejo ferroso-tripiridiltriazina coloreado (Fe^{2+} -TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593 nm.^{22, 24} El patrón utilizado para comparar los resultados fue el trolox.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación y procesamiento de las muestras se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) 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.

3.2. Definición de población y muestra

3.2.1. Población

Está constituida por las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, que crecen en la comunidad de Huaraca, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

3.2.2. Muestra

Está constituida por un kilogramo de hojas frescas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, que fueron recolectadas en la comunidad de Huaraca a 3800 m.s.n.m. en horas de la mañana en el mes de marzo, realizando muestreo por conveniencia

3.2.3. Unidad de análisis

5 g de extracto seco de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”.

3.2.4. Sistema de muestreo

Libre por conveniencia

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Recolección e identificación de la muestra vegetal

Las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha” fueron recolectadas en horas de la mañana, seleccionadas, lavadas y secadas a temperatura ambiente, en un lugar con buena ventilación, cambiando el papel de soporte y removiendo el vegetal para evitar su descomposición, por un periodo de tres semanas según las directrices de la OMS.²⁵

La clasificación de la planta fue realizada por la Blga. Laura Aucasime Medina, de acuerdo al sistema de clasificación de Arthur Cronquist et al.1981 (Anexo 1).

3.3.2 Obtención del extracto hidroalcohólico

Luego del secado de las hojas se procedió a reducir el tamaño de la muestra utilizando molino de cuchilla, hasta obtener un pulverizado uniforme, luego se pesó 20 g aproximadamente de muestra seca pulverizada, el cuál fue llevado a un frasco ámbar para su maceración, cubriéndolo con alcohol de 50° hasta una altura de 1-2 cm por encima de la muestra, por un periodo de 24 h. Después se colocó en un percolador durante 24 horas adicionales, posteriormente se dejó salir el percolado a razón de 20 gotas por minuto (agregando continuamente el solvente) y posteriormente fue filtrada para evitar polvillo.

Luego se procedió a secar el extracto empleando una estufa a una temperatura de 40 °C. El producto obtenido se envasó en un recipiente ámbar.

3.3.3 Identificación de compuestos químicos del extracto hidroalcohólico

La identificación de los diferentes compuestos químicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, fueron realizadas siguiendo los procedimientos de Perez et al.,²⁶ y Miranda y Cuéllar.²⁷

3.3.4 Determinación del contenido de fenoles totales

La determinación de contenido de fenoles totales se realizó mediante el método de espectrofotometría de Folin-Ciocalteu, para lo cual se usó ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia.²⁸

Este método se fundamenta en su carácter reductor y seguida neutralización. Consiste en la mezcla de la muestra a analizar y el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual tiene la capacidad de reaccionar con los compuestos polifenólicos, dando como resultado un cambio de coloración de amarillo a azul, y su intensidad depende del contenido de fenoles presentes en la muestra. Seguidamente se mide esta coloración en el espectrofotómetro.²⁹

A. Procedimiento

Se tomó 100 µL de las muestras convenientemente diluidas, 500 µL del reactivo Folin – Ciocalteu 1:10, 400 µL de una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 7,5 %. Se mezclaron en un tubo de ensayo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 765 nm utilizando un espectrofotómetro. El contenido de fenoles totales fue expresado en miligramos de equivalentes de ácido gálico

(GAE) por gramo de muestra seca (MS), a partir de una curva de calibración del estándar ácido gálico de 10 a 60 µg/mL.

B. Cálculos

Para determinar el valor del contenido de fenoles totales se procedió a realizar una regresión lineal con las absorbancias obtenidas, de tal manera que se obtiene la siguiente ecuación: $y=bx+a$, donde “a” es la intersección y “b” pendiente, para calcular el contenido de fenoles totales se debe reemplazar en el valor correspondiente en el eje “Y” (absorbancia) y en el eje “X” (concentración µg/mL), posteriormente fueron expresados como mg EAG/g de extracto seco.

3.3.5 Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, fue determinado por el método de Gonzales³⁰, Empleando el reactivo de cloruro de aluminio (AlCl₃), utilizando la rutina como el compuesto flavonoide de referencia.

A. Procedimiento

Se preparó una solución madre de rutina, para ello se pesó 1 mg de rutina, y se llevó a un matraz de 25 mL, se disolvió con 2,5 mL de metanol y se aforó a volumen con etanol de 50°.

A partir de la solución del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, se tomaron alícuota de 2 mL y se transfirieron a un volumétrico de 5 mL, se adicionó a continuación 0,5 mL del reactivo de cloruro de aluminio (AlCl₃) 2%. Se completó con alcohol de 50° hasta volumen. Después de treinta minutos de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 415 nm. El contenido de flavonoides totales fue expresado como equivalentes de rutina (mg de rutina/g MS) a partir de la curva de calibración de este compuesto.³¹

La curva de calibración se trabajó en un intervalo de concentración de 8-32 µg/mL. Las evaluaciones del extracto hidroalcohólico de *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, se realizó por triplicado.

B. Cálculos

Para determinar el valor del contenido de flavonoides totales se procedió a realizar una regresión lineal con las absorbancias obtenidas, de tal manera que se obtiene la siguiente ecuación: $y=bx+a$, donde “a” es la intersección y “b” pendiente para calcular el contenido de flavonoides totales, se debe reemplazar en el valor

correspondiente en el eje “Y” (absorbancia) y en el eje “X” (concentración µg/mL), posteriormente fueron expresados como mg ERu/g de extracto seco.

3.3.6 Determinación de la actividad antioxidante

3.3.6.1 Método de radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

Se realizó la evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante siguiendo la metodología descrito por Sousa et al.⁵, el seguimiento del consumo de radical DPPH por las muestras, mediante la disminución de la absorbancia de las soluciones a diferentes concentraciones. Estas mediciones fueron realizadas en UV-Vis a una longitud de onda de 515 nm, se usó el trolox como control positivo. Los resultados fueron expresados como CI₅₀, % de actividad antirradicalaria.

A. Procedimiento

Se procedió a preparar 50 mL de la solución madre DPPH en etanol 96° a una concentración de 40 µg/mL, se deberá mantener en el refrigerador y protegido de la luz, se realizó diluciones de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1 µg/mL. La curva de calibración se construyó a partir de los valores de absorbancia obtenidos a 515 nm de todas las soluciones (1 a 40 µg/mL), medidas en una cubeta de vidrio con el camino óptico de 1cm y teniendo como “blanco” el etanol.⁵

El extracto seco *Brachyotum naudinii* Triana “qihwncha”, y el control positivo (trolox) en etanol 96°, fueron diluidos a concentraciones de 250, 200, 150, 100, 50 y 25 µg/mL. Las medidas de absorbancia de las mezclas de reacción (0,3 mL de solución de muestra y 2,7 mL de la solución madre de DPPH a la concentración de 40 µg/mL) se realizarán a 515 nm a 30 minutos. Se utilizó una mezcla de etanol (2,7 mL) y 0,3 mL del extracto como blanco.⁵

B. Cálculos

- Calcular el porcentaje de actividad antioxidante (porcentaje de inhibición), según la siguiente ecuación:

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

Donde:

A_c: Absorbancia del control

A_m: Absorbancia de la muestra

A_b: Absorbancia del blanco

- Calcular la concentración media inhibitoria (CI₅₀) de la actividad antioxidante, según la ecuación exponencial del porcentaje de DPPH remanente en función de la concentración de Trolox y/o extractos secos.

3.3.6.2 Método del Radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

- Preparación de la solución madre de ABTS: Se preparó una solución madre de ABTS (7 Mm), para ello se pesó exactamente 0,09601 g de ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 98%) y se disolvió en 25 mL de agua destilada.^{31, 32, 33}
- Preparación de la solución de persulfato de potasio: Se preparó una solución de persulfato de potasio (2,45 Mm), para ello se pesó 0,0165 g de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) y se disolvió en 25 mL de agua destilada.^{32, 33, 34,37}

- **Preparación del radical ABTS•+**

En un frasco ámbar, se colocó 5 mL de la solución madre ABTS (7 mM) y 5 mL de la solución de Persulfato de Potasio K₂S₂O₈ (2,45 mM), se homogenizó y se cubrió con papel aluminio. La solución se incubó de 12 a 16 horas a temperatura ambiente (±25°C) antes de su utilización.

Una vez formado el radical ABTS•+ se diluyó con etanol 96° hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (± 0,02) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción).^{32, 33,35, 36,37}

- **Procedimiento**

Se colocó 20 µL de las soluciones de los extractos y estándares a concentraciones de 50 a 250 µg/mL en tubos de vidrio y se hizo reaccionar con 980 µL del radical ABTS•+.

Se midió la densidad óptica de la mezcla de reacción al minuto 6 a 734 nm, los ensayos se realizarán por triplicado.

- **Cálculo**

- Calcular el porcentaje de actividad antioxidante (porcentaje de inhibición), según la siguiente ecuación:

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

Donde:

A_c: Absorbancia del control

A_m: Absorbancia de la muestra

A_b: Absorbancia del blanco

- Calcular la concentración media inhibitoria (CI₅₀) de la actividad antioxidante, según la ecuación lineal del porcentaje de actividad antioxidante en función de la concentración de Trolox y/o extractos secos.

3.3.6.3 Método poder reductor antioxidante Férrico (FRAP)

Este ensayo se basa en el poder de un compuesto o extracto para reducir la 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ). Un antioxidante potencial puede reducir el ion férrico (Fe^{3+}) a ion ferroso (Fe^{2+}); esta última forma un complejo azul ($\text{Fe}^{2+}/\text{TPTZ}$), cuya absorbencia se lee a 590 nm, La reacción debe llevarse a cabo en condiciones ácidas (pH 3.6) para conservar la solubilidad del hierro. El poder reductor está relacionado con el grado de hidroxilación y la conjugación en los fenoles.¹

a. Desarrollo del método ^{34, 37}

- Solución de ácido clorhídrico HCl 40 Mm. Se diluirá 535ul de HCl (37 %) en 100 mL de agua destilada.
- Solución TPTZ 10 mM. Se pesará 0,0312 g del reactivo TPTZ y se disolverá en un matraz de 10 mL con HCl 40 mM
- Solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Se pesará 0,1352 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se disolverá en 25 mL de agua destilada.
- Tampón acetato 0,3 mM; PH 3,6 para 250 mL. Se disolverá 0,00615 g de acetato de sodio en 200 mL de agua destilada. Ajustar el PH a 3,6 utilizando HCl 40 mM y completar hasta los 250 mL con agua destilada.

b. Preparación de solución de trabajo diario FRAP

Mezclar 25 mL del tampón acetato 0,3 mM, 2,5 mL de 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine 10 mM preparado en HCl 40 mM y 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Esta preparación debe mantenerse durante todo el proceso en baño maría a 37 °C.

c. Procedimiento

Se colocarán 20 μl de las soluciones de los extractos a concentraciones de 50 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tubos de vidrio y se hacen reaccionar con 980 μL de la solución de trabajo.

Se medirá la densidad óptica de la mezcla de reacción al minuto 30 a 593 nm, los ensayos se realizarán por triplicado.

d. Cálculos

- Calcular el porcentaje de actividad antioxidante (porcentaje de inhibición), según la siguiente ecuación:

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

Donde:

A_c : Absorbancia del control

A_m : Absorbancia de la muestra

A_b : Absorbancia del blanco

- calcular la concentración media inhibitoria (CI_{50}) de la actividad antioxidante, según la ecuación lineal del porcentaje de actividad antioxidante en función de la concentración de Trolox y/o extractos secos.

3.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de los estudios fueron procesados por Microsoft Excel y en el Software OriginPro.

Los resultados se expresan como promedio, la diferencia significativa existente entre los tratamientos fue evaluada a través del análisis de varianza (ANVA one-way), seguidos de la prueba de t-student, con un nivel de significación estadística de 0,05.

