

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad
antioxidante del extracto atomizado de las hojas de
Baccharis uniflora (Ruiz & Pav) pers "chilca".

Ayacucho - 2018.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por:

Bach. ZANABRIA CARBAJAL, Tania Mirian

AYACUCHO - PERÚ

2019

A Dios, fuente inagotable de mis fortalezas en este camino que se llama “vida”, y por permitirme seguir adelante a pesar de las adversidades.

A mi familia por su apoyo incondicional, por ser el pilar más importante en mi vida.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de mi formación profesional y por brindarme los espacios necesarios para la elaboración de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias de la Salud y a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, a los excelentes docentes que elaboran en ella, quienes contribuyeron en mi formación y por habernos inculcado conocimientos y valores.

A mi asesor Q.F. Marco R. Arones Jara, por su dirección y el apoyo que me ha demostrado durante el tiempo que duro la investigación, confiando en mí en todo momento durante los momentos difíciles que he atravesado a lo largo de la elaboración de este trabajo, del mismo modo, por hacerme participe en el proyecto FOCAM.

A los jurados revisores quienes con sus sugerencias, dedicación y aclaraciones desinteresadas participaron en la elaboración del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. Baccharis	6
2.3. Radicales libres	8
2.4. Estrés oxidativo	9
2.5. Compuestos fenólicos	11
2.6. Medición de la actividad antioxidante	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	17
3.2. Definición de la población y muestra	17
3.2.1. Población	17
3.2.2. Muestra	17
3.2.3. Muestreo	17
3.2.4. Unidad experimental	18
3.3. Diseño metodológico	18
3.3.1. Recolección e identificación de la muestra vegetal	18
3.3.2. Preparación de La muestra.	18
3.3.3. Tamizaje fitoquímico	18
3.3.4. Determinación del contenido de fenoles totales	19
3.3.5. Determinación del contenido de flavonoides totales	20
3.3.6. Determinación de la actividad antioxidante in vitro	21
3.4. Tipo y diseño de investigación	22
3.4.1. Tipo de investigación	22
3.4.2. Diseño de investigación	22
3.5. Análisis de datos	22

IV. RESULTADOS	23
V. DISCUSIÓN	29
VI. CONCLUSIONES	33
VII. RECOMENDACIONES	35
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz & Pavon) Pers “chilca”.	6
Tabla 2. Clasificación de los radicales libres	9
Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes exógenos y endógenos.	11
Tabla 4. Clasificación de los polifenoles y ejemplos	12
Tabla 5. Comparación de métodos para medir capacidad antioxidante basada en la instrumentación requerida, la relevancia biológica, el mecanismo antioxidante, el punto final, el método de cuantificación y la adaptabilidad para medir antioxidantes lipofílicos o hidrofílicos.	15
Tabla 6. Identificación de metabolitos secundarios de las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho, 2018	25
Tabla 7. Concentración media inhibitoria (IC50%) de la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho, 2018	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Planta de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz & Pavon) Pers “chilca”.	7
Figura 2. Interacción entre radicales libres y antioxidantes.	10
Figura 3. Estructura básica de los compuestos fenólicos.	13
Figura 4. Estructura básica de los flavonoides	13
Figura 5. Clasificación de los flavonoides.	14
Figura 6. Reacción del DPPH* con el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	16
Figura 7. Contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho, 2018	26
Figura 8. Porcentaje de actividad antioxidante por el método de DPPH del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho, 2018	27

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Certificado de identificación botánica de <i>Baccharis uniflora</i> (R&P) Pers “chilca”. Ayacucho 2018	43
Anexo 2. Flujograma de recolección y preparación de la muestra de <i>baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018.	44
Anexo 3. Flujograma de obtención de extracto atomizado de las hojas <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”, cuantificación de fenoles y flavonoides, determinación de la actividad antioxidante.	45
Anexo 4. Resultado de la identificación fitoquímica en extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018.	46
Anexo 5. Procedimiento para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.	47
Anexo 6. Procedimiento para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018.	48
Anexo 7. Curva de calibración de Quercetina para la cuantificación de flavonoides totales.	49
Anexo 8. Procedimiento para la determinación del contenido de Flavonoides totales del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018.	50
Anexo 9. Resultado de las coloraciones que presentaron los fenoles y flavonoides en el extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018.	51
Anexo 10. Procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018.	52
Anexo 11. Resultados de la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018	53

Anexo 12.	Análisis de varianza de la actividad antioxidante por el método de DPPH del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018	54
Anexo 13.	Comparaciones múltiples de Duncan de las medias de actividad antioxidante por el método de DPPH del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018	55
Anexo 14.	Prueba de T de Student de la concentración media inhibitoria de la actividad antioxidante, según el método DPPH del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018	56
Anexo 15.	Matriz de consistencia	57

RESUMEN

La actividad antioxidante cumple una función importante en las enfermedades neurodegenerativas ya que contribuye a la disminución de los radicales libres, estrés oxidativo y prevención de células cancerígenas. Los objetivos planteados de este trabajo de investigación fueron demostrar la actividad antioxidante, cuantificar el contenido de flavonoides y compuestos fenólicos del extracto de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca” e identificar los metabolitos secundarios. Este estudio descriptivo se realizó en el laboratorio de 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, durante los meses de octubre del 2018 y marzo del 2019 en la ciudad de Ayacucho. Los metabolitos principales presentes en el extracto atomizado fueron: flavonoides, taninos, fenoles y triterpenos. El contenido de fenoles totales fue de 155,3 mg EAG/g EA. Mientras el contenido de flavonoides fue 32,2 +/- 0,05 mg ER/g EA. Finalmente se determinó la actividad antioxidante del extracto atomizado de hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”, mediante el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). La concentración inhibitoria 50 (CI50) del extracto atomizado de hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca” sobre el radical DPPH fue de 286,8± 1,01 µg/mL. Finalmente se concluye que, el extracto atomizado de hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”, presenta compuestos bioactivos con propiedades antioxidante.

Palabras claves: *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers, fenoles, flavonoides, antioxidante, DPPH.

I. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales, el hombre ha estado dependiendo de la Madre Naturaleza para todas sus necesidades básicas.¹ Es por ello que forman parte de lo que ahora se conoce como medicina tradicional²

El género *Baccharis* es uno de los géneros más importantes de la familia asteraceae,¹ que representa una de las familias más numerosas de angiospermas con más de 1500 géneros y más de 20 000 especies. Las asteráceas ocupan el segundo lugar entre las familias más diversas de la flora peruana. Esta familia es reconocida en el Perú por presentar alrededor de 245 géneros y 1530 especies. El género *Baccharis* es exclusivamente americano y presenta 250 especies, 70 de las cuales están presentes en el Perú y 20 de estas son endémicas.²

Se utilizan ampliamente en América del Sur, no solo en medicina tradicional, sino también por su importancia económica y ambiental.³ Las diferentes especies del género *Baccharis* en medicina popular se usa por sus propiedades digestivas, hepatoprotectoras, antiinflamatorias como analgésicos en varias dolencias, contusiones e inflamaciones,^{3, 4} diuréticos, tratamiento de la diabetes, antibiótico, enfermedades gastrointestinales, úlceras.⁴ Los efectos benéficos de estas especies pueden ser atribuidos al menos en parte a las propiedades antioxidantes y depuradoras de radicales libres.⁴

Actualmente, el estudio de antioxidantes naturales tiene un importante impacto científico y económico, en tal sentido, nuestro país tiene un abundante riqueza en cuanto a las plantas silvestres con potentes efectos antioxidantes y pigmentos naturales que bien podrían ser utilizadas en la industria dermocosmética y en la industria alimentaria.⁵ La actividad antioxidante cumple una función importante en las enfermedades neurodegenerativas ya que contribuye a la disminución de los radicales libres, estrés oxidativo y prevención de células cancerígenas.⁹ Estudios químicos previos sobre diferentes especies del género *Baccharis* han

encontrado varios compuestos como terpenoides, tricotecenos, cromenas y flavonoides.¹ Además, se ha revelado que los extractos de plantas son una fuente importante de compuestos químicos con alta actividad antioxidante. Este capítulo pretende resumir los principales temas relacionados con la actividad antioxidante que se encuentran en extractos de plantas o metabolitos secundarios como los fenoles y los flavonoides, entre otros compuestos aislados de fuentes naturales. También se han incluido varios métodos para determinar la capacidad antioxidante.⁶

Los radicales libres son compuestos altamente inestables que contiene uno o más electrones desapareados, que fácilmente conducen a reacciones incontroladas generando un estrés oxidativo.^{10,7}

La finalidad de esta investigación no es descubrir un nuevo fármaco u obtenerlo; lo que se trata es demostrar la actividad antioxidante in vitro de los compuestos fenólicos y flavonoides totales cuantificados y obtenidos del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers, debido a que la planta no cuenta con estudios, por lo tanto, éste sería el primer trabajo realizado para la comunidad científica. También se realizó el análisis fitoquímico preliminar. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación está enfocada en contribuir con la búsqueda de nuevos antioxidantes de origen natural que enriquezca el conocimiento actual sobre los antioxidantes y su papel en la salud humana. Por otro lado, el trabajo tiene utilidad metodológica ya que podrían realizarse futuras investigaciones que utilizaran metodologías compatibles.

Objetivo general

Demostrar la actividad antioxidante y cuantificar el contenido de flavonoides y compuestos fenólicos del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”, Ayacucho - 2018

Objetivo específico

- Realizar la identificación fitoquímica del extracto atomizado de las hojas *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”.
- Determinar el contenido de flavonoides del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”.
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”.
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Hasta la actualidad aún no se ha reportado ningún trabajo de investigación farmacológico ni químico de la especie *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers "chilca", pero si se ha encontrado trabajos de investigación realizados sobre otras especies de la misma familia.

Tiopanta T², realizó un trabajo de investigación en el año 2018 cuyo título fue: "Evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas de *Baccharis genistelloides* (Lam.) pers"; donde el material vegetal fue recolectado en la provincia de Loja. El extracto fue obtenido por maceración usando etanol al 70% como solvente, y posteriormente se concentró y liofilizó, siguiendo un procedimiento estándar. El tamizaje fitoquímico indico la presencia de flavonoides, alcaloides, triterpenos, saponinas y taninos entre los más representativos. El extracto liofilizado de hojas de *B. genistelloides* presento 504,82 mg QE/g de flavonoides y 225,76 mg GA/g de fenoles totales. La actividad antioxidante se evaluó mediante el método DPPH, en términos de IC₅₀ se obtuvo un valor de 303,28 µg/mL

Bianchina et al⁶, realizaron un estudio en el año 2018 titulada: "Capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos del extracto fluido de hojas y tallos de *Baccharis genistelloides*". Este trabajo tuvo como objetivo determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los flavonoides totales extraídos de las hojas y tallos de *Baccharis genistelloides*. Se hizo la determinación cualitativa de flavonoides totales mediante la reacción de Shinoda y se cuantificó por el método espectrofotométrico de Kostennikova Z, utilizándose Quercetina como estándar a 256 nm. La capacidad antioxidante se determinó mediante el método descrito por Brand Williams, para ello se utilizó el extracto fluido de las hojas y tallos de *Baccharis genistelloides* a diferentes concentraciones, los resultados fueron expresados en porcentaje de captura del radical libre 2;2-

difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Se encontró una concentración de flavonoides totales de $0,64\% \pm 0,0116$, determinándose que la capacidad antioxidante es directamente proporcional a la concentración de flavonoides. Se concluyó que *Baccharis genistelloides* contiene flavonoides con actividad antioxidante proporcional a su concentración.

Almeyda⁸, realizó un estudio en el año 2017 cuyo título fue: "Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017". El estudio tuvo como objetivo, determinar la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Se recolectó las hojas en el centro poblado de Anchac - Wasi (Huaraca) del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. El extracto atomizado se obtuvo en el atomizador Mini Spray Dryer B-290 a partir del concentrado del extracto hidroalcohólico, en el que se evaluaron sus características organolépticas y fisicoquímicas, así como la cuantificación de los compuestos fenólicos totales por el método Folin-Ciocalteu y el porcentaje de actividad antioxidante por el método de DPPH. El extracto atomizado presentó un color marrón claro; olor suigéneris; sabor amargo; aspecto resinoso; solubilidad en metanol; pH de 6,34; humedad de 6,70%; cenizas de 5,21% y un rendimiento de 6,8%. De la cuantificación de compuestos fenólicos totales se pudo determinar un promedio de $15,9 \pm 0,5$ mg EAG/g de extracto atomizado y un nivel de significancia de $p > 0,05$ entre el porcentaje de actividad antioxidante del ácido gálico y el extracto atomizado a diferentes concentraciones.

Rodríguez et al⁹, realizaron un estudio en el año 2015 cuyo título es: "Actividad antibacteriana y antioxidante de *Baccharis revoluta* Kunth". Donde el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana y antioxidante de las partes aéreas de *Baccharis revoluta*, la especie fue colectada en el municipio de Chocontá, Cundinamarca. Las pruebas de eficacia antimicrobiana exhibieron inhibición significativa de los extractos. Además, los extractos etanólicos presentaron una actividad antioxidante representativa, con una IC_{50} y actividad antioxidante relativa de 7,2% y 43,64%, para el extracto etanólico de hoja 6,95% y 45,57% para el extracto etanólico de tallos y 7,1% y 44,16 % para el extracto etanólico de flores, lo que nos determina una gran potencialidad de estos extractos etanólicos.

