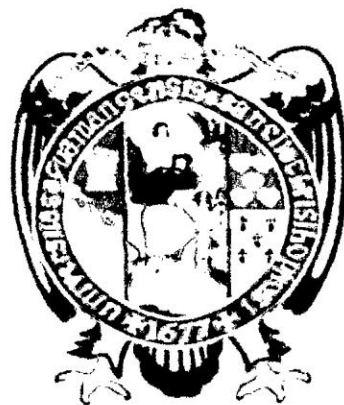


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antioxidante de los flavonoides aislados de la
raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara".
Ayacucho - 2012.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR:
Bach. PALOMINO NOA, LUZ PILAR

AYACUCHO – PERÚ

2013

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. Luz Pilar Palomino Noa

R.D. N° 034-2014-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día viernes 25 de abril del año dos mil catorce, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, reunidos para recepcionar el trabajo de sustentación de tesis: Actividad antioxidante de los flavonoides aislados de la raíz de *Hypseocharis bilobata Killip* "pacha tara"- Ayacucho 2012, siendo los miembros del Jurado Calificador los docentes Edna Leon Palomino (presidente (e); Enrique Javier Aguilar Felices (Asesor); Maricela López Sierralta (secretaria (e)); para recepcionar las sustentación de la señorita Luz Pilar Palomino Noa, quien pretende optar título profesional de Química Farmacéutica.

La presidenta (e) prof. Edna León Palomino, inicia el acto de sustentación, indicando a la bachiller el tiempo estimado de sustentación – exposición, no mayor a cuarenta y cinco minutos, luego del cual el Jurado calificador procede a realizar las observaciones, aclaraciones y preguntas que crea por conveniente.

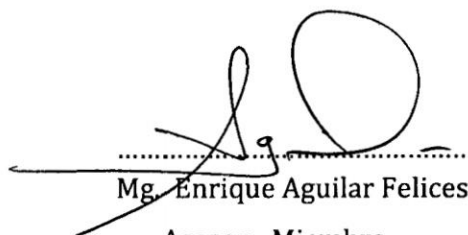
Luego la presidenta (e) solicita a la sustentante y al público en general para que abandone el auditorio y deje al Jurado calificador para que puedan deliverar y calificar como sigue:

JURADO CALIFICADOR	Exposición	Respuestas	Promedio
Maricela López Sierralta	17	17	17
Enrique Javier Aguilar Felices	17	17	17
Edna Leon Palomino	16	16	16
		PROMEDIO	17

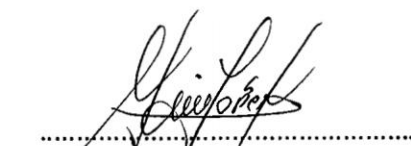
De la evaluación realizada la sustentante obtiene la calificación promedio de DIECISIETE (17) de la cual dan fé los miembros estampando su firma al pie de la presente. Culmina el acto de la sustentación siendo las seis y quince de la noche.



Mg. Edna Leon Palomino
Presidente (e) - Miembro



Mg. Enrique Aguilar Felices
Asesor - Miembro



Mg. Maricela López Sierralta
Secretaria (e) - Miembro

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres, Roberto e Hilda

A mi hermana Lizbeth

A Alex Rumer

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi *Alma Mater*, por haberme permitido ocupar sus aulas y optar esta noble profesión.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y a todos los docentes de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica por su invaluable labor en la formación académica y moral a los estudiantes.

A mi asesor del presente trabajo, el Mg. Enrique Aguilar Felices, que con gran criterio profesional y comprensión humana contribuyó a la realización de la presente tesis.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la ejecución del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara"	4
2.3. Radicales libres	7
2.4. Antioxidantes	14
2.5. Flavonoides	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Ubicación del lugar de estudio	23
3.2. Población y muestra	23
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	24
3.3.1. Recolección de la muestra	24
3.3.2. Técnica de extracción de flavonoides	24
3.3.3. Aislamiento de flavonoides	24
3.4. Pruebas cromatográficas	25
3.5. Pruebas espectrales	26
3.6. Determinación de la actividad antioxidante	26
3.7. Análisis de datos	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	34
VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	40
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	44