Los promedios de la actividad antioxidante son reportados en gráficos y los valores de CI_{50} son reportados en tablas.

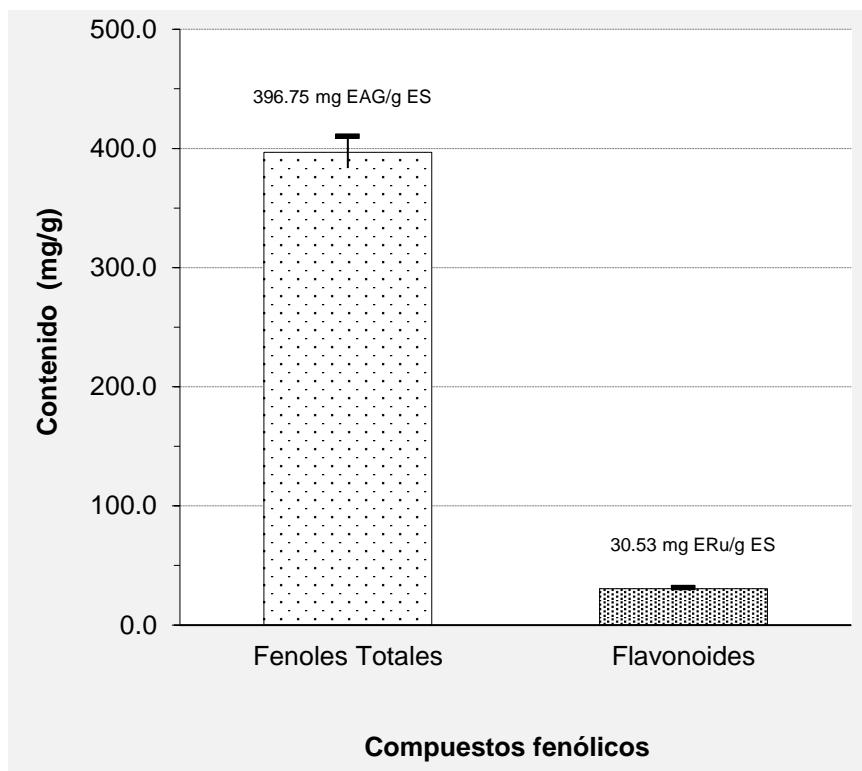
Para identificar diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones evaluados se realizó el análisis de varianza, comparaciones múltiples de Duncan y t de Student de muestras independientes con un nivel de confianza de 95%.

IV. RESULTADOS

Tabla 4. Metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración rojiza
Fenoles y/o Taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración azul intenso
Saponinas	Espuma	+++	Espuma
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann - Burchard	+++	Coloración violeta
Quinonas	Borntrager	+++	Coloración roja en la fase acuosa (superior)
Catequinas	Catequinas	++	Coloración verde
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+++	Precipitado naranja
Azúcares reductores	Fehling	+++	Precipitado rojo

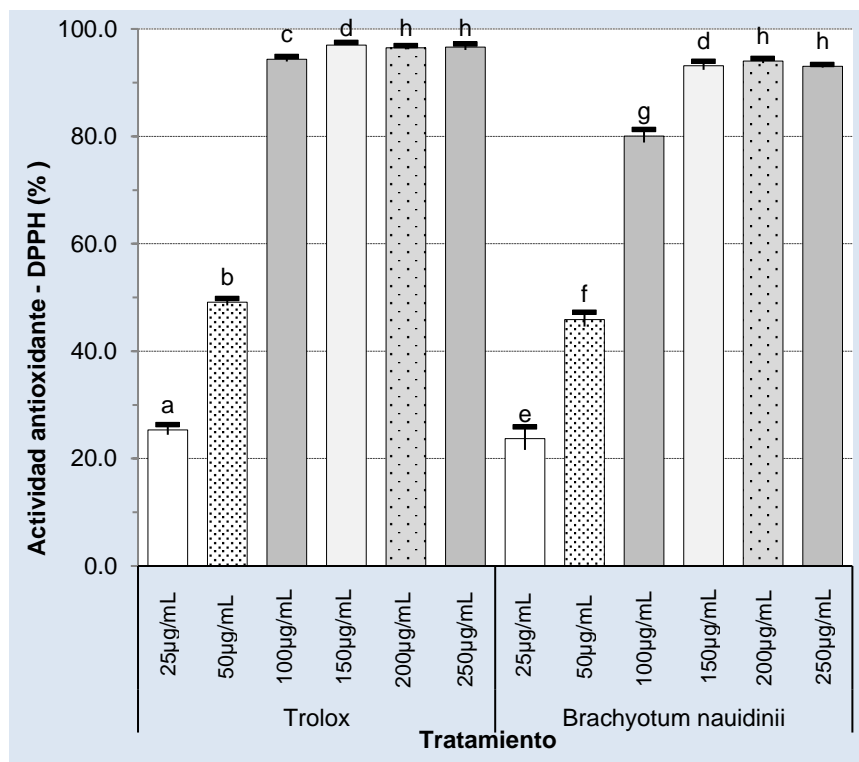
LEYENDA: Escasa/ligera (+); Regular (++); Abundante/intenso (+++)



EAG/g ES: Equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco

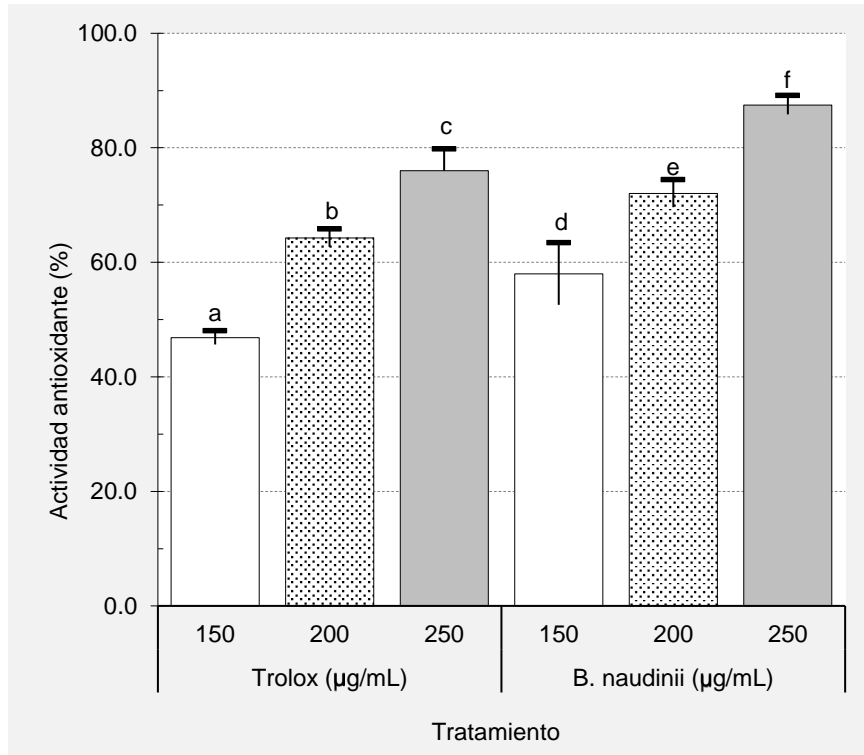
ERu/g ES: Equivalente a rutina por gramo de extracto seco

Figura 8. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



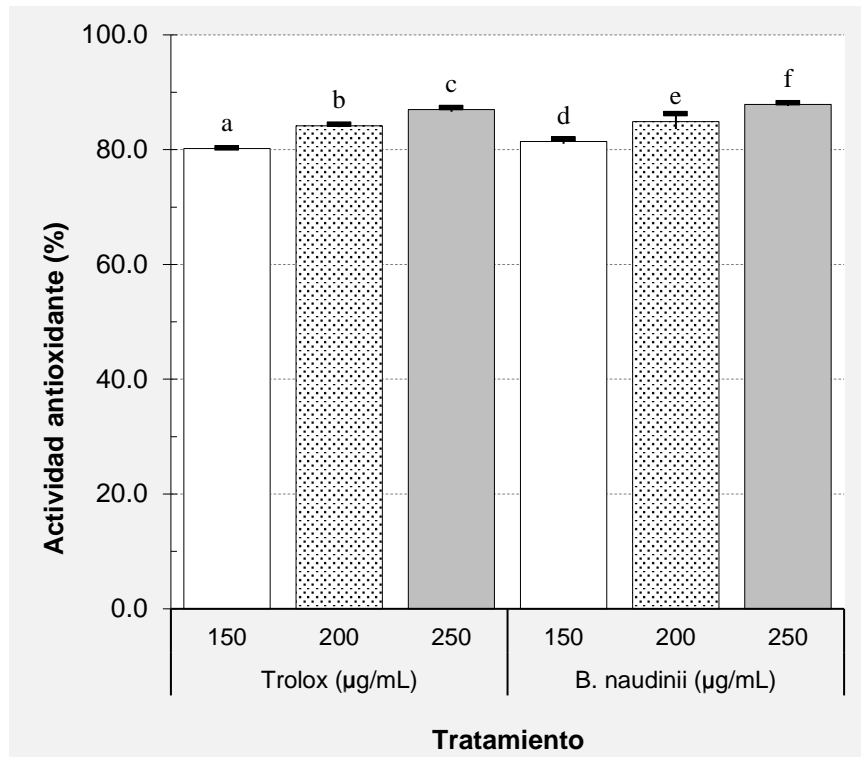
$p=3,5 \times 10^{-42}$

Figura 9. Comparación múltiple de Duncan del porcentaje de actividad antioxidante mediante el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



$\rho = 6,58 \times 10^{-12}$

Figura 10. Comparación múltiple de Duncan del porcentaje de actividad antioxidante mediante el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



$$p = 3,12 \times 10^{-12}$$

Figura 11. Comparación múltiple de Duncan del porcentaje de actividad antioxidante mediante el método FRAP del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

Tabla 5. Prueba T de igualdad de varianzas de la concentración media inhibitoria (CI_{50}), del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha” mediante tres métodos. Ayacucho 2018.

Muestra	DPPH CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ABTS CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	FRAP CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Brachyotum naudinii</i> T.	42,9*	136,2*	38,2*
Trolox	38,5*	157,3*	35,8*
ρ	0,00015	0,00019	0,00387

V. DISCUSIÓN

El oxígeno forma, en los organismos aerobios intermediarios, compuestos conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés “Reactive Oxygen Species”), como un proceso natural, constante, inevitable y beneficioso para la supervivencia; no obstante, si las especies reactivas se encuentran en exceso serán perjudiciales para el organismo. Así pues, son necesarias defensas antioxidantes que neutralicen estos compuestos, manteniendo un equilibrio entre las especies reactivas y los antioxidantes, estos sistemas o procesos de defensa comprenden procesos enzimáticos y no enzimáticos.⁴³

Rivas et al.²³, señalan que 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. Estos participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares y procesos neurodegenerativas. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento y otros

En la tabla 4 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, donde se pudo evidenciar la presencia de catequinas, taninos, flavonoides, saponinas, quinonas, esteroides, cumarinas y azúcares reductores. Resaltando los ensayos de cloruro férrico y shinoda, mediante los cuales se observaron la presencia de taninos y flavonoides respectivamente, observándose una coloración azul oscuro intenso para taninos hidrolizables y una coloración rojiza para flavonoides, la importancia de estos compuestos es debido a que diversas investigaciones mencionan que la actividad antioxidante se debe a estos metabolitos secundarios.