Andrade et al¹⁰, realizaron un estudio en el año 2014 que lleva por título: " Perfil fenólico y actividad antioxidante de extractos de hojas y flores de yacón

(*Smallanthus sonchifolius*). En este trabajo los compuestos fenólicos individuales encontrados en los extractos se caracterizaron y cuantificaron mediante HPLC-DAD. La extracción por decocción de las hojas mostró los valores fenólicos y flavonoides totales más altos a 42,20 mg GAE/g dw y 39,71 mg RE/g dw, respectivamente. Los compuestos fenólicos más abundantes en los extractos de hojas (1,97 y 2,81 mg/g dw, respectivamente) fueron el ácido gálico (ácido 3;4;5-trihidroxibenzoico) y la rutina (quercetina-3-rutinosido trihidroxidrato). Myricetin (3;3;4;5;7-hexahydroxyflavone) y ácido gálico (3;4;5-trihydroxybenzoic acid) fueron los compuestos fenólicos encontrados en las cantidades más altas en los extractos de flores (16,09 y 1,36 mg/g dw, respectivamente) y estos compuestos se identificaron y cuantificaron en este estudio por primera vez. La decocción de las hojas de yacón exhibió la mayor actividad antioxidante en el ensayo DPPH a $EC_{50} = 220,50$ g dw. La infusión de extracto de las hojas mostró más actividad antirradical en los ensayos ABTS que en los otros extractos estudiados (422,13 μ M equiv. Trolox/g dw).

Valdez¹¹, realizó un estudio en el año 2014 titulada: "Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en *Oenothera rosea* Ait «yawar suqu», *Baccharis salicifolia* R&P «chilca» y *Piper elongatum* Vahl «matico». Ayacucho-2014", donde el trabajo de investigación se ejecutó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH. Las muestras fueron recolectadas en el distrito de Huamanguilla y la provincia de Cangallo del departamento de Ayacucho. La identificación taxonómica se realizó en el Herbarium Huamangensis de la UNSCH según el sistema de Clasificación de Cronquist. A. El extracto hidroalcohólico se obtuvo mediante el método Soxhlet. Se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos mediante reacciones de coloración y precipitación según el procedimiento descrito por Miranda y Cuellar. El contenido de flavonoides totales y fenoles totales se realizó mediante los métodos de Zhishen et al y Singletón y Rossi. Es así que se compara el contenido de fenoles y flavonoides totales de las tres muestras, en equivalentes de ácido caféico y quercetina. *Baccharis salicifolia* R&P "chilca", presentó 12,62%, *Oenothera rosea* Ait. "yawar suqu" 6,42% y *Piper elongatum* Vahl. "matico" 3,88% de fenoles totales. El contenido de flavonoides fue *Oenothera rosea* Ait. "yawar suqu" 8,32%, *Piper elongatum* Vahl. "matico" 6,21% y *Baccharis salicifolia* R&P "chilca" 9,96%. Se concluye que *Baccharis salicifolia* R&P "chilca" presentó cantidades superiores de fenoles y flavonoides totales frente a *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", y *Piper elongatum* Vahl "matico".

Rodriguez et al⁴, quienes realizaron un trabajo de investigación en el año 2007 cuyo título fue: "Estudio morfoanatómico sobre poblaciones de *Baccharis microcephala* y su actividad antioxidante. Comparación con otras especies de *Baccharis*". En este trabajo se realizó el estudio de *B. microcephala* (Bm) y se comparó con: *B. articulata* (Ba), *B. crispa* (Bc), *B. gaudichaudiana* (Bg) y *B. trimera* (Bt). Aunque las especies estudiadas presentaron una similar concentración de flavonoides, *B. microcephala* mostró la mayor actividad depuradora de DPPH de radicales libres (IC₅₀ = 12 µg/ml).

2.2. Baccharis

2.2.1. Clasificación taxonómica

La **Tabla 1**, muestra la clasificación taxonómica de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pavon) Pers, según el sistema de clasificación de Cronquist A., del año 1988.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pavon) Pers "chilca".

DIVISIÓN	Magnoliophyta.
CLASE	Magnoliopsida.
SUBCLASE	Asteridae
ORDEN	Asterales.
FAMILIA	Asteraceae
GÉNERO	Baccharis
ESPECIE	<i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz & Pavon) Pers.
NOMBRE VULGAR	"chilca"

Fuente constancia N° 253-USM-2018 del herbario San Marcos (USM) del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. **(Anexo 1)**.

2.2.2. Descripción botánica

Arbusto perennifolio de hasta más de 1 metro de alto, poco ramificado; hojas simples, alternas, sésiles, de 2 a 3 cm de largo por 0,6 a 1 cm de ancho, de color verde oscuro, sésiles, de 2- 3 cm de largo por 0,6 – 1 cm de ancho, de color verde oscuro, de aspecto pegajoso debido a la presencia de conductos resiníferos, de forma espatulada las adultas y las hojas más tiernas angostamente oblongada-lineales, dentadas en las márgenes. Inflorescencia en capítulos o cabezuelas solitarias y terminales, el involucreo acampanado (en forma de campana) de 1,2 cm de largo, formado por 3 – 4 hileras de brácteas; flores pequeñas tubulosas, cáliz formado por un penacho de pelos blanquecinos que constituyen el vilano. Androceo formado por 5 estambres libres por los filamentos y unidos por las anteras (sinanterio), gineceo de ovario ínfero con estilo simple y apical, frutos son pequeños aquenios provistos de vilano que le sirve como elemento de dispersión.



Figura 1. Planta de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pavon) Pers "chilca".

2.2.3. Hábitad

Es una especie silvestre, propia de climas templado – fríos, crece formando parte de la vegetación alto andina a veces como parte de la vegetación ribereña encima de los 3 200 msnm (comunidad de Huaraca-Vinchos).

2.2.4. Usos en la medicina tradicional

Baccharis punctulata (Asteraceae), popularmente conocida como "Chíllka saru saru" en Bolivia, ha sido utilizada para el tratamiento del asma, luxaciones y contusiones.³

Las especies de *Baccharis* conocidos popularmente como "carqueja", se utilizan en medicina popular como diurético, estomacales, en infusión o decocción, como hepáticas, colagogas, como secantes de úlceras y antisépticas en uso externo. También se emplean en la formulación de medicamentos fitoterápicos y en la preparación de bebidas alcohólicas y analcohólicas. Por sus propiedades amargas, son utilizadas principalmente en Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. Se les ha atribuido que tienen actividad antioxidante.^{12, 13}

Los lugareños usan como combustible, excelente como leña por el contenido de resinas que arde tanto fresca como seca; también es apreciada como planta tintórea tratando con mordientes especiales se obtienen diversas tonalidades de

colores verde, amarillo y gris humo; como medicinal en la medicina casera usan para el reumatismo y soldar fracturas de huesos utilizando las hojas machacadas en forma de emplastos.

2.3. Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas inestables muy reactivas con un electrón desaparejado en una órbita exterior. Esta situación dura tan sólo microsegundos, hasta que el electrón desaparejado se estabiliza robando un electrón de un átomo o molécula adyacente; ello, por supuesto, crea otro electrón desaparejado. Sigue rápidamente una cascada de estas reacciones que, si no se controla, se expande de forma agresiva y logarítmica, provocando una reacción en cadena de destrucción tisular que ataca a las proteínas, los ácidos nucleicos y las membranas celulares que contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados. En los sistemas biológicos, los radicales libres más importantes son el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno; en presencia de metales de transición como el hierro y el cobre, ambos radicales libres producen radicales hidroxilo.¹⁴

Pueden originarse endógenamente dentro de las células como intermediarios metabólicos o exógenamente.¹⁵

Procesos Endógenos. Endógenamente los radicales libres se pueden generar a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial o por las células fagocitarias (neutrófilos, monolitos o macrófagos), que utilizan el sistema de la NADPH oxidada generando directamente O_2^- . Por otra parte, también generan óxido nítrico (NO), que con O_2^- dan lugar a la formación del ONOO⁻ capaz de inducir peroxidación lipídica de las lipoproteínas.¹⁵

Los agentes exógenos, también pueden contribuir a un incremento de los RL. Por ejemplo, el humo del tabaco, radiación electromagnética, luz solar, ozono, xenobioticos que producen radicales libres durante su detoxificación por el citocromo P450, agentes contaminantes, aditivos, etc¹⁵ y en el ser humano se generan radicales libres en la cadena respiratoria mitocondrial, también son generados por factores como: la contaminación ambiental, el ejercicio físico intenso, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, el estrés, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas.^{9, 16}

El exceso de proliferación de radicales libres también se fomenta por exposición a residuos de los hidrocarburos del tabaco, aumento de las cargas tóxicas por

metales pesados e hidrocarburos clorados, residuos aldehído del alcohol, grasas oxidadas, radiación ultravioleta, radiación gamma, reducción de la saturación de oxígeno en órganos vitales por llevar una vida sedentaria y valores más elevados de metabolitos de catecolaminas debido a estrés agudo y crónico.¹⁴

Tabla 2. Clasificación de los radicales libres

Clasificación	Radical libre
Especies reactivas de oxígeno	Oxígeno singulete
	Ion superóxido
	Radical hidroxilo
	Peróxido de hidrogeno
	Radicales alcoxi y peroxi
	Radical hidroperoxilo
Especies reactivas de nitrógeno	Óxido nítrico
	Dióxido nítrico
	Peroxinitrito
Especies radicales de azufre	Radical litio
Especies reactivas de cloro	Acido hipocloroso

2.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un término asociado a las células y a la acción de un radical libre que le afecta, así en condiciones normales se da un equilibrio entre la producción de radicales libres u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes (exógeno y endógeno). Este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación sea menor y con menos daño celular. Cuando se rompe el equilibrio, éste se podrá asociar con un déficit en el sistema antioxidante o por la proliferación descontrolada de los radicales libres.¹⁷ Estos confluyen en la alteración estructural y funcional de las macromoléculas orgánicas, llevando a las células afectadas a procesos disfuncionales y a la muerte por necrosis o apoptosis.^{18,19}

Las especies reactivas de oxígeno (ERO); son producto del proceso metabólico, se forman a partir del oxígeno molecular (O_2) al ser utilizado por los organismos aerobios.²⁰ La reducción del O_2 se produce a través de los electrones que escapan de la cadena respiratoria, dando origen al súper oxido (O_2^-), el cual puede dismutar fácilmente y formar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que en presencia de metales como el hierro (Fe^{2+}) y el cobre (Cu^+), produce el radical Hidroxil (OH), que es considerado la especie oxidante más dañina en los sistemas biológicos y el principal responsable del daño oxidativo.¹⁸

Los productos oxidativos secundarios del metabolismo normal y de los procesos patológicos no controlados por antioxidantes dan lugar a graves lesiones de ADN, proteínas y lípidos, y provocan o contribuyen a la aparición de más de 100 enfermedades agudas y crónicas y, de hecho, al propio envejecimiento. Las enfermedades más conocidas en este contexto son: aterosclerosis, infarto de miocardio y angina de pecho, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca congestiva, cáncer, enfisema, cirrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome metabólico, diabetes, hipertensión, inmunodeficiencia, sida, toxemia del embarazo, úlceras pépticas, alergias, asma enfermedades autoinmunitarias (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerodermia, esclerosis múltiple), enfermedad inflamatoria genérica, gastritis, shock séptico, migraña, sensibilidad química múltiple, psoriasis, dermatitis atópica, pancreatitis aguda, enfermedad de Alzheimer y disfunción cerebral, enfermedad de Parkinson, demencia multiinfarto, osteoporosis, cataratas, degeneración macular y cáncer (secundario a quimioterapia y radiación).¹⁴

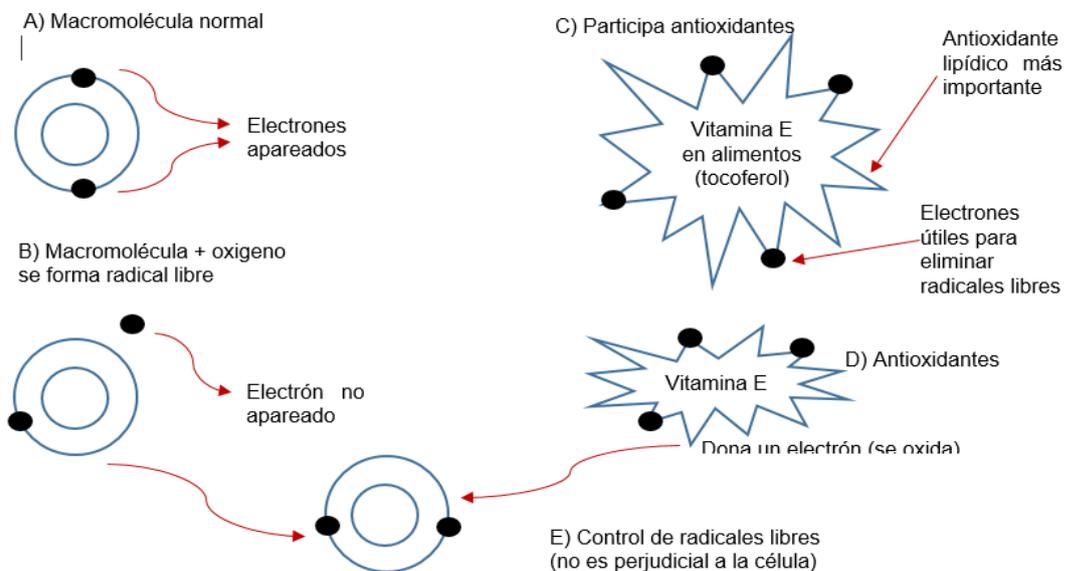


Figura 2. Interacción entre radicales libres y antioxidantes¹⁷.