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Tipos de especies reactivos de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno de interés biológico.	9
Tabla 2. Características cromatográficas de la fracción flavónica.	30
Tabla 3. Características espectrales en el espectro ultravioleta visible de la fracción flavónica.	31
Tabla 4. Tiempos de retención de las fracciones flavónicas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de las fracciones flavónicas.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	La superación de los sistemas pro-oxidantes por los antioxidantes favorece la instauración del estrés oxidativo.	8
Figura 2.	Acción antioxidante.	11
Figura 3.	2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides.	16
Figura 4.	Origen biosintético de los flavonoides	18
Figura 5.	Reacción de reducción del DPPH	27
Figura 6.	Porcentaje de captación del radical libre DPPH de la fracción flavónica.	33

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación botánica	45
Anexo 2. Flujograma de obtención del extracto etanólico.	46
Anexo 3. Flujograma de fraccionamiento del extracto etanólico.	47
Anexo 4. Esquema de pruebas fitoquímicas, cromatográficas y biológicas de la fracción de acetato de etilo.	48
Anexo 5. Recolección de la muestra.	49
Anexo 6. Equipo de evaporador rotatorio BUCHI 3000.	50
Anexo 7. Extracción líquido - líquido del extracto hidroalcohólico	51
Anexo 8. Placa de toques con la prueba de Shinoda. Fracción flavónica (A), quercetina (B) y rutina (C).	52
Anexo 9. Sembrado y desarrollo de la cromatografía en capa fina.	53
Anexo 10. Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica; vapores de NH ₃ (A), luz ultravioleta 366 nm (B). Fracción flavónica (I), quercetina (II) y rutina (III).	54
Anexo 11. Curva espectral de la fracción aislado 1.	55
Anexo 12. Curva espectral de la fracción aislado 2.	56
Anexo 13. Cromatograma del estándar rutina determinado a 257,4 nm y 368,8 nm mediante un sistema HPLC.	57
Anexo 14. Cromatograma del estándar quercetina determinado a 257,4 nm y 368,8 nm mediante un sistema HPLC.	58
Anexo 15. Cromatograma de la fracción aislado 1 y fracción aislado 2 determinado a 257,4 nm y 368,8 nm mediante un sistema HPLC.	59
Anexo 16. Porcentaje de captación del radical libre DPPH de la fracción flavónica.	60

Anexo 17.	Análisis de varianza del porcentaje de captación del radical libre DPPH de la fracción flavónica.	61
Anexo 18.	Matriz de consistencia	62

RESUMEN

Los radicales libres, producidos normalmente durante el metabolismo aerobio se utilizan en diversos procesos fisiológicos como un mecanismo de defensa contra agentes infecciosos. Sin embargo, estas moléculas son altamente reactivas, capaces de dañar a las diversas biomoléculas de nuestras células. En este sentido, el presente trabajo de investigación básico descriptivo se realizó con el objetivo de determinar la actividad antioxidante de los flavonoides aislados de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", desarrollado en los laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en el laboratorio de Control de Calidad de Laboratorios Farminustria (LF) de la ciudad de Lima durante los meses de enero a junio del 2012. Las raíces fueron recolectadas en el centro poblado de Mayupampa, distrito de Chiara del departamento de Ayacucho, durante los meses de enero y febrero en estado de floración y en buen estado de conservación. La actividad antioxidante se determinó mediante la captación del radical libre DPPH (1,1 difenil-2 picrilhidrazilo). Se logró aislar e identificar los flavonoides quercetina y rutina mediante cromatografía en capa fina, espectro ultravioleta y corroborado por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), siendo la quercetina la más importante; con tiempos de retención de 6,679 min y 3,388 min que se asemejan a los valores de los estándares de quercetina y rutina de 7,376 min y 3,363 min, respectivamente. En todos los casos los flavonoides contenidos en la fracción flavónica demostraron actividad antioxidante de 96,64%; 94,68% y 94,31% dependiente de la concentración, a mayor concentración, mayor actividad antioxidante a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml respectivamente, similares a la vitamina C, quercetina y rutina, mostrando diferencias entre el grupo de tratamiento y la concentración ($p < 0,05$). Se concluye que las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", tienen actividad antioxidante superior al 90%, siendo la concentración de 100 µg/ml con mayor actividad antioxidante.