Los resultados descritos párrafos anteriores, se relacionan con los estudios realizado por Aguirre et al.², quienes realizaron el tamizaje fitoquímico de las especies *M. quintuplinervis* y *M. speciosa* pertenecientes a la familia melastomateceae , donde se pudo evidenciar que las dos especies presentan similitudes en los metabolitos secundarios de tipo terpenoide y esteroide con la prueba de *Salkowski* y *Lieberman-Bouchard*, en los extractos con hexano y metanol; hay presencia de fenoles con cloruro férrico y la prueba de *Folin-Ciocalteu* en los extractos metanólico, butanólico y acuoso para ambas especies; presencia de flavonoides con Shinoda en los extractos metanólico y butanólico de *M. quintuplinervis*; taninos condensados en los extractos butanólico y acuoso en el caso de *M. speciosa*; mientras que para *M. quintuplinervis* solo en el extracto acuoso; taninos hidrolizables en los extractos butanólico y acuoso en ambas especies.

Pérez et al.²⁶, mencionan que una coloración azul indica la presencia de taninos hidrolizables y una coloración verde, de taninos condensados.

Miranda et al.²⁷, Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos, pero si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general; verde intenso, taninos del tipo pirocatecólicos; azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

En el caso del *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, se pudo observar una coloración azul intenso para taninos hidrolizables del tipo pirogalotánicos.

Toapanta⁴⁵, señala que los compuestos fenólicos también conocidos como polifenólicos (fenoles, taninos y flavonoides), forman un conjunto muy amplio de sustancias. Estos compuestos protegen a las plantas contra los daños oxidativos y llevan a cabo la misma función en el organismo humano. Los flavonoides, también conocidos como bioflavonoides, son un grupo de sustancias polifenólicas las cuales están presentes en la mayoría de las plantas. Son principalmente reconocidos como los pigmentos responsables del color de las hojas en las plantas. La mayoría de los tejidos vegetales pueden sintetizar flavonoides, los cuales se presentan en forma de glucósidos solubles en agua y se localizan en las hojas y frutas empleadas en la alimentación humana.

En la figura 8, se observan los resultados de la cuantificación de fenoles y flavonoides totales. Se usaron los métodos espectrofotométricos de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio (AlCl₃) respectivamente. Para la cuantificación de

fenoles totales se elaboró la curva de calibración con el estándar ácido gálico, con un coeficiente de correlación de 0,9998 (anexo 7), realizando los cálculos correspondientes se obtuvo 396,75 mg EAG/g de extracto seco. La curva de calibración para la cuantificación de flavonoides fue realizada con la estándar rutina, con un coeficiente de correlación de 0,9986 (anexo 9) obteniendo 430,53 mg ERu/g de extracto seco. Se puede observar que el contenido de flavonoides es menor en comparación con el contenido de fenoles totales, esto se debe a que los fenoles engloban los flavonoides.

Cuando se realizó la cuantificación de flavonoides según el método de Tricloruro de Aluminio en las muestras, estas presentaron un color amarillo, según Amaya et al.⁴⁶, esto se debe a que el catión de aluminio forma complejos estables con el flavonoide en etanol evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas.

Durante la cuantificación de fenoles totales se observó una coloración azul según Carpio²⁸, es porque el reactivo de Folin-Ciocalteu, reacciona con los compuestos polifenólicos en un medio alcalino, dando como resultado un cambio de coloración de amarillo a azul, y su intensidad depende del contenido de fenoles presentes en la muestra.

Todos los fenoles poseen una estructura común: un anillo fenol, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol.⁴⁴

Los flavonoides son polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas, los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos.⁴⁴

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C.⁴⁴

Existe correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad de captura de radicales libres. La polaridad de los compuestos fenólicos es determinante en cuanto a la capacidad de capturar radicales libres. Los compuestos fenólicos que poseen mayor cantidad de sustituyentes hidroxilados (polihidroxilados) tienen una polaridad mayor que los otros fenoles. Los compuestos fenólicos capturan las especies reactivas del oxígeno, tales como radical anión superóxido y radicales lípidos peroxi.⁴⁴

En esta investigación se determinó la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii triana* “qihwncha”, a través de tres métodos colorimétricos *in-vitro* con las especies radicalarias sintéticas DPPH, ABTS y FRAP, puesto que estos son los más utilizados en los laboratorios del mundo debido a que indican de manera general, la capacidad antioxidante de las sustancias para donar hidrógenos o captar electrones.

En la figura 9, se muestran los resultados de la actividad antioxidante según el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii triana* “qihwncha” y del estándar Trolox a seis diferentes concentraciones.

Para determinar la actividad antioxidante mediante el método DPPH, se trabajó con la curva de calibración del radical (anexo 11), se elaboró de acuerdo a la metodología descrita por Sousa y col.⁵, a las concentraciones de 1 µg/mL, 5µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL y 35 µg/mL, preparado de acuerdo al anexo 10. La muestra problema y el estándar fueron preparadas a las concentraciones de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL y 250 µg/mL (anexo 10). El extracto hidroalcohólico de las hojas *Brachyotum naudinii triana* “qihwncha” a las concentraciones de 100µg/mL, 150µg/mL, 200µg/mL y 250µg/mL, mostraron mayor capacidad antioxidante con respecto al estándar Trolox. Esto se debe al tipo de polifenoles, que viene hacer los taninos hidrolizables y flavonoides. La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii triana* “qihwncha” con respecto al estándar Trolox es estadísticamente significativa ($p=3,5 \times 10^{-42}$) anexo 14.

Los taninos o polifenoles poliméricos tienen mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples.⁴⁴

Ocampo et al.⁴, reportaron el estudio de las hojas de las especies *Meriania speciosa* y *Meriania nobilis* de la familia melastomataceae, obteniendo extractos de diferente polaridad, a estos extractos se evaluó la actividad captadora de radicales con DPPH (FRS₅₀: capacidad captadora de radicales que reduce en un 50% al radical DPPH) en microplacas de 96 pozos. Este estudio determinó que las dos especies presentan una buena actividad antioxidante. Los extractos que mayor actividad antioxidante mostraron fueron: butanol con FRS₅₀ de $7,6 \pm 0,8$ y $23,4 \pm 2,4$; acuoso con FRS₅₀ de $28,5 \pm 2,9$ y $63,0 \pm 2,6$ y hexano 2 con FRS₅₀ de $17,0 \pm 2,6$ y $18,2 \pm 2,5$ mg/L, para las especies *M. speciosa* y *M. nobilis* respectivamente. El extracto butanólico de la especie *M. speciosa* mostró la mayor

actividad antioxidante con un FRS_{50} de $7,6 \text{ mg/L} \pm 0,8$, este valor es comparable con el valor hallado para la quercetina FRS_{50} : $4,2 \text{ mg/L} \pm 0,4$.

La solución de alcohol DPPH es de color morado oscuro, el cual desaparece en presencia de antioxidantes, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm. El DPPH es hidrófoba por lo que sus reacciones deben ejecutarse en solventes orgánicos, por ejemplo, metanol.⁶

En la figura 10, se muestran los resultados de la actividad antioxidante según el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana "qihwncha" y del estándar Trolox a tres diferentes concentraciones. La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico a las concentraciones de 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$, es mayor que el estándar Trolox, esto se debe a que el método ABTS es hidrofílica y lipofílica. La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana "qihwncha" con respecto al estándar Trolox es estadísticamente significativa ($p=6,58 \times 10^{-12}$) anexo 20.

Zaquinaula⁶, menciona que el método ABTS mide la capacidad captadora de radicales libres a través de la decoloración del radical ABTS. Este método es capaz de determinar propiedades antioxidantes tanto hidrofílicas y lipofílicas. En este método, el color azul/verde del radical $ABTS^+$, generado por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio, se reduce en presencia de antioxidantes, y el grado de decoloración se determina en un punto de tiempo fijo, por tanto, entre mayor es la capacidad antioxidante del polifenol, mayor es la decoloración generado sobre el radical ABTS.

Kuskoski et al.³⁴, mencionan sobre los métodos químicos utilizados para determinar la capacidad antioxidante (captación de radicales libres), el radical ABTS es uno de los más rápidos, originando resultados reproducibles y coherentes. Además, el ABTS presenta importantes ventajas; muestra varios máximos de absorción y una buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica.

En la figura 11, se muestran los resultados de la actividad antioxidante según el método FRAP del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana "qihwncha" y del estándar Trolox a tres diferentes concentraciones. La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico a las concentraciones de 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$, es mayor que el estándar Trolox, esto se debe a que el método FRAP es hidrofílica y lipofílica, tiene el mismo comportamiento que

el método ABTS. La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha” con respecto al estándar Trolox es estadísticamente significativa ($p=3,12 \times 10^{-12}$) anexo 26.

El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ión férrico (Fe^{3+}) al ión ferroso (Fe^{2+}). De este modo se genera una coloración de intensidad proporcional a la actividad reductora de la muestra por transferencia de electrones. En la tabla 5, se muestran los resultados de la concentración media inhibitoria (CI_{50}), según el método DPPH, ABTS y FRAP para *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”. Donde a menor concentración media inhibitoria (CI_{50}) mayor capacidad antioxidante, los resultados obtenidos fueron 42,9 $\mu\text{g/mL}$, 136,2 $\mu\text{g/mL}$ y 38,2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Se observaron diferencias entre los tres ensayos de captura de radicales libres (DPPH, ABTS y FRAP) empleados. Estos ensayos miden la capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra para capturar el radical libre, sin embargo, sus condiciones de reacción y cinética son diferentes. Además, otra importante diferencia entre los ensayos es que el ABTS $\cdot+$ y FRAP puede medir la actividad antioxidante en medio orgánico u acuoso teniendo en cuenta la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos en la muestra. Contrario a esto, el ensayo con DPPH \cdot solo se puede realizar en un medio orgánico, lo cual constituye una limitante al momento de interpretación de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos presentes en una muestra, situación que justifica las diferencias evidenciadas entre ambas determinaciones colorimétricas.

Los antioxidantes naturales han alcanzado una gran importancia por la relación directa que manifiestan con la disminución del riesgo a producir enfermedades coronarias y cáncer, entre otras. Numerosos antioxidantes, presentes en las frutas y verduras, entre los cuales se encuentran la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), β -caroteno (pro-vitamina A), compuestos fenólicos y flavonoides, se han relacionado a efectos positivos en la salud debido a su efecto antioxidante.³