2.4.1. Sistema de defensa antioxidante

Son componentes fundamentales de protección que se encargan de mantener un equilibrio correcto entre la producción y la eliminación de especies reactivas de oxígeno y otros compuestos relacionados. Un antioxidante es toda sustancia que hallándose presente en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato. El principal mecanismo de defensa que tenemos los humanos frente al daño

oxidativo para contrarrestar los efectos nocivos producidos por las ERO son los antioxidantes naturales. Los antioxidantes naturales se pueden clasificar de forma esquemática en enzimáticos y no enzimáticos o de pequeño peso molecular y se pueden clasificar en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células) y exógenos (ingresan a través de la dieta), **Tabla 3.**^{21,20} Dentro de los enzimáticos, hay sistemas protectores que se sintetizan en el interior de las células como superóxido dismutasa (SOD), catalasa o glutatión peroxidasa (GP), y otros que se encuentran en los fluidos extracelulares, como por ejemplo ceruloplasmina, transferrina o haptoglobina. Entre los sistemas antioxidantes no enzimáticos destacan el glutatión, el ácido ascórbico (vit C), el alfa-tocoferol (vit E) y los carotenoides. El mecanismo de acción de los antioxidantes puede ser: a) preventivo, evitando la formación de radicales libres (albúmina, ferritina, ceruloplasmina, transferrina); b) reparador, mediante la reparación endógena del daño causado por los radicales libres (SOD, GP, catalasa), y c) secuestrador de radicales libres (vit E, vit C, betacaroteno, flavonoides). Entre los antioxidantes derivados de la dieta, los que tienen más repercusión sobre la piel son el alfa-tocoferol, los carotenoides (ambos liposolubles con gran capacidad de protección sobre las membranas celulares frente a la peroxidación lipídica), y el ácido ascórbico, que actúa como cofactor de diferentes enzimas. Los niveles de antioxidantes en la piel son mayores en zonas fotoexpuestas. En la epidermis los niveles de ascorbato se quintuplican respecto a la dermis. Además, se ha demostrado que la cantidad de ferritina es mayor en los queratinocitos que en los fibroblastos por la situación anatómica donde se encuentran.²¹

Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes exógenos y endógenos.

Exógenos	Endógenos No enzimáticos
Vitamina E	Glutatión, coenzima Q
Vitamina C	Ácido tiótico
betacaroteno	Enzimáticos. cofactor
Flavonoides	Superoxido dismutasa, cobre, manganeso, zinc, catalas, hierro
licopeno	Glutatión peroxidasa, selenio

2.5. Compuestos fenólicos

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios producidos por todas las plantas;¹¹ son un grupo cercano a 8000 sustancias que pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura.²² La cantidad de compuestos polifenólicos y tipos presentes en un alimento varía en función de la especie

vegetal, variedad y parte del vegetal considerada (fruto, semillas, brotes, hojas), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado, condiciones de almacenamiento. Se sabe que poseen múltiples efectos biológicos, incluida la actividad antioxidante, el cual es debido a su habilidad para quelar metales, inhibir la actividad de la enzima lipooxigenasa y actuar como atrapadores de radicales libres.^{23, 22} Son biosintetizados en las plantas a través del metabolismo secundario y cumplen numerosas funciones biológicas que han permitido la adaptación y evolución de las distintas especies. Entre las cuales se encuentran, el transporte de hormonas, la atracción de agentes polinizadores, el crecimiento del tubo polínico y la fecundación, la dispersión de semillas, el establecimiento de relaciones simbióticas, la protección de los fotosistemas frente al daño oxidativo, las respuestas de defensa frente a herbívoros y al ataque de patógenos, y la tolerancia a condiciones abióticas desfavorables.²⁴

Se han clasificado en varias categorías: fenólicos simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas.

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos.⁶ La **Tabla 4**, muestra los diferentes grupos de polifenoles y algunos ejemplos de cada grupo y la (**Figura 3**) muestra la estructura química del grupo fenol.

Tabla 4. Clasificación de los polifenoles y ejemplos.

Estructura química	Tipo de polifenol	Nombre del polifenol
C ₆	Fenol simple	Eugenol
C ₆ -C ₁	Acido fenólico	Ácido gálico
	Acido benzoico	Ácido elágico
(C ₆ -C ₁) _n	Taninos hidrolizables	
C ₆ -C ₂	Ácido fenil acético	
C ₆ -C ₃	Ácido hidroxinamico	Ácido cafeico
	cumarinas	Ácido ferúlico
(C ₆ -C ₃) ₂	lignanos	
C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonas	
	xantonas	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estibenos	Resveratrol
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides	Antocianinas
		Flavonoles

	Flavonas
	Flavanonas
	Isoflavonas
	flavanoides
	chalconas
$(C_6-C_3-C_6)_n$	proantocianinas

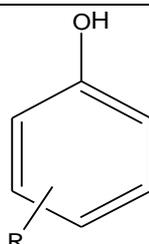


Figura 3. Estructura básica de los compuestos fenólicos.

2.5.1. Flavonoides

Químicamente los flavonoides son sustancias del grupo polifenol cuyo esqueleto primario comprende 15 átomos de carbono dispuestos en dos anillos de fenilo (A y B), unidos por un puente de 3 carbonos, con la estructura general C₆-C₃-C₆, los cuales pueden formar o no un tercer anillo^{23,24}.

Los flavonoides y los compuestos relacionados (antocianinas, catequinas y leucoantocianidinas) proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos.²⁵ Son compuestos con habilidad para atrapar radicales libres, quelar metales pesados y modular la actividad de ciertas enzimas.²⁶ Todos los flavonoides son estructuras hidrolizadas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenólicas.⁶ La **Figura 4**, presenta la estructura química de los flavonoides²⁷.

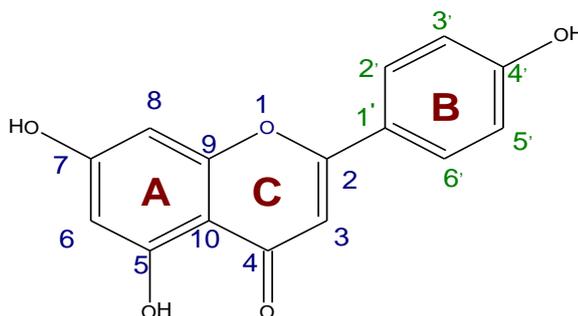


Figura 4. Estructura básica de los flavonoides²⁷.

2.5.1.1. Clasificación de los flavonoides

En función de sus características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en seis principales grupos:

- Los flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

- Los flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Las flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- Las antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.
- Las isoflavonas, representados por la Genisteína que tiene dos grupos -OH unidos en la posición 1 y 3 del anillo C.
- Los flavanonoles. Principalmente destaca la taxifolina, la cual se caracteriza por la unión de un grupo -OH al carbono 1,2 y 3 del anillo C.²⁸

La modificación de la estructura básica, a través de diferentes niveles de oxidación y sustituyentes al anillo C, es responsable de las diferentes clases de flavonoides **Figura 5.**²⁷

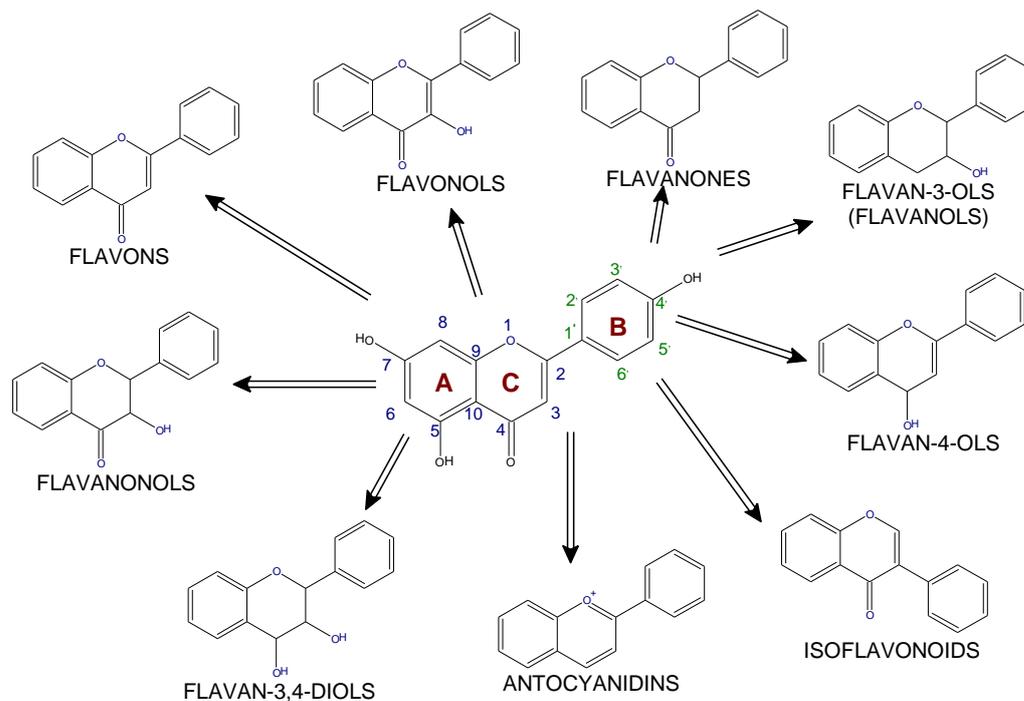


Figura 5. Clasificación de los flavonoides²⁷.

2.6. Medición de la actividad antioxidante

Los métodos de medición de la actividad antioxidante “*in Vitro*” muestran extrema diversidad; muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno singlete, y fuentes de radicales libres.²⁹

La actividad antioxidante está determinada por 3 factores:³⁰

- Reactividad química del antioxidante.
- Capacidad del antioxidante para acceder hasta el sitio de reacción.
- Estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres.

Un método unificado para determinar capacidad antioxidante debería estar estandarizado y cumplir con los siguientes requisitos:³⁰

- Utilizar un radical biológicamente relevante.
- Ser un método simple.
- Utilizar un punto final definido y un mecanismo conocido.
- Emplear instrumentación fácilmente disponible.
- Tener buena reproducibilidad.
- Ser adaptable para medir antioxidantes lipofílicos/hidrofílicos y a diferentes radicales.
- Ser adaptable a formatos de tamizaje de alta capacidad para control de calidad de rutina en gran cantidad de muestras.

Tabla 5. Comparación de métodos para medir capacidad antioxidante basada en la instrumentación requerida, la relevancia biológica, el mecanismo antioxidante, el punto final, el método de cuantificación y la adaptabilidad para medir antioxidantes lipofílicos o hidrofílicos.

Método	Instrumentación	Relevancia biológica	Mecanismo	Punto final	Cuantificación	Lipófilos, Hidrófilos
CARO	-	+++	TAH	Tiempo	ABC	+++
PATAR	++	+++	TAH	Fase de inducción	CE ₅₀ , Fase de inducción	--
CRHF	---	--	TE	Tiempo	Absorbancia	---
ABTS	-	-	TE TAH	tiempo	Absorbancia	+++
DPPH	-	-	TE TAH	Tiempo	Absorbancia CE ₅₀ .	-
Peroxidación lipídica LDL	--	+++	TAH	Fase de inducción	Tiempo de inducción, dienos conjugados SRAT	---

^a De la más (+++) a la menos (---) especializada.

^b Del mas (+++) al menos (---) relevante.

^c TAH: Transferencia de átomos de Hidrogeno, TE: Transferencia de electrones.

^d ABC: Área bajo la curva, CE₅₀: Concentración efectiva 50, SRAT: Sustancias reactivas con Ácido Tiobarbiturico.

* Del mas (+++) al menos (---) adaptable.

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

Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.¹⁶

El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante.²⁹

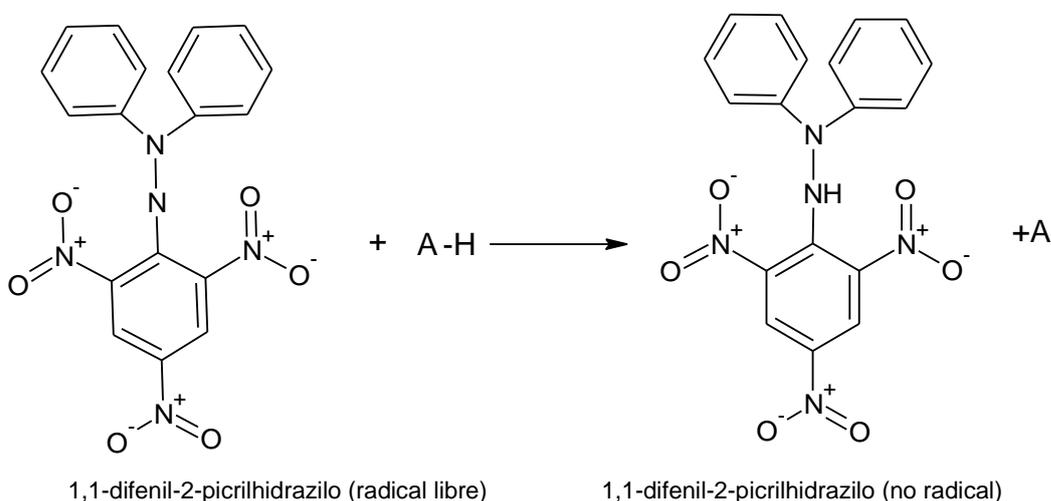


Figura 6. Reacción del DPPH* con el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El trabajo de investigación se realizó en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos "Laboratorio de Control de Calidad", de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de las Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población

Hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers "chilca" que crecen en las zonas áridas del centro poblado de Huaraca, Anchac-Huasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho.

3.2.2. Muestra

20 g de hojas desecadas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers "chilca", cantidad que se recolectó en horas de la mañana en el mes de mayo.

3.2.3. Muestreo

La técnica de muestreo fue no probabilística en la que se empleó la estrategia del muestreo aleatorio simple. El muestreo fue de conveniencia ya que permitió seleccionar aquellos casos accesibles que acepten ser incluidos. Esto, fundamentado en la conveniente accesibilidad y proximidad de los datos para el investigador.

3.2.3.1. Criterios de inclusión

- Hojas en buen estado de conservación.
- Hojas integrales sin lesiones por traumatismo o plaga.
- Hojas normalmente pigmentadas.

