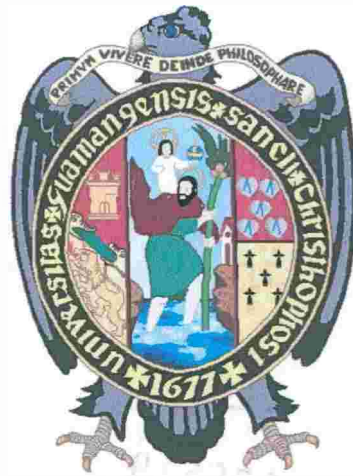


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los
compuestos fenólicos aislados de las hojas de
Ageratina sternbergiana (DC) King & Rob
"marmaquilla". Ayacucho-2012.**

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

PRESENTADO POR:

Bach. CORONADO BENDEZÚ, ELVA CARINA

AYACUCHO – PERÚ

2013

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D.N° 114-13-UNSCH-FCB-D

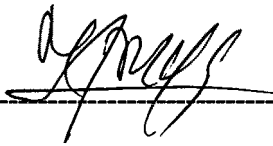
Bach. Elva Carina CORONADO BENDEZÚ

En la ciudad de Ayacucho a los quince días del mes de agosto del año dos mil trece, se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, siendo las dieciséis horas los miembros del jurado calificador integrado por el Mg. José Manuel Diez Macavilca Presidente (e) y los miembros Mg. Raúl Antonio Mamani Aycachi y el Mg. Enrique Javier Aguilar Felices asesor del trabajo de investigación y secretario Docente encargado para recepcionar la sustentación de la tesis titulada Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla". Ayacucho 2012; presentado por la Bachiller Elva Carina Coronado Bendezú; quien pretende obtener el título profesional de Químico Farmacéutica.

Como primer acto el Presidente de jurado calificador dio instrucciones a la sustentante para su exposición, el cual no debe ser mayor de cuarenta y cinco minutos, culminada la exposición el Presidente solicitó a los miembros del jurado calificador, para que realicen sus observaciones, preguntas y aclaraciones que consideren pertinentes, para realizar la calificación correspondiente. Los miembros del Jurado Calificador participaron en el siguiente orden: Mg. Raúl Antonio Mamani Aycachi, Mg. José Manuel Diez Macavilca y el Mg. Enrique Javier Aguilar Felices como asesor. Culminado la participación de los miembros del Jurado Calificador, el Presidente invitó a la sustentante y al público asistente a desalojar temporalmente el Auditorium para que el Jurado Calificador pueda realizar y deliberar su calificación en privado obteniendo la siguiente calificación:

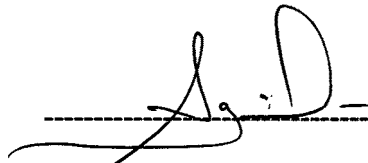
Jurado calificador	Exposición	Respuesta a preguntas	Promedio
Mg. José Manuel Diez Macavilca	17	17	17
Mg. Raúl Antonio Mamani Aycachi	17	17	17
Mg. Enrique Javier Aguilar Felices	17	17	17
		Promedio	17

De la evaluación realizada, la sustentante obtuvo la nota promedio de DIECISIETE (17) de lo cual dan Fe los miembros del jurado calificador, estampando su firma al pie de la presente acta. Culminando el acto de sustentación siendo las diecisiete horas con treinta y cinco minutos.



Mg. Raúl Antonio Mamani Aycachi

Miembro



Mg. Enrique Javier Aguilar Felices

Miembro - Asesor

Secretario (e)



Mg. José Manuel Diez Macavilca

Presidente (e)

DEDICATORIA

A Dios, a mi madre y mis hermanos.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; por brindarme una formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, y en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica.

A todos los docentes de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica quienes contribuyeron con mi formación académica, a mi asesor Mg. Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices, por compartir sus conocimientos y dedicadas orientaciones que hicieron posible el desarrollo y culminación de esta investigación.

A todas las personas quienes con sus consejos y apoyo influyeron para la culminación del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. <i>Ageratina stembergiana</i> (DC) King & Rob "marmaquilla"	5
2.3. Compuestos fenólicos	6
2.4. Inflamación	11
2.5. Antiinflamatorios no esteroideos	12
2.6. Radicales libres	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	16
3.2. Definición de población y muestra	16
3.3. Material biológico	16
3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos	16
3.4.1. Recolección de la muestra	16
3.4.2. Preparación del extracto etanólico	17
3.4.3. Tamizaje fitoquímico	17
3.4.4. Extracción de compuestos fenólicos	17
3.4.5. Identificación de compuestos fenólicos	17
3.4.6. Aislamiento de compuestos fenólicos	18
3.5. Ensayos biológicos	19
3.5.1. Determinación de la actividad antiinflamatoria	19
3.5.2. Método de capacidad secuestradora del radical DPPH	21
3.6. Análisis de datos	23
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSIÓN	34
VI. CONCLUSIONES	40
VII. RECOMENDACIONES	41

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Metabolitos secundarios del extracto etanólico	25
Tabla 2. Características químicas de los compuestos fenólicos	26
Tabla 3. Características cromatográficas de los compuestos fenólicos	27
Tabla 4. Características espectrales de los compuestos fenólicos	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Flavonoides aislados de <i>Ageratina sternbergiana</i>	6
Figura 2. Estructura de los ácidos benzoicos	8
Figura 3. Estructura de los ácidos cinámicos	9
Figura 4. Núcleo básico de los flavonoides	10
Figura 5. Clasificación de flavonoides	10
Figura 6. Reacción de reducción del DPPH	21
Figura 7. Volumen de inflamación en función del tiempo	29
Figura 8. Porcentaje de inflamación en función del tiempo	30
Figura 9. Volumen de inflamación según tratamientos	31
Figura 10. Porcentaje de inflamación según tratamientos	32
Figura 11. Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH según tratamientos	33

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica	47
Anexo 2. Certificado sanitario del material biológico.	48
Anexo 3. Flujograma de la obtención de los compuestos fenólicos	49
Anexo 4. Recolección de <i>Ageratina stembergiana</i> DC) King & Rob "marmaquilla"	50
Anexo 5. Equipo de rotavapor para la concentración del extracto etanólico	51
Anexo 6. Tubos de ensayo del tamizaje fitoquímico y reacción de Shinoda del extracto etanólico	52
Anexo 7. Equipo de extracción líquido-líquido	53
Anexo 8. Pruebas químicas de los compuestos fenólicos aislados	54
Anexo 9. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos aislados (I), quercetina (II) y ácido caféico (III) revelados con luz ultravioleta	55
Anexo 10. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos, revelados con cloruro férrico al 5% (I) y DPPH (II)	56
Anexo 11. Cromatografía en capa fina preparativa y recuperación de fracciones	57
Anexo 12. Curva espectral de las fracciones F1, F2, F3 aislados	58
Anexo 13. Curva espectral de los estándares ácido benzoico y ácido tánico	59
Anexo 14. Evaluación de la actividad antiinflamatoria	60
Anexo 15. Porcentaje de inflamación de los compuestos fenólicos	61
Anexo 16. Análisis de varianza del volumen de inflamación	62
Anexo 17. Prueba de Tukey del porcentaje de inflamación	63
Anexo 18. Porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH según tratamientos	64
Anexo 19. Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH	65
Anexo 20. Matriz de consistencia	66

RESUMEN

Los compuestos fenólicos tienen propiedades biológicas como antiinflamatorias y antioxidantes y se encuentran ampliamente distribuidas en muchas especies vegetales. El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla", durante los meses de octubre del 2012 a marzo del 2013. La muestra fue recolectada en el distrito de Quinoa, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, obteniéndose los compuestos fenólicos a partir de un extracto etanólico, con solventes de diferente polaridad, realizándose su identificación mediante ensayos cualitativos, cromatográficas y espectrales. La actividad antiinflamatoria se realizó mediante el método del edema plantar inducido por carragenina.¹ Para esta prueba se utilizaron 25 ratas hembras de un peso promedio entre 180 a 200 g que fueron divididos en cinco grupos al azar, a las cuales se les administraron los compuestos fenólicos a la dosis de 100 mg/kg; 200 mg/kg y 400 mg/kg, disueltas en carboximetilcelulosa; se utilizó como blanco (carboximetilcelulosa) y estándar (diclofenaco) y la actividad antioxidante se realizó por el método de secuestro del radical libre DPPH.² Se identificó la presencia de azúcares reductores, catequinas, lactonas y/o cumarinas, flavonoides, fenoles y/o taninos, triterpenos y/o esteroides. Los compuestos fenólicos fueron caracterizados como derivados del ácido benzoico y dos flavonoides. A la dosis de 400 mg/kg se obtuvo un menor porcentaje de inflamación (9,53%), cercano al diclofenaco (6,76%); mientras que la actividad antioxidante fue de 96,68% a la concentración de 100 µg/ml, comparable al ácido caféico (97,08%) y el ácido ascórbico (97,51%). Se concluye que los compuestos fenólicos aislados tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante.

Palabras clave: *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob, compuestos fenólicos, antiinflamatorio, antioxidante

I. INTRODUCCIÓN

Hasta la actualidad la medicina tradicional ha servido de generación en generación, en el alivio de un sinnúmero de enfermedades. Dado que nuestro país posee una enorme diversidad de plantas medicinales debido a sus diferentes ecosistemas, representa en gran medida, una rica fuente de alternativas de tratamiento de diversas enfermedades.

Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y tiene que ver en la iniciación en algunas enfermedades degenerativas.³ Las enfermedades que involucran procesos inflamatorios presentan una alta incidencia en la población mundial, es por ello que la búsqueda de alternativas naturales de tratamiento es un elemento importante en las investigaciones médico- farmacéuticas, de manera que puedan sustituirse o disminuir el consumo de los fármacos sintéticos y así evitar la incidencia de sus efectos adversos.⁴

Los compuestos fenólicos son constituyentes importantes de la planta y les otorga múltiples efectos benéficos, estos compuestos presentan una amplia gama de actividades biológicas incluyendo la actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, antihipertensiva y efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares, además pueden ejercer efectos antioxidantes como el secuestro

de radicales libres, donan moléculas de hidrógeno, barren moléculas de superóxido, quelan metales de transición; todas estas propiedades se deben principalmente al grupo hidroxilo presente en su anillo estructural.³ La acción antiinflamatoria de los compuestos fenólicos se debe a que estos actúan por la vía 5-lipoxigenasa e inhiben fundamentalmente la vía de ciclooxigenasa.⁵

La especie *Ageratina stembergiana* es nativa de los andes con propiedades farmacológicas y representa una gran alternativa para la prevención de algunas enfermedades como problemas renales, inflamatorias, digestivos, dolor de cabeza, etc.⁶ Esta especie contiene compuestos fenólicos,⁷ y una nueva flavanona llamada sternbin (5,3', 4'-trihidroxi-7methoxy-flavanona).⁸

Por todas estas consideraciones, el propósito fue conocer la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina Stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla", con los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".
- Obtener los compuestos fenólicos de las hojas de *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".
- Determinar la dosis con mayor actividad antiinflamatoria entre las dosis evaluadas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".

- Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla" sobre los radicales libres de DPPH.

II. MARCOTEÓRICO

2.1 Antecedentes

Sanabria *et al.*,⁹ evaluaron la actividad antifúngica y antibacteriana de la parte aérea de la *Ageratina ibaguensis* y aislaron un terpenoide con actividad antimicrobiana. La concentración crítica antifúngica estuvo comprendida entre 500 y 2000 µg/ml y la actividad antibacteriana entre 190 y 930 µg/ml.

La actividad antiviral de las hojas de *Ageratina havanensis* fueron determinados por Del Barrio *et al.*,¹⁰ contra Vesivirus de conejo (RaV) (Caliciviridae) y virus de herpes simplex humano tipo 1 y 2 (HSV-1, HSV-2) (Herpesviridae). Las propiedades antivirales fueron investigadas por medición de la inhibición del efecto citopático viral inducido en células Vero. Los mayores efectos inhibitorios se encontraron para el extracto de acetato de etilo a partir de hojas.

El efecto analgésico de las hojas de *Ageratina glabrata*, García *et al.*,¹¹ identificaron un nuevo derivado de timol, 10-benzoiloxo-6, 8,9-trihydroxythymol isobutirato que interactúa con la enzima COX-2 en un ligando-receptor acoplamiento estudio.

La actividad antiinflamatoria a partir de los tallos de *Ageratina stembergiana* (DC) fueron determinados por León *et al.*,⁷ donde la mayor dosis (200 mg/kg) tuvo una mejor respuesta antiinflamatoria y similar actividad a la indometacina de 10 mg/kg.

2.2 *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla"

2.2.1 Clasificación taxonómica

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GÉNERO	:	<i>Ageratina</i>
ESPECIE	:	<i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob
NOMBRE COMÚN	:	"marmaquilla"

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* (2012) (Anexo 1).

2.2.2 Descripción botánica

Arbusto erguido, ramificado desde la base, de 40 a 70 cm de altura; hojas opuestas, pecioladas, anchamente ovoides-lanceoladas, algo dentado en los bordes, de 3-6 cm de largo por 3-4,5 cm de ancho; inflorescencia en pequeñas cabezuelas que se agrupan formando casi corimbos, las cabezuelas son acampanuladas, de 5-6 mm de largo con los estilos filiformes que sobresalen; brácteas involucrales dispuestas en dos series; fruto aquenio de 2 mm de largo con papus blanquecino.^{12, 13}

2.2.3 Distribución

Ampliamente distribuidas en Puno, Ancash, Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Junín, Cuzco, Huánuco, Lima, Amazonas, La Libertad, Pasco, Huancavelica.¹²

2.2.4 Composición química

En los estudios fitoquímicos realizados en el extracto etanólico de los tallos se determinó la presencia de azúcares, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, cumarinas, aminoácidos, esteroides.⁷ De las partes aéreas se determinaron la presencia de: eupatarone, junto con 2-hidroxibenzaldehído, 12-hidroxi-2-3-

dihidroeuparine, spathulenol, precone II, dammaradienol, acetato de dammaradienol, 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavanone, 5,7-dihidroxi-4'-methoxyflavanone y sakuranetin, además de esta especie se han obtenido una nueva flavanona llamada Sternbin (5,3', 4'-trihidroxi-7-methoxy-flavanona).⁸

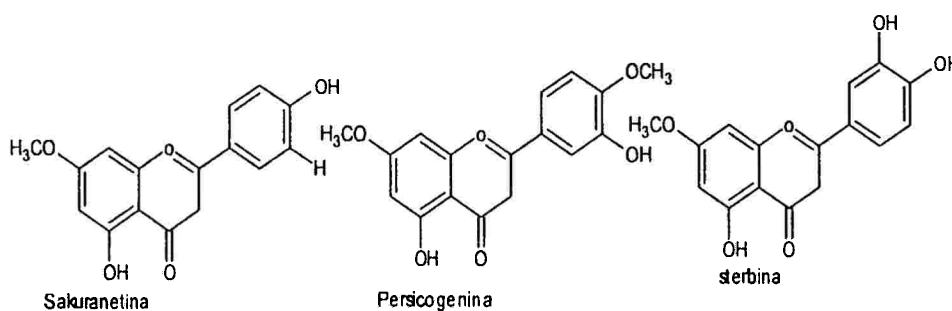


Figura 1. Flavonoides aislados de *Ageratina stembergiana* ⁸

De la *Ageratina ibaguensis* se aislaron: flavonoides, antraquinonas, taninos, esteroides, triterpenoides, lactona terpénica y presenta reacciones negativas para: alcaloides, cardenólidos.⁹

A partir de *Ageratina havanensis* se identificaron cuatro flavonoides: 5,4'-dihidroxi-7 metoxiflavanona (sakuranetina), 3,5,4'-trihidroxi-7 metoxiflavanona (7-methoxyaromadendrin), 4'-O-β-D-glucosil-5,3'-dihidroxi-7 metoxiflavanona (4'-O-β-D-glucosil-7-metoxi-eriodictiol) y 4'-O-β-D-glucosil-5 hidroxi-7-metoxiflavanona (4'-O-β-D-glucosilsakuranetina).¹⁰

2.2.5 Usos tradicionales

Antiinflamatorio, cicatrizante, golpes, contra la diarrea, tónico, digestivo, emenagogo, dolor de estómago, dolor de cabeza, diurética.⁶

2.3 Compuestos fenólicos

Son metabolitos secundarios producidas por todas las plantas, un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser

solubles en agua; pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro, que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico.¹⁴

En los últimos años se han acumulado evidencias de que algunos compuestos fenólicos ingeridos en la dieta habitual pueden tener implicaciones sobre la salud humana como la reducción de algunos tipos de cáncer. Además estos compuestos fenólicos son utilizados para tratar enfermedades relacionadas con procesos antiinflamatorias y desordenes cardiovasculares debido a la actividad que ejercen sobre el sistema circulatorio, mejorando la circulación periférica, la movilización del colesterol y disminuyendo la fragilidad capilar.¹⁵

Los compuestos fenólicos tienen una gran capacidad antioxidante, considerado la actividad biológica responsable del efecto preventivo sobre algunas enfermedades y el mecanismo por el que actúan reside en su capacidad para captar radicales libres que se pueden generar en las células del cuerpo humano y que son resultado de la combinación de muchos factores ambientales.¹⁶

2.3.1 Clasificación

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

No flavonoides

Entre ellos: Ácidos fenólicos: derivados del ácido benzoico C6-C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3.¹⁷

Flavonoides (C6-C3-C6)

Formados por dos grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado, antocianos, isoflavonas, flavonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles, taninos condensados y lignanos.¹⁷

2.3.2 Ácidos fenólicos

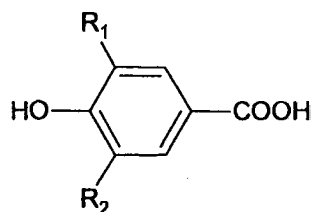
Estos compuestos tienen una función carboxílica y un grupo hidroxílico fenólico, estos compuestos derivan del ácido benzoico (anisaldehído, vanillina, ácido verátrico, ácido anísico) y del ácido cinámico (cafeico, ferúlico y sináptico).