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, presenta actividad antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH, ABTS y FRAP con una concentración inhibitoria de CI_{50} de 42,9 $\mu\text{g/mL}$, 136,8 $\mu\text{g/mL}$ y 38,2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, estas son estadísticamente similares al estándar Trolox. DPPH ($p = 3,5 \times 10^{-42}$), ABTS ($p = 6,58 \times 10^{-12}$) y FRAP ($p = 3,12 \times 10^{-12}$)
2. Los metabolitos identificados en el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, fueron: flavonoides, taninos hidrolizables, esteroides, quinonas, cumarinas, saponinas y azúcares reductores.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, contiene compuestos fenólicos totales en promedio de 396,8 mg EAG/g de extracto seco.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, contiene flavonoides totales en promedio de 30,5 mg ERu/g de extracto seco.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar el aislamiento y cuantificación de taninos y/o fenoles, ya que en la marcha fitoquímica que se realizó se pudo observar que el *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, presenta abundantes fenoles hidrolizables.
- Realizar el aislamiento de los metabolitos secundarios que se encuentran presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, responsables de la actividad antioxidante.
- Realizar la extracción de compuestos con actividad antioxidante con otros solventes y otras técnicas.
- Realizar estudios clínicos y farmacológicos para evaluar la eficacia y seguridad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gómez Ruiz LR. Evaluación de la actividad antioxidante en los extractos obtenidos por CO₂ supercrítico [Internet] [tesis]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Distrital de Francisco José de Caldas; 2017 [citado 2 de marzo de 2018]. Disponible en: C:\Users\FARMACIA\AppData\Local\Temp\GOMEZ RUIZ-3.pdf
2. Aguirre M, Aguirre SM, Isaza JH, Colmenares AJ, Ocampo DM, Jaramillo MT, et al. Actividad ictiotóxica de extractos de dos especies colombianas del género *Meriania Swartz* (melastomataceae) Rev. cubana de plantas medicinales. 2016; 21(2):203–214. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v21n2/pla08216.pdf>
3. Cerón Martínez LJ, López Ledesma IA. Extracción y cuantificación de compuestos con actividad antioxidante a partir de cascarras de tres variedades de papa (*solanum tuberosum*) en el departamento de Nariño. [Internet] [tesis]. [Nariño, Colombia]: Universidad de Nariño; 2013 [citado 15 de junio de 2018]. Disponible en: <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/89552.pdf>
4. 52.pdf
5. Ocampo DM, Valverde CL, Colmenares AJ, Isaza JH. Fenoles totales y actividad antioxidante en hojas de dos especies colombianas del género *Meriania* (melastomataceae). Rev. colomb. Quim. 2014; 43(2):41–46. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v43n2/v43n2a06.pdf>
6. Sousa C de M, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa C da, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quím Nova. 2007; 30(2):351–355. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/20.pdf>
7. Zaquinaula Ñahuazo FE. Determinación de la capacidad antioxidante en alimentos tradicionales [Internet] [Tesis]. [Loja, Ecuador]: Universidad Técnica Particular de Loja; 2016 [citado 8 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/16302/1/Zaquinaula%20%C3%B1ahuazo%20Fabi%C3%A1n%20Efra%C3%ADn.pdf>
8. Alarcón Zavaleta TM. Actividad antioxidante y biológica de extractos de maíz azul (*Zea mays L.*) [Internet] [tesis]. [Veracruz, México]: Universidad Veracruzana; 2011 [citado 7 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/46795/2/AlarconZavaletaTaniaMargarita1d2.pdf>
9. Vintimilla Gualan, MG. Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos agroindustriales de mango [Internet] [tesis]. [Loja, Ecuador]: Universidad Técnica Particular de Loja; 2013 [citado 10 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/5752/1/tesis%20terminadaa.pdf>
10. Sandino Ramirez TID. Anatomía y morfología comparada del desarrollo del ovario y fruto en la tribu Cyphostyleae (Melastomataceae), y su interpretación en un contexto filogenético. [Internet] [Tesis]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2011 [citado 8 de julio de 2018]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/4925/1/tamaraisabeldobaibasandinoramirez.2011.parte1.pdf>
11. Freire A, Fernández D, Quintana C. Usos de melastomataceae en el Ecuador. SIDA. 2002; 20(1):233–260. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/303289507_Usos_de_Melastomataceae_en_el_Ecuador

12. Reynel C, guía de identificación de las plantas comunes del derecho de vía ducto de Perú Ing, melchorita Perú Lng junio 2012. Pp 46. Disponible en: http://peruling.com/wp-content/uploads/2016/06/Guiaidentificacion_plantas.pdf.
13. García Ramírez AE. Evaluación in vitro/in vivo de propiedades antioxidantes de clones promisorios de papa criolla (*Solanum phureja*) [Internet] [tesis]. [Bogotá - Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2011 [citado 5 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8675/1/andreaelisagarciaramirez.2011.pdf>
14. Carvajal Aguilar MG. Evaluación de la actividad antioxidante de las hojas y frutos de la Feijoa (*Acca Sellowiana*) [Internet] [tesis]. [Riobamba, Ecuador]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2015 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://dspace.espacech.edu.ec/bitstream/123456789/4007/1/56T00530%20UDCTFC.pdf>
15. Oropeza Guerrero MP. Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de *Ipomoea murucoides* (casahuate) [Internet] [tesis]. [Oaxaca, México]: universidad tecnológica de la mixteca; 2012 [citado 5 de enero de 2018]. Disponible en: http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/11616.pdf
16. Martínez Dotor J. Efecto del procesamiento en el contenido de Compuestos Fenólicos y las propiedades antioxidantes de diferentes variedades de Frijol (*Phaseolus Vulgaris* L) mexicano [Internet] [tesis]. [Toluca, México]: universidad autónoma del estado de México; 2013 [citado 5 de enero de 2018]. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14379/407988.pdf?sequence=1>
17. Villanueva Bautista E. Contenido de betalaínas y determinación de la actividad antioxidante de accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd" quinoa" del distrito de Tambillo-Ayacucho 2014 [Internet] [tesis]. [Ayacucho, Perú]: universidad nacional de san Cristóbal de huamanga; 2015 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/977/Tesis%20B733_Vil.pdf?sequence=
18. Coavoy Sánchez IA. evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de la tuna morada (*Opuntia ficus-indica*) del distrito de san bartolomé, huarochirí, lima. [Internet] [tesis]. [Lima - Perú]: universidad peruana union; 2015 [citado 5 de enero de 2018]. Disponible en: http://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/UPEU/232/lbeth_Tesis_bachiller_2015.pdf?sequence=1
19. Muedas Taipe G. Estudio químico y de actividad antioxidante de la *Bauhinia guinensis* var. *kuntiana* Aubl. [Internet] [tesis]. [Lima, Peru]: PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ; 2013 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/4794/MUEDAS_TAIPE_GOLFER_ACTIVIDAD_ANTIOXIDANTE_BAUHINIA_GUINENSIS.pdf?sequence=1
20. Bohórquez Fajardo R. Determinación de actividad antioxidante de extractos de hojas de *Diplostegium phyllicoides* (Kunth) Wedd [Internet] [tesis]. [Bogotá, Colombia]: universidad de ciencias aplicadas y ambientales u.d.c.a.; 2016 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://repository.udca.edu.co:8080/jspui/bitstream/11158/591/1/Determinaci%C3%B3n%20de%20actividad%20antioxidante%20Displostephium%20philyciode.pdf>
21. Cerón Martínez LJ, López Ledesma IA. extracción y cuantificación de compuestos con actividad antioxidante a partir de cascara de tres variedades de papa (*solanum tuberosum*) en el departamento de Nariño [Internet] [tesis]. [San Juan de Pasto, Colombia]: Universidad de Nariño; 2013 [citado 6 de

- enero de 2018]. Disponible en: <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/89552.pdf>
22. Usquiano Lecoña IV. Evaluación de la capacidad antioxidante y determinación de compuestos fenólicos a partir de extractos de frutas de los valles de la Paz [Internet] [tesis]. [La Paz, Bolivia]: Universidad Mayor de San Andrés; 2013 [citado 20 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/4148/T-1841.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 23. Huaccho Huamán CV. capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenoides y antocianinas de 84 cultivares de mashua (*tropaeolum tuberosum ruiz y pavón*) [internet] [tesis]. [lima, Perú]: universidad nacional agraria la molina; 2016 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2844/Q04-H833-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 24. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. Investigación en plantas de importancia médica [Internet]. 1.ª ed. Mexico: OmniaScience; Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 2016 [citado 22 de febrero de 2018]. 452 p. Disponible en: <http://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/issue/view/34>
 25. Valenzuela Bustamante PD. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *ugni molinae turcz.* [Internet] [tesis]. [Santiago, Chile]: Universidad de Chile; 2015 [citado 6 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/134044/Evaluacion-de-la-actividad-antioxidante-y-determinacion-del-contenido-de-fenoles-totales-y-flavonoides.pdf;sequence=1>
 26. Organización Mundial de la Salud. Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección de Plantas Medicinales. Directrices de un grupo científico de la OMS. Ginebra, 2003
 27. Pérez F, Aponte GL, Avalos FR, Nuñez LV. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú. Pueblo cont. 2011; 22(2): 421-426. Disponible en: <file:///C:/Users/FARMACIA/AppData/Local/Temp/435-1596-1-PB-1.pdf>
 28. Miranda M, Cuéllar A. Manual de Prácticas de laboratorio. Farmacognosia y Productos naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad de la Habana: Editorial Félix Varela; 2000.
 29. Carpio Apaza RE, Figueroa Huayllapuma T. Efecto de la adición de goma arábica y maltodextrina en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en extracto de sancayo (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado [Internet] [tesis]. [Arequipa - Perú]: universidad nacional de san Agustín de Arequipa; 2017 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/3014/lacaapr.pdf?sequence=>
 30. Gómez Salguero D. Determinación de la capacidad antioxidante del aceite de híbrido de palma en diferentes estados de maduración [Internet] [tesis]. [Bogotá, Colombia]: pontificia universidad javeriana; 2014 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/16066/GomezSalgueroDaniela2014.pdf?sequence=1>
 31. Gonzales Gonzales L. Composición fenólica y actividad antioxidante de las hojas de *Mosiera crenulata* [Internet] [tesis]. [Cuba]: Universidad Central «Marta Abreu» de las Villas; 2016 [citado 8 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/>

- 6372/Lorena%20Gonz%C3%A1lez%20Gonz%C3%A1lez.pdf?sequence=1&isAllowed=y
32. palomino García IR. caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia [Internet] [Tesis de maestría]. [Medellín, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2009 [citado 20 de marzo de 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Lady-Palomino/publication/30757644Caracterizacion_fisicoquimica_y_evaluacion_de_la_actividad_antioxidante_de_propoleos_de_Antioquia/links/58adf85545851503be91e803/Caracterizacionfisicoquimica-y-evaluacion-de-la-actividadantioxidante-de-propoleos-de-Antioquia.pdf
 33. Carvajal Aguilar MG. Evaluación de la actividad antioxidante de las hojas y frutos de la Feijoa (*Acca Sellowiana*) [Internet] [tesis]. [Riobamba, Ecuador]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2015 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://dspace.esepoch.edu.ec/bitstream/123456789/4007/1/56T00530%20UDCTFC.pdf>
 34. Agudo Medina L. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Rev Electrónica Autodidacta*. 2010; pág. 27 - 34. Disponible en: http://www.academia.edu/13924487/T%C3%A9cnicas_para_la_determinaci%C3%B3n_de_compuestos_antioxidante_en_alimentos._Laura_Agudo_Medina_ISSN_19899041_Autodidacta
 35. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso Márquez CJ, Otero CM, Rojano B, Osorio JA. Actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* s.) en poscosecha. *Temas Agrar*. 2014;19(2):173 - 184. Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/temasagrarios/article/viewFile/732/848>
 36. Guayasamin Pérez LE, Aldana Pérez CD. evaluación de la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de *Ficus citrifolia* y caracterización química de los polifenoles [Internet] [tesis]. [Quito]: Universidad Politécnica Salesiana; 2014. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6011/1/UPSQT04207.pdf>
 37. Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc Tecnol. Aliment*. 2005;25(4):726–732. disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27642.pdf>
 38. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. Investigación en plantas de importancia médica [Internet]. 1.ª ed. Mexico: OmniaScience; Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 2016 [citado 22 de febrero de 2018]. 452 p. Disponible en: <http://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/issue/view/34>
 39. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo Editorial; 1994.
 40. Bruneton J. Plantas medicinales Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Primera edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España. 2001
 41. Villar M. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España. 1999.
 42. Iglesias J. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de pesca. [tesis de doctorado]. España. USC; 2009.
 43. Zhañay A. “relación entre la actividad antioxidante, y concentración de compuestos fenólicos contenidos en el fruto del pungal (*Solanum crinitipes*)”. Riobamaba-Ecuador, 2012. [Fecha de acceso 28 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://dspace.esepoch.edu.ec/bitstream/123456789/2582/1/56T00350.pdf>

44. Domínguez Marín LE. Efectos de la aplicación del extracto hidroalcohólico de flores de caléndula (*caléndula officinalis*) en la estabilización del color y vida útil en pulpa de frutas. [Internet] [Tesis]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2012 [citado 8 de noviembre de 2018].
45. Paladino SC. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*vitís vinífera* L.) [Internet] [Tesis]. [La Rioja, Colombia]: Universidad Nacional de Cuyo; 2012 [citado 8 de noviembre de 2018].
46. Toapanta Caguana S. Cambios en la capacidad antioxidante durante el almacenamiento refrigerado de uvilla (*Physalis peruviana* L.) orgánica sin capuchón tratada con radiación UV-C. [Internet] [tesis]. [Quito, Ecuador]: Universidad Tecnológica Equinoccial; 2012 [citado 18 de octubre de 2018].
47. Amaya L, Portillo C. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta visible. [internet] [tesis]. [San Salvador, El Salvador]. Universidad de El Salvador; 2013 [citado 16 de octubre del 2018].