3.2.3.2. Criterios de exclusión

- Hojas que se encuentren en mal estado de conservación y que presente signos visibles de descomposición microbiana.
- Hojas de plantas en etapa juvenil.
- Hojas incompletas, con lesiones por traumatismo o plaga.

3.2.4. Unidad experimental

Veinte gramos de hoja seca, molido de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”.

3.3. Diseño metodológico

3.3.1. Recolección e identificación de la muestra vegetal

Las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca” fueron recolectadas, seleccionadas, lavadas y envueltas en papel kraft para su secado a temperatura ambiente por un periodo de tres semanas cambiando el papel de soporte y removiendo el vegetal para evitar su descomposición, en una habitación oscura y con buena ventilación, luego se procedió a reducir el tamaño de la muestra, y se guardó en un frasco de boca ancha color ámbar debidamente rotulado para ser conservado a temperatura ambiente. La clasificación taxonómica de la planta (hojas, tallo, flor, raíz), fue realizada por el Mg. Hamilton Beltrán Santiago, según al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et al, 1988.

3.3.2. Preparación de La muestra

Se pesó 20 gramos de muestra seca pulverizada por duplicado las cuales se llevaron a macerar con 200 ml de etanol 70° en un recipiente de color ámbar por un tiempo de 48h. Luego se llevó a un equipo de percolación, después se dejó salir el percolado a razón de 20 gotas por minuto cada 24h (agregando continuamente el solvente) por 3 días y posteriormente se filtró (3 veces) para evitar polvillos. Seguidamente se procedió a concentrar la muestra en baño maría a una temperatura de 60°C hasta obtener una cantidad de 200 ml y una concentración de etanol de 10°. Finalmente, el extracto concentrado es llevado al atomizador Mini Spray Driver B-290 del CEDACMEF obteniéndose un polvo fino la cual se envasó en unos tubos estériles y libres de humedad.

3.3.3. Tamizaje fitoquímico

La identificación fitoquímica del extracto de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”, se realizó siguiendo los procedimientos de Pérez et al. Una vez obtenido el extracto atomizado se realizó las pruebas pertinentes para la identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios, se

tomó un 1mg de polvo fino, se reconstituyo con alcohol de 70° y se le agregaron los reactivos correspondientes para generar reacciones simples específicas de coloración y precipitación.³¹

3.3.4. Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Singleton y Rossi.³² con algunas modificaciones y se utilizó el ácido gálico como estándar.

Fundamento

La técnica de Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar antioxidantes fenólicos y polifenólicos, este reactivo de folin-ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico que, al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes, forman complejos fosfomolibdico - fosfotúngstico. En medio básico la transferencia de electrones reduce estos complejos a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), los cuales son cromógenos de color azul intenso que son proporcionales a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra de interés.^{33,34}

Procedimiento:

a. Preparación de la curva de calibración (estándar: ácido gálico).

Se Pesó 20 mg de ácido gálico la cual se disolvió con un volumen de 25 mL de agua destilada obteniéndose una solución stock con una concentración de 800 µg/ml; de esta solución madre se prepararon soluciones estándares a las concentraciones de 10; 20; 40; 60 µg/ml respectivamente.

El método consiste en tomar 100µL de las muestras convenientemente diluidas, y se colocó en tubos de ensayo debidamente rotulados, a los cuales se le agrego 500 µL del reactivo folin y 400 µL de carbonato de sodio 7,5 % y se dejó reposar por tiempo de 30 minutos en un ambiente oscuro, pasado el tiempo estimado se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

b. Preparación de la muestra.

- Se pesó 100,5 mg del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (R&P) Pers "chilca" y se llevó diluciones de 10 mL; 25 mL y 5 mL aforado con etanol de 70° (solución muestra)
- 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 al 7,5 %.

- Se mezcló en un tubo de ensayo
- Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Se leyó las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 765 nm utilizando un espectrofotómetro.
- El contenido de fenoles totales se expresó en miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de material vegetal seco, a partir de una curva de calibración del estándar ácido gálico de 10 a 60 µg/mL.

3.3.5. Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales del extracto atomizado de las hojas *Baccharis uniflora* (R&P) Pers “chilca” se determinó por el método de Zhishen et al.³⁵ con algunas modificaciones y la sustancia estándar utilizada fue el compuesto flavonoide rutina.

Fundamento

Este método se basa en la reacción de los grupos OH de los flavonoides y el aluminio (Al^{+3}) formando un complejo rosado que se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm.³⁶

Procedimiento:

a. Preparación de la curva de calibración

Primero se preparó cloruro de aluminio ($AlCl_3$) 2% y etanol al 50°. Luego se pesó 1mg de rutina, la cual se llevó a un matraz de 25 mL, se disolvió con 2,5 mL de metanol y se enrazó con etanol de 50° obteniéndose una concentración de rutina de 40 µg/mL; de esta solución stock se tomó alícuotas de 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mL respectivamente a la cual se le agregó 0,5 mL de tricloruro de aluminio y etanol al 50 % cantidad suficiente para 5 mL. El blanco se prepara de igual forma sin la solución de rutina.

Dejamos reposar 30 minutos y luego se realizó las respectivas lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm.

b. Preparación de la muestra

Se pesó 100,5 mg de extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (R&P) Pers “chilca”, la cual se llevó a disolver en 10 mL de etanol 70°, de esta solución se tomó 2 mL y este se llevó a un volumen de 25 mL.

Luego de la solución anterior se tomó 2 mL, se le agregó 0,5 mL de $AlCl_3$ y etanol 70° cantidad suficiente para 5 mL.

Después de treinta minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm.

El contenido de flavonoides totales del extracto se calculó como equivalentes de rutina (mg ER/g EA) a partir de la ecuación obtenida de la curva de calibración de este compuesto.

El tratamiento del extracto atomizado de *Baccharis uniflora* (R&P) Pers "chilca" se realizó por triplicado.

3.3.6. Determinación de la actividad antioxidante in vitro

3.3.6.1. Ensayo del DPPH según (Brand-Willians y col,1995)

La determinación de la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas *Baccharis uniflora* (R&P) Pers "chilca" se llevó a cabo de acuerdo al método Brand-Willians y Col.³⁶ con algunas modificaciones y cada una de los ensayos se realizó por triplicado.

Fundamento

El radical DPPH es un compuesto sólido de color púrpura y presenta un electrón desapareado, cuando este radical libre se estabiliza frente a un antioxidante se decolora hasta quedar de color amarillo pálido.²⁵

Procedimiento:

Se procede a preparar 50 mL de la solución madre DPPH en etanol 96° a una concentración de 40 mg/mL, posteriormente se mantiene en refrigeración y protegido de la luz, se realizaron diluciones de 35; 30; 25; 20; 15; 10; 5; 1 µg/mL. La curva de calibración se construye 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.³⁸

El extracto etanólico de las hojas *Baccharis uniflora* (R&P) Pers "chilca", y el control positivo (trolox) en etanol 96°, fueron diluidos a concentraciones de 250; 200; 150; 100; 50 y 25 mg/mL. Las medidas de absorbancia de las mezclas de reacción (0,3 mL de solución de muestra y 2,7 mL de la solución madre de DPPH a la concentración de 40 µg/mL) se realizaron a 515 nm a 1; 5 y 10 minutos, cada 10 minutos hasta 1 hora. Se utilizó una mezcla de etanol (2,7 mL) y 0,3 del extracto como blanco.

Cálculos:

- Calcular el porcentaje de actividad antioxidante

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

Dónde:

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

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

Calcular la concentración media inhibición de la actividad antioxidante, de la ecuación lineal del porcentaje de actividad antioxidante versus concentración Trolox y extractos atomizados, utilizando el software Excel³⁷

3.4. Tipo y diseño de investigación**3.4.1. Tipo de investigación**

El presente trabajo de investigación corresponde a un estudio de tipo descriptivo, observacional y básico, con un nivel de investigación de enfoque cuantitativo.

Se basa en recoger información sobre la identificación taxonómica de la planta objeto, especificar las características, realizar la identificación preliminar de metabolitos secundarios, medir la cantidad de fenoles, flavonoides y evaluar la capacidad antioxidante. Los datos recogidos servirán como conocimientos básicos para posteriores investigaciones.

3.4.2. Diseño de investigación

El diseño de la investigación es descriptivo³⁸.

M – O

Dónde:

M : Corresponde a los tratamientos, extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”.

O : Es la observación de la composición de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante.

3.5. Análisis de datos

Los datos que se obtuvieron de la evaluación de los estudios serán procesados por Microsoft y en el Softwar OriginPro. Los resultados se expresan como promedio, la diferencia significativa existente entre los tratamientos será evaluada del análisis de varianza (ANOVA one-way), seguidos de la prueba de t-student, con un nivel de significancia estadística de 0,05. Los promedios de la actividad antioxidante son reportados en gráficos y los valores de CI₅₀ son reportados en tablas. Para identificar diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones evaluadas se calculó en análisis de varianza, comparaciones múltiples de Duncan y t de Student de muestras independientes con nivel de confianza de 95%, mediante el programa de SPSS versión 20.

IV. RESULTADOS

Tabla 6. Identificación de metabolitos secundarios del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho - 2018

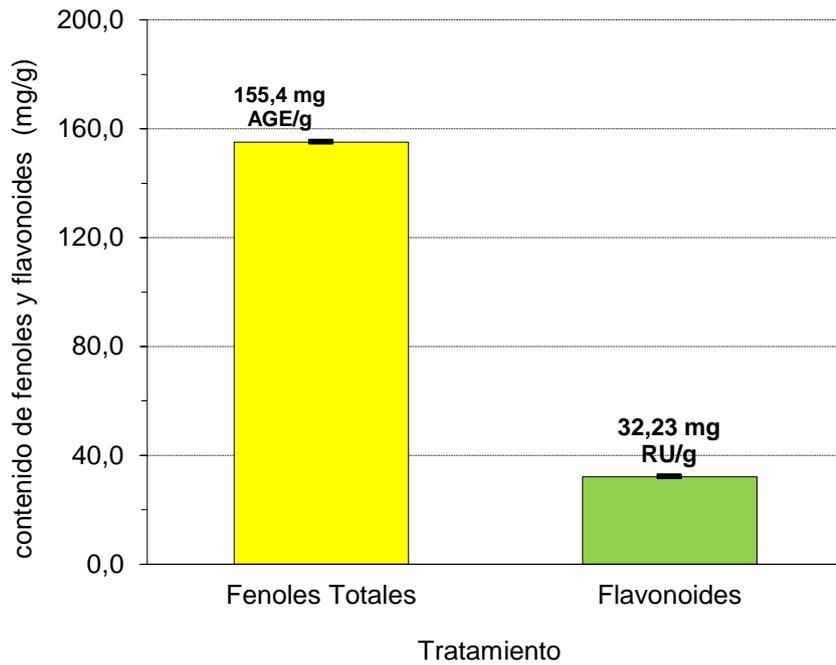
Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Flavonoides	Shinoda	++	Coloración amarilla
Fenoles y/o Taninos	Cloruro Férrico	+++	Coloración verde intenso (tipo pirocatecólicos)
Esteroides y/o triterpenoides	Liebermann y burchard	++	Verde intenso visible

Leyenda:

(+): Poco / leve

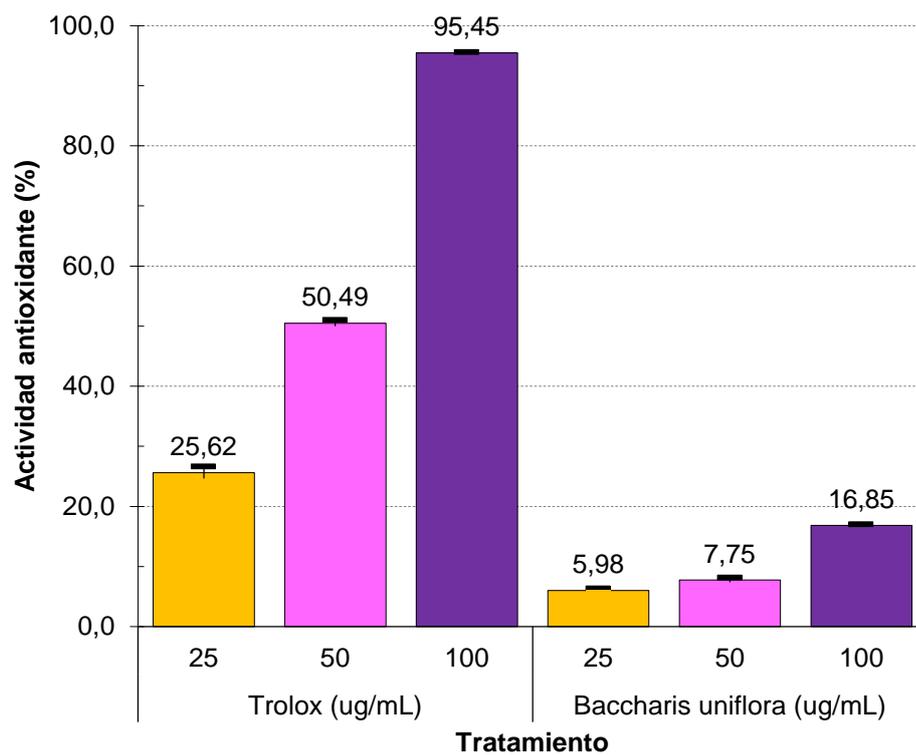
(++): Regular / moderado

(+++): Abundante / intensa



Tratamiento	Fenoles totales (mgAG/g Ext. At.)	Flavonoides totales (mgR/g Ext.At.)
	155,4 +/- 0,15	32,2 +/- 0,05

Figura 7. Contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho - 2018



Tratamiento	Concentración (µg/mL)		
	25	50	100
Trolox	25,62 ± 0,98*	50,49 ± 0,48*	95,45 ± 0,12*
<i>Baccharis uniflora</i>	5,98 ± 0,32*	7,75 ± 0,36*	16,85 ± 0,12*

ANOVA, $p = 5,26 \times 10^{-26}$

Figura 8. Porcentaje de actividad antioxidante por el método de DPPH del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers "chilca". Ayacucho - 2018

Tabla 7. Concentración media inhibitoria ($IC_{50\%}$) de la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers "chilca". Ayacucho - 2018

Método	Troxol ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Baccharis Uniflora</i> ($\mu\text{g/mL}$)
DPPH	39,8 \pm 0,43*	286,8 \pm 1,01*

V. DISCUSIÓN

La biodiversidad es el banco de moléculas bioactivas que demanda la industria de los productos farmacológicos, cosmeceúticos, nutricosméticos, fitocosméticos, de perfumes, fragancias, sabores y aromas.³⁹ En tal sentido, los metabolitos presentes en los vegetales se asocian con una capacidad antioxidante natural, y que estudios epidemiológicos han mostrado efectos benéficos para la salud humana.²⁶

En la presente investigación se buscó determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”.