Las acciones más importantes de los ácidos fenólicos son la actividad antimicrobiana y la actividad antiinflamatoria.⁵

Los ácidos fenólicos tienen propiedades antisépticas urinarias, propiedades antiinflamatorias de los derivados salicílicos. Inhiben la 5-lipooxigenasa de granulocitos humanos, de ello resulta una inhibición en la formación de hidroperóxidos y leucotrienos que podrían justificar el empleo en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o alérgicas.¹⁸

Los ácidos fenólicos tienen gran importancia debido a su amplia actividad biológica como son: antioxidantes, antivirales, antitumorales, antifúngicos, antimutagénicos, hepatoprotectores, antiinflamatorias e inmunoestimulantes. La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos denominados ácidos de serie cinámica son más activos que los derivados hidroxilo del ácido benzoico debido a que poseen grupos OH y carbonilo no unidos directamente al anillo bencénico.¹⁵

- **Ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico**



Ácido p-hidroxibenzoico

R ₁	R ₂	
H	H	ácido p-hidroxibenzoico
OCH ₃	H	ácido vanílico
OH	OH	ácido gálico
OCH ₃	OCH ₃	ácido siringico

Figura 2. Estructura de los ácidos benzoicos ⁵

• **Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico**

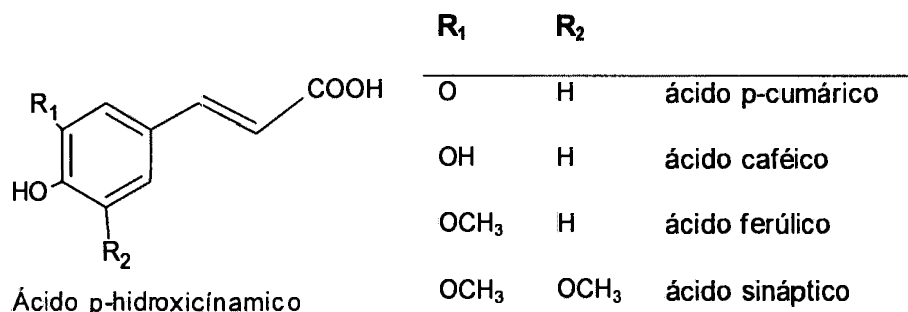


Figura 3. Estructura de los ácidos cinámicos ⁵

2.3.3 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Estos 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. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma).¹⁹

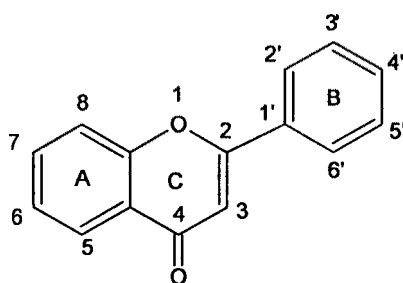


Figura 4. Núcleo básico de los flavonoides ¹⁹

2.3.4.1 Clasificación

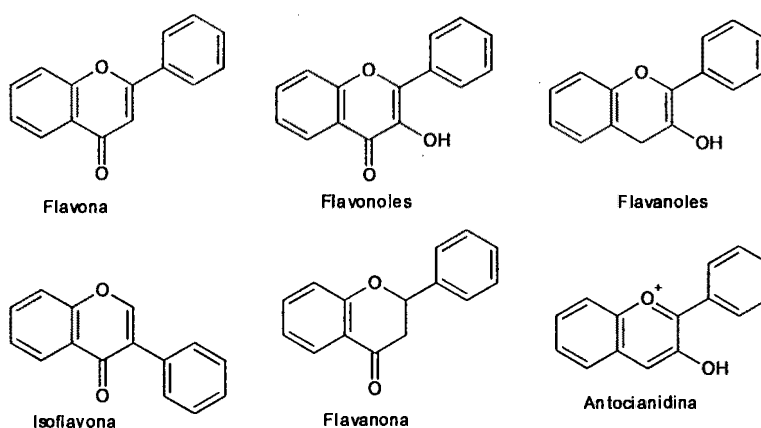


Figura 5. Clasificación de flavonoides ²⁰

2.3.4.2 Actividad antiinflamatoria de los flavonoides

La acción antiinflamatoria que posee se relaciona en parte con su interacción con diversos enzimas implicados en el metabolismo del ácido araquidónico. *In vitro* los flavonoides polihidroxiados actúan preferentemente por la vía 5-lipoxigenasa, mientras que los menos hidroxiados inhiben fundamentalmente la vía de ciclooxigenasa. *In vivo*, sin embargo parecen comportarse como inhibidores duales. Otro mecanismo implicado en la acción antiinflamatoria y en los cuales puede intervenir los flavonoides son:

- Inhibición de la liberación de histamina
- Inhibición de la migración celular
- Acción antirradicalaria
- Efecto protector vascular.⁵

2.3.4.3 Actividad antioxidante de los flavonoides

Resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Estos flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos.²¹

Los flavonoides pueden funcionar como:

- Secuestradores de radicales ROO° , RO° , O_2°
- Inactivadores de iones metálicos
- Sinergismo: reduce oxidantes oxidados (ácido ascórbico).²²

2.4 Inflamación

Es una respuesta defensiva del organismo frente a un agente irritante o infeccioso caracterizado por el movimiento de las células y fluidos desde la sangre hacia los tejidos extravasculares en el lugar en el que se ha iniciado el estímulo nocivo, bajo la influencia de factores quimiotáctico producidos localmente. Esta reacción vascular tiene como objetivo eliminar los agentes y los tejidos lesionados.²³ Esta respuesta inflamatorias está formada por plasma, células circulantes, vasos sanguíneos y constituyentes celulares del tejido conectivo. Entre las células circulantes se incluyen los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, vasófilos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son los mastocitos que rodean a los vasos sanguíneos y los fibroblastos.²⁴

2.4.1 Pasos del proceso inflamatorio

Inicia con la dilatación de los capilares, arteriolas locales, esto produce un exceso de flujo sanguíneo local, además la vasodilatación es provocada por numerosos mediadores químicos producidos por la célula del tejido circundante

entre ellos: la histamina, ciertas prostaglandinas (PGE_2 , PGI_2 , PGE_1) y el factor activador de plaquetas. Otro fenómeno que ocurre es el aumento de la permeabilidad de las paredes de las vénulas poscapilares locales, lo que favorece al paso de un volumen de líquido a los espacios intersticiales. Al intersticio ingresan grandes cantidades de agua, fibrinógeno, inmunoglobulinas. El paso de proteínas aumenta la presión oncótica y la salida de agua lo que clínicamente provoca el edema que se localiza en el área de la lesión y el aumento de la permeabilidad vascular se favorece por acción principalmente de la histamina y las prostaglandinas PGE_2 y PGI_1 .²⁵

2.4.2 Tipos de inflamación

- **Inflamación aguda.**- Es de duración corta, se inicia muy rápidamente, se caracteriza por el exudado de fluido plasmático y se produce la acumulación de neutrófilos, hay vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar.²⁶
- **Inflamación crónica.**- Sucede cuando el estímulo inflamatorio es persistente lo que puede ocasionar destrucción del tejido o pérdida de la función del órgano afectado. El infiltrado de las células inmunes típico de la inflamación crónica está compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.²⁶

2.5 Antiinflamatorios no esteroideos

Son todos aquellos que inhiben a la enzima ciclooxigenasa que es el paso previo de la vía de síntesis de los prostanoïdes. Existen dos isoenzimas de la ciclooxigenasa: ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2). La COX-1 se expresa sobre plaquetas, mucosa gástrica y vasculatura renal y es responsable de transmisión celular de señales fisiológicas. La mayoría de los efectos secundarios de los antiinflamatorios no esteroideos se dan por inhibición de esta enzima. La COX-2 es inducida en los lugares donde se produce la inflamación y su inhibición provoca los efectos antiinflamatorios y analgésicos de

los antiinflamatorios no esteroideos. Las principales acciones de los antiinflamatorios no esteroideos son los efectos antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos, aunque no todos los ejercen en igual grado.²⁶

La capacidad de los antiinflamatorios no esteroideos para reducir la inflamación es variable, dependiendo del tipo de proceso inflamatorio, participación relativa de algunos eicosanoides en él y también de la posibilidad de que actúen, además, por mecanismos de acción independientes de la inhibición de las ciclooxigenasas. Al inhibir la síntesis de PG y tromboxanos, los antiinflamatorios no esteroideos reducen su actividad sensibilizadora de las terminaciones sensitivas, así como la actividad vasodilatadora y quimiotáctica, interfiriendo de esta forma en uno de los mecanismos iniciales de la inflamación.²⁷

2.6 Radicales libres

Son aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, esta configuración espacial les hace muy inestable, extraordinariamente reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse con la mayoría de las biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) provocando un gran daño en ellas y en las membranas celulares, además cumplen numerosas funciones útiles en el organismo (de hecho, nuestro propio cuerpo los fabrica en cantidades moderadas para luchar, por ejemplo, contra las infecciones), pero en cantidades excesivas tienen el potencial de dañar nuestras células y el material genético allí contenido. Los principales radicales libres que se originan son los derivados de la respiración aerobia y se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplasmático, lo cual puede conducir a mutación y muerte celular.²⁸

Ciertos compuestos químicos ingeridos en la dieta, diversas sustancias tóxicas (humo del cigarrillo), radiaciones electromagnéticas, ozono y algunos medicamentos pueden ejercer su acción nociva en el organismo a través de la generación de radicales libres.²⁹

2.6.1 Formación de los radicales libres

a) Fuentes endógenas: Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Al elevarse las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden acarrear importantes alteraciones funcionales.³⁰

b) Fuentes exógenas: los radicales libres se producen como respuesta a la: Contaminación ambiental, radiación ionizante, luz ultravioleta, ciertas drogas, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, reactivos, solventes industriales, componentes del tabaco, hiperoxia, algunas enfermedades como: diabetes, procesos inflamatorios, fenómenos de isquemia.³⁰

2.6.2 Especies reactivas del oxígeno (ERO)

Son moléculas muy reactivas, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción.

Las principales especies reactivas del oxígeno son:

- Radical hidroxilo (HO^\bullet)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido (O^\bullet_2)
- Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)
- Peróxido (ROO^\bullet).³¹

2.6.3 Estrés oxidativo

Es el desbalance entre la producción de ERO y la defensa antioxidante que provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocasionan el deterioro y muerte celular.²⁸

2.6.4 Sistema de protección antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación. El antioxidante al reaccionar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico.³²

2.6.5 Clasificación de los antioxidantes

- **Exógenos:** vitamina E, vitamina C, Beta caroteno, Compuestos fenólicos.
- **Endógenos:** glutatión, Coenzima Q, Acido tioctico.
- **Cofactores:** cobre, Zinc, Manganeso, Hierro, Selenio.²⁸

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de Investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Farmacognosia y Farmacología del Área académica de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre del 2012 a marzo del 2013.

3.2 Definición de la población y muestra

Población: hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob. "marmaquilla" del distrito de Quinua, provincia de Huamanga, departamento Ayacucho.

Muestra: Un kg de hojas secas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".

3.3 Material biológico

Estuvo conformado por 25 ratas albinas hembras de la cepa Holtzman, de un peso aproximado de 180 a 200 g (Anexo 2), que fueron adquiridas con una semana de anticipación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, los cuales fueron alimentados con alimento balanceado y agua.

3.4 Diseño metodológico para la recolección de datos

3.4.1 Recolección de la muestra

Se procedió a recolectar las hojas frescas (Anexo 4), para luego lavarlos con la finalidad de eliminar los componentes de contaminación, después se procedió al

secado a medio ambiente durante siete días, después se trituró con un molino; una parte de la planta con hojas y flor estuvo utilizada para la identificación taxonómica en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas.

3.4.2 Preparación del extracto etanólico

Un kg de muestra seca y molida se maceró en frascos de color ámbar por un período de una semana en nueve litros de alcohol de 96° cuyo volumen cubrió la muestra. Durante el proceso se agitó mecánicamente el frasco para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se procedió a filtrar, concentrar en un rotavapor y luego en una estufa a 40°C, hasta obtener un extracto seco (Anexo 5).

3.4.3 Tamizaje fitoquímico

La identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios se realizó mediante ensayos de coloración y precipitación ³³ (Anexo 6).

3.4.4 Extracción de los compuestos fenólicos

El extracto etanólico seco se reconstituyó con agua destilada y se trató con 300 ml de éter de petróleo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que puedan interferir con la extracción de los compuestos fenólicos. La extracción líquido-líquido se realizó con 300 ml de acetato de etilo en un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo donde se encuentra los compuestos fenólicos ² (Anexo 7).

3.4.5 Identificación de compuestos fenólicos

Pruebas cualitativas.

- Reactivo de cloruro férrico: Se añadió unas gotas de cloruro férrico, sobre la fracción de acetato de etilo.
- DPPH 2 mg%
- Permanganato de potasio (Anexo 8).

Cromatografía en capa fina (CCF)

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)
- Volumen de inyección: 20 µl
- Revelador: Luz ultravioleta, cloruro férrico y DPPH.

La fracción de acetato de etilo se disolvió en 0,5 ml de metanol y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica previamente activada (fase estacionaria), se colocó la placa de CCF en la cámara teniendo cuidado que el solvente butanol: ácido acético: agua (4:1:5) no sobrepase a la muestra aplicada y dejándose que el líquido ascienda por capilaridad. Posteriormente se procedió a sacar la placa cromatográfica teniendo en cuenta que el solvente haya llegado hasta los 2 cm de la parte superior de la placa, se dejó secar la placa de CCF al aire libre y se observó en la lámpara UV CAMAG (Anexo Nº 9), finalmente se reveló con cloruro férrico al 1% y DPPH y se observó la presencia de manchas (Anexo 10).

3.4.6 Aislamiento de compuestos fenólicos

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 5 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)

La siembra de la fracción de acetato de etilo se realizó en bandas con el propósito de aislar los compuestos fenólicos, los cuales se evidenciaron en la luz ultravioleta. Estas bandas fueron recuperados, disueltos en metanol y filtrados, obteniéndose tres bandas.

Pruebas espectrales

Las bandas obtenidas fueron leídas en el espectrofotómetro ultravioleta GENESYS 6, en el rango de 200 a 500 nm, registrándose los máximos picos de absorción.

3.5 Ensayos biológicos

3.5.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria

Método del edema plantar inducida por carragenina

Fundamento: Consiste en la administración subcutánea de una pseudosolución de carragenina, extraída de las algas marinas *Chondrus crispus* a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, provocando una reacción de carácter inflamatoria agudo mediado por la liberación de diversos autacoides generando edema, eritema, dolor.¹

Procedimiento:

- **Preparación de la muestra:** Se diluyó 2 g de los compuestos fenólicos en 100 ml de carboximetilcelulosa al 0,1%, obteniéndose una concentración al 2%.
- **Preparación de carragenina:** La suspensión de carragenina al 1% (Laboratorios SIGMA), fue preparado por disolución de 1 g de carragenina en 100 ml de solución salina estéril (0,9 % NaCl).
- **Preparación de estándar:** Se diluyó tres tabletas de diclofenaco (150 mg) en 50 ml de solución salina estéril (0,9 % NaCl).
- Las 25 ratas fueron divididos en 5 grupos: primer grupo (blanco), segundo grupo (estándar), tercer grupo, cuarto grupo y quinto grupo (compuestos fenólicos). los cuales estuvieron en ayunas previo al experimento.
- Cada rata fue marcada con plumón marcador.