IX. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación de *Brachyotum naudinii triana* “qihwncha”, Ayacucho 2017.



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

C E R T I F I C A

Que, el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fito medicamentos “Marco A. Garrido Malo”, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	MELASTOMATACEAE
GENERO	:	Brachyotum
ESPECIE	:	<i>Brachyotum naudinii</i> Triana.
N.V.	:	“qihwncha”

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

Ayacucho, 2 de Junio del 2017

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

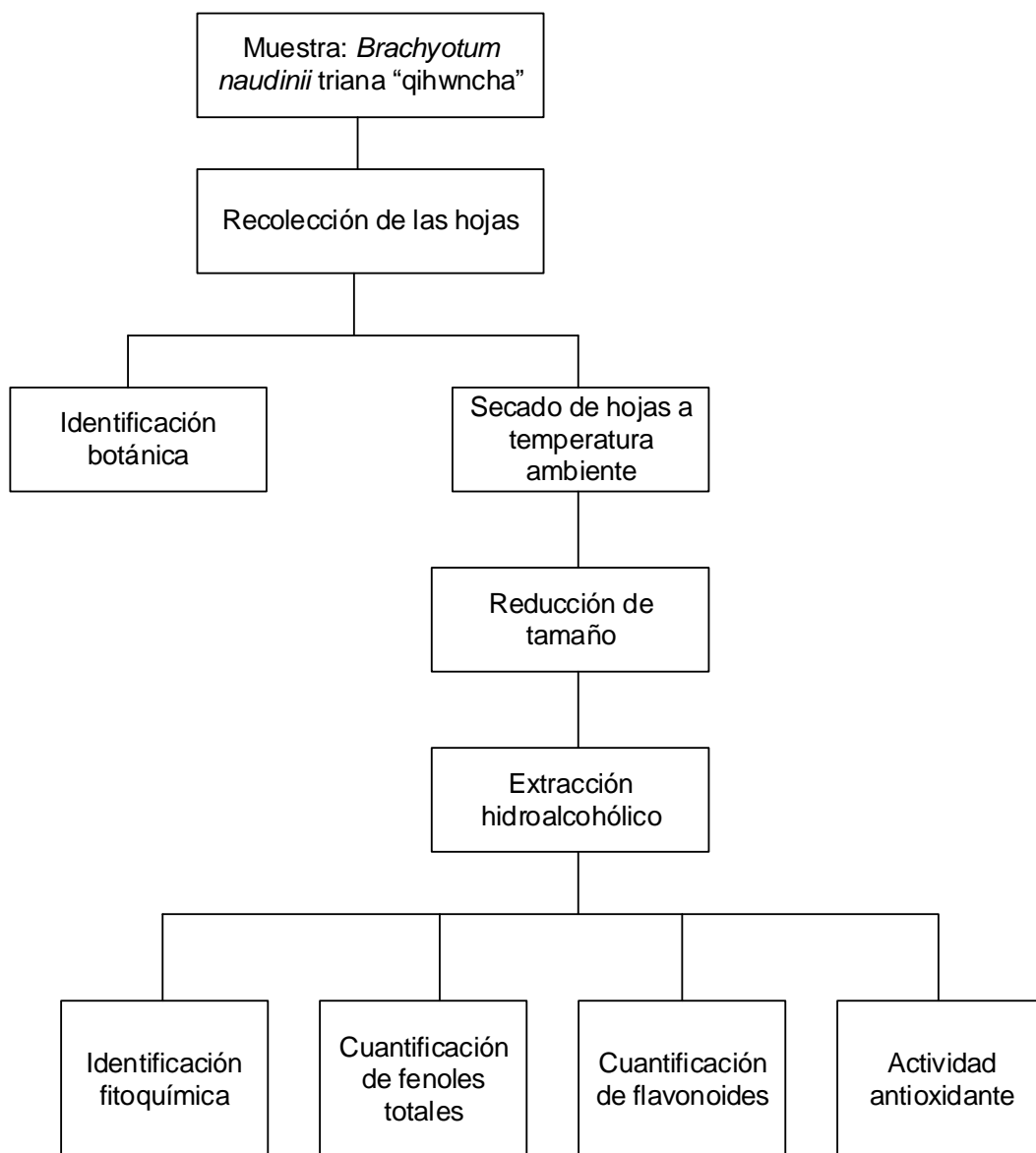
JEFE

Anexo 2. Fotografía de las hojas y flores de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



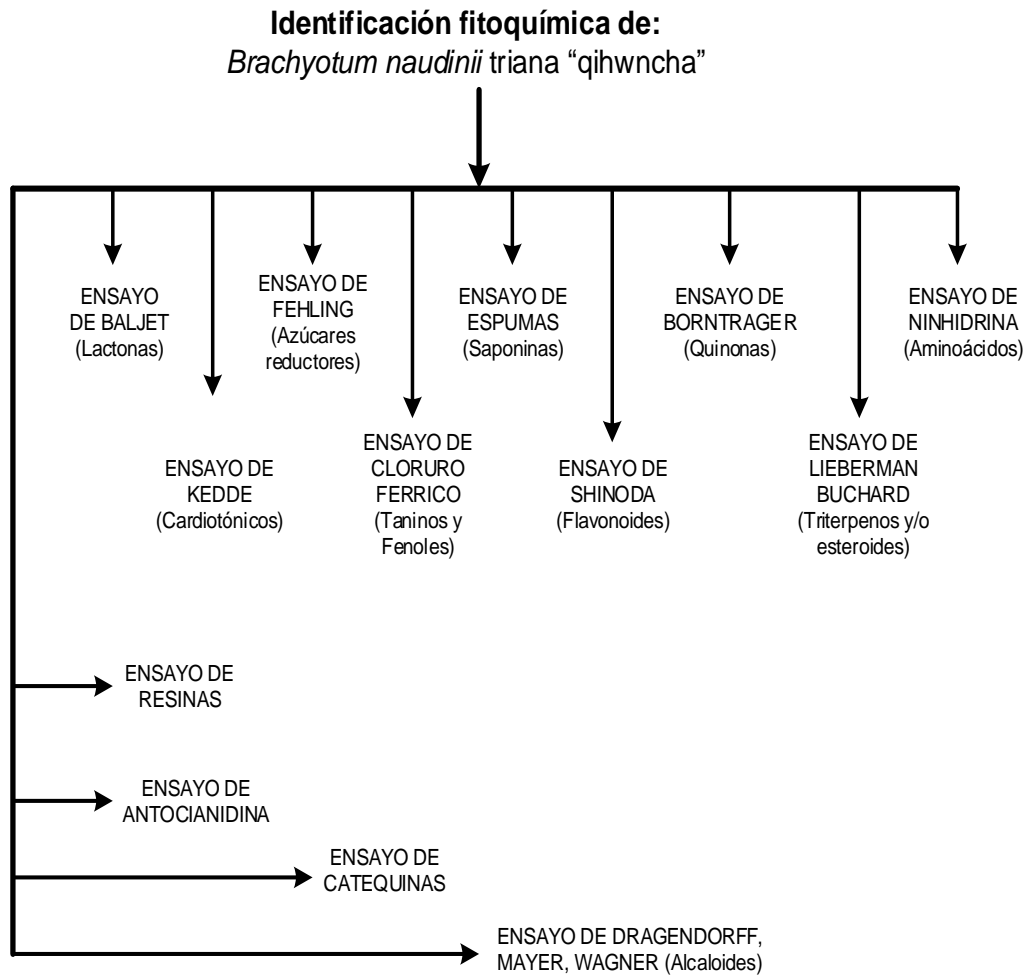
Fuente: fotografía propia

Anexo 3. Flujograma de procedimientos a seguir para la determinación de la actividad antioxidante de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



Fuente: elaboración propia

Anexo 4. Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



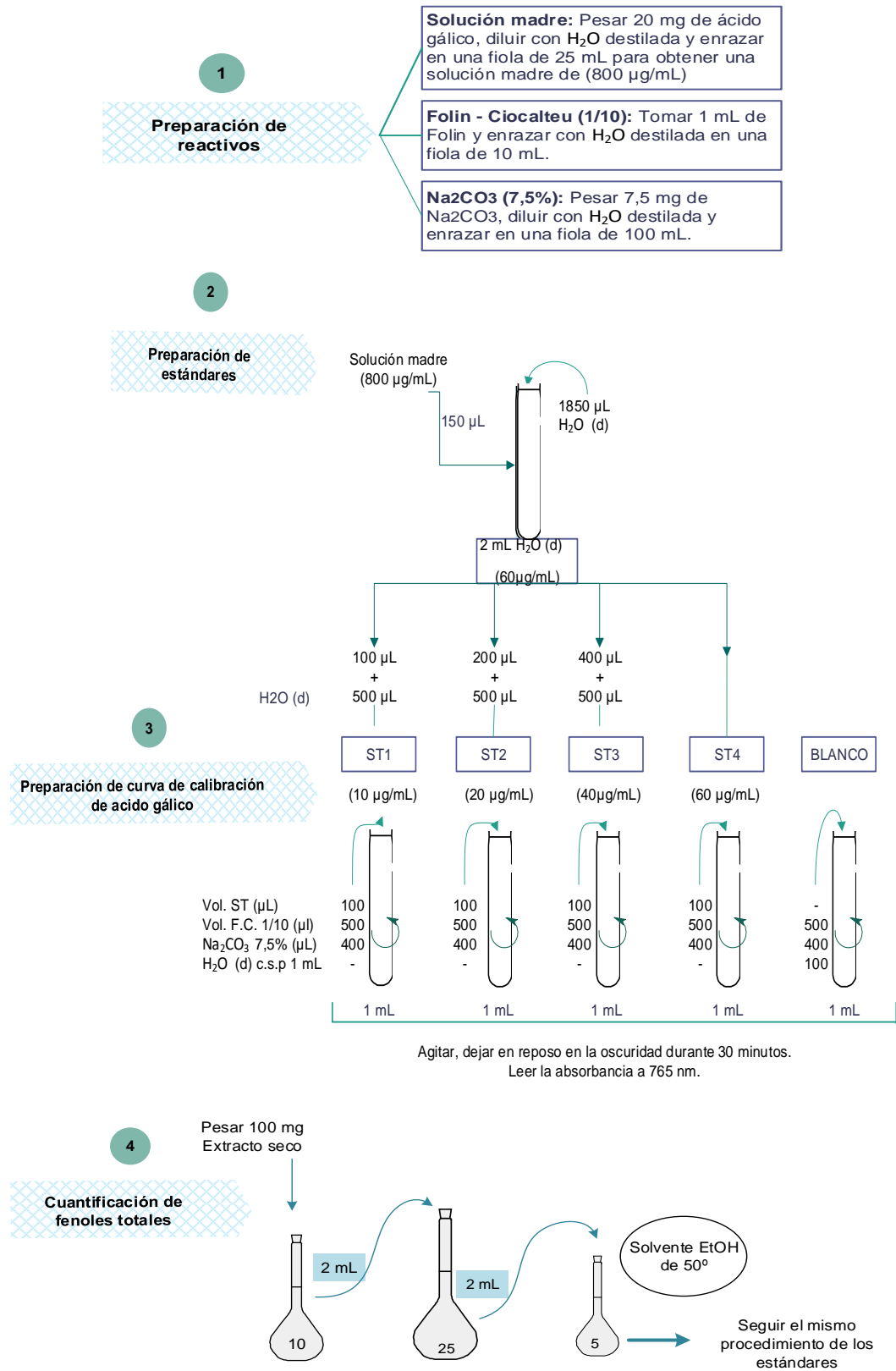
Fuente: elaboración propia

Anexo 5. Resultados de la identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