Mediante el análisis fitoquímico se pudo determinar cualitativamente la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, esteroides y/o triterpenos y alcaloides. Resultando positivo para estos metabolitos y negativo para quinonas y saponinas por lo que este extracto atomizado de las hojas de *Baccharis Uniflora* (Ruiz & Pav) pers. “chilca” presenta un alto contenido de compuestos fenólicos que le otorgan propiedades terapéuticas para la salud, el cual se puede observar en la tabla 6. Así mismo, en la identificación de esteroides y/o triterpenos, se observa una coloración verde intenso, dada la abundancia reconocida de los triterpenos de origen vegetal, se han reportado diversas propiedades de estos compuestos, donde resalta el efecto anticancerígeno, función hepática, biliar y propiedades antihipertensivas y antiinflamatorias.⁴⁰

Herrera et al,⁴¹ demostraron la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides en grandes cantidades en las hojas de *Baccharis latifolia*, los cuales les confieren el poder antioxidante.

En el extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers. “chilca”, los metabolitos que predominan en mayor cantidad son: flavonoides, fenoles, esteroides y/o triterpenos; que dicho sea de paso actúan como

antioxidantes protegiendo los lípidos, la sangre y demás fluidos corporales del ataque de radicales libres de especies del oxígeno.⁴²

Gutiérrez et al⁴³, menciona que el perfil químico de una planta medicinal es directamente relacionado con sus usos tradicionales, actividades biológicas y propiedades farmacológicas. De la Cruz⁴⁴, refiere que los flavonoides (presentes en el género *Baccharis*), como los ácidos fenólicos demuestran fuerte atrapamiento de radicales libres y al mismo tiempo son capaces de inhibir la formación de estos últimos al enlazarse con iones de metales de transición, es por esta razón que Almeida⁴⁵, en su tesis menciona que el estudio es crítico, debido a la higroscopia inherente del extracto atomizado y a la cantidad de extracto añadido. Las medidas utilizadas para evitar estos inconvenientes es adecuar un área de trabajo controlado el porcentaje de humedad en el medio.

El procedimiento de Folin-Ciocalteu es un método ampliamente utilizado y proporciona una estimación rápida y útil del contenido de fenoles en extractos vegetales.⁴⁶ Como se puede observar en la figura 7, presenta los resultados del contenido de fenoles totales en el extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers. "chilca", donde se determinó que dicha muestra presenta fenoles totales, expresados en ácido gálico por gramo de extracto de 155,4 mg. EAG/g.EA ($p < 0,05$).

En la figura 7, se muestra el contenido de fenoles y flavonoides totales de las hojas de *Baccharis Uniflora* (Ruiz & Pav) pers "chilca" que fueron de 155,4 +/- 0,15 (mg EAG/g Ext. At.) y 32,2 +/- 0,05 (mg ERu/g Ext.At.), respectivamente. En este caso el contenido de compuestos fenolicos totales fue mayor en cuanto al resultado obtenido en el estudio de Khorshid Z. et al, donde el extracto de hojas de *achicoria* utilizado tenia un alto contenido de flavonoides (6,82 mg/g de RE) y contenido fenólico de (85 mg/g EAG) que puede ser responsable de su actividad antioxidante. Por otro lado, Tiopanta T², indicó que el extracto liofilizado de las hojas de *Baccharis genistelloides* presentó 504,82 mg QE/g de flavonoides y 225,76 mg GA/g de fenoles totales, que son valores superiores a los resultados obtenidos en esta investigación. El valor inferior reportado en el trabajo de investigación puede estar estrechamente relacionado con las propiedades farmacológicas y medicinales. Por ende, con lo mencionado se deja en evidencia que la cantidad de fenoles y flavonoides es muy variable entre una especie a otra, y esta variación se debe a muchos factores como el proceso de extracción que fueron sometidos.

El método utilizado para determinar la actividad antioxidante fue de decoloración del radical DPPH, que nos da una confianza y seguridad en los resultados, ya que es un radical estable y estandarizado. Para determinar la actividad antioxidante se trabajó con la curva de calibración de DPPH que se elaboró de acuerdo a Sousa.⁴⁵ En la figura 8, se presenta los resultados de la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis Uniflora* (Ruiz & Pav) pers. "chilca", evaluado según el método DPPH. Para ello se tomaron diferentes concentraciones de 25 µg/mL; 50 µg/mL y 100 µg/mL, donde dicha muestra presentó una actividad antioxidante de 5,98 ± 0,32%; 7,75 ± 0,36% y 16,85 ± 0,12% respectivamente. Mientras, que el Trolox, a las mismas concentraciones presentó una actividad antioxidante de 25,62 ± 0,98%; 50,49 ± 0,48% y 95,45 ± 0,12% respectivamente ($p < 0,05$). Así, la mayor inhibición de las hojas se observó a 100 µg/ml con 16,85%. Por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa

Rodríguez et al⁴⁷, En su trabajo de investigación "Estudio morfoanatómico sobre poblaciones de *Baccharis microcephala* y su actividad antioxidante" en la cual mencionan que los resultados de la investigación indican que la capacidad depuradora del DPPH no sólo depende del contenido total de flavonoides en los extractos sino de la proporción de los compuestos.

Así mismo, Pineda et al⁴⁸, mencionan que la capacidad antioxidante depende del tipo y concentración de los antioxidantes involucrados. En las condiciones en que se encuentran varios de estos compuestos, el cual presenta diferente capacidad antioxidante en el estudio: Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos.

El extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers. "chilca" contiene metabolitos secundarios que actúan en la neutralización de los radicales libres, como los fenoles y los flavonoides.

Estos flavonoides contiene en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, que las confiere una gran capacidad antioxidante, desempeñando un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis y el cáncer.⁴⁵

El IC₅₀ del DPPH mide la efectividad de un compuesto para inhibir una actividad biológica y/o bioquímica.⁴⁹ En esta investigación se midió la concentración del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers. "chilca", necesarios para disminuir en un 50% la concentración inicial de los radicales libres (DPPH⁺), teniendo en cuenta que a menor valor de IC₅₀ es mayor la actividad antioxidante.³⁰ En tal sentido, en la tabla 7 nos muestra la concentración media inhibitoria de la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers. "chilca"; donde la concentración media inhibitoria por el método DPPH fue 286,8 ± 1,01* µg/mL a comparación con el trolox que fue de 39,8± 0,43* µg/mL.

Existen trabajos de investigación que confirman la capacidad antioxidante de esta especie tal como la investigación realizada por Figueroa et al⁴⁹, donde se demostró que las hojas y tallos de *Baccharis genistelloides* "carqueja" contienen una concentración de 0,00015 µg/mL, y finalmente concluyen que, el porcentaje de captación de DPPH es proporcional a la concentración.

Rodríguez et al⁴⁷, demostraron que la *Baccharis microcephala* muestra una fuerte actividad depuradora de radicales libres (IC₅₀=12 µg/ml). Siendo una de las especies con mejor actividad antioxidante a diferencia de la planta en estudio,

Así mismo, existen trabajos de investigación que confirman la capacidad antioxidante de esta especie tal como la investigación realizada por Justil, et⁵⁰, quienes trabajaron con el extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* procedente de Junín, encontrando un efecto quimioprotector sobre el cáncer de colon en ratas inducido con DPPH°(IC₅₀=0,15 µg/ml). Es necesario resaltar la importancia de este resultado ya que con esta pequeña concentración del extracto de *Baccharis genistelloides* se puede conseguir una gran actividad antirradicalaria.

Los resultados de la presente investigación como se observa son inferiores al obtenido en el extracto de *Baccharis genistelloides*, donde los factores que pueden afectar en su capacidad antiradicalaria son: la metodología de extracción, el tipo de solvente y la metodología de atomización.

VI. CONCLUSIONES

1. Se realizó la identificación fitoquímica del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca” encontrándose metabólicos principales como: flavonoides, taninos, fenoles, esteroides y/o triterpenos y alcaloides.
2. Se determinó el contenido de flavonoides totales del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) Pers “chilca”. En la cual se obtuvo la cantidad de fenoles totales de 155,4 mg equivalentes al ácido gálico por gramo de extracto atomizado.
3. Se determinó el contenido de compuestos fenólicos del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers. “chilca”; la cual fue de 32,2 +/- 0,05 mg equivalentes de rutina por gramo de extracto atomizado.
4. Por último, se determinó la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers. “chilca”; donde la concentración media inhibitoria por el método DPPH fue $286,8 \pm 1,01 \mu\text{g/mL}$. A comparación con el trolox que fue de $39,8 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$. Por otro lado, el porcentaje de actividad antioxidante por el método DPPH a diferentes concentraciones de 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$, dicha muestra presentó una actividad antioxidante $5,98 \pm 0,32\%$; $7,75 \pm 0,36\%$ y $16,85 \pm 0,12\%$ respectivamente. Mientras, que el Trolox, a las mismas concentraciones presentó una actividad antioxidante de $25,62 \pm 0,98\%$; $50,49 \pm 0,48\%$ y $95,45 \pm 0,12\%$ respectivamente .

VII. RECOMENDACIONES

1. Es recomendable realizar otros estudios más profundos a través de otros métodos adicionales sobre el extracto más activo.
2. Realizar trabajos de optimización con la finalidad de obtener resultados óptimos.
3. Realizar estudios clínicos y farmacológicos para evaluar la eficacia y seguridad del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers. "chilca".

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rahman I, Afzal A, Iqbal Z, Ijaz F, Ali N, Shah M, et al. Historical perspectives of Ethnobotany. Clin Dermatol [Internet]. 2 de abril de 2018 [citado 11 de junio de 2019]; Disponible en: <http://cort.as/-P6Q8>.
2. Toapanta Iza. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. [Internet] [Tesis]. [Riobamba]: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo; 2018. Disponible en: <http://cort.as/-P6Rd>
3. Ascari J, de Oliveira M, Nunes D, Granato D, Scharf D, Simionatto E, et al. Chemical composition, antioxidant and antiinflammatory activities of the essential oils from male and female specimens of *Baccharis punctulata* (Asteraceae). J Ethnopharmacol. 2019 disponible en: <http://cort.as/-P6SU>
4. Rodríguez M, Martínez M, Ferrari S, Campagna M, Bandoni A, Gattuso S, et al. Estudio morfoanatómico sobre poblaciones de *Baccharis microcephala* y su actividad antioxidante. comparación con otras especies de *Baccharis*. Bol latinoam caribe plantas med aromáticas [Internet]. 2007;6(5). Disponible en: <http://cort.as/-P6T9>
5. Ibáñez C, Afonso L, Tapia Y, Lizarazu J, et al. Búsqueda de colorantes naturales en el valle de zongo con posibles propiedades antioxidantes y/o fotoprotectoras. Investig Amp Desarro. 2016;1(16):5-24.
6. Bianchina F, Ruíz R, Gutierrez A. Capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos del extracto fluido de hojas y tallos de *Baccharis genistelloides*. SCIÉENDO [Internet]. 2018;21(2):249-57. Disponible en: <http://cort.as/-P6UA>
7. Almeyda Rodas W. Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2017. [Internet] [Tesis]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga; 2017. Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2333>
8. Reynoso L, Rodríguez F. Capacidad antioxidante del néctar de *Prunus pérsica* (durazno) y *Aloe vera* (sábila) in vitro con el 2,2 difenil – 1 – picrilhidrazilo (dpph*) [Internet] [Tesis]. [Trujillo]: Universidad Nacional de Trujillo; 2016. Disponible en: <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/97909>
9. Rodríguez A, Roa A, Palacios O. Actividad antibacteriana y antioxidante de *Baccharis revoluta* Kunth. Nova. [Internet] [citado el 15 de junio de 2016];14(25):57.
10. Andrade E, Leone R, Ellendersen L, Masson M. Phenolic profile and antioxidant activity of extracts of leaves and flowers of *Yacon* (*Smallanthus sonchifolius*). Ind Crops Prod. [Internet]; 62:499-506.
11. Valdez P. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en *Oenothera rosea* Ait «yawar suqu», *Baccharis salicifolia* R&P «chilca» y *Piper elongatum* Vahl «matico». Ayacucho-2014 [Internet] [tesis]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga; 2014. Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2502>
12. Budel J, Paula J, Santos V, Franco C, Farago P, Duarte M. Pharmacobotanical study of *Baccharis pentaptera*. Rev Bras Farmacogn. [Internet] [citado julio de 2015];25(4):314-9.
13. Rodríguez M, Gattuso S, Gattuso M. *Baccharis crispa* y *Baccharis trimera* (Asteraceae): Revisión y Nuevos Aportes para su Normalización Micrográfica. Lat Am J Pharm. 2008;11.