- La administración de la muestra problema y el estándar fue por vía oral a través de una sonda adaptada por un medidor de volumen.
- A todos los grupos se le administró 0,1 ml de carragenina, después de 30 minutos de administrar la muestra y el estándar en el tejido subplantar de la pata posterior derecha de la rata.
- La medición del volumen de la pata se realizó utilizando un pletismómetro desde el tiempo cero y cada 30 minutos hasta 5 horas.

Técnicas de medición:

- Preparar el pletismómetro manual.
- Enrazar con agua a la altura de la marca de la jeringa.
- Sumergir la pata inflamada en la jeringa hasta coincidir con la marca de la pata y la jeringa superior.
- Retirar el animal y medir el volumen desplazado en la jeringa inferior.

El cálculo del porcentaje de inflamación se realizó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inflamación} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Dónde:

V_T = Volumen de la pata inflamada en un tiempo "X"

V_0 = Volumen de la pata normal.

Diseño experimental

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 5 ratas, y tratados vía oral de la siguiente manera:

- Grupo I: Blanco, al cual se le administró carboximetilcelulosa al 0,1% y 30 minutos después se inyectó carragenina (0,1 ml) al 1%.
- Grupo II: Control, al cual se le administró diclofenaco 20 mg/kg y 30 minutos después se inyectó 0,1 ml de carragenina 1%.

- Grupo III, IV, V: Se administró 100 mg/kg, 200 mg/kg y 400 mg/kg de los compuestos fenólicos en carboximetilcelulosa al 0,1% y 30 minutos después se les inyectó 0,1 ml de carragenina al 1%.

3.5.2 Método de la capacidad secuestradora del radical DPPH

Fundamento: El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa. Se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre en toda la molécula, de manera que las moléculas no dimerisen, como en el caso de la mayoría de otros radicales libres. La deslocalización también da lugar a un color violeta oscuro, que se caracteriza por una banda de absorción en solución de etanol a aproximadamente 520 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces esto da lugar a la forma reducida con la pérdida de este color violeta.²

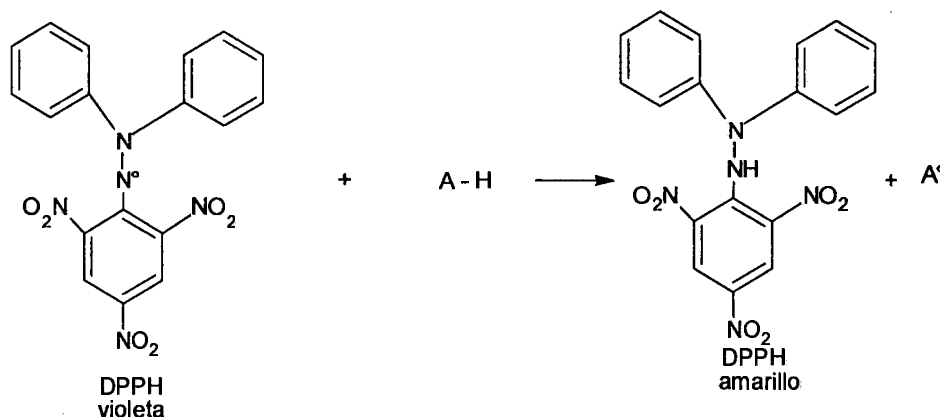


Figura 6. Reacción de reducción del DPPH³⁴

Procedimiento:

Para el ensayo se utilizó lo siguiente:

- Una solución metanólica de DPPH de 20 µg/l.

- Una solución metanólica del extracto a una concentración de 300 µg/ml (solución A)
- Una solución blanco de metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- Un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (solución A) más 1,5 ml de metanol.
- Un patrón de referencia con 1,5 ml de DPPH más 0,75 ml de agua destilada.
- La muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una solución final de 100 µg/ml.
- Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro.
- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 para obtener una solución final de 50 µg/ml (solución B) y luego en una proporción de 1:9, para obtener una concentración final de 10 µg/ml (solución C).
- Con la solución B y C se procedió igual que el anterior.
- Para la comparación, el estándar Vitamina C y ácido caféico, se preparó siguiendo el mismo procedimiento que conlleva a lograr concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.

Para los cálculos del porcentaje de actividad antioxidante se empleó la siguiente fórmula:

$$AA \% = \frac{Ac - (Am - Ab)}{Ac} \times 100$$

Dónde:

AA%: porcentaje de actividad antioxidante.

Ac: Absorbancia del DPPH.

Am: Absorbancia de la muestra.

Ab: Absorbancia del blanco.

3.6 Análisis de datos

Para la actividad antiinflamatoria, se analizaron los datos de volumen de inflamación, hallando la media de cada uno de los tratamientos y la desviación estándar; y se representó en forma de un gráfico de barras de error. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante el análisis de varianza y la prueba complementaria de Tukey al 95% de confianza.

Los resultados de la actividad antioxidante se representaron en forma de gráficos en función de las medias. Las diferencias entre las medias fueron contrastadas mediante el Análisis de Varianza Factorial (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios del extracto etanólico

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Azúcares reductores	Benedict	++	Precipitado rojo
Catequinas	Catequina	+++	Mancha verde carmelita a luz UV
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+++	Precipitado rojo
Flavonoides	Shinoda	++	Fase amilica de color rojo intenso
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde intensa
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	++	Coloración verde oscura

Leyenda:

- (+) : Leve
- (++) : Moderada
- (+++): Abundante

Tabla 2. Características químicas de los compuestos fenólicos

Fracción	Prueba de FeCl ₃ 5%	Prueba de KMnO ₄	DPPH	Características		
				FeCl ₃	KMnO ₄	DPPH
Acetato de etilo	+++	+++	+++	verde oscuro	decolora, precipita	decolora

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

Tabla 3. Características cromatográficas de los compuestos fenólicos

Fracción	Revelador		
	Fluorescencia	FeCl ₃	DPPH
Acetato de etilo	celeste	marrón	Amarillo
	azul	marrón	Amarillo
	Verde-limón	marrón	Amarillo
Ac. Caféico	celeste	marrón	Amarillo
Quercetina	amarillo	marrón	Amarillo

Tabla 4. Características espectrales de los compuestos fenólicos

Fracción	Sub-fracciones	Ultravioleta (nm)
Acetato de etilo	F1(celeste)	270 nm.
	F2 (azul)	280 nm y 330 nm
	F3 (verde limón)	285 nm y 330 nm
Estándar ácido benzoico		230 nm y 270 nm
Estándar ácido tánico		220 nm y 272 nm