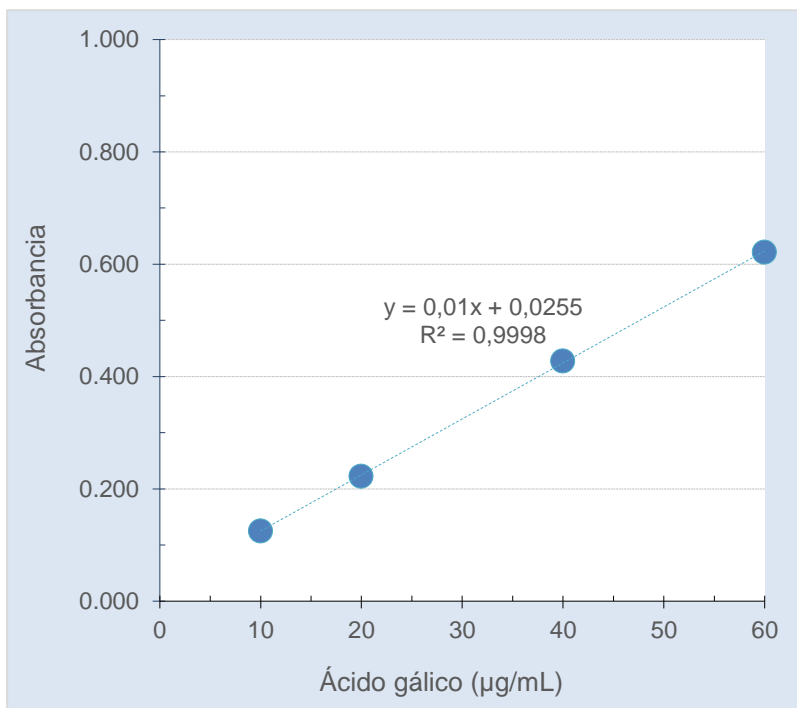


Fuente: fotografía propia

Anexo 6. Metodología para cuantificación de fenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu del extracto hidroalcohólico de las hojas de de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



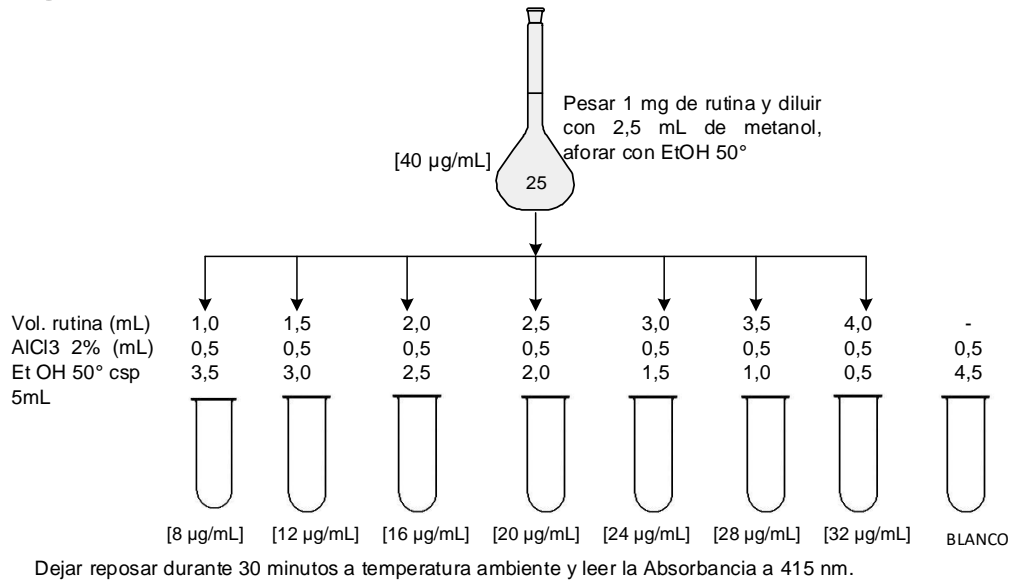
Anexo 7. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



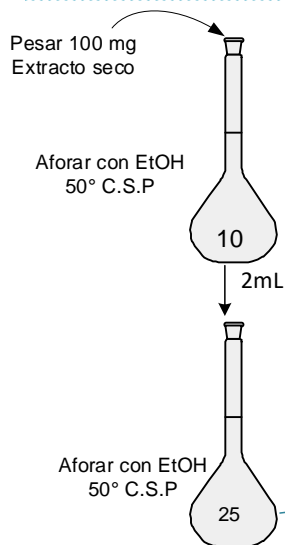
Anexo 8. Protocolo para la determinación del contenido de flavonoides totales en del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

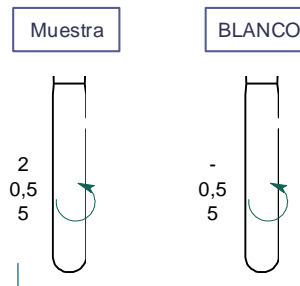
1 Preparación de la curva de calibración de rutina



2 Preparación de la muestra



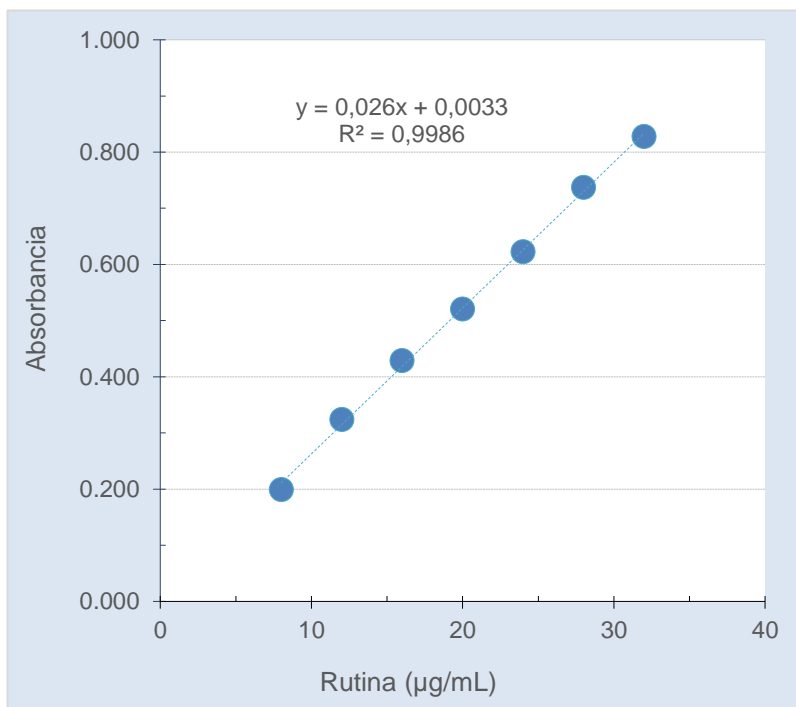
3 Lectura de muestras



Agitar, dejar en reposo en la oscuridad durante 30 minutos.
Leer la absorbancia a 415 nm.

Fuente: elaboración propia

Anexo 9. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



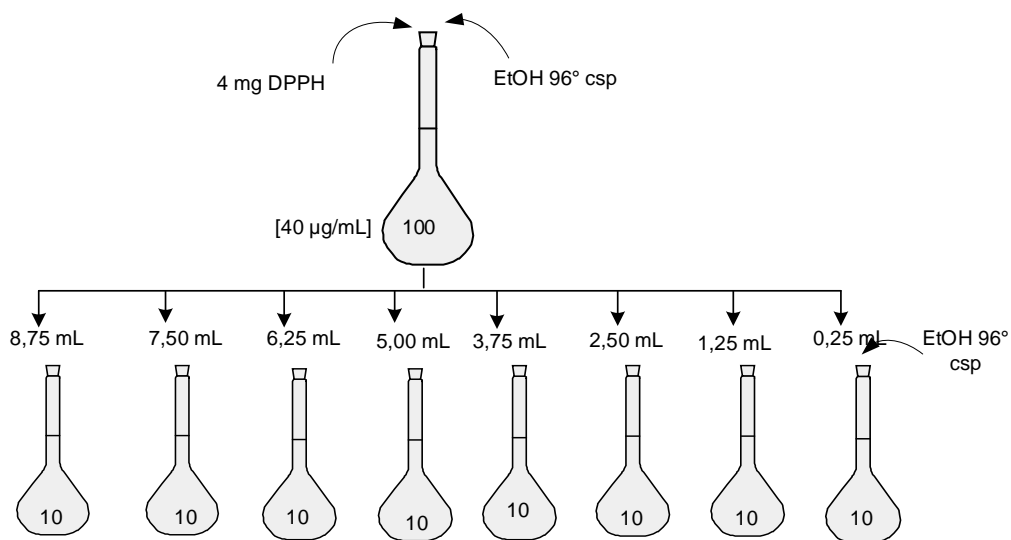
Anexo 10. Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

MÉTODO DPPH

1 Preparación de la solución de trabajo de DPPH

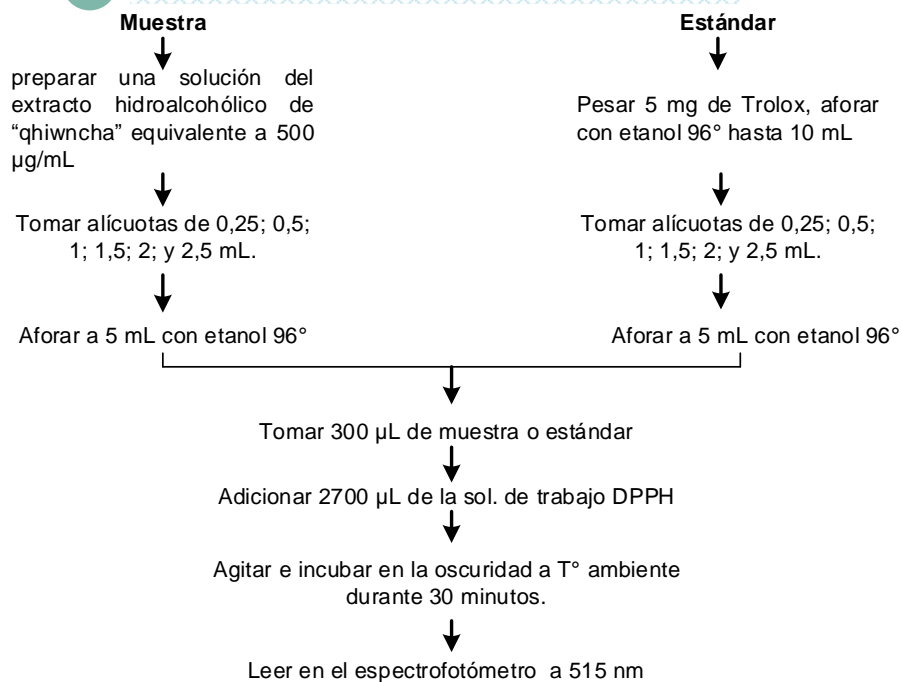
→ Pesar 4 mg de DPPH, aforar a 100 mL con EtOH 96°.