14. Anderson RA. Prescripción de antioxidantes. En: Medicina integrativa [Internet]. Elsevier; 2009 [citado 1 de junio de 2019]. p. 1063-75. Disponible en: <http://cort.as/-P6Wz>
15. San Miguel A, Martín G. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. Gac Médica Bilbao. [Internet];106(3):106-13.
16. Guija P, Inocente C, Ponce P, Zarzamora N. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. Horiz Med [Internet]. 2015;15(1):57-60. Disponible en: <http://cort.as/-P6Xy>
17. Coronado H, Vega, Gutiérrez T, Vázquez F, Radilla V C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Rev Chil Nutr. [Internet];42(2):206-12.
18. Delgado O, Betanzos C, Sumaya M. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. Investig Cienc [Internet]. 2010;18(50). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=67415744003>
19. Martínez L, Boll W, Hernández M, Rubio O, Sánchez M, Ríos C, et al. Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. Mensaje Bioquim [Internet]. 2010;34:43-59. Disponible en: <http://cort.as/-P6YT>
20. Alberto R, Karol Z, Cortes C. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). Rev Cuba Plantas Med [Internet]. diciembre de 2018;17(4):408-19. Disponible en: <http://cort.as/-P6Yk>.
21. De Gálvez MV. Antioxidantes en fotoprotección, ¿realmente funcionan? Actas Dermo-Sifiliográficas. [Internet] [citado 18 de abril de 2019];101(3):197-200.
22. Zapata S, Piedrahita A, Rojano B. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia | Zapata | Perspectivas en Nutrición Humana. Rev Perspect En Nutr Humana [Internet]. 2014;16(1). Disponible en: <http://cort.as/-P6gz>
23. Raffa D, Maggio B, Raimondi M, Plescia F, Daidone G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. Eur J Med Chem. 15 de diciembre de 2017;142:213-28.
24. Wahby I. Aproximaciones biotecnológicas tendientes a la mejora del cáñamo («*Cannabis sativa*» L.) obtención de raíces transformadas, transformación genética y regeneración «in vitro». [Granada]: Editorial de la Universidad de Granada; 2007.
25. Vargas P. Contenido de flavonoides y fenoles totales en hojas de tres especies del género *Senecio* y determinación de su actividad antioxidante in vitro. Ayacucho, 2017. [Tesis]. [ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga; 2017.
26. Barrón Y, García M, Soto H, Colinas L, Kite G. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. Rev Fitotec Mex [Internet]. 2011;34(3). Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php>
27. Garfias L, Antonio M. Determinación de la actividad biológica de flavonoides y su identificación por electroforesis capilar en plantas medicinales [Internet] [tesis]. [Mexico]: Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología; 2017 [citado 31 de julio de 2018]. Disponible en: <http://cort.as/-P6Zs>
28. Limón D, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, Guevara J. los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos

- farmacológicos. Mensaje Bioquímico [Internet]. 2010;34(1). Disponible en: <http://cort.as/-P6gj>
29. Villacorta V, Perez V. Actividad antioxidante in vitro de las hojas y frutos de *Morinda citrifolia* Linn. mediante el método de secuestro de radicales libres 1,1-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH). Univ Nac Amaz Peru [Internet]. 27 de enero de 2017 [citado 4 de agosto de 2018]; Disponible en: <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/169136>
 30. Londoño L. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En Desarro Transversalidad Ser Lasallista Investig Cienc Corp Univ Lasallista [Internet]. 2012 [citado 25 de abril de 2019]; Disponible en: <http://cort.as/-P6gN>.
 31. Pérez A, León A, Rodríguez Á, Vásquez N. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú. Univ Priv Antenor Orrego Trujillo Perú [Internet]. 2011;22(2):6. Disponible en: journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/download/435/400
 32. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *am j enol vitic* [Internet]. 1 de enero de 1965;16(3):144-58. Disponible en: <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
 33. García M, Fernández S, Fuentes L. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Repos Inst UPV [Internet]. 2015; Disponible en: <http://cort.as/-P6a7>
 34. Cruzado M, Pastor A, Castro N, Cedrón JC. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). *Rev Soc Quím Perú* [Internet]. 1 de marzo de 2013;79(1). Disponible en: <http://cort.as/-P6aQ>
 35. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. La determinación del contenido de flavonoides en la mora y sus efectos de eliminación en los radicales superóxido. *ScienceDirect* [Internet]. 1999; 64:555-9. Disponible en: <http://cort.as/-P6ae>
 36. Parimelazhaga T. Ensayos farmacológicos de productos naturales de origen vegetal | Parimelazhagan Thangaraj | Saltador [Internet]. Vol. 71. Editorial Springer International Publishing Switzerland; 2015. Disponible en: <http://cort.as/-P6an>
 37. Sousa C, Silva H, Vieira J, Ayres M, Costa C, Araújo D, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova*.2007. [Internet];30(2):351-5.
 38. Violeta C. Guía de diseño y desarrollo de tesis UCV [Internet]. Education presentado en; 22:20:40 UTC. Disponible en: <http://cort.as/-P6bP>
 39. Torres F. Etnobotánica y bioprospección en páramos y bosques de neblina de del norte peruano: conocimiento tradicional para la ciencia e innovación. Agosto 2015 [Internet]. [citado 25 de julio de 2018]; Disponible en: <http://cort.as/-P6bD>
 40. Cely V, Matulevich J, Castrillón W. Triterpenos y Esteroles de *Salvia Leucantha* (Lamiaceae) y Evaluación de su Capacidad Antioxidante. *Rev Fac Cienc Básicas*. 10 de junio de 2014;10(1):68.
 41. Herrera B, Yarasca Á, Granara A, Yica R, Jurado B. Cribado fitoquímico del *Baccharis latifolia* (R&P.) Pers. (chilca). [Internet]:7.
 42. Rosario S. Terpenos y Esteroides [Internet]. 13:07:39 UTC [citado 1 de junio de 2019]. Disponible en: <http://cort.as/-P6f->
 43. Gutiérrez R, Estrada Z, Nieto-Trujillo A, Cruz S, Arellanes M. Actividad anti-inflamatoria in vivo y toxicidad aguda de extractos metanólicos de hojas de plantas silvestres y cultivos de suspensiones celulares de *buddleja cordata*

- kunth (buddlejaceae). Rev Mex Ing Quimica. 1 de enero de 2018;17(1):317-30.
44. De la Cruz. Actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* «romero» [tesis]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2012.
 45. Almeyda RW. Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2017. [tesis]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2017.
 46. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de antioquia (colombia). 2009 [citado 2 de mayo de 2019]; Disponible en: <http://cort.as/-P6fg>
 47. Rodriguez M, Gattuso S, Gattuso M. *Baccharis crispa* y *Baccharis trimera* (Asteraceae): Revisión y Nuevos Aportes para su Normalización Micrográfica. Lat Am J Pharm. 2008;11.
 48. Pineda D, Salucci M, Lázaro R, Maiani G. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. :8.
 49. Figueroa G, Ruíz R, Gutierrez A. Antioxidant capacity in vitro of the total flavonoids obtained from the fluid extract of leaves and stems of *Baccharis genistelloides*. SCIÉENDO. 29 de junio de 2018;21(2):249-57.
 50. Justil H, Arroyo J, Valencia J. Extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* (carqueja) sobre el cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas. An Fac Med. abril de 2010;71(2):88-96.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación botánica de *Baccharis uniflora* (R&P) Pers "chilca". Ayacucho-2018.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 253-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos "Marco Garrido Maio" de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Farmacia y Bioquímica; ha sido estudiada y clasificada como: ***Baccharis uniflora* (Ruiz & Pavon) Pers.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

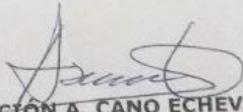
DIVISION: MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE: ASTERIDAE
ORDEN: ASTERALES
FAMILIA: ASTERACEAE
GENERO: *Baccharis*
ESPECIE: *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pavon) Pers.

Nombre vulgar: "Chilca"
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 27 junio de 2018

ACE/ddb

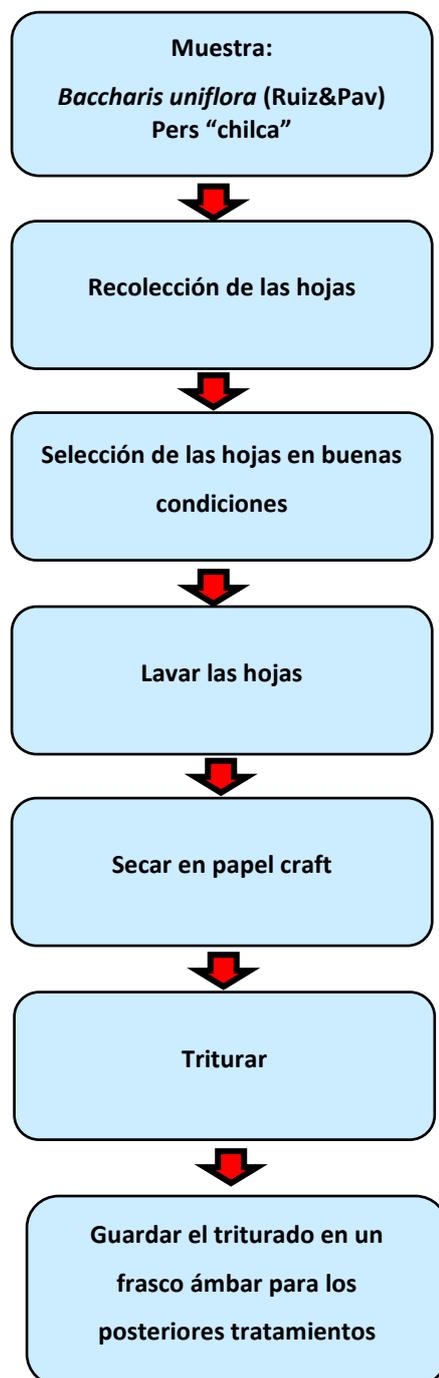

Mg. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

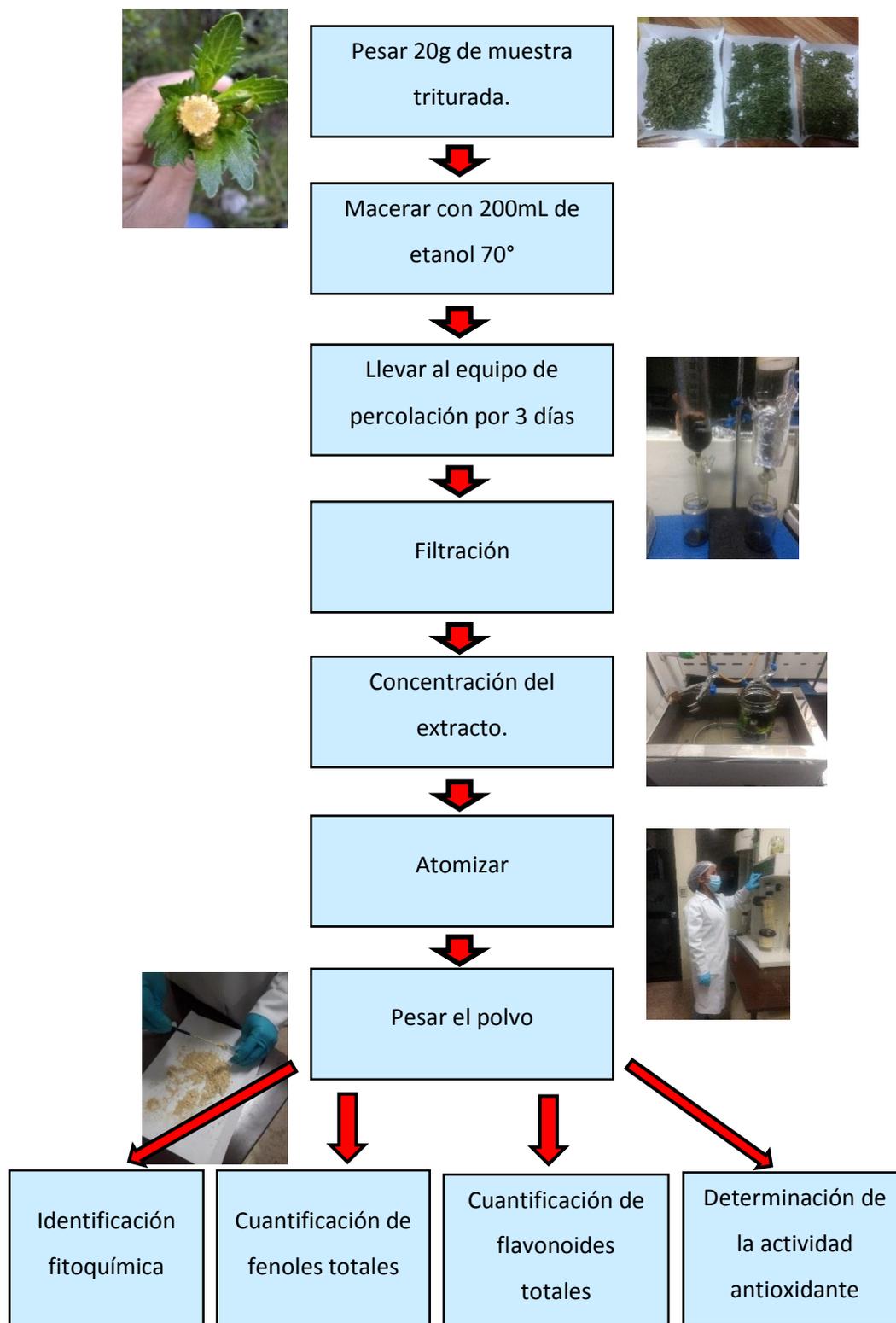
Teléfono:
619-7000 anexo 5701, 5703, 5704