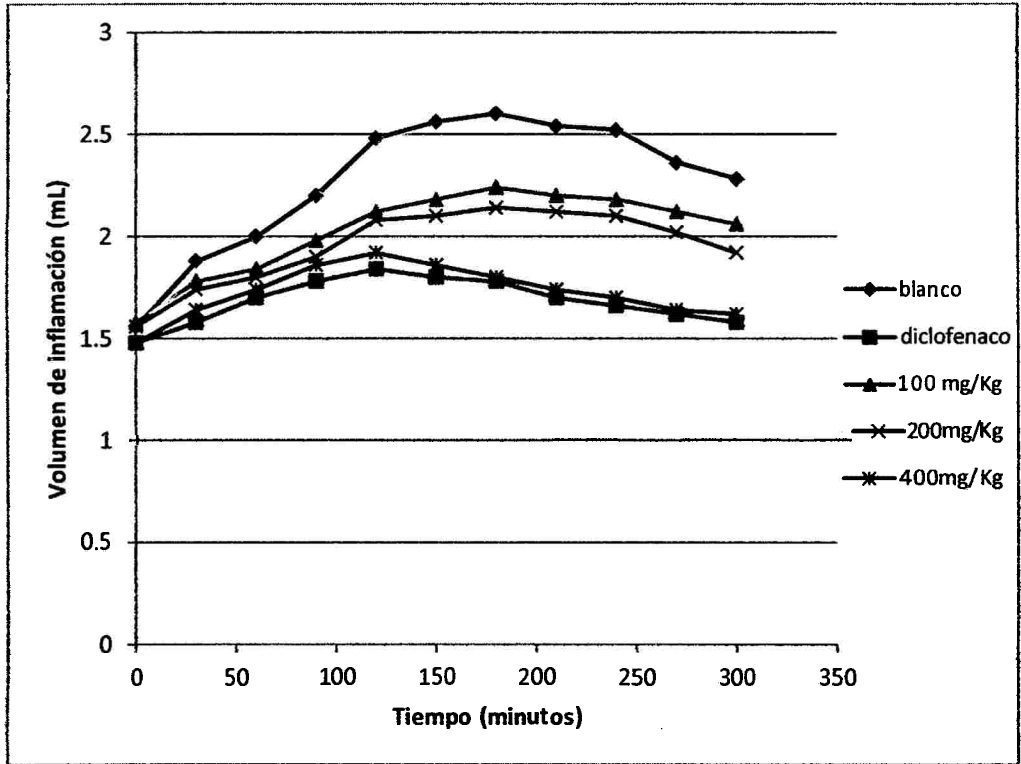


Figura 7. Volumen de inflamación en función del tiempo

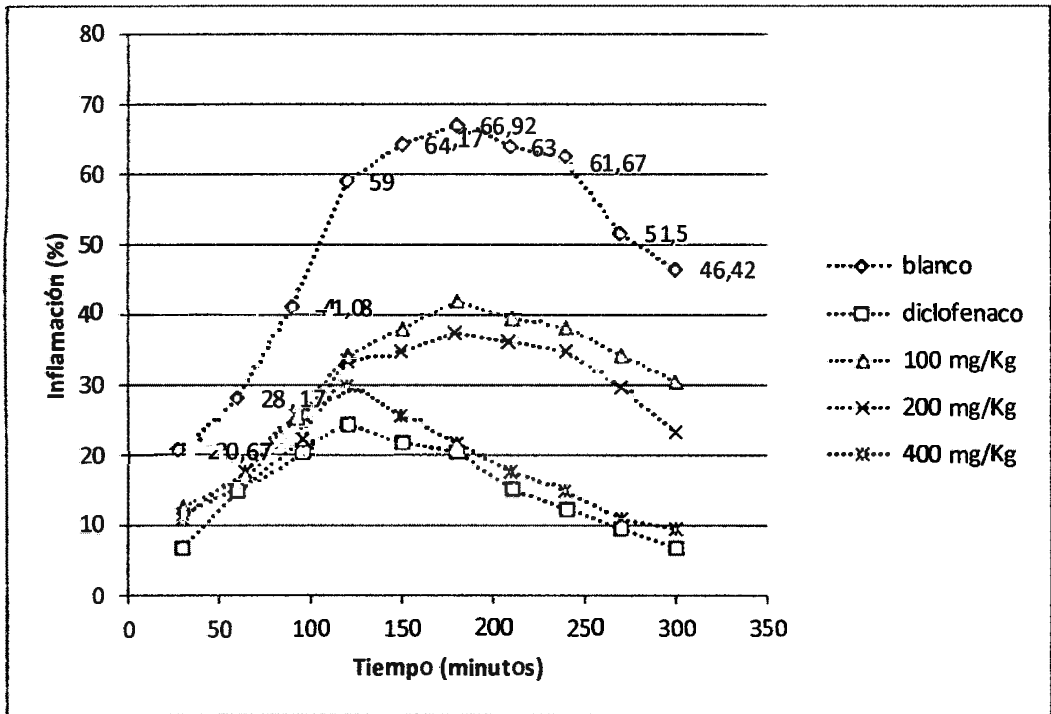


Figura 8. Porcentaje de inflamación en función del tiempo

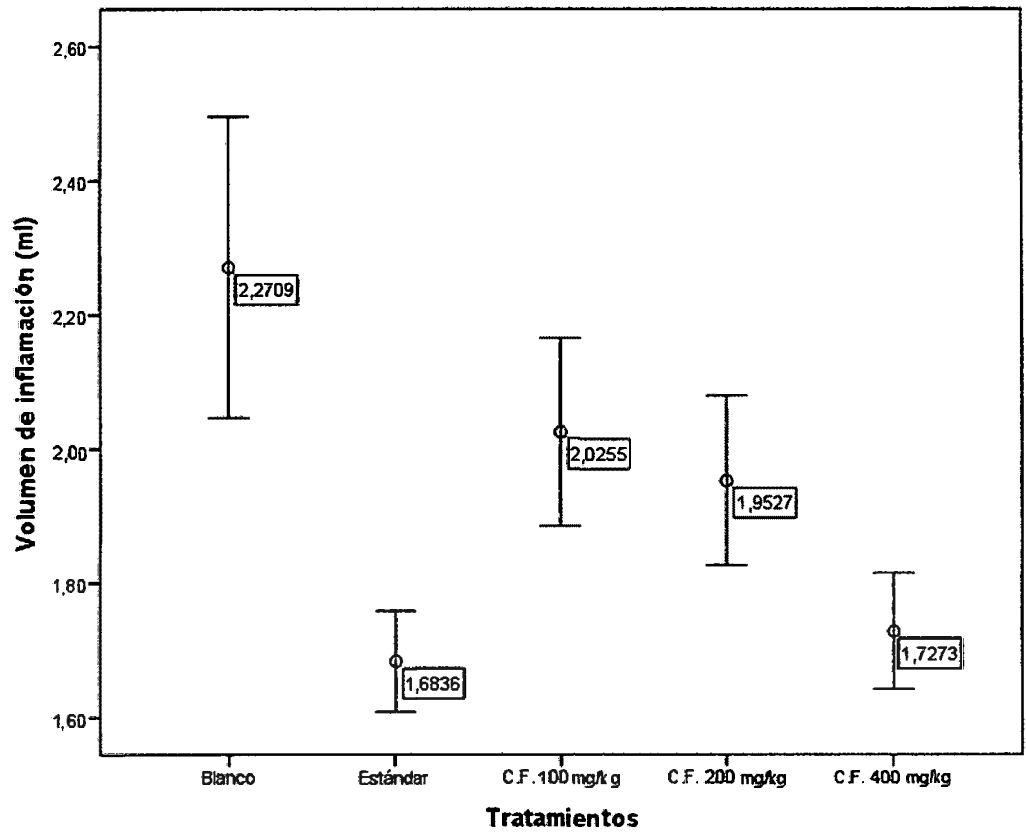


Figura 9. Volumen de inflamación según tratamientos

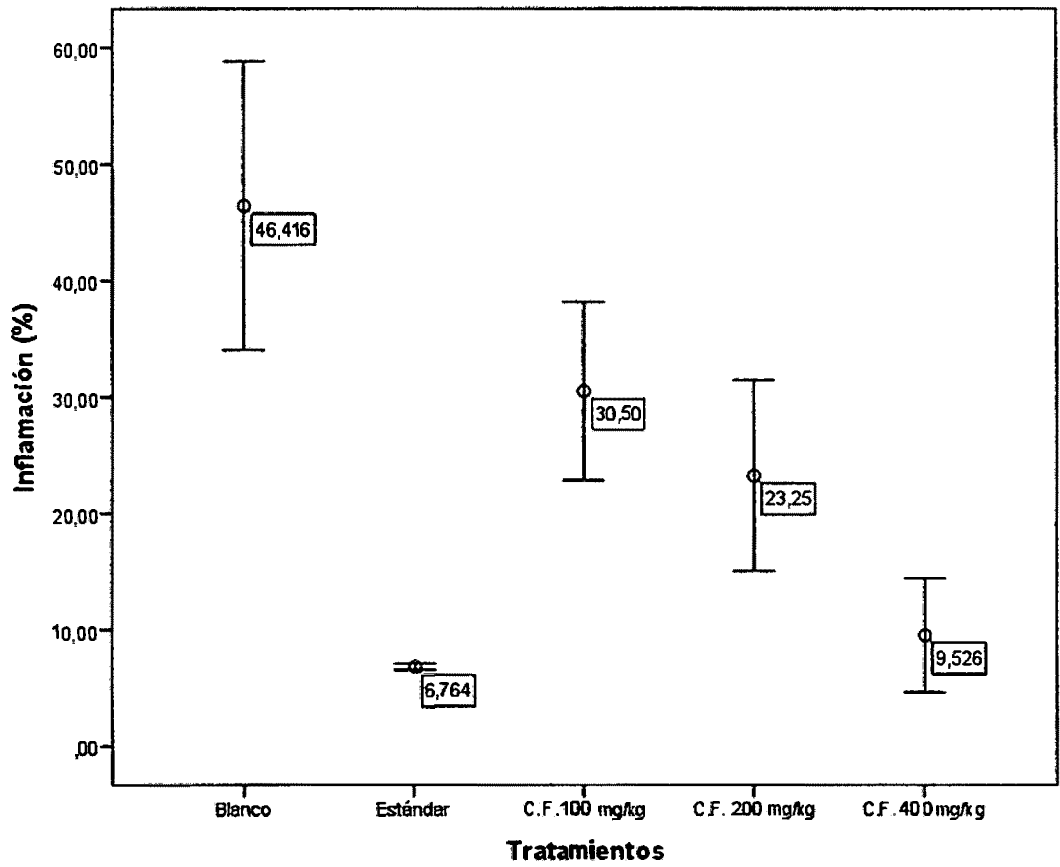


Figura 10. Porcentaje de inflamación según tratamientos

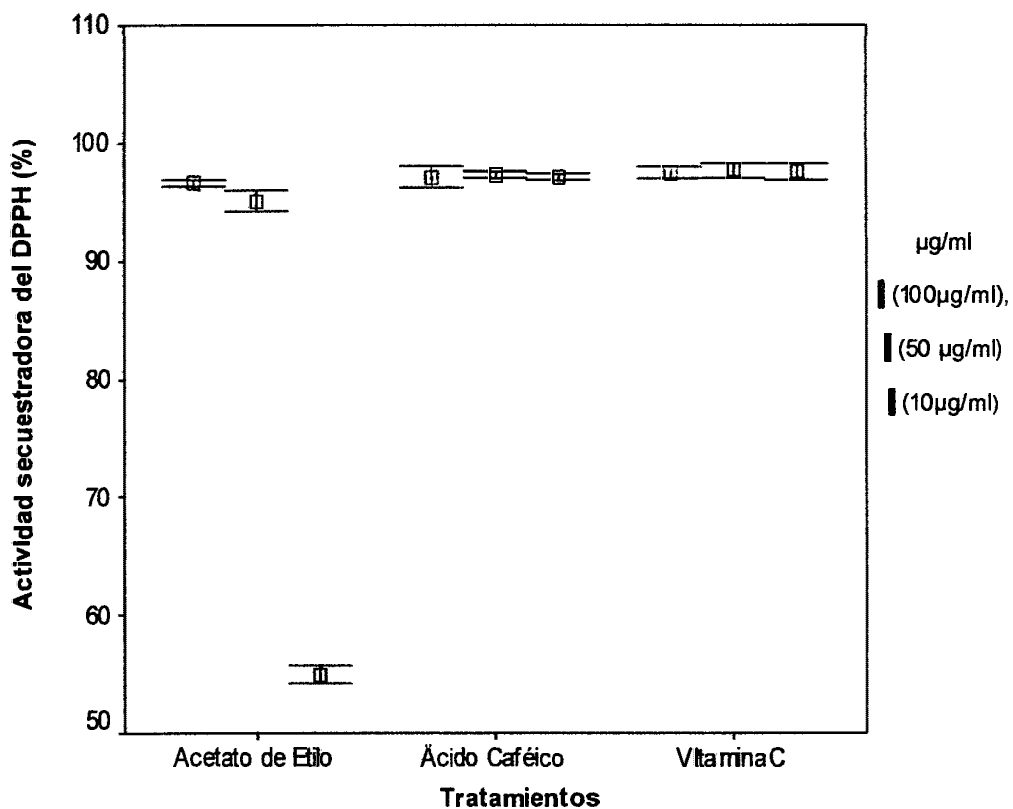


Figura 11. Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH según tratamientos

V. DISCUSIÓN

El organismo humano bajo condiciones normales y ambientales produce sustancias químicamente inestables llamadas radicales. Estos pueden producir daños oxidativos en diversas macromoléculas biológicas, lo que puede propiciar el inicio de enfermedades degenerativas como: cáncer, inflamación, cardiopatías cataratas, etc. Por lo que se ha generado un gran interés hacia el papel que ejercen los antioxidantes.³⁵

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se utiliza una secuencia de disolventes con polaridad divergente.³⁶ De esta manera, se procedió a la extracción de los compuestos fenólicos con diferentes solventes, primeramente con etanol para extracción de los metabolitos secundarios presentes en la planta, segundo con el éter de petróleo para poder eliminar las resinas y grasas del extracto, después se extrajo con acetato de etilo para extraer los compuestos fenólicos² (Anexo 7).

En el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico desarrollado según la técnica de Lock de Ugaz¹⁴ y Miranda y Cuellar³³, se reporta la presencia de los metabolitos secundarios como: azúcares reductores, catequinas, lactonas y/o cumarinas, flavonoides, fenoles y/o taninos, triterpenos y/o esteroides (Tabla 1 y Anexo 6), lo cual coincide con un reporte anterior.⁷ Por lo que asumimos que la presencia de estos metabolitos secundarios podría explicar su acción farmacológica y justificar

el empleo de la planta en el tratamiento antiinflamatoria y antioxidante. Los metabolitos secundarios encontrados en abundancia fueron: catequinas, cumarinas y fenoles y/o taninos, los compuestos fenólicos pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro que producen cuando se le agrega el cloruro férrico al 5%.¹⁴ En la prueba de catequina se evidencia por la fluorescencia verde a la luz UV, así mismo en la prueba de Baljet para identificar cumarinas dan un precipitado de color rojo y en concentraciones moderadas se identificó flavonoides, azúcares reductores y triterpenos y/o esteroides, con la reacción de Shinoda el cambio de color de amarillo a roja indica la presencia de flavonas y flavonoles, color rojo presencia de flavanonas.¹⁴ En la prueba de Benedict para los azúcares reductores dan un precipitado de color rojo ladrillo, en la prueba de Liebermann-Burchad para los triterpenos y/o esteroides dan un color verde oscuro.

En las pruebas químicas realizadas de los compuestos fenólicos aislados (Tabla 2 y Anexo 8), fueron diferenciadas por las pruebas de cloruro férrico al 5%, Con KMnO_4 y DPPH, en la prueba química con FeCl_3 al 5 % se produjo un color verde oscuro identificándose presencia de grupos fenólicos en abundante concentración. La prueba química con KMnO_4 produce un cambio de coloración y un precipitado intenso, este cambio de coloración del KMnO_4 se debe a que ésta se reduce debido a la acción de los compuestos.⁵ En la prueba química con DPPH se observa la decoloración del radical libre, debido a que el radical libre tiene un electrón desapareado y es de color violeta decolorándose a amarillo cuando reacciona con los compuestos fenólicos que pueden donar un átomo de hidrogeno.^{37 38} Dado que todas las reacciones son positivas podemos afirmar que los compuestos fenólicos de las hojas de *Ageratina sternbergiana* tienen propiedades antiinflamatoria y antioxidante.

En la Tabla 3 y Anexo 9, se observa la presencia de fluorescencias de color celeste, azul y verde-limón a la luz del espectro ultravioleta, de lo cual se deduce que se trata de tres compuestos fenólicos diferentes, cuando se revela a la misma placa con cloruro férrico al 1 % y DPPH (Anexo 10), se observan manchas de color marrón y amarillo a la luz visible. Estas fluorescencias de color celeste, azul y verde a la luz UV indican que se trata de compuestos fenólicos.¹⁴ Estudios realizados de la *Ageratina stembergiana* determinaron la presencia de una flavanona llamada sterbin (5,3^l,4^l- trihidroxi- metoxi- flavanona), 5,3^l- dihidroxi-7,4^l - dimetoxiflavanona y sakuranetina.⁸

Para la caracterización de los compuestos fenólicos se realizó con la espectroscopia ultravioleta, lográndose separar de la fracción de acetato de etilo tres bandas (F1, F2 y F3) (Tabla 4 y Anexo 11). La fracción F1 corresponde a un compuesto fenólico con una fluorescencia celeste y muestra una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 270 nm, la fracción F2 corresponde a un compuesto fenólico con una fluorescencia azul y muestra una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 280 y 330 nm, la fracción F3 corresponde a otro compuesto fenólico con una fluorescencia verde-limón y muestra una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 285 y 330 nm (Anexo 12).

Los estándares utilizados fueron: Ácido benzoico con una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 230 y 270 nm y ácido tánico con una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 220 y 275 nm (Tabla 4 y Anexo 13), que son similares a la absorbancia de la fracción F1. Por lo tanto podemos asumir que se trata de un compuesto fenólico derivado del ácido benzoico.

En un estudio realizado sobre *Ageratina stembergiana* se reportó la presencia persicogenina (5,3^l - dihidroxi, 7,4^l - dimetoxi- flavona) con absorbancia en el espectro UV a 292 y 332 nm y sterbina (5,3^l,4^l-trihidroxi, 7-metoxi-flavanona), con absorbancia en el espectro UV a 280 y 330 nm.⁸ Todos estos datos son

similares a los reportados en el presente trabajo por lo tanto podemos asumir que los compuestos fenólicos aislados podrían corresponder a la persicogenina, sterbina y un derivado del ácido benzoico.

El mayor efecto de la carragenina se obtiene a las tres horas después de su inyección.³⁹ ¹ siendo comprobada en la presente investigación ya que en la inducción de edema por carragenina hay un incremento progresivo durante las tres primeras horas con un porcentaje de inflamación de 66,92 %, a partir de ésta hay una disminución de la inflamación (Figura 8).

En la Figura 7, se muestra la variación del volumen de inflamación de los compuestos fenólicos en función del tiempo y en la Figura 8, se observa el porcentaje de la inflamación, donde se aprecia que el diclofenaco 20 mg/kg (estándar) presenta una menor curva seguida de la dosis de 400 mg/kg, 200 mg/kg, 100 mg/kg y por último el blanco. Debido a que los compuestos fenólicos presentes en esta especie vegetal a las diferentes dosis si posee efecto antiinflamatorio, esta propiedad se debe a su acción antioxidante y a su habilidad de actuar contra la histamina y otros mediadores de la inflamación.^{40, 41,42} En un estudio de la actividad antiinflamatoria de esta especie, la dosis de 200 mg/kg tiene una mejor respuesta en comparación con las demás dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg y la indometacina.⁷

En la Figura 9, se muestra la variación del volumen de inflamación según los tratamientos, en donde se puede apreciar que la dosis de 400 mg/kg tiene un comportamiento similar al diclofenaco en su capacidad para disminuir la inflamación inducida por carragenina, debido a que estos compuestos ejercen acción antiinflamatoria al inhibir las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de 5-lipoxigenenasa y ciclooxigenasa.¹⁹ ⁴³

En la Figura 10 y Anexo 15, se observa que la dosis de 400 mg/kg comparado con el estándar (diclofenaco), poseen un comportamiento similar con un

porcentaje de inflamación de 6,764% y 9,526%. Del análisis estadístico, (Anexo 16), se demuestra que existe diferencia significativa en los diferentes tratamientos evidenciándose de esta manera que existe efecto antiinflamatorio en los grupos que recibieron los compuestos fenólicos respecto al control y en la prueba de Tukey (Anexo 17), se demuestra que la dosis de 200 mg/kg y 100 mg/kg son similares pero aún no se comparan estadísticamente al estándar (diclofenaco). Asimismo se observa que la dosis de 400 mg/kg y el estándar (diclofenaco), estadísticamente poseen el mismo comportamiento farmacológico. En la Figura 11 y Anexo 18, se muestra que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina stembergiana* demostraron tener actividad antioxidante al captar los radicales libres DPPH. Esta capacidad antioxidante de estos compuestos se debe principalmente a sus propiedades redox, el cual les permite actuar como agente reductora donante de hidrogeno, desactivadores de hidrogeno singlete o quelantes de metales, además depende de su estructura individual y del número de hidroxilos sustituyentes.^{36, 3}

La concentración de 10 µg/ml tuvo una actividad antioxidante del 54,39 %, los de 50 µg/ml en un 95,17 % y los de 100 µg/ml en 96,68 %, y los estándares ácido caféico y ácido ascórbico en 97,2 % y 97,61%. Si comparamos los porcentajes de captación de radicales libres de los estándares con los compuestos fenólico aislados podemos decir que las concentraciones de 50 µg/ml y 100 µg/ml de compuestos fenólicos tiene una actividad antioxidante ligeramente inferior a los estándares. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular, la cual influye en la facilidad con la que un átomo de hidrogeno de un grupo hidroxilo aromático puede ser donado a un radical libre y en la habilidad de un fenol de soportar un electrón no apareado.⁴⁴ La vitamina C es un poderoso antioxidante hidrosoluble, inhibe la oxidación de los lípidos,

actúa contra las enfermedades cardíacas, cáncer y otros trastornos degenerativos.²⁸

En el análisis de varianza factorial demuestra que existe diferencia estadística entre la actividad secuestradora de los compuestos fenólicos, ácido caféico y ácido ascórbico (Anexo 19).

Con estos resultados obtenidos en el presente trabajo podemos afirmar que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla" tiene actividad antiinflamatoria y antioxidante.

VI. CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos aislados de las hojas *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla" tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante.
2. El extracto etanólico de las hojas *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla", presenta metabolitos secundarios como son: azúcares reductores, catequina, cumarinas, flavonoides, fenoles y taninos y triterpenos y/o esteroides.
3. Se aislaron tres compuestos fenólicos (dos flavonoides y un derivado del ácido benzoico) de las hojas *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".
4. La dosis de 400 mg/kg de los compuestos fenólicos tuvo mayor actividad antiinflamatorio entre las dosis evaluadas y similar efecto antiinflamatorio que el diclofenaco.
5. Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla" tienen actividad antioxidante sobre los radicales libres del DPPH.

VII. RECOMENDACIONES

1. Proseguir con el estudio de la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla" cuantificando cada uno de los componentes por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
2. Realizar estudios de formulación de los compuestos fenólicos en distintas presentaciones para su empleo como antiinflamatorio y antioxidante.
3. Realizar estudios de toxicidad de las hojas de *Ageratina stembergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo. Métodos Farmacológicos para la validación de plantas medicinales. Barcelona- España. 2001.
2. Aguilar Felices E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante y antirradicalaria. [tesis de maestría]. Lima. UNMSM; 2007.
3. Muñoz A, Ramos F. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades Biomedicinales. Horizonte Médico [revista en internet] junio 2007. [acceso Febrero – Julio del 2013]; Vol. 7: N°1: 23-31. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v73n3/a03v73n3.pdf>.
4. Vicet Muro L. Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora*, L [tesis doctoral]. Cuba. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas; 2009.
5. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España. 1999.
6. Pietrellini F. Las plantas medicinales en un piso alto y mesoandino. Estudio etnobotánico de la zona de Puquio- Ayacucho: Impreso en Graficenter Perú; 2007.
7. León N, Félix L, Chávez J, Quispe P. Estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de los tallos de *Ageratina sternbergiana* (DC). ECI Perú. Rev. de encuentro científico internacional [revista en internet] agosto 2011. [acceso junio 2013]. 8(2): 245-252. disponible en: <http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.phpscript=sciarttex&pid=S181301942011000200041&lng=es&nrm=iso.ISSN1813-0194>
8. Gonzales A, Fraga B, García V, Hernández M. Esterbina. Una nueva flavanona del *Eupatorium sterbergianum*. Rev. Latinoamer. Quím. [revista en internet] 1984. [acceso marzo 2013]; 14(3): pp. 115-117. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/21733>.
9. Sanabria A, Sarmiento G, Rodríguez M. Actividad antifúngica y antibacteriana de *Ageratina ibaguensis*. Rev. Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. [revista en internet] 1995. [acceso marzo 2013]; N° 23: 58-63. Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/231338514_Actividad_antifungica_Ageratina_ibaguensis.
10. Del Barrio G, Spengler I, García T, Roque A, Álvarez A, Calderón J. Antiviral activity of *Ageratina havanensis*, and major chemical compounds from the most active fraction. Brazilian Journal of Pharmacognosy. [revista en internet] 2011. [acceso febrero 2013]; 21(5): 915-920. Disponible en: [http://www.researchgate.net/publication/231338514_Antiviral_activity_of_Ageratina_havanensis_\(Kunth\)_and_major_chemical_compounds_from_the_most_active_fraction](http://www.researchgate.net/publication/231338514_Antiviral_activity_of_Ageratina_havanensis_(Kunth)_and_major_chemical_compounds_from_the_most_active_fraction).
11. García G, García E, Martínez I, Scior T, Salvador J, Martínez M. Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test. Brazilian Journal of Pharmacognosy. [revista en internet] setiembre/octubre 2011. [acceso febrero 2013]; 21(5): 928-935. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v21n5/aop17311.pdf>
12. Tovar O. Plantas medicinales del Mantaro. CONCYTEC. Perú. 2001.
13. Arteta M. Etnobotánica de plantas vasculares en el centro poblado Llochon, distrito Capachira, Departamento Puno, 2007-2008. [tesis pregrado]. Arequipa- Perú; 2008.

14. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo Editorial; 1994.
15. Soler Cantero A. Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional [tesis doctoral]. Universidad de Lleida; 2009.
16. Echavarría B, Franco A, Martínez A. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de Macroalgas del Caribe de Colombia. VITAE, Rev. de la Facultad de Química Farmacéutica [revista en internet] 2009. [acceso marzo 2013]; 16(1): 126-131. Disponible en: <https://www.cenam.mx/simposio2009/sm2009/compuestosfenolicos/M2/S M2009-M220-1108.pdf>
17. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. OFFARM, ámbito Farmacéutico nutrición [revista en internet] 2004. [acceso febrero 2013]; 23(6). Disponible en: http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet_f=10&pident_articulo=13063508&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v23n06a13063508pdf001.pdf
18. Bruneton J. Plantas medicinales. Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza-España. 2001.
19. Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Rev. Nutr. Hosp [revista en internet]. 2002. [acceso febrero 2013]; 17 (6): 271-278. Disponible en: http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002/2002_los_flavonoides_propiedades-y_acciones_antioxidantes.pdf
20. Hollman P, Arts. Flavonols, flavones and flavanols: Nature, occurrence and dietary burden. J Sci Food Agric. [revista en internet] 2000. [acceso marzo 2013]; 19(4): 1487-1496. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/AGR/IND22079368/reload=0;jsessionid=gCBU5iyUzFclzt7fSZ0.4>
21. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev. Fac. Med. UNAM [revista en internet] 2009 Marzo-Abril. [acceso Febrero 2013]; Vol. 52 No. 2; pp:73-75; disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>
22. Frankel E. Oxidación lipídica y evaluación de antioxidantes. Universidad de California. Davis EE.UU. Editado por Franco D. y Moure A. (2010). En antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicología y aplicaciones industriales. Santiago de Compostela: Gráficas Garabal S.L. 2005.
23. Brees M, Berkow R. El manual de Merck de diagnóstico y tratamiento de la inflamación. Décima Edición. Editorial Harcourt; 2000.
24. García P. Inflamación. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp) [revista en internet] 2008. [acceso febrero 2013]; 102(1); pp. 91-159. Disponible en: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>
25. Hall V, Murillo N, Rocha M, Rodríguez E. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Centro nacional de información de medicamentos del Instituto de Investigación Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica. 2001.
26. Dawson S. Lo esencial en Farmacología. inflamación, analgesia e inmunidad. 9ª ed. Madrid-España: Elsevier; 2003.
27. Flores J. Farmacología Humana. Cuarta Edición. Editorial Masson. España. 2003.

28. Criado C, Moya M. Vitaminas y antioxidantes. Servicio de Medicina Interna y Urgencias. Ed. Sanidad y Ediciones, S.L. Barcelona. actuaciones el médico; 2009.
29. Troncoso L. Efecto del ascorbato sobre la ruptura de los puentes disulfuro. [tesis de maestría]. Lima Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1996.
30. Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomédica y estrés oxidativo. Rev. Med. Milit. "DR. Luís Díaz Soto" Cuba [revista en internet]. 2001. [acceso febrero 2013]; Vol. 30 (1): 36-44. Disponible en: http://bvvs.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/mil07100.pdf
31. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cubana Med. Milit. [revista en internet]. 2002. [acceso Febrero de 2013]; 30(1):15-20. Disponible en: http://bvvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf
32. Céspedes T, Sánchez D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Rev. Cubana Cardiol. [revista en internet] 2000. [acceso marzo 2013]; 14(1): 55-60. disponible en: http://bvvs.sld.cu/revistas/car/vol14_1_00/car08100.pdf
33. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y productos naturales, Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba. 2000.
34. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenyl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Sangklanakarín J. sci. technol. [revista en internet] 2003. [acceso febrero 2013]; 26(2): 211-219. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-old/journal/26-2/07-DPPH.pdf>
35. Ramírez I. Efecto de la administración oral de extractos vegetales con actividad antioxidante sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en ratas [tesis doctoral]. universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Química y Farmacia; 2004.
36. Banerjee S, Bonde C. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia retusa* Spreng Bark: Impact of dielectric constant and geographical location Journal of medicinal plants research [revista en internet]. 2011. [acceso febrero 2013]; Vol. 5(5). 817-822. disponible en: <http://www.academicjournals.org/jmpr/pdf/pdf2011/4Mar/Banerjee%20and%20Bonde.pdf>
37. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico [revista en internet]. 2008 [acceso Febrero de 2013]; Vol. 8 N°1. Disponible en: <http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008-I/Art4-Vol8-N1.pdf>.
38. Gutiérrez M, Ortiz C, Mendoza C. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimento animal. Simposio de Metrología [revista en internet] 2008. [acceso febrero 2013]; Vol. 1(1). Disponible en: https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf
39. Gómez H, Gonzales K, Medina J. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas [revista en internet]. 2011. [acceso febrero 2013]; Vol. 10. N°3. 182-217; disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oaid=85618379003>
40. Martínez A. Flavonoides. Doctor en Ciencias de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia- Medellín. Colombia. 2005.

41. Estrada R, Ubaldo D, Araujo A. Los flavonoides y el sistema nervioso central. *Salud mental [revista en internet]* 2012 setiembre. [acceso marzo 2013]; 35(5): 375-384. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018533252012000500004&script=sci_arttext
42. Ruiz N, Rincón F, Hernández V, Figueroa D. Determinación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en granos de maíz. *Rev. Fitotécnica Mexicana [revista en internet]* 2008 setiembre. [acceso marzo 2013]; 31(3): 29-34. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/610/61009706.pdf>
43. Vergel N. Estudio de la actividad anticonvulsivante de los metabolitos secundarios tipo cumarinas [tesis doctoral]. Universidad Nacional de Colombia. 2011.
44. Calderón P. Determinación de las propiedades antioxidantes del jugo de naranja comercial sometido a distintas condiciones de almacenamiento. [tesis pre-grado]. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 5. Certificado de identificación taxonómica



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, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Elva Carina, **CORONADO BENDEZÚ**, 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
SUBCLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GENERO	:	Ageratina
ESPECIE	:	<i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob.
N.V.	:	"marmaquilla"

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

Ayacucho, 20 de Noviembre del 2012

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

Dña. Laura Mercedes Rojas
Jefe

Anexo 2

Tabla 6. Certificado sanitario del material biológico



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Vicerrectorado de Investigación

CERTIFICADO

San Martín de Porres, 13 de Diciembre del 2012

Mediante la Presente se certifica que las 25 ratas albinas de la cepa Holtzman, de sexo hembra, edad adulta y pesos entre 180 a 200 gramos adquiridas por la Srta. Elva Carina Coronado Bendezú, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizados en cualquier protocolo Biomédico.

Atentamente

D^o. Fernando Benavides M.

Jefe de Bioterio-LID

Vicerrectorado de Investigación-UPCH

Av. Honorio Delgado 430 - Lima 31 Aptdo. Postal 4314 - Lima 100
Telef: (51-1) 482-1524 Fax: (51-1) 319-0004

Anexo 3

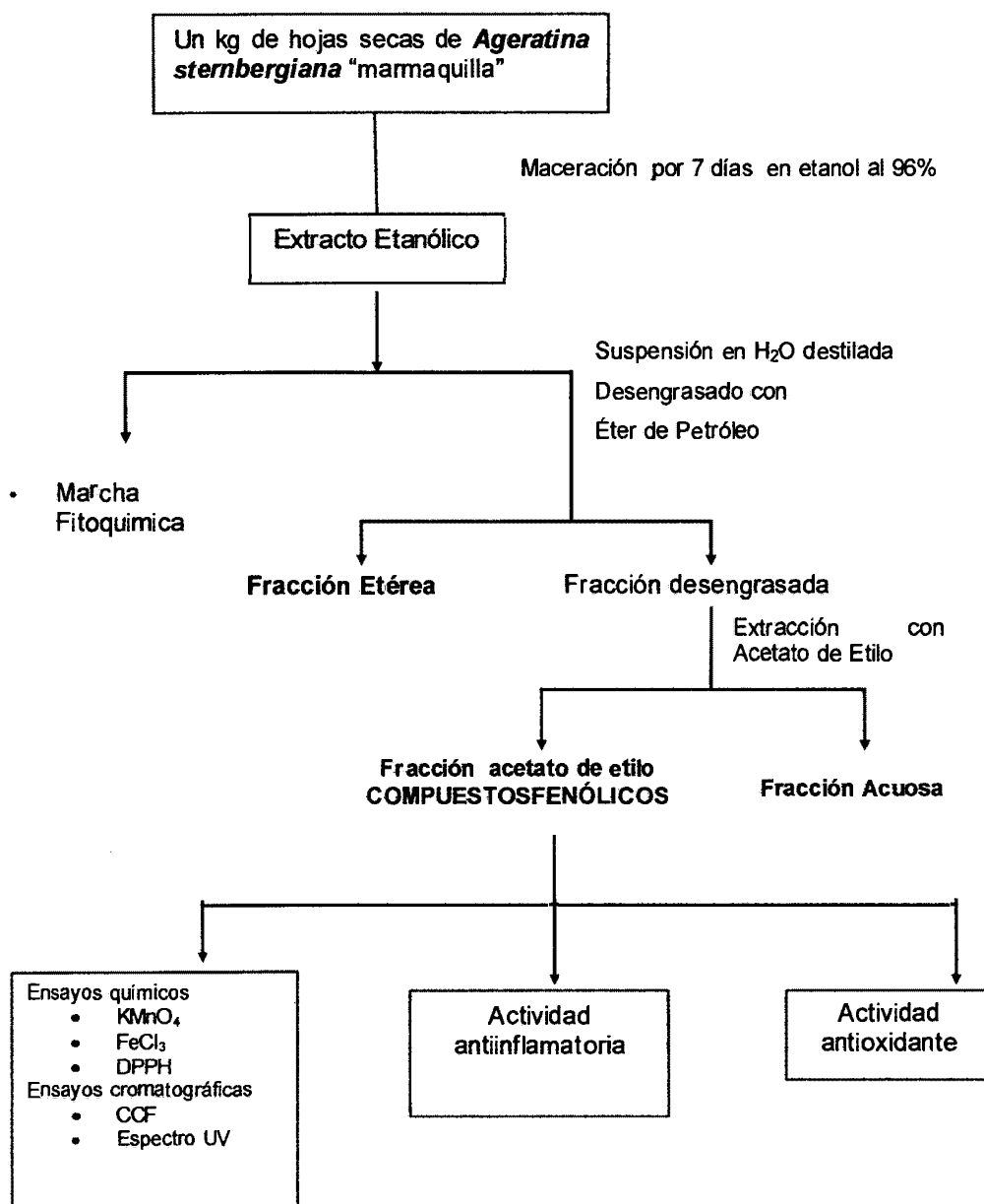


Figura 12. Flujograma en obtención de los compuestos fenólicos

Anexo4



Figura 13. Recolección de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob
"marmaquilla"

Anexo 5



Figura 14. Equipo de rotavapor para la concentración del extracto etanólico

Anexo 6

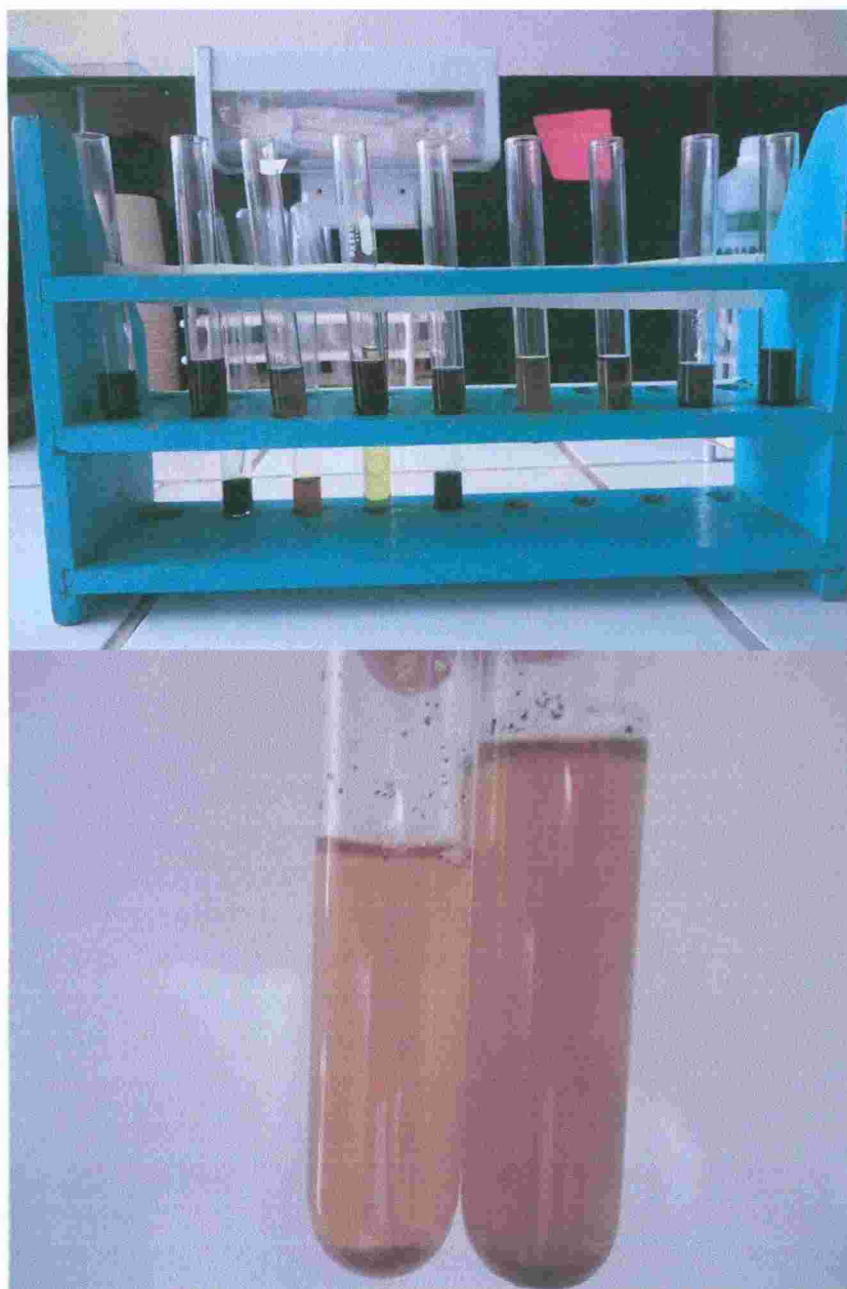


Figura 15. Tubos de ensayo del tamizaje fitoquímico y reacción de Shinoda del extracto etanólico