2 Preparación de la curva de calibración de DPPH



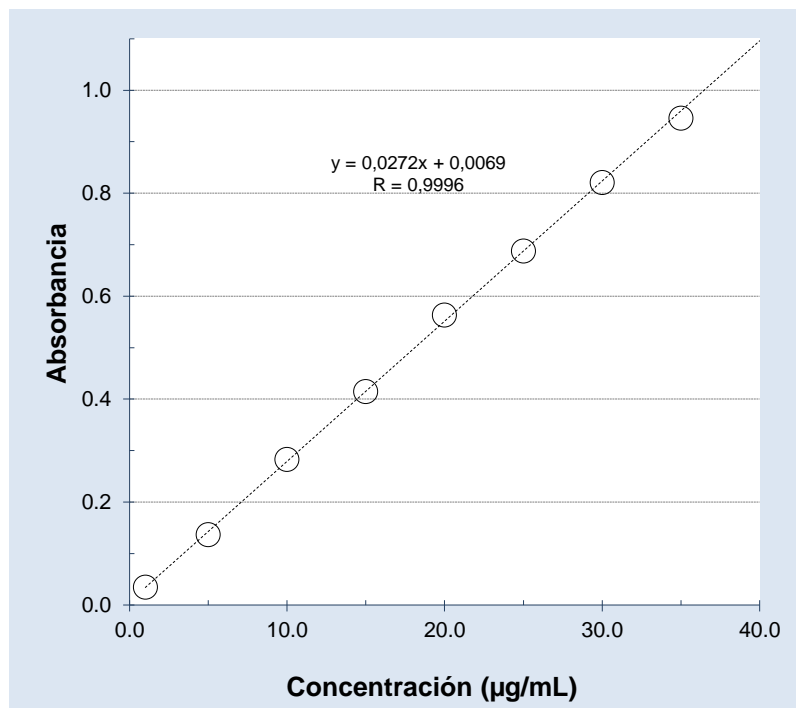
Leer la Absorbancia a 515 nm, calibrar el espectrofotómetro con EtOH 96°.

3 Determinación de la actividad antioxidante



Fuente: elaboración propia

Anexo 11. Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante, según el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



Anexo 12. Actividad antioxidante, según el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

Elaboración de la curva de calibración del radical DPPH



Actividad antioxidante de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”



Fuente: fotografía propia

Anexo 13. Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH.

a. Estándar Trolox

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

b. Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”.

[µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	23,72	0,848	3,576	2,11	25,83	21,61
50	45,88	0,531	1,158	1,32	47,20	44,56
100	80,03	0,470	0,587	1,17	81,19	78,86
150	93,15	0,313	0,336	0,78	93,93	92,37
200	94,03	0,165	0,176	0,41	94,44	93,62
250	93,05	0,095	0,103	0,24	93,29	92,81

Anexo 14. Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	28302,3	11,0	2572,9	12234,8	3,5 x 10 ⁻⁴²
Dentro de grupos	5,0	24,0	0,2		
Total	28307,4	35			

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes

Anexo 15. Prueba t student, de igualdad de varianzas de la concentración media inhibitoria (CI_{50}), mediante el método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	2,86	0,1658	-14,05	4	0,000149033	-4,466666667	0,32	-5,35	-3,58
No se asumen varianzas iguales			-14,05	2,594	0,0016	-4,466666667	0,32	-5,57	-3,36

Sig. bilateral = p

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes

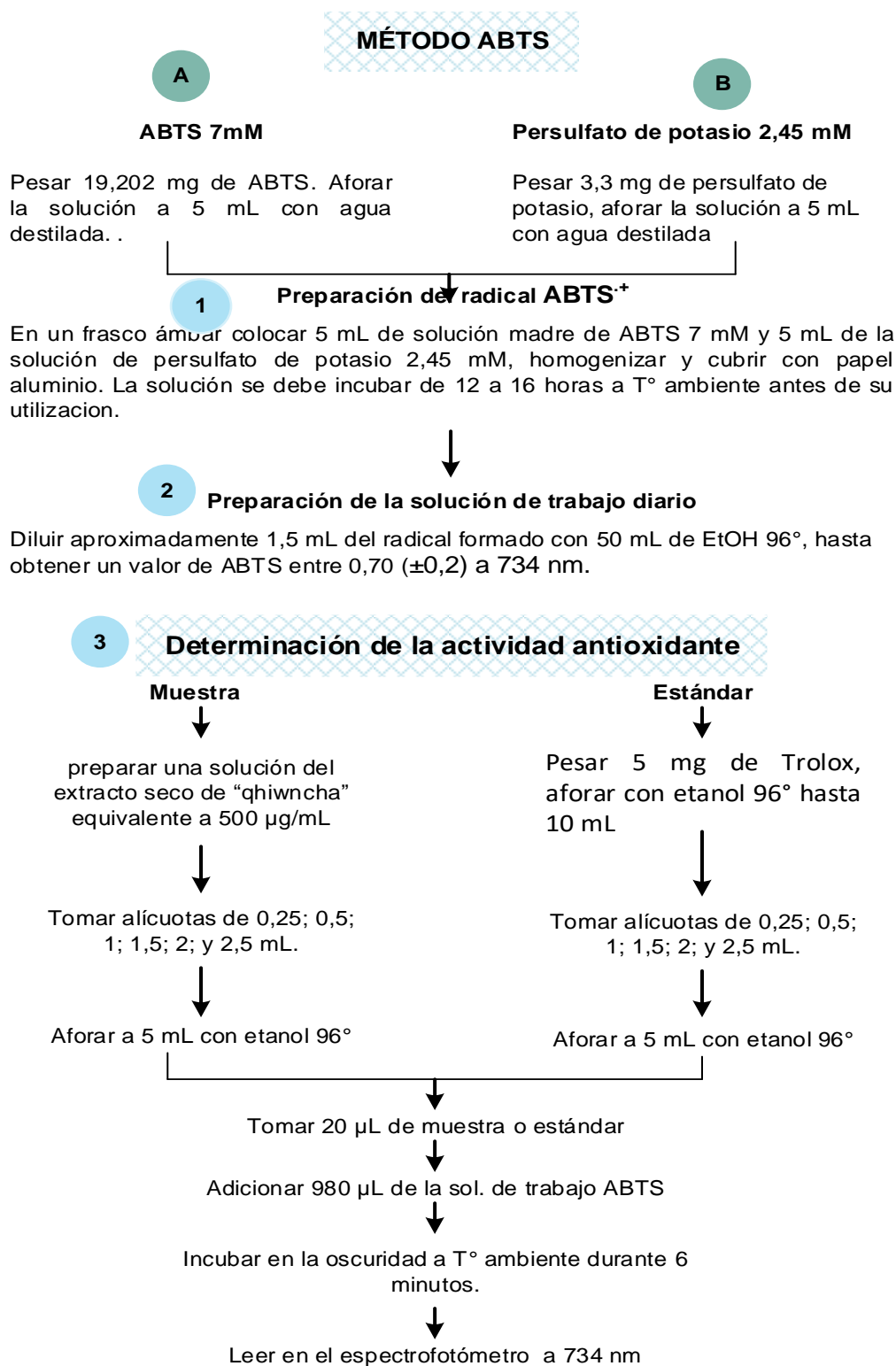
Anexo 16. Comparación múltiple de Duncan de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA							
		1	2	3	4	5	6	7	8
B. naudinii 25 µg/mL	3	23,7							
Trolox 25 µg/mL	3		25,3						
B. naudinii 50 µg/mL	3			45,9					
Trolox 50 µg/mL	3				49,1				
B. naudinii 100 µg/mL	3					80,0			
Trolox 100 µg/mL	3						94,4		
B. naudinii 150 µg/mL	3							93,2	
Trolox 150 µg/mL	3								97,0
B. naudinii 200 µg/mL	3								94,0
Trolox 200 µg/mL	3								96,5
B. naudinii 250 µg/mL	3								93,1
Trolox 250 µg/mL	3								96,6
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Se muestran las medias para los grupos en los subgrupos homogéneos

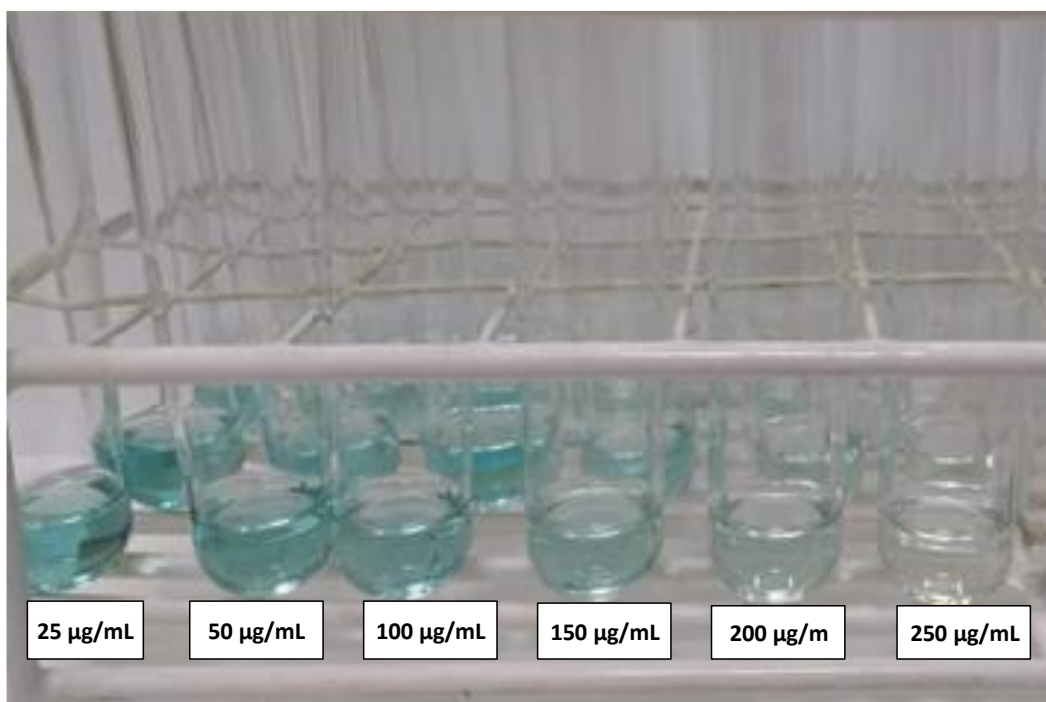
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,00

Anexo 17. Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



Fuente: Elaboración propia

Anexo 18. Actividad antioxidante por el método ABTS, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



Fuente: fotografía propia

Anexo 19. Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS.

a. Estándar Trolox

[µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	11,43	0,591	5,168	1,47	12,90	9,96
50	20,41	0,354	1,737	0,88	21,29	19,52
100	33,29	0,313	0,939	0,78	34,06	32,51
150	46,84	0,478	1,020	1,19	48,03	45,65
200	64,25	0,625	0,973	1,55	65,81	62,70
250	76,02	1,523	2,004	3,78	79,80	72,23

b. Extracto hidroalcohólico de las hojas de de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”

[µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	13,39	0,608	4,536	1,51	14,90	11,88
50	22,32	0,739	3,311	1,84	24,16	20,49
100	33,83	0,306	0,904	0,76	34,59	33,07
150	57,99	2,175	3,750	5,40	63,39	52,58
200	72,02	0,964	1,339	2,40	74,42	69,63
250	87,47	0,649	0,742	1,61	89,08	85,86

Anexo 20. Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3059,6	5,0	611,9	271,3	6,58 x 10 ⁻¹²
Dentro de grupos	27,1	12,0	2,3		
Total	3086,7	17			

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes

Anexo 21. Prueba T student de igualdad de varianzas de la concentración media inhibitoria (CI50), mediante el método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	0,06	0,8259	13,19	4	0,000190604	21,03	1,59	16,60	25,46
No se asumen varianzas iguales			13,19	3,921	0,0002	21,03	1,59	16,57	25,49

Sig. bilateral = ρ

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes

Anexo 22. Comparación múltiple de Duncan de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA					
		1	2	3	4	5	6
Trolox 150 µg/mL	3	46,8					
B_naudinii 150 µg/mL	3		58,0				
Trolox 200 µg/mL	3			64,3			
B_naudinii 200 µg/mL	3				72,0		
Trolox 250 µg/mL	3					76,0	
B_naudinii 250 µg/mL	3						87,5
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Se muestran las medias para los grupos en los subgrupos homogéneos

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,0

Anexo 23. Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

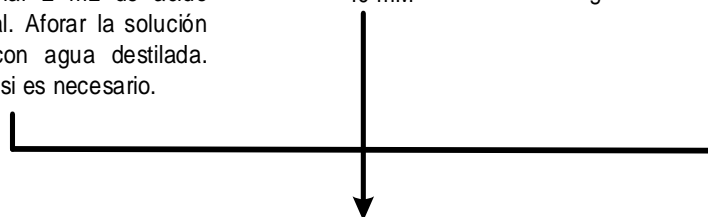
METODO FRAP

Buffer acetato de sodio 0,3 mM PH 3,6	Solución TPTZ 10 Mm	Solución FeCl₃. 6H₂O 20 Mm
--	----------------------------	---

Pesar 6,15 mg de acetato de sodio, adicionar 2 mL de ácido acético glacial. Aforar la solución a 250 mL con agua destilada. Ajustar el PH si es necesario.