E-mail: museohn@unmm.edu.pe
<http://museohn.unmm.edu.pe>

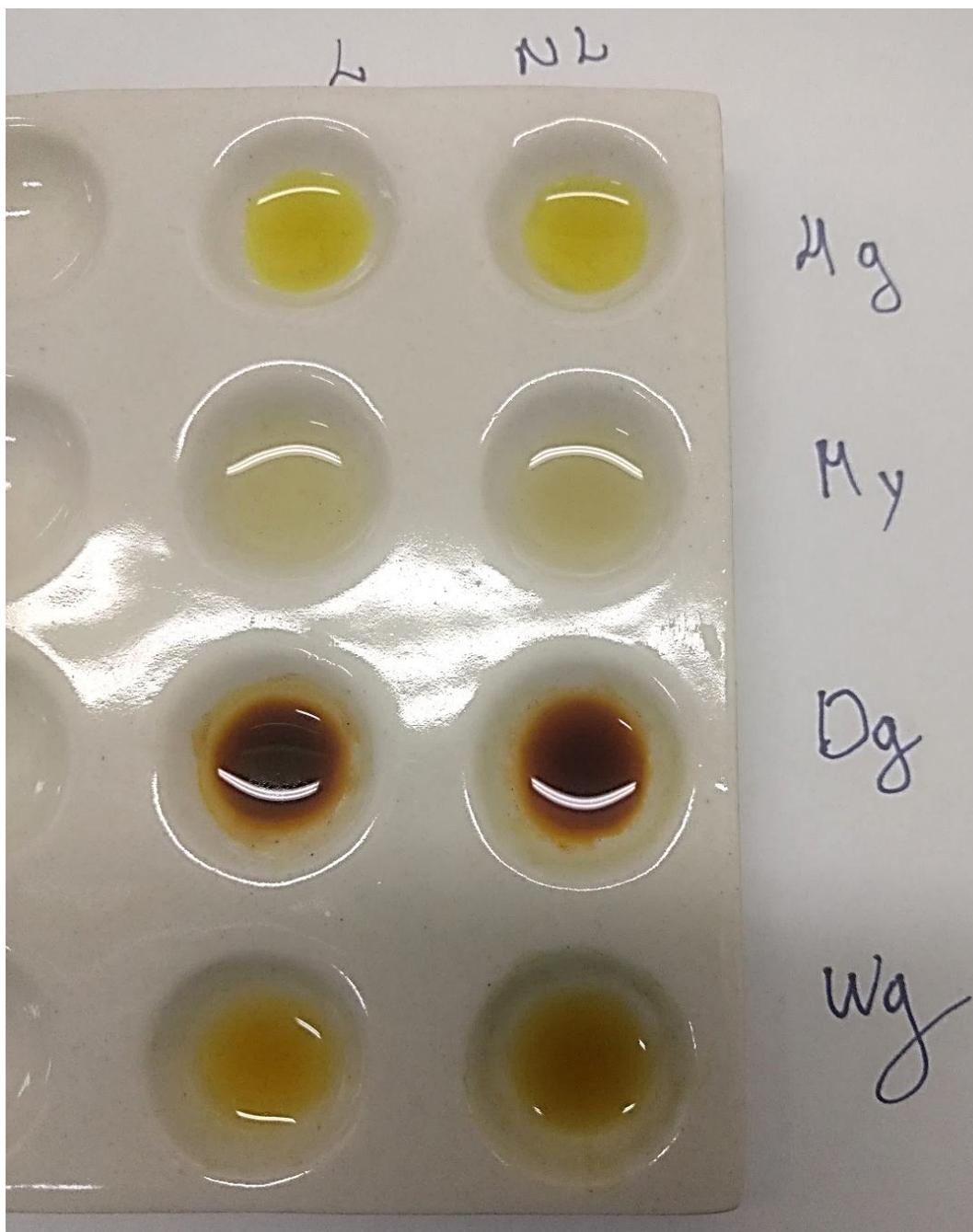
Anexo 2. Flujograma de recolección y preparación de la muestra de *Baccharis uniflora* (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018



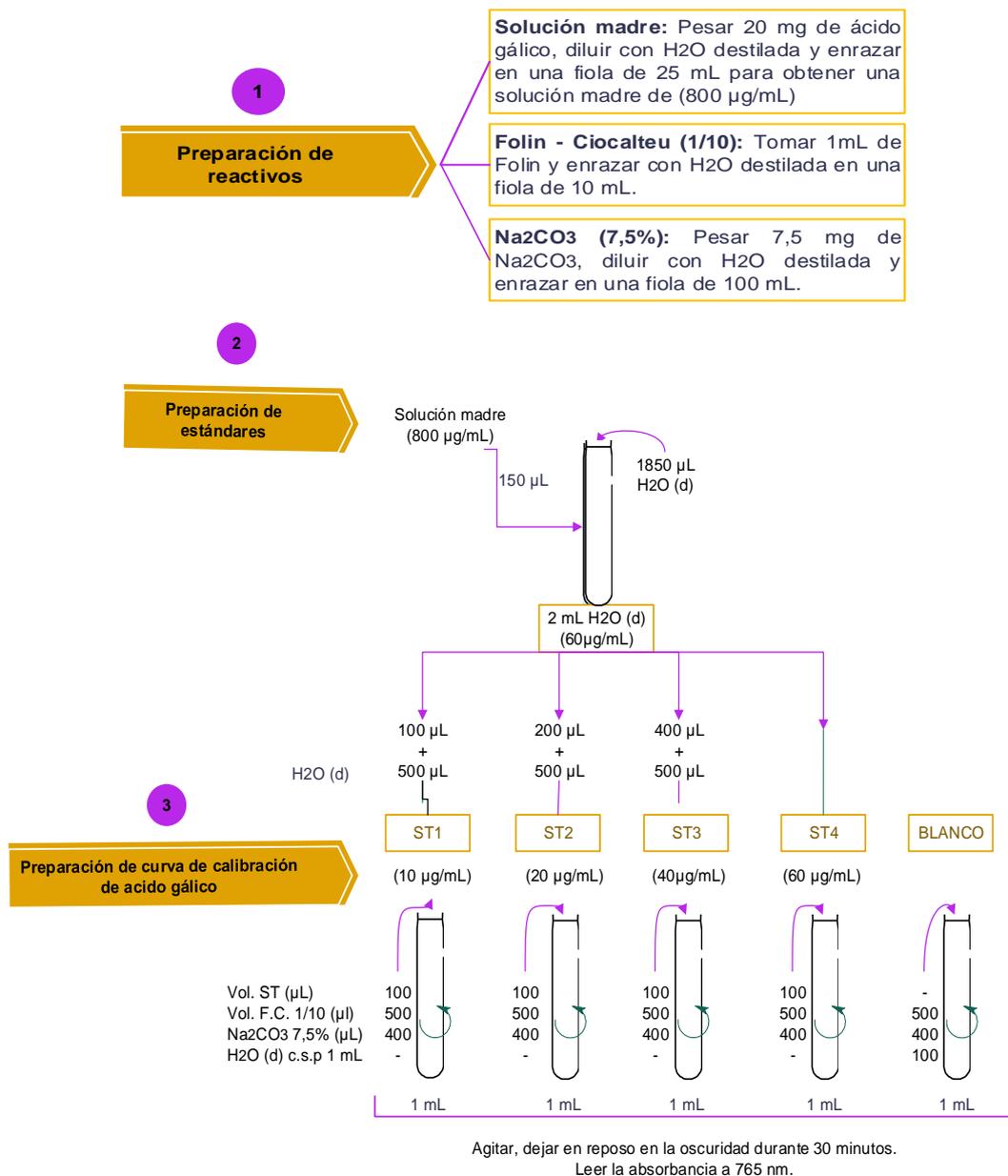
Anexo 3. Flujograma de obtención de extracto atomizado de las hojas *Baccharis uniflora* (Ruiz&Pav) pers “chilca”, cuantificación de fenoles y flavonoides, determinación de la actividad antioxidante.



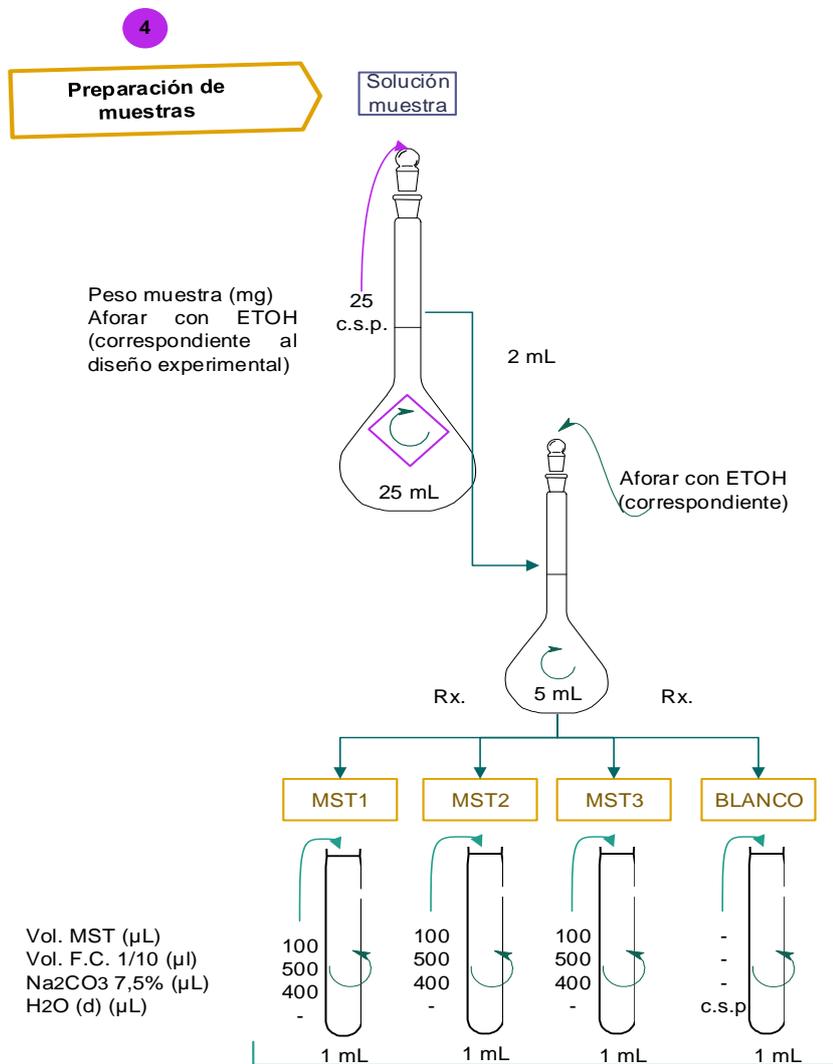
Anexo 4. Resultado de la identificación fitoquímica en extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz&Pav) pers "chilca". Ayacucho-2018.



Anexo 5. Procedimiento para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.



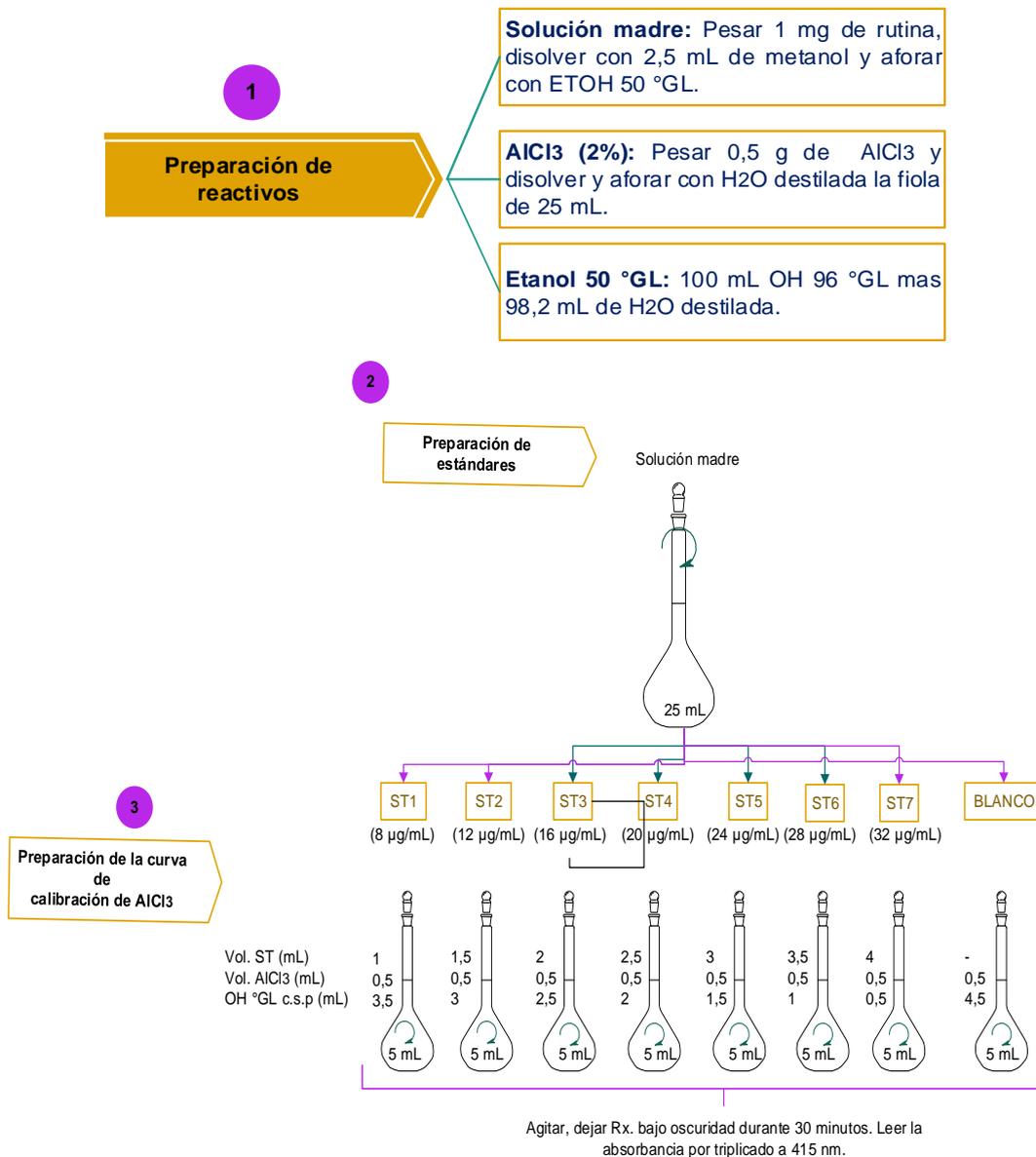
Anexo 6. Procedimiento para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz&Pav) pers “chilca”. Ayacucho 2018.