Palabras clave: actividad antioxidante, flavonoides, *Hypseocharis bilobata* Killip.

I. INTRODUCCIÓN

En nuestros días aumenta el número de enfermedades en cuya etiología estaría involucrado el estrés oxidativo, producido por el ataque oxidativo de los radicales libres que superan las defensas antioxidantes del cuerpo.

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). Dichas especies reactivas (ER) provocan daño oxidativo a las macromoléculas, que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes endógenos. Todo esto induce a que se presenten diversas enfermedades, como diabetes, alzheimer, aterosclerosis, procesos inflamatorios, parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, entre otros¹.

En este sentido, numerosas investigaciones han demostrado los efectos antioxidantes de compuestos fitoquímicos. Estos incluyen entre otros, a los flavonoides que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante².

Hypseocharis bilobata Killip "pacha tara" es una especie herbácea nativa que crece de manera silvestre en las zonas alto andinas, y es utilizada tradicionalmente como cicatrizante de heridas y para el alivio de úlceras y

gastritis, entre otros usos, por su contenido en taninos y fenoles, flavonoides, entre otros; además de poseer otras actividades también importantes como antitusivas, antiespasmódicas^{3,4,5}.

Siendo *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara”, una especie utilizada en nuestra región y conociéndose la presencia de flavonoides, en el presente trabajo de investigación básico descriptivo se ha propuesto aislarlos mediante técnicas cromatográficas, proponer su estructura química, utilizando técnicas espectrales ultravioleta, corroborando con la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y determinar la actividad antioxidante de la fracción flavónica por medio de las ensayo del radical libre DPPH, relacionándolo con su estructura química.

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

Objetivo general

- Evaluar la actividad antioxidante de los flavonoides aislados de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara”.

Objetivos específicos

- Identificar los flavonoides mediante pruebas cromatografías por capa fina, espectrofotometría ultravioleta y HPLC de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara”.
- Determinar la concentración que presenta mayor actividad antioxidante de los flavonoides aislados.
- Relacionar la estructura química de los flavonoides con la actividad antioxidante.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Carhuapoma M⁶, realizó el estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "arrayán", obteniendo como resultado un 63,56% de capacidad de captación del radical DPPH comparada con la vitamina C con 69,78%; es decir, que el aceite esencial tiene similar capacidad antioxidante que la vitamina C. Aguilar E⁷, demostró la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña", caracterizando a los flavonoides como apigenina y la naringenina, siendo la apigenina el flavonoide más importante. En otro estudio se determinó la actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" sobre el DPPH, donde la fracción clorofórmica, la fracción acetato de etilo tuvieron una actividad antioxidante superior al 50%; y el extracto hidroalcohólico y la fracción acuosa tuvieron una buena actividad antioxidante de 92,24%; 84,41%; 65,09% y 90,89%; 82,78%; 65,62% respectivamente a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, siendo el extracto hidroalcohólico y la fracción acuosa con mayor actividad antioxidante⁸. Jayo C⁹, realizó un estudio comparativo de la actividad antioxidante del extracto metanólico de cuatro cultivares de *Oxalis*

tuberosa Mol. “oca” sobre el DPPH, obteniendo como resultado una actividad antioxidante de 92,72% del cultivar rosado al estado crudo, seguido del amarillo (77,68%), jaspeado (69,26%) y violáceo (61,38%); y al estado de cocción el violáceo presentó mayor actividad (68,96%) seguido del jaspeado (67,22%), rosado (57,14%) y amarillo (41,71%). Así mismo se ha realizado el estudio sobre la actividad antiulcerosa del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara”, demostrando tener actividad antiulcerosa en concentraciones de 100 mg/kg, 250 mg/kg y 500 mg/kg, siendo ésta última la que presentó mejor actividad antiulcerosa⁴. También se realizaron estudios sobre la actividad antiespasmódica y efecto citoprotector del extracto acuoso de *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara” sobre íleon de rata y en la mucosa gástrica de rata blanca sometido a stress por restricción hipotérmica, respectivamente. Se demostró tener efecto antiespasmódico por acción de la acetilcolina. En cuanto al efecto citoprotector expresa un ligero efecto antiulceroso⁵.