Anexo 7



Figura 16. Equipo de extracción líquido– líquido

Anexo 8

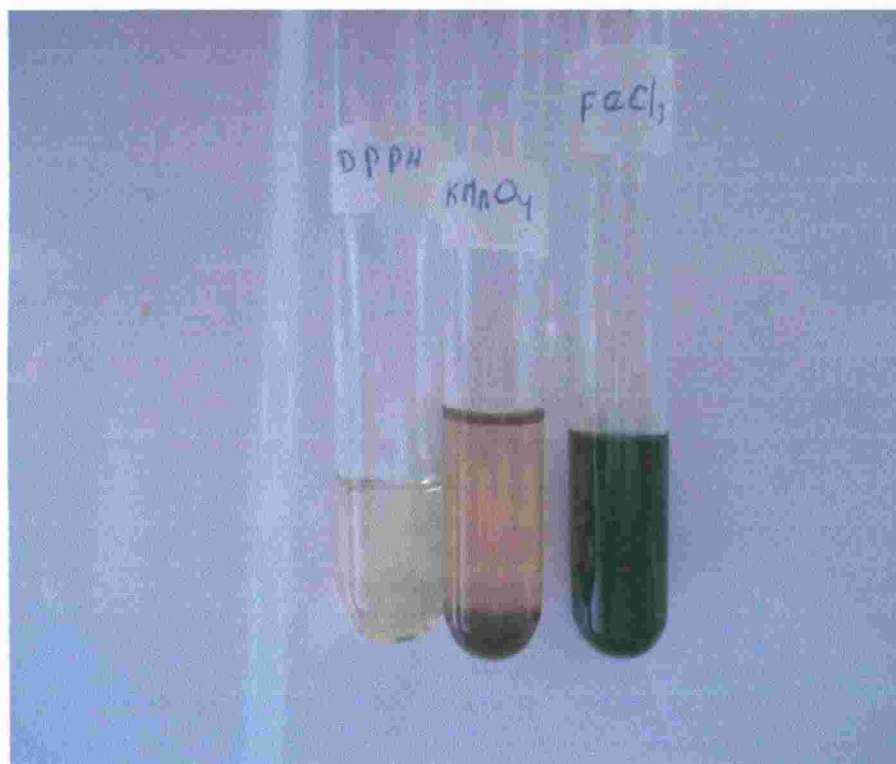


Figura 17. Pruebas químicas de los compuestos fenólicos aislados

Anexo 9

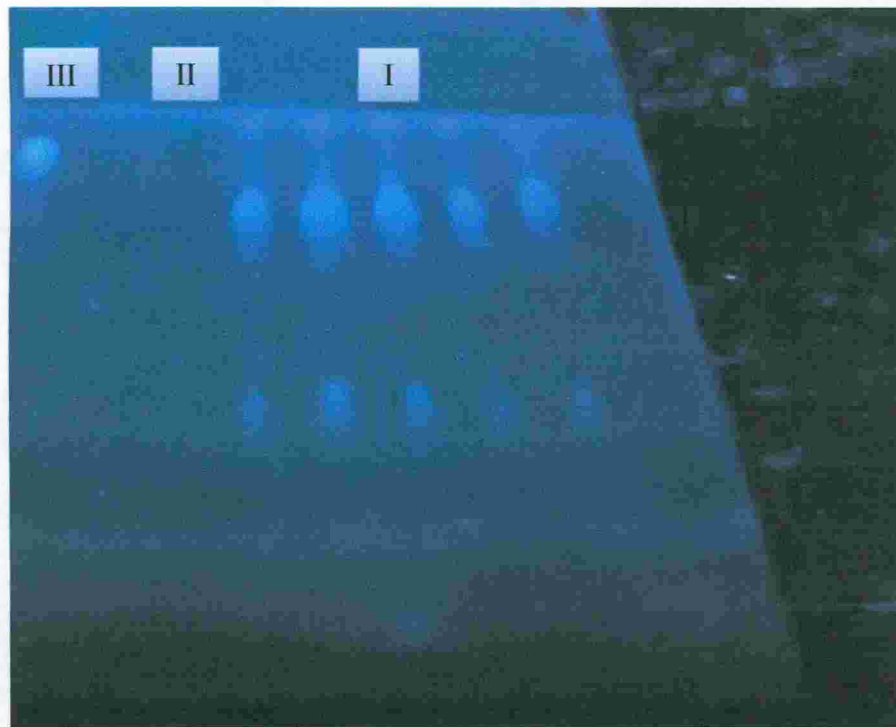


Figura 18. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos aislados (I), quercetina (II) y ácido caféico (III) revelados con luz ultravioleta

Anexo 10

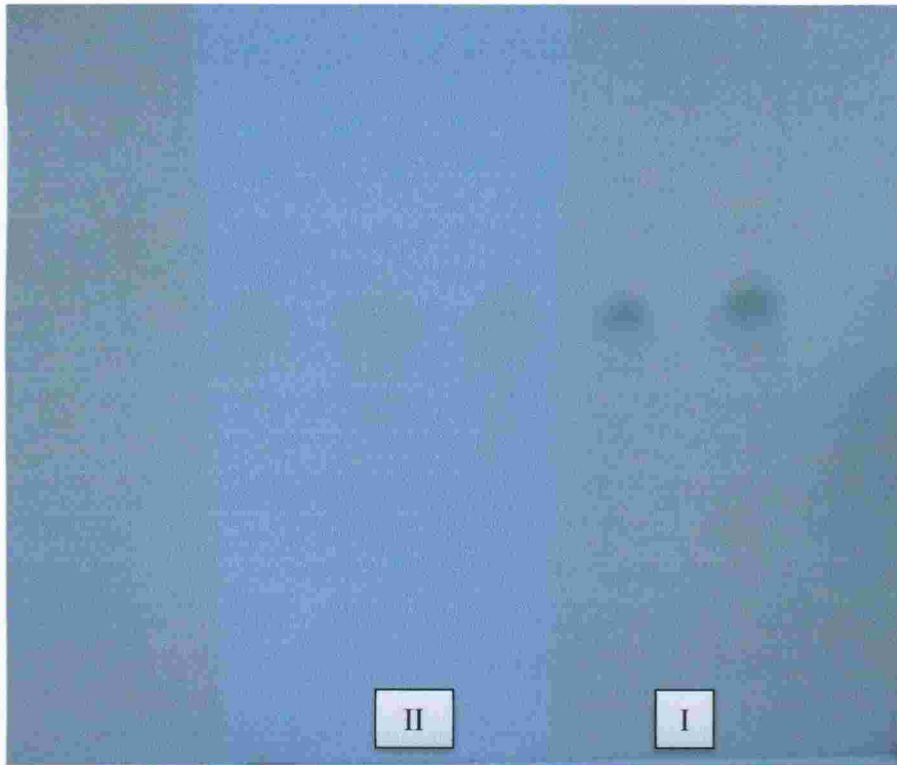


Figura 19. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos, revelados con cloruro férrico al 5% (I) y DPPH (II)

Anexo 11

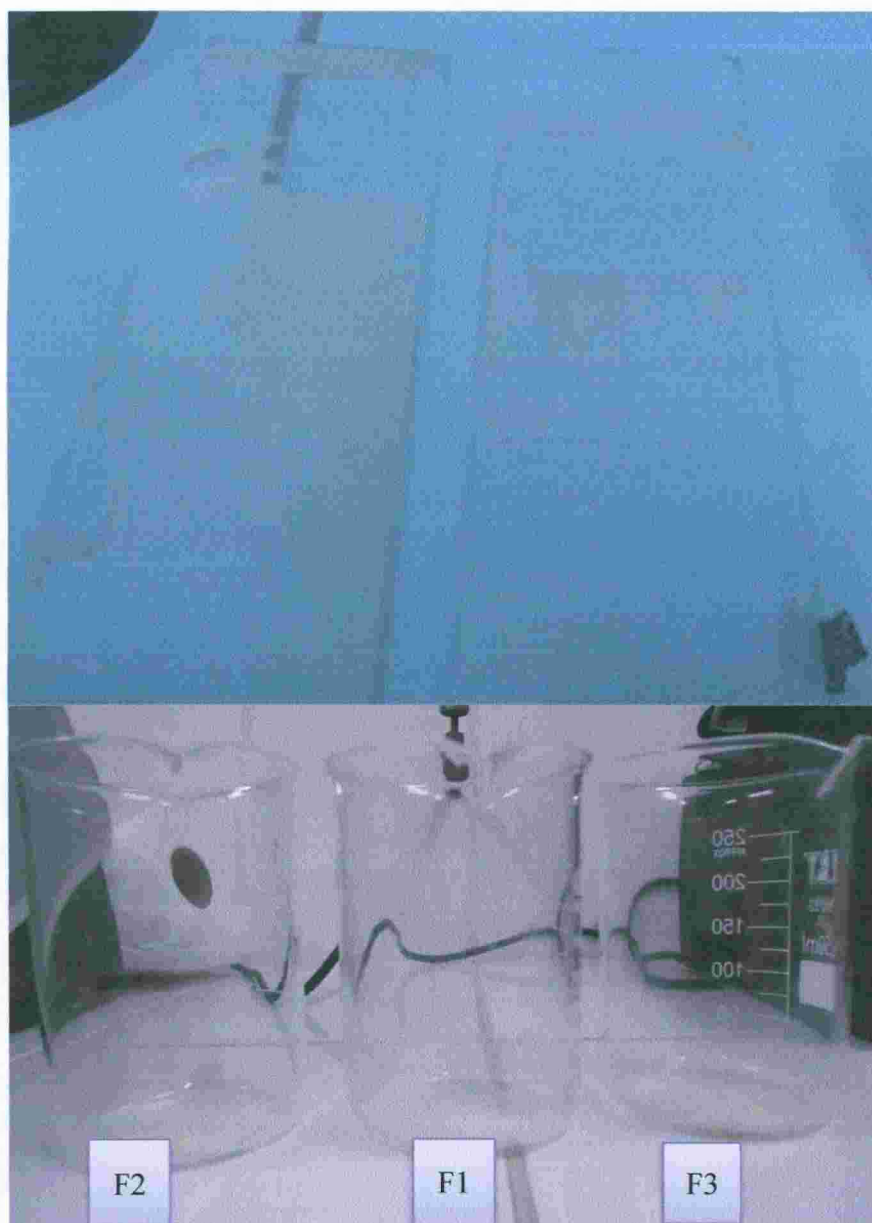


Figura 20. Cromatografía en capa fina preparativa y recuperación de fracciones

Anexo 12

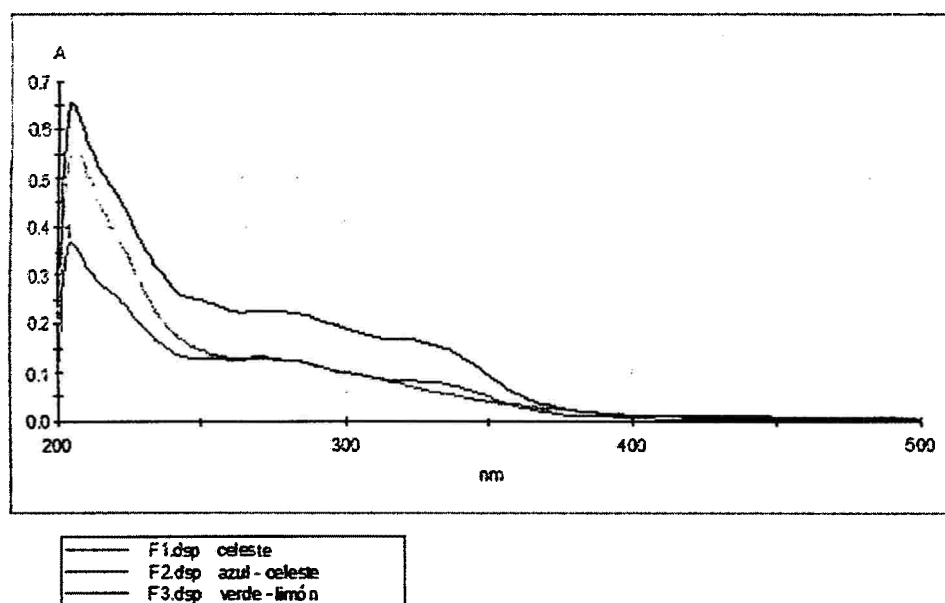


Figura 21. Curva espectral de las fracciones F1, F2, F3 aislados

Anexo 13

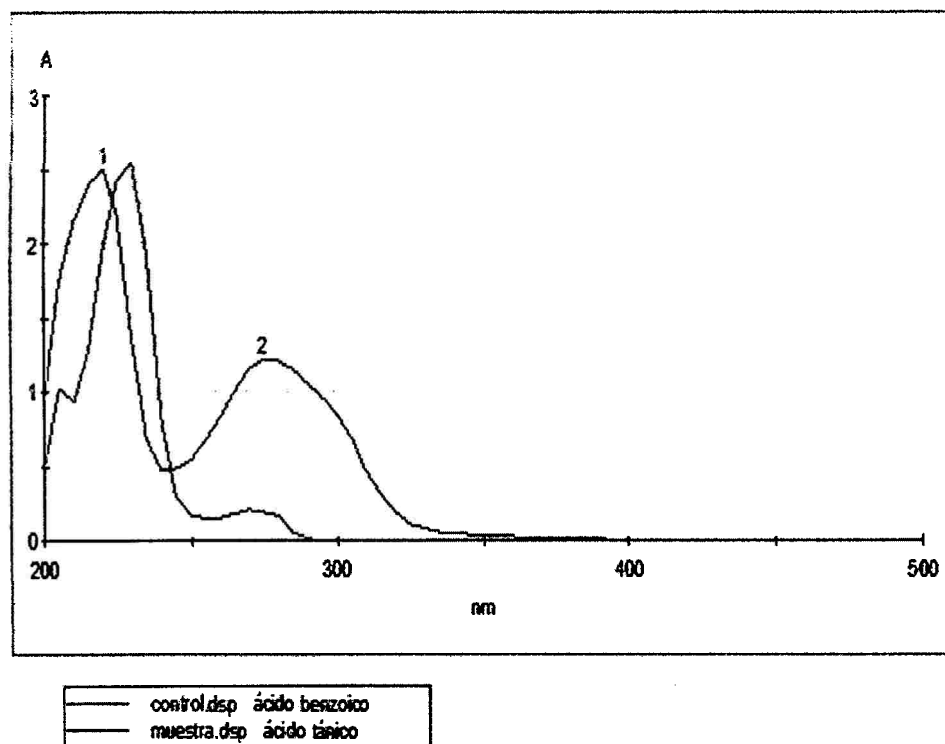


Figura 22. Curva espectral de los estándares ácido benzoico y ácido tánico

Anexo 14

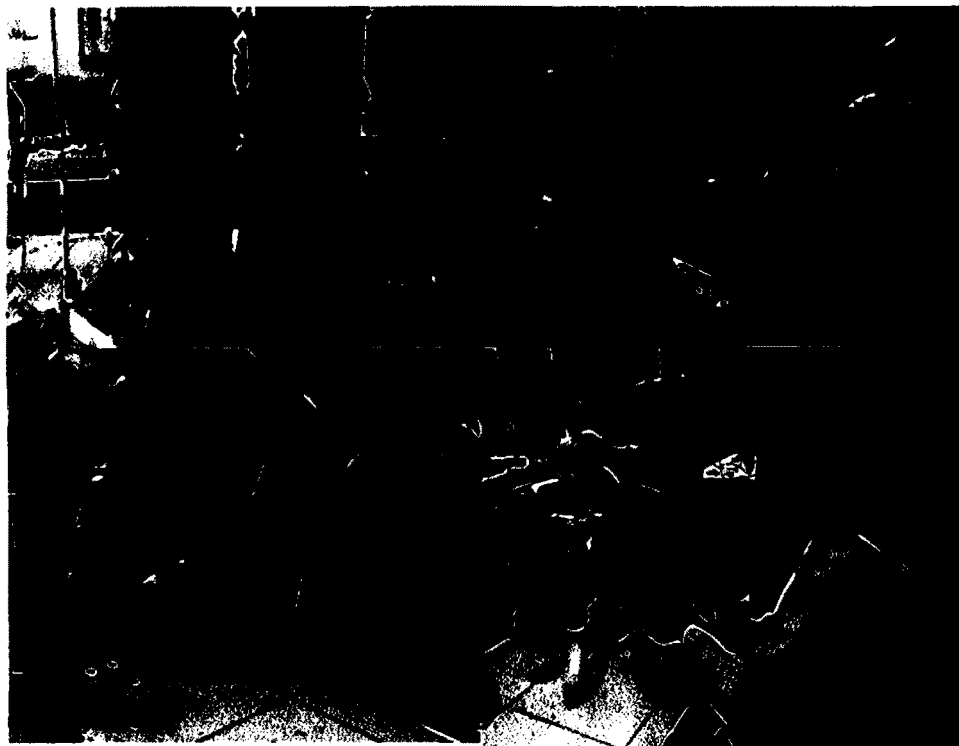


Figura 23. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Anexo 15

Tabla 7. Porcentaje de inflamación de los compuestos fenólicos

	% inflamación	
Carragenina	46,416	100,00
Diclofenaco	6,764	14,57
100 mg/kg	30,50	65,71
200 mg/kg	23,25	50,09
400 mg/kg	9,526	20,52

Anexo 16

Tabla 8. Análisis de varianza del volumen de inflamación

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,504	4	0,626	14,238	0,000
Intra-grupos	2,198	50	0,044		
Total	4,702	54			

Anexo 17

Tabla 9. Prueba de Tukey del porcentaje de inflamación

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Estándar (diclofenaco 20 mg/kg)	5	6,7640		
C.F. 400 mg/kg	5	9,5260		
C.F. 200 mg/kg	5		23,2500	
C.F. 100 mg/kg	5		30,5000	
Blanco	5			46,4160
Sig.		0,955	0,386	1,000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Anexo 18

Tabla 10. Porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH según tratamientos