Pesar 78 mg de TPTZ, aforar a 25 mL con HCl 40 mM

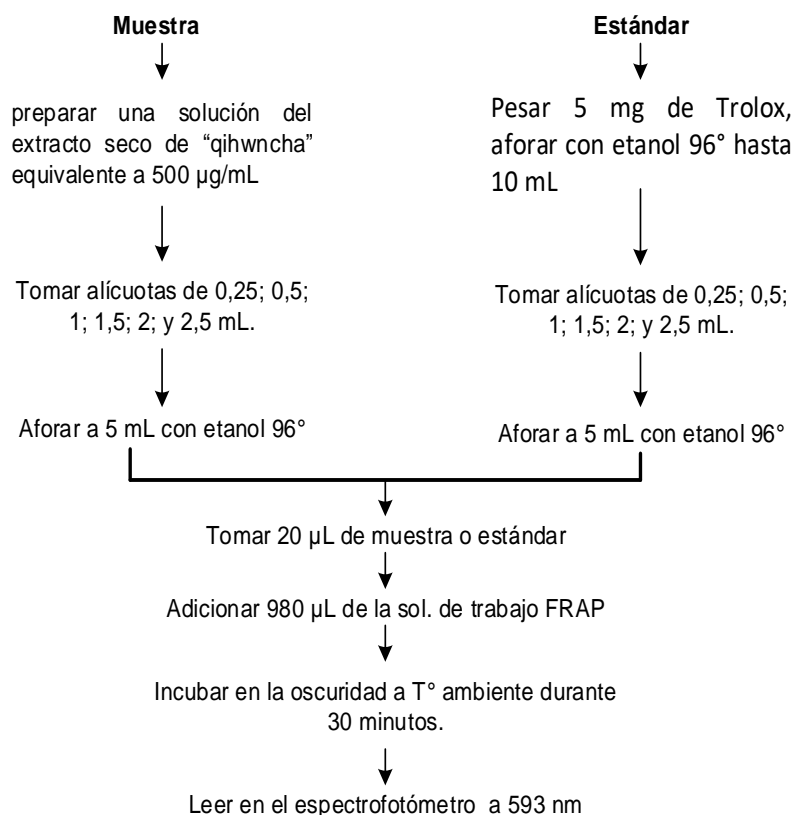
Pesar 135,2 mg de cloruro férrico, aforar a 25 mL con agua destilada



Preparación de la solución de trabajo diario

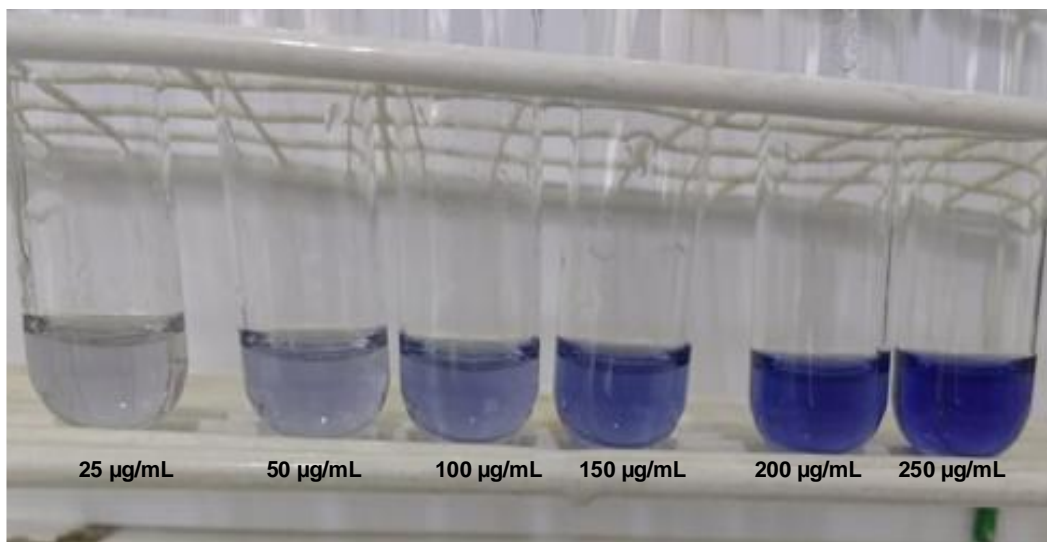
Mezclar 25 mL de buffer acetato + 2,5 mL de TPTZ + 2,5 mL de FeCl₃. 6H₂O calentar a 37 °C, mantener a esa temperatura durante todo el trabajo.

Determinación de la actividad antioxidante



Fuente: elaboración propia

Anexo 24. Actividad antioxidante por el método la captación del ión férrico (Fe^{+3}) FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.



25

Fuente: fotografía propia

Anexo 25. Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del ión férrico (Fe⁺³) FRAP.

a. Estándar Trolox

[µg/mL]	TX	S	%CV	+/-	LS	LI
25	43,97	1,368	3,112	3,40	47,37	40,57
50	56,51	1,084	1,919	2,69	59,20	53,81
100	71,81	0,322	0,448	0,80	72,61	71,01
150	80,20	0,017	0,021	0,04	80,24	80,16
200	84,16	0,095	0,113	0,24	84,40	83,92
250	86,97	0,137	0,157	0,34	87,30	86,63

b. Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”

[µg/mL]	X _{50°}	S	%CV	+/-	LS	LI
25	40,73	0,336	0,826	0,84	41,56	39,89
50	57,09	0,347	0,608	0,86	57,95	56,23
100	74,37	0,373	0,501	0,93	75,30	73,44
150	81,43	0,168	0,206	0,42	81,84	81,01
200	84,89	0,533	0,628	1,32	86,21	83,56
250	87,87	0,106	0,121	0,26	88,13	87,60

Anexo 26. Análisis de varianza de la actividad antioxidante mediante la captación del ión férrico (Fe^{+3}) FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	135,8	5,0	27,2	307,6	$3,12 \times 10^{-12}$
Dentro de grupos	1,1	12,0	0,1		
Total	136,9	17			

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes

Anexo 27. Prueba de T student de igualdad de varianzas de la concentración media inhibitoria (CI50), mediante la captación del ión férrico (Fe⁺³) FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brachyotum naudinii* triana “qihwncha”, Ayacucho 2018.

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	0,01	0,9263	-6,00	4	0,003874036	-2,523333333	0,42	-3,69	-1,36
No se asumen varianzas iguales			-6,00	4,000	0,0039	-2,523333333	0,42	-3,69	-1,36

Sig. bilateral = p

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes

Anexo 28. Comparación múltiple de Duncan de la actividad antioxidante mediante la captación del ión férrico (Fe^{+3}) FRAP, del extracto hidroalcohólico de las hojas de de *Brachyotum naudinii triana* “qihwncha”, Ayacucho 2018.

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA					
		1	2	3	4	5	6
Trolox 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3	80,2					
<i>Brachyotum naudinii triana</i>	3		81,4				
Trolox 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3			84,2			
<i>Brachyotum naudinii triana</i>	3				84,9		
Trolox 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3					87,0	
<i>Brachyotum naudinii triana</i>	3						87,9
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Se muestran las medias para los grupos en los subgrupos homogéneos

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,0

Anexo 29
Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de <i>Brachyotum naudinii</i> triana y "qihwncha", Ayacucho 2018.</p>	<p>¿Cuál es la actividad antioxidant e, contenido de compuesto s fenólicos y flavonoide s de <i>Brachyotum naudinii</i> triana "qihwncha" ?</p>	<p>Objetivos Generales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar el Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y Actividad antioxidante de <i>Brachyotum naudinii</i> Triana "qihwncha", Ayacucho 2018. <p>Objetivos Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar la composición fitoquímica de <i>Brachyotum naudinii</i> Triana "qihwncha", • Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos de las hojas <i>Brachyotum naudinii</i> Triana "qihwncha", • Cuantificar el contenido de flavonoides totales de las hojas <i>Brachyotum naudinii</i> Triana "qihwncha", • Determinar la capacidad antioxidante de las hojas <i>Brachyotum naudinii</i> Triana "qihwncha", por el método DPPH, ABTS, FRAP. 	<ul style="list-style-type: none"> • Familia melastomataceae • Genero <i>Brachyotum</i> • <i>Brachyotum naudinii triana</i> "qihwncha", • Clasificación taxonómica • Descripción botánica • Hábitat y distribución geográfica • Radical libre <p>Se considera un radical libre (RL) a una entidad química de átomo o molécula que presenta un electrón desapareado en el orbital externo y puede tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Una molécula se convierte en radical libre al perder o ganar un electrón.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antioxidantes <p>Primarios Secundarios</p>	<p><i>Brachyotum naudinii</i> triana "qihwncha" presenta elevada concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante</p>	<ul style="list-style-type: none"> • variable 1 <p>contenido de fenoles totales</p> <p>indicador</p> <p>mgAG / g de extracto seco</p> <ul style="list-style-type: none"> • variable 2 <p>contenido de flavonoides</p> <p>indicador</p> <p>mgRut / g de extracto seco</p> <ul style="list-style-type: none"> • variable 3 <p>capacidad antioxidante</p> <p>indicadores</p> <p>Porcentaje de actividad antioxidante CI50.</p>	<p>Tipo de estudio: Básico</p> <p>Nivel de estudio: descriptivo</p> <p>Diseño muestral:</p> <p>Población:</p> <p>Hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana DC."qihwncha"." que crecen en zonas áridas, del centro poblado de Waraca anexo Anchachuasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho.</p> <p>Muestra:</p> <p>Hojas de <i>Brachyotum naudinii</i> triana DC."qihwncha", recolectadas centro poblado de Waraca anexo Anchachuasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho.</p> <p>Metodología:</p> <p>La cuantificación de fenoles totales se realizará por el método de Folin – Ciocalteau,</p> <p>La cuantificación de flavonoides se realizará de acuerdo al método utilizado por Cleyton Marcos de M. Sousa.</p> <p>La capacidad antioxidante se determinará por el método de DPPH, ABTS y FRAP</p> <p>Instrumentos</p> <p>Los datos se recolectarán usando un espectrofotómetro UV-VIS.</p> <p>Análisis de datos:</p> <p>Los datos serán organizados en una matriz para calcular la media y la desviación estándar, asimismo, serán graficados en forma de histogramas y barras, con un nivel de confianza del 95%,</p>