Agitar, dejar Rx. en reposo bajo oscuridad durante 30 minutos. Leer la absorbancia a 765 nm.

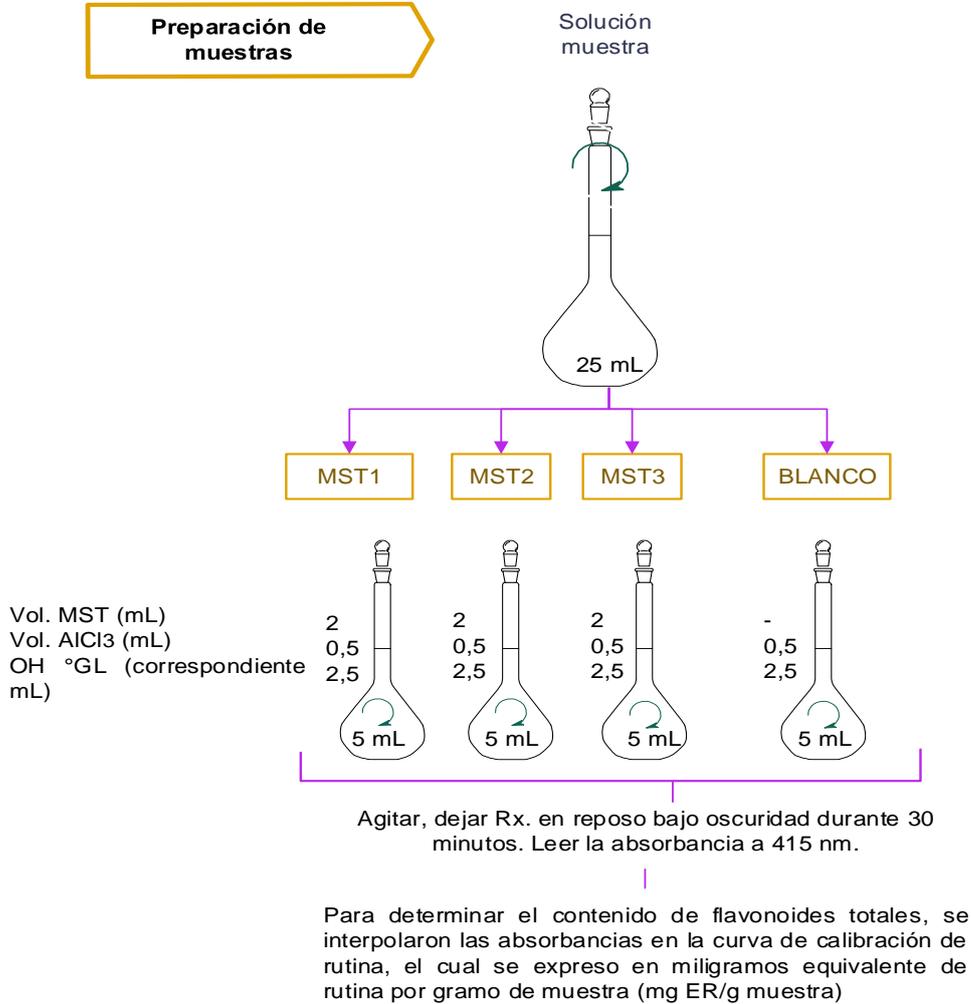
Para determinar el contenido de fenoles totales, se interpolaron las absorbancias en la curva de calibración de ácido galico, el cual se expresó en miligramos equivalente de ácido galico por gramo de muestra (mg EAG/g muestra)

Anexo 7. Curva de calibración de Rutina para la cuantificación de flavonoides totales.

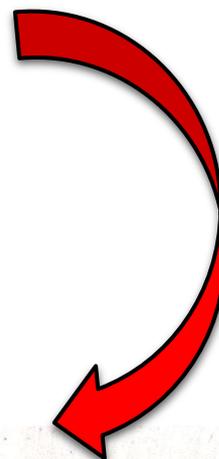


Anexo 8. Procedimiento para la determinación del contenido de Flavonoides totales del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho – 2018.

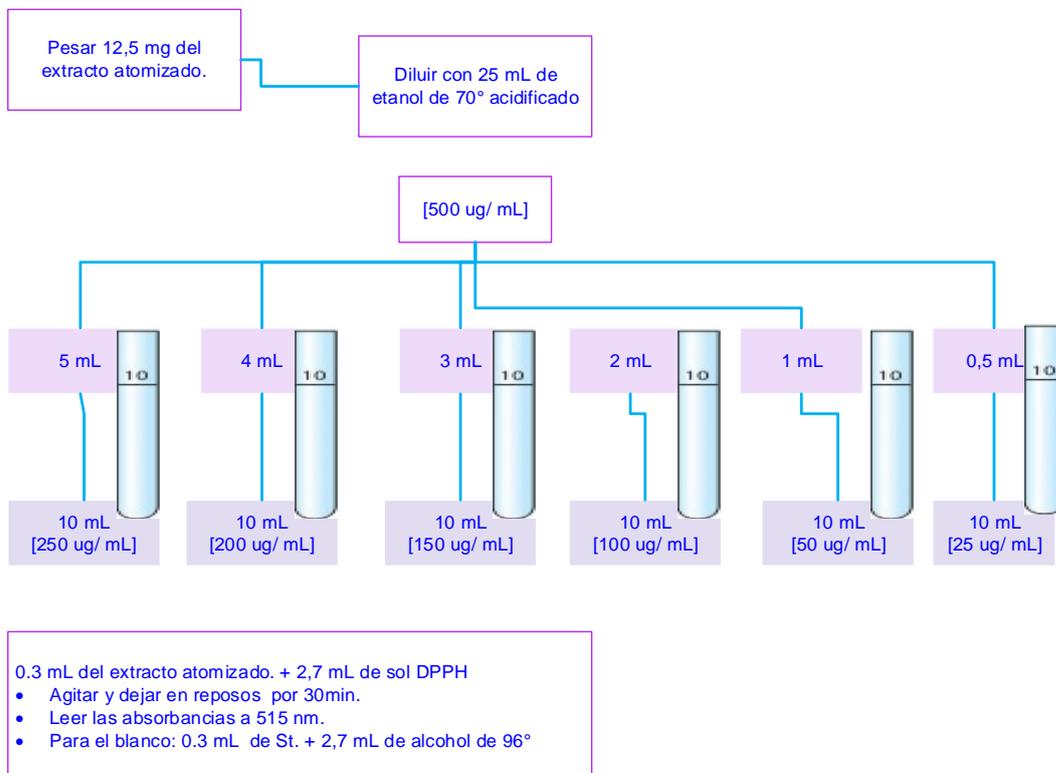
4



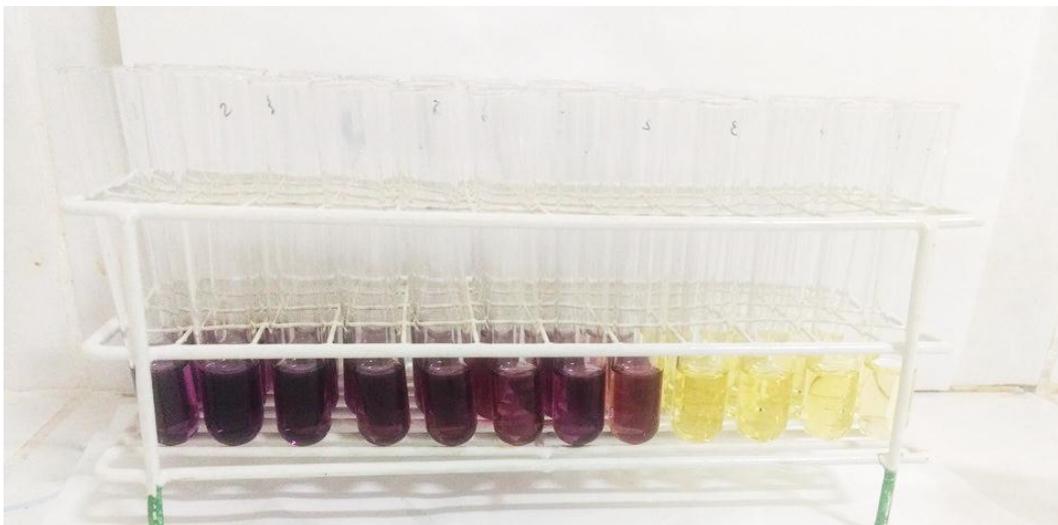
Anexo 9. Resultado de las coloraciones que presentaron los fenoles y flavonoides en el extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018.



Anexo 10. Procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018.



Anexo 11. Resultados de la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018



E.A. [ug/ml]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	5,98	0,127	2,126	0,32	6,30	5,66
50	7,75	0,144	1,861	0,36	8,11	7,39
100	16,85	0,048	0,285	0,12	16,97	16,73
150	26,03	0,048	0,185	0,12	26,15	25,91
200	31,63	0,048	0,152	0,12	31,75	31,52
250	40,81	0,048	0,118	0,12	40,93	40,69

Anexo 12. Análisis de varianza de la actividad antioxidante por el método de DPPH del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	17656,0	5,0	3531,2	61335,0	5,26 x 10 ⁻²⁶
Dentro de grupos	0,7	12,0	0,1		
Total	17656,7	17			

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

Anexo 13. Comparaciones múltiples de Duncan de las medias de actividad antioxidante por el método de DPPH del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA					
		1	2	3	4	5	6
mp 25 ug/mL	3	6,0					
mp 50 ug/mL	3		7,7				
mp 100 ug/mL	3			16,9			
Trolox 25 ug/mL	3				25,6		
Trolox 50 ug/mL	3					50,5	
Trolox 100 ug/mL	3						95,4
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Anexo 14. Prueba de T de Student de la concentración media inhibitoria de la actividad antioxidante, según el método DPPH del extracto atomizado de las hojas de *Baccharis uniflora* (Ruiz & Pav) pers “chilca”. Ayacucho-2018

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	3,96	0,1175	-781,04	4	1,6123E-11	-247,07	0,32	-247,95	-246,19
No se asumen varianzas iguales			-781,04	2,706	0,0000	-247,07	0,32	-248,14	-246,00

Anexo 15.
Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	DISEÑO METODOLÓGICO
Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers. Ayacucho – 2018	¿Cuánto será el contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers.?	<p>Objetivo general</p> <ul style="list-style-type: none"> • Demostrar la actividad antioxidante y cuantificar el contenido de flavonoides y compuestos fenólicos del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz & Pav) Pers “chilca”, Ayacucho - 2018 <p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Realizar la identificación fitoquímica del extracto atomizado de las hojas <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz & Pav) Pers “chilca”. • Determinar el contenido de flavonoides del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz & Pav) Pers “chilca”. • Determinar el contenido de compuestos fenólicos del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz & Pav) Pers “chilca”. • Determinar la capacidad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis uniflora</i> (Ruiz & Pav) Pers “chilca”. 	<p>Descripción botánica</p> <p>Arbusto perennifolio de hasta más de 1 metro de alto, poco ramificado; hojas simples, alternas, sésiles, de 2 a 3 cm de largo por 0,6 a 1 cm de ancho, de color verde oscuro, sésiles, de 2-3 cm de largo por 0,6 – 1 cm de ancho, de color verde oscuro, de aspecto pegajoso debido a la presencia de conductos resiníferos, de forma espatulada las adultas y las hojas más tiernas angostamente oblongada-lineales, dentadas en las márgenes.</p> <p>Radicales libres</p> <p>Los radicales libres son especies químicas inestables muy reactivas con un electrón desaparejado en una órbita exterior. Esta situación dura tan sólo microsegundos, hasta que el electrón desaparejado se estabiliza robando un electrón de un átomo o molécula adyacente; ello, por supuesto, crea otro electrón desaparejado.</p>	<p>H⁰: el extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers “chilca”., tienen compuestos fenólicos y flavonoides, con actividad antioxidante.</p> <p>H₁: el extracto atomizado de las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers “chilca”., no tienen compuestos fenólicos y flavonoides, con actividad antioxidante.</p>	<p>a. Variable independiente</p> <p>flavonoides Polifenoles totales Indicador Equivalentes de rutina (mgRu/g) Equivalentes de ácido gálico (mg/g)</p> <p>b. Variable dependiente:</p> <p>Actividad antioxidante Indicadores Porcentaje de inhibición (%), TEAC</p>	<p>Nivel de investigación</p> <p>Básico- experimental</p> <p>Población: las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers “chilca”., que crecen en zonas andinas, del centro poblado de Huaraca, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.</p> <p>Muestra: 20 g las hojas de <i>Baccharis Uniflora</i> (Ruiz & Pav) pers “chilca”</p> <p>Diseño de investigación</p> <p>M-O</p> <p>Dónde: M: muestra O: información (observaciones).</p> <p>Análisis de datos</p> <p>Los datos obtenidos fueron procesados y analizados mediante el programa Microsoft Excel y el Software OriginPro. Para identificar diferencias significativas de las muestras fueron evaluadas mediante el análisis de varianza (ANOVA), comparaciones múltiples del Duncan y t-Student para muestras independientes , donde fueron evaluados los valores de CI₅₀ entre el trolox y las muestras, con un nivel de confianza de 95% (para ello se utilizó el programa SPSS versión 19.0)</p>