Repeticiones	Estándares								
	Ácido caféico			Vitamina C			Compuestos fenólicos		
	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml
1	97,29	97,29	97,29	97,29	97,46	97,29	96,7 4	94,75	55,07
2	97,29	97,29	97,12	97,63	97,63	97,80	96,5 6	94,47	55,53
3	96,66	97,46	97,12	97,63	97,97	97,80	96,7 4	95,29	55,07
Promedio	97,08	97,34	97,18	97,51	97,68	97,63	96,6 8	95,17	54,39
D.E	0,36	0,10	0,10	0,20	0,26	0,29	0,1	0,38	0,31

Anexo 19

Tabla 11. Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH

			Método único				
			Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig
Captación de radical libre(%)	Covariables	Concentración (µg/ml)	864,448	1	864,448	7,927	0,10
	Efectos principales	Tratamientos	1379,609	2	689,804	6,326	0,006
		Modelo	2244,057	3	1748,019	6,860	0,002
		Residual	2508,054	23	109,046		
		Total	4752,111	26	182,774		

- a. Actividad secuestradora del DPPH (%) por tratamientos con concentración (µg/ml)
 b. Todos los efectos introducidos simultáneamente

Anexo 20

Tabla 12. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla". Ayacucho-2012.	¿Tendrá actividad antiinflamatoria y antioxidante los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla".	<p>Objetivo general: Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla".</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla". • Obtener los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla". • Determinar la dosis con mayor actividad antiinflamatoria entre las dosis evaluadas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla". • Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla" sobre los radicales libres de DPPH. 	<p><i>Ageratina sternbergiana</i>: Es un arbusto erguido, ramificado desde la base, hojas simples, opuestas, inflorescencia en cabezuelas.</p> <p>Usos tradicionales: Como antiinflamatorio, golpes, contra la diarrea, tónico, digestivo, emenagogo, dolor de estómago, dolor de cabeza, diurética.</p> <p>La inflamación: es una respuesta defensiva del organismo frente a un agente irritante caracterizado por el movimiento de las células desde la sangre hacia el lugar en el que se ha iniciado el estímulo nocivo.</p> <p>Radical libre. Molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado. Es muy reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse con las biomoléculas celulares.</p> <p>Sistema de protección antioxidante Compuestos fenólicos Flavonoides: son pigmentos naturales presentes en los vegetales, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo.</p>	<p>Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla" posee actividad antiinflamatoria a mg/kg. 200 mg/kg y 400mg/kg.</p> <p>Actividad antiinflamatoria Indicador: Dosis de 100 mg/kg. 200 mg/kg y 400mg/kg.</p> <p>Actividad antioxidante Indicador: Concentración a: 10, 50 y 100 µg/ml.</p> <p>Variables dependientes Actividad antiinflamatoria y antioxidante.</p> <p>Indicador: • Volumen de inflamación • Porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH.</p>	<p>Tipo de Estudio: Básica Experimental.</p> <p>Población: Hojas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla" del distrito de Quimua, provincia de Huamanga, departamento Ayacucho.</p> <p>Muestra: Un kg de hojas secas de <i>Ageratina sternbergiana</i> (DC) King & Rob "mamaquilla".</p> <p>Animales de experimentación. Conformado por 25 ratas albinas Holtzman hembras de peso entre 180 a 200 g adquiridas de la universidad Peruana Cayetano Heredia.</p> <p>Diseño metodológico para la recolección de datos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Recolección, identificación y selección de la muestra. • Preparación del extracto etanólico. • Tamizaje fitoquímico • Extracción e identificación de los compuestos fenólicos. <p>Determinación de la actividad antiinflamatoria (CYTED, 2001). Se utilizará el método del edema plantar inducido por carragenina.</p> <p>Determinación de la actividad antioxidante: Método de la capacidad secuestradora del radical DPPH (Aguilar, 2007).</p> <p>Diseño experimental. Randomizado, los animales serán divididos de manera aleatoria en cinco grupos de cinco animales cada uno.</p> <p>Análisis estadístico. En la actividad antiinflamatoria los datos de volumen de inflamación se hallará la media de cada uno de los tratamientos y la desviación estándar, y se representaran en forma de un gráfico de barras de error. Las diferencias entre las medias se evaluarán mediante el análisis de varianza y la prueba complementaria de Tukey al 95% de confianza.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Los resultados de la actividad antioxidante serán representados en forma de gráfico de barras en función de las medias. Las diferencias entre las medias serán contrastadas mediante el Análisis de Varianza factorial (ANOVA) a una nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). 	

Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob “marmaquilla”. Ayacucho – 2012.

Elva Carina Coronado Bendezú¹, Enrique Aguilar Felices¹

¹Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

Los compuestos fenólicos tienen propiedades biológicas como antiinflamatorias y antioxidantes y se encuentran ampliamente distribuidas en muchas especies vegetales. El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob “marmaquilla”, durante los meses de octubre del 2012 a marzo del 2013. La muestra fue recolectada en el distrito de Quinua, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, obteniéndose los compuestos fenólicos a partir de un extracto etanólico, con solventes de diferente polaridad, realizándose su identificación mediante ensayos cualitativos, cromatográficos y espectrales. La actividad antiinflamatoria se realizó mediante el método del edema plantar inducido por carragenina.¹ Para esta prueba se utilizaron 25 ratas hembras de un peso promedio entre 180 a 200 g que fueron divididos en cinco grupos al azar, a las cuales se les administraron los compuestos fenólicos a la dosis de 100 mg/kg; 200 mg/kg y 400 mg/kg, disueltas en carboximetilcelulosa; se utilizó como blanco (carboximetilcelulosa) y estándar (diclofenaco) y la actividad antioxidante se realizó por el método de secuestro del radical libre DPPH.² Se identificó la presencia de azúcares reductores, catequinas, lactonas y/o cumarinas, flavonoides, fenoles y/o taninos, triterpenos y/o esteroides. Los compuestos fenólicos fueron caracterizados como derivados del ácido benzoico y dos flavonoides. A la dosis de 400 mg/kg se obtuvo un menor porcentaje de inflamación (9,53%), cercano al diclofenaco (6,76%); mientras que la actividad antioxidante fue de 96,68% a la concentración de 100 µg/ml, comparable al ácido caféico (97,08%) y el ácido ascórbico (97,51%). Se concluye que los compuestos fenólicos aislados tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante.

Palabras clave: *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob, compuestos fenólicos, antiinflamatorio, antioxidante

SUMMARY

Phenolic compounds have biological properties such as anti-inflammatory and antioxidants and are widely distributed in many plant species. This research work was conducted in order to determine the anti-inflammatory and antioxidant activity of the phenolic compounds isolated from the leaves of *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob “marmaquilla” during the months of October 2012 to March 2013. The sample was collected in the district of Quinua, Huamanga province, department of Ayacucho, phenolic compounds obtained from an ethanol extract with solvents of different polarity, performing qualitative identification by tests, chromatographic and spectral. Anti-inflammatory activity was performed using the method carragenina.¹ Induced edema were used for this test 25 female rats weighing an average of 180 to 200 g were divided at random into five groups to which the compounds were administered phenolic dose of 100 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg, dissolved in carboxymethylcellulose, was used as blank (carboxymethylcellulose) and standard (diclofenac) and antioxidant activity was performed by the method of free radical sequestration DPPH.² Was identified the presence of reducing sugars, catechins, lactones and/or coumarins, flavonoids, phenols and/or tannins, triterpenes and/or steroids. Phenolic compounds were characterized as derivatives of benzoic acid and two flavonoids. A dose of 400 mg/kg was obtained the lowest percentage of swelling (9,53%), close to diclofenac (6,76%) whereas the antioxidant activity was 96,68 % at the concentration of 100 µg/ml, comparable to caffeic acid (97,08%) and ascorbic acid (97,51%). We conclude that the isolated phenolic compounds have anti-inflammatory and antioxidant activity.

Key words: *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob, phenolic compounds, anti-inflammatory, antioxidant

INTRODUCCIÓN

Hasta la actualidad la medicina tradicional ha servido de generación en generación, en el alivio de un sinnúmero de enfermedades. Dado que nuestro país posee una enorme diversidad de plantas medicinales debido a sus diferentes ecosistemas, representa en gran medida, una rica fuente de alternativas de tratamiento de diversas enfermedades.

Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y tiene que ver en la iniciación en algunas enfermedades degenerativas.³ Las enfermedades que involucran procesos inflamatorios presentan una alta incidencia en la población mundial, es por ello que la búsqueda de alternativas naturales de tratamiento es un elemento importante en las investigaciones médico-farmacéuticas, de manera que puedan sustituirse o disminuir el consumo de los fármacos sintéticos y así evitar la incidencia de sus efectos adversos.⁴

Los compuestos fenólicos son constituyentes importantes de la planta y les otorga múltiples efectos benéficos, estos compuestos presentan una amplia gama de actividades biológicas incluyendo la actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, antihipertensiva y efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares, además pueden ejercer efectos antioxidantes como el secuestro de radicales libres, donan moléculas de hidrógeno, barren moléculas de superóxido, quelan metales de transición; todas estas propiedades se deben principalmente al grupo hidroxilo presente en su anillo estructural.³ La acción antiinflamatoria de los compuestos fenólicos se debe a que estos actúan por la vía 5-lipoxigenasa e inhiben fundamentalmente la vía de ciclooxigenasa.⁵

La especie *Ageratina sternbergiana* es nativa de los andes con propiedades farmacológicas y representa una gran alternativa para la prevención de algunas enfermedades como problemas renales, inflamatorias, digestivos, dolor de cabeza, etc.⁶ Esta especie contiene compuestos fenólicos,⁷ y una nueva flavanona llamada sternbin (5,3', 4'-trihidroxí-7methoxy-flavanona).⁸

Por todas estas consideraciones, el propósito fue conocer la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina Sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla", con los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".
- Obtener los compuestos fenólicos de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".
- Determinar la dosis con mayor actividad antiinflamatoria entre las dosis evaluadas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".
- Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla" sobre los radicales libres de DPPH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de Investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Farmacognosia y Farmacología del Área académica de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre del 2012 a marzo del 2013.

Definición de la población y muestra

Población hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob. "marmaquilla" del distrito de Quinua, provincia de Huamanga, departamento Ayacucho.
Muestra. Un kg de hojas secas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".

Material biológico

Estuvo conformado por 25 ratas albinas hembras de la cepa Holtzman, de un peso aproximado de 180 a 200 g que fueron adquiridas con una semana de anticipación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, los cuales fueron alimentados con alimento balanceado y agua.

Diseño metodológico para la recolección de datos

Recolección de la muestra

Se procedió a recolectar las hojas frescas, para luego lavarlos con la finalidad de eliminar los componentes de contaminación, después se procedió al secado a medio ambiente durante siete días, después se trituró con un molino; una parte de la planta con hojas y flor estuvo utilizada para la identificación taxonómica en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Preparación del extracto etanólico

Un kg de muestra seca y molida se maceró en

frascos de color ámbar por un período de una semana en nueve litros de alcohol de 96° cuyo volumen cubrió la muestra. Durante el proceso se agitó mecánicamente el frasco para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se procedió a filtrar, concentrar en un rotavapor y luego en una estufa a 40°C, hasta obtener un extracto seco.

Tamizaje fitoquímico

La identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios se realizó mediante ensayos de coloración y precipitación.⁹

Extracción de los compuestos fenólicos

El extracto etanólico seco se reconstituyó con agua destilada y se trató con 300 ml de éter de petróleo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que puedan interferir con la extracción de los compuestos fenólicos. La extracción líquido-líquido se realizó con 300 ml de acetato de etilo en un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo donde se encuentra los compuestos fenólicos.²

Identificación de compuestos fenólicos

Pruebas cualitativas.

- Reactivo de cloruro férrico: Se añadió unas gotas de cloruro férrico, sobre la fracción de acetato de etilo.
- DPPH 2mg^o/%
- Permanganato de potasio.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)
- Volumen de inyección: 20 µl
- Revelador: Luz ultravioleta, cloruro férrico y DPPH.

Aislamiento de los compuestos fenólicos

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 5 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)
- La siembra se realizó en bandas con el propósito de aislar los compuestos fenólicos, los cuales se evidenciaron en la luz ultravioleta. Estas bandas fueron recuperadas, disueltas en metanol y filtrados, obteniéndose tres bandas.

Pruebas espectrales

Las bandas obtenidas fueron leídas en el espectrofotómetro ultravioleta GENESYS 6, en el

rango de 200 a 500 nm, registrándose los máximos picos de absorción.

Determinación de la actividad antiinflamatoria Método del edema plantar inducida por carragenina

Fundamento: Consiste en la administración subcutánea de una pseudosolución de carragenina, extraída de las algas marinas *Chondrus crispus* a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, provocando una reacción de carácter inflamatoria agudo mediado por la liberación de diversos autocoides generando edema, eritema, dolor.¹

Procedimiento:

- Preparación de la muestra: Se diluyó 2 g de los compuestos fenólicos en 100 ml de carboximetilcelulosa al 0,1%, obteniéndose una concentración al 2%.
- Preparación de carragenina: La suspensión de carragenina al 1% (Laboratorios SIGMA), fue preparado por disolución de 1 g de carragenina en 100 ml de solución salina estéril (0,9 % NaCl).
- Preparación de estándar: Se diluyó tres tabletas de diclofenaco (150 mg) en 50 ml de solución salina estéril (0,9 % NaCl).
- Las 25 ratas fueron divididos en 5 grupos: primer grupo (blanco), segundo grupo (estándar), tercer grupo, cuarto grupo y quinto grupo (compuestos fenólicos). los cuales estuvieron en ayunas previo al experimento.
- Cada rata fue marcada con plumón marcador.
- La administración de la muestra problema y el estándar fue por vía oral a través de una sonda adaptada por un medidor de volumen.
- A todos los grupos se le administró 0,1 ml de carragenina, después de 30 minutos de administrar la muestra y el estándar en el tejido subplantar de la pata posterior derecha de la rata.
- La medición del volumen de la pata se realizó utilizando un pletismómetro desde el tiempo cero y cada 30 minutos hasta 5 horas.

El cálculo del porcentaje de inflamación se realizó con la siguiente formula:

$$\% \text{ de inflamación} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Dónde:

V_T = Volumen de la pata inflamada en un tiempo "X"

V_0 = Volumen de la pata normal.

Diseño experimental

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 5 ratas, y tratados vía oral de la siguiente manera:

- Grupo I: Blanco, al cual se le administró carboximetilcelulosa al 0,1% y 30 minutos después se inyectó carragenina (0,1 ml) al 1%.
- Grupo II: Control, al cual se le administró diclofenaco 20 mg/kg y 30 minutos después se inyectó 0,1 ml de carragenina 1%.
- Grupo III, IV, V: Se administró 100 mg/kg, 200 mg/kg y 400 mg/kg de los compuestos fenólicos en carboximetilcelulosa al 0,1% y 30 minutos después se les inyectó 0,1 ml de carragenina al 1%.

Método de la capacidad secuestradora del radical DPPH

Fundamento: El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa. Se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre en toda la molécula, de manera que las moléculas no dimerisen, como en el caso de la mayoría de otros radicales libres. La deslocalización también da lugar a un color violeta oscuro, que se caracteriza por una banda de absorción en solución de etanol a aproximadamente 520 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces esto da lugar a la forma reducida con la pérdida de este color violeta.²

Procedimiento:

Para el ensayo se utilizó lo siguiente:

- Una solución metanólica de DPPH de 20 µg/l.
- Una solución metanólica del extracto a una concentración de 300 µg/ml (solución A)
- Una solución blanco de metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- Un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (solución A) más 1,5 ml de metanol.
- Un patrón de referencia con 1,5 ml de DPPH más 0,75 ml de agua destilada.
- La muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una solución final de 100 µg/ml.
- Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro.
- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 para obtener una solución final de 50 µg/ml (solución B) y luego en una proporción de 1:9, para obtener una concentración final de 10 µg/ml (solución C).
- Con la solución B y C se procedió igual que el anterior.
- Para la comparación, el estándar Vitamina C y ácido caféico, se preparó siguiendo el mismo

procedimiento que conlleva a lograr concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.

Para los cálculos del porcentaje de actividad antioxidante se empleó la siguiente fórmula:

$$AA \% = \frac{Ac - (Am - Ab)}{Ac} \times 100$$

Dónde:

AA%: porcentaje de actividad antioxidante.

Ac: Absorbancia del DPPH.

Am: Absorbancia de la muestra.

Ab: Absorbancia del blanco

Análisis de datos

Para la actividad antiinflamatoria, se analizaron los datos de volumen de inflamación, hallando la media de cada uno de los tratamientos y la desviación estándar; y se representó en forma de un gráfico de barras de error. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante el análisis de varianza y la prueba complementaria de Tukey al 95% de confianza.

Los resultados de la actividad antioxidante se representaron en forma de gráficos en función de las medias. Las diferencias entre las medias fueron contrastadas mediante el Análisis de Varianza Factorial (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Tabla 1: Metabolitos secundarios del extracto etanólico

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Azúcares reductores	benedict	++	precipitado rojo
Catequinas	catequina	+++	mancha verde carmelita a luz uv
Lactonas cumarinas	baljet	+++	precipitado rojo
Flavonoides	shinoda	++	fase amilica de color rojo intenso
Fenoles taninos	cloruro férrico	+++	coloración intensa
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	++	Coloración oscuro

Legenda: Leve,(+): Moderada,(++): Abundante,(+++)

Tabla 2: características químicas de los compuestos fenólicos

Fracción	Prueba de FeCl ₃ 5%	Prueba de KMnO ₄	DPPH	Características		
				FeCl ₃	KMnO ₄	DPPH
Acetato de etilo	+++	+++	+++	verde osuro	decolora, precipita	decolora

Leyenda: Leve,(+); Moderada,(++); Abundante,(+++)

Tabla 3: características cromatográficas de los compuestos fenólicos

Fracción	Revelador		
	Fluorescencia	FeCl ₃	DPPH
Acetato de etilo	celeste	marrón	Amarillo
	azul	marrón	Amarillo
	verde-limón	marrón	Amarillo
Ac. Caféico	celeste	marrón	Amarillo
Quercetina	amarillo	marrón	Amarillo

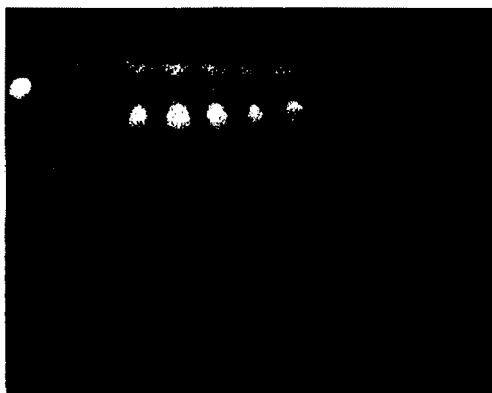


Figura 1: Cromatográfica en capa fina de los compuestos fenólicos aislados revelados con luz ultravioleta

Tabla 4: características espectrales de los compuestos fenólicos

Fracción	Sub-fracciones	Ultravioleta (nm)
Acetato de etilo	F1(celeste)	270 nm.
	F2 (azul)	280 nm y 330 nm
	F3 (verde limón)	285 nm y 330 nm
Estándar benzoico	ácido	230 nm y 270 nm
Estándar tánico	ácido	220 nm y 272 nm

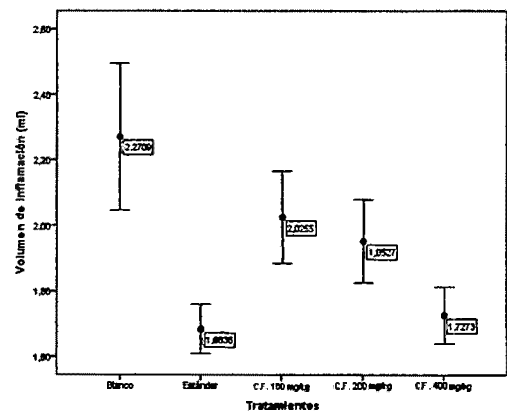


Figura 2. Volumen de inflamación según tratamiento

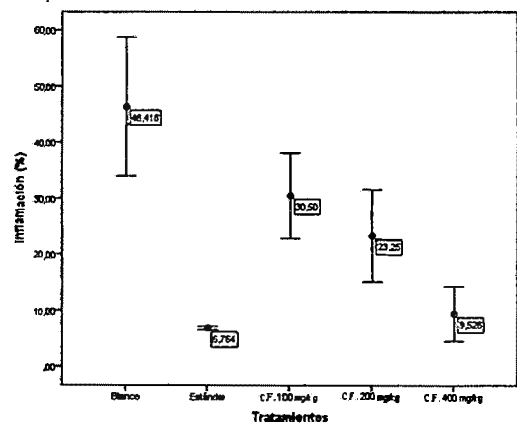


Figura 3. Porcentaje de inflamación según tratamiento

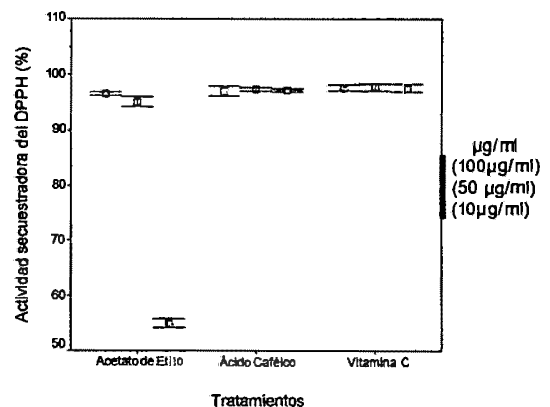


Figura 4. Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH según tratamiento

DISCUSIÓN

El organismo humano bajo condiciones normales y ambientales produce sustancias químicamente inestables llamadas radicales. Estos pueden producir daños oxidativos en diversas macromoléculas biológicas, lo que puede propiciar el inicio de enfermedades degenerativas como: cáncer, inflamación, cardiopatías cataratas, etc.

Por lo que se ha generado un gran interés hacia el papel que ejercen los antioxidantes.¹⁰

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se utilizó una secuencia de disolventes con polaridad divergente.¹¹ De esta manera, se procedió a la extracción de los compuestos fenólicos con diferentes solventes, primeramente con etanol para extracción de los metabolitos secundarios presente en la planta, segundo con el éter de petróleo para poder eliminar las resinas y grasas del extracto, después se extrajo con acetato de etilo para extraer los compuestos fenólicos.²

En el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico desarrollado según la técnica de Lock de Ugaz¹² y Miranda y Cuellar⁹, se reporta la presencia de los metabolitos secundarios como: azúcares reductores, catequinas, lactonas y/o cumarinas, flavonoides, fenoles y/o taninos, triterpenos y/o esteroides (Tabla 1), lo cual coincide con un reporte anterior,⁷ por lo que asumimos que la presencia de estos metabolitos secundarios podría explicar su acción farmacológica y justificar el empleo de la planta en el tratamiento antiinflamatorio y antioxidante. Los metabolitos secundarios encontrados en abundante concentración fueron: catequinas, cumarinas y fenoles y/o taninos, los compuestos fenólicos pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro que producen cuando se le agrega el cloruro férrico al 5%.¹² En la prueba de catequina se evidencia por la fluorescencia verde a la luz UV, así mismo en la prueba de Baljet para identificar cumarinas dan un precipitado de color rojo y en concentraciones moderadas se identificó flavonoides, azúcares reductores y triterpenos y/o esteroides, con la reacción de Shinoda el cambio de color de amarillo a roja indica la presencia de flavonas y flavonoles, color rojo presencia de flavanonas.¹² En la prueba de Benedict para los azúcares reductores dan un precipitado de color rojo ladrillo, en la prueba de Liebermann- Burchad para los triterpenos y/o esteroides dan un color verde oscuro.

En las pruebas químicas realizadas de los compuestos fenólicos aislados (Tabla 2), fueron diferenciadas por las pruebas de cloruro férrico al 5%, Con KMnO_4 y DPPH, en la prueba química con FeCl_3 al 5 % se produjo un color verde oscuro identificándose presencia de grupos fenólicos en abundante concentración. La prueba química con KMnO_4 produce un cambio de coloración y un precipitado intenso, este cambio de coloración del KMnO_4 se debe a que ésta se reduce debido a la acción de los compuestos.⁵ En la prueba química con DPPH se observa la decoloración del radical libre, debido a que el radical libre tiene un electrón desapareado y es de color violeta decolorándose a amarillo cuando reacciona con los

compuestos fenólicos que pueden donar un átomo de hidrogeno.^{13, 14}

En la Tabla 3 y Figura 1, se observa la presencia de fluorescencias de color celeste, azul y verde-limón a la luz del espectro ultravioleta, de lo cual se deduce que se trata de tres compuestos fenólicos diferentes, cuando se revela a la misma placa con cloruro férrico al 1 % y DPPH, se observan manchas de color marrón y amarillo a la luz visible. Estas fluorescencias de color celeste, azul y verde a la luz UV indican que se trata de compuestos fenólicos.¹² Estudios realizados de la *Ageratina sternbergiana* determinaron la presencia de una flavanona llamada sterbin (5,3^l,4^l-trihidroxi- metoxi- flavanona), 5,3^l-dihidroxi-7,4^l-dimetoxiflavanona y sakuranetina.⁸

Para la caracterización de los compuestos fenólicos se realizó con la espectroscopia ultravioleta, lográndose separar de la fracción de acetato de etilo tres bandas (F1, F2 y F3) (Tabla 4). La fracción F1 corresponde a un compuesto fenólico con una fluorescencia celeste y muestra una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 270 nm, la fracción F2 corresponde a un compuesto fenólico con una fluorescencia azul y muestra una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 280 y 330 nm, la fracción F3 corresponde a otro compuesto fenólico con una fluorescencia verde-limón y muestra una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 285 y 330 nm.

Los estándares utilizados fueron: Ácido benzoico con una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 230 y 270 nm y ácido tánico con una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 220 y 275 nm, que son similares a la absorbancia de la fracción F1. Por lo tanto podemos asumir que se trata de un compuesto fenólico derivado del ácido benzoico.

En un estudio realizado sobre *Ageratina sternbergiana* se reportó la presencia persicogenina (5,3^l - dihidroxi, 7,4^l - dimetoxi-flavona) con absorbancia en el espectro UV a 292 y 332 nm y sterbina (5,3^l,4^l-trihidroxi, 7-metoxi-flavanona), con absorbancia en el espectro UV a 280 y 330 nm.⁸ Todos estos datos son similares a los reportados en el presente trabajo por lo tanto podemos asumir que los compuestos fenólicos aislados podrían corresponder a la persicogenina, sterbina y un derivado del ácido benzoico.

En la Figura 2, se muestra el volumen de inflamación según los tratamientos, en donde se puede apreciar que la dosis de 400 mg/kg tiene un comportamiento similar al diclofenaco en su capacidad para disminuir la inflamación inducida por carragenina, debido a que los compuestos fenólicos presentes en esta especie vegetal a las diferentes dosis si posee efecto antiinflamatorio,

esta propiedad se debe a su acción antioxidante y a su habilidad de actuar contra la histamina y otros mediadores de la inflamación,^{15,16, 17} además inhiben las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de 5-lipoxigenasa y ciclooxigenasa.^{18, 19}

En la Figura 3, se observa el porcentaje de inflamación según los tratamientos, donde la dosis de 400 mg/kg comparado con el estándar (diclofenaco), poseen un comportamiento similar con un porcentaje de inflamación de 6,764% y 9,526%.

En la Figura 4, se muestra que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob demostraron tener actividad antioxidante al captar los radicales libres DPPH. Esta capacidad antioxidante de estos compuestos se debe principalmente a sus propiedades redox, el cual les permite actuar como agente reductora donante de hidrogeno, desactivadores de hidrogeno singlete o quelantes de metales, además depende de su estructura individual y del número de hidroxilos sustituyentes.^{11, 3}

La concentración de 10 µg/ml tuvo una actividad antioxidante del 54,39 %, los de 50 µg/ml en un 95,17 % y los de 100 µg/ml en 96,68%, y los estándares ácido caféico y ácido ascórbico en 97,2% y 97,61%. Si comparamos los porcentajes de captación de radicales libres de los estándares con los compuestos fenólico aislados podemos decir que las concentraciones de 50µg/ml y 100µg/ml de compuestos fenólicos tiene una actividad antioxidante ligeramente inferior a los estándares. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular, la cual influye en la facilidad con la que un átomo de hidrogeno de un grupo hidroxilo aromático puede ser donado a un radical libre y en la habilidad de un fenol de soportar un electrón no apareado.²⁰

Con estos resultados obtenidos en el presente trabajo podemos afirmar que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla" tiene actividad antiinflamatoria y antioxidante.

CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos aislados de las hojas *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla" tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante.
2. El extracto etanólico de las hojas *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla", presenta metabolitos secundarios como son: azúcares reductores, catequina, cumarinas, flavonoides, fenoles y taninos y triterpenos y/o esteroides.

3. Se aislaron tres compuestos fenólicos (dos flavonoides y un derivado del ácido benzoico) de las hojas *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla".
4. La dosis de 400 mg/kg de los compuestos fenólicos tuvo mayor actividad antiinflamatorio entre las dosis evaluadas y similar efecto antiinflamatorio que el diclofenaco.
5. Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ageratina sternbergiana* (DC) King & Rob "marmaquilla" tienen actividad antioxidante sobre los radicales libres del DPPH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo. Métodos Farmacológicos para la validación de plantas medicinales. Barcelona- España. 2001.
2. Aguilar Felices E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante y antirradicalaria. [Tesis de maestría]. Lima. UNMSM; 2007.
3. Muñoz A, Ramos F. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades Biomedicinales. Horizonte Médico [revista en internet] junio 2007. [acceso Febrero – Julio del 2013]; Vol. 7: N°1: 23-31. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v73n3/a03v73n3.pdf>.
4. Vicet Muro L. Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora*, L [tesis doctoral]. Cuba. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas; 2009.
5. Villar del Fresno, A. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España. 1999.
6. Pietrellini F. Las plantas medicinales en un piso alto y mesoandino. Estudio etnobotánico de la zona de Puquio- Ayacucho. Impreso en Graficenter Perú; 2007.
7. León N, Félix L, Chávez J, Quispe P. Estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de los tallos de *Ageratina sternbergiana* (DC). ECIPerú. Rev. de encuentro científico internacional [revista en internet] agosto 2011. [acceso junio 2013]. 8(2): 245-252. disponible en: <http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.phpscript=sciarttex&pid=S181301942011000200041&lng=es&nrm=iso.ISSN1813-0194>
8. Gonzales A, Fraga B, García V, Hernández M. Esterbina. Una nueva flavanona del *Eupatorium sterbergianum*. Rev. Latinoamer. Quím. [Revista en internet] 1984. [acceso marzo 2013]; 14(3): pp. 115-117. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/21733>
9. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y productos

- naturales, Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba. 2000.
10. Ramírez I. Efecto de la administración oral de extractos vegetales con actividad antioxidante sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en ratas [tesis doctoral]. universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Química y Farmacia; 2004.
 11. Banerjee S, Bonde C. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia retusa* Spreng Bark: Impact of dielectric constant and geographical location Journal of medicinal plants research [revista en internet]. 2011. [acceso febrero 2013]; Vol. 5(5). 817-822. disponible en:
<http://www.academicjournals.org/jmpr/pdf/pdf/2011/4Mar/Banerjee%20and%20Bonde.pdf>
 12. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo Editorial; 1994.
 13. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico [revista en internet]. 2008 [acceso Febrero de 2013]; Vol. 8 N°1. Disponible en:
<http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008-1/Art4-Vol8-N1.pdf>.
 14. Gutiérrez M, Ortiz C, Mendoza C. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimento animal. Simposio de Metrología [revista en internet] 2008. [acceso febrero 2013]; Vol. 1(1). Disponible en:
https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf
 15. Martínez A. Flavonoides. Doctor en Ciencias de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia- Medellín. Colombia. 2005.
 16. Estrada R, Ubaldo D, Araujo A. Los flavonoides y el sistema nervioso central. Salud mental [revista en internet] 2012 setiembre. [acceso marzo 2013]; 35(5): 375-384. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018533252012000500004&script=sci_arttext
 17. Ruiz N, Rincón F, Hernández V, Figueroa D. Determinación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en granos de maíz. Rev. Fitotécnica Mexicana [revista en internet] 2008 setiembre. [acceso marzo 2013]; 31(3): 29-34. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/610/61009706.pdf>
 18. Martínez S, González J, Culebras J, Tuffón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Rev. Nutr. Hosp [revista en internet]. 2002. [acceso febrero 2013]; 17 (6): 271-278. Disponible en:
http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002/2002_los_flavonoides_propiedades_acciones_antioxidantes.pdf
 19. Vergel N. Estudio de la actividad anticonvulsivante de los metabolitos secundarios tipo cumarinas [tesis doctoral]. Universidad Nacional de Colombia. 2011.
 20. Calderón P. Determinación de las propiedades antioxidantes del jugo de naranja comercial sometido a distintas condiciones de almacenamiento. [tesis pre-grado]. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007.