2.2. *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara”

2.2.1. Taxonomía

Según el certificado de identificación botánica del *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Anexo 1), la especie se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	GERANIALES
FAMILIA	:	OXALIDACEAE
GÉNERO	:	<i>Hypseocharis</i>

ESPECIE	:	<i>Hypseocharis bilobata</i> Killip
NOMBRE VULGAR	:	"pacha tara"

2.2.2. Descripción botánica

Planta herbácea perenne, arrosetada y acaule vivaz, que crece normalmente sin la participación de la mano del hombre a ras del suelo con una altura entre los 6 a 20 cm y cobertura de 16 cm de diámetro. Hojas basales numerosas, compuestas imparipinnadas y nerviación poco marcada y penninervias. Con peciolo, raquis, foliolo y peciolulo. Crecen y se extienden a ras del suelo alcanzando una longitud promedio de 8 cm. Raíz pivotante primaria que se convierte en una sola raíz bulbosa de forma cónica y fibrosa: 70% en volumen y 75% en peso promedio del total de la planta. Flor simple terminal, completa y solitaria muy vistosa de color blanco, unida a la planta por un pedúnculo floral de 6 cm heteroclamidia, actinomorfa, estrobiloidea. La antera está formada por dos tecas del mismo tamaño. El pistilo o gineceo es de ovario súpero pubescente pluricarpelar. Fruto capsular con semilla acorazonada de color negro de 2 mm de longitud. Su desarrollo está influenciado por la humedad del suelo y crece hasta la fase de amacollamiento, donde las hojas se secan y queda la raíz subterránea con yemas de renuevo^{5,10}.

2.2.3. Distribución geográfica

El género endémico *Hypseocharis*, crece desde el Perú hasta Chile y Argentina, total nueve especies; cuatro del Perú, número difícil de establecer con precisión debido a la existencia de probables sinonimia aún sin resolver en Bolivia y Perú¹¹. Tiene una amplia distribución geográfica en pastizales de neblina, praderas alto andinas y ambientes de pre puna y puna entre 2,000 y 4,200 msnm. Se extiende desde el norte del Perú (departamento de Ancash, 10° latitud sur) hasta el noroeste de la Argentina (provincia de La Rioja, 30° latitud sur).

En la Argentina se encuentra desde el límite con Bolivia hasta el norte de la provincia de La Rioja¹².

En el Perú, *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" es una planta nativa de las zonas alto andinas, que crece a ras del suelo asociada a plantas cespitosas desde los 3,500 a 3,800 msnm. Se distribuye entre los departamentos de Ayacucho, Cuzco, Huancavelica y Junín, con predilección hacia el sur.

Se desarrolla de manera silvestre en las montañas y su población se ve favorecida en lugares de alta humedad, a orillas de los ríos, en pastizales de neblina y ambientes de pre puna y puna⁵.

2.2.4. Etnobotánica y etnofarmacología

Según informaciones etnobotánicas y etnofarmacológicas la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" es empleada por los pobladores alto andinos como antiespasmódico, antitusivo, cicatrizante de heridas y para el alivio de úlceras y gastritis^{3,5}.

Del mismo modo, en la medicina popular las raíces de *Hypseocharis pimpinefolia* son usadas por los pobladores de la puna de Salta y Jujuy como antiinflamatorias y para "el dolor de cintura" así como para curar heridas. En la actualidad las raíces de *Hypseocharis pimpinefolia* son usadas en la puna como alimento de emergencia. Las raíces de *Hypseocharis tridentata* también son comestibles, pero su tamaño es notablemente menor, lo que en la práctica reduce considerablemente su utilidad. En ambos casos las raíces crudas tienen un sabor levemente amargo y astringente. Cocidas, en cambio, adquieren un sabor dulce suave, con una textura agradable¹².

2.2.5. Composición química

El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" evidencia los siguientes metabolitos secundarios: taninos y fenoles, flavonoides,

saponinas, saponinas esteroidales, triterpenos, esteroides, azúcares reductores y glicósidos cardiotónicos^{4,5}.

2.3. Radicales libres

Se considera un radical libre (RL) a una entidad química de átomo o molécula que presenta un electrón desapareado en el orbital externo y puede tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Una molécula se convierte en radical libre al perder o ganar un electrón^{13,14}, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células.

La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus¹⁵.

Los mecanismos de formación de los radicales libres son tres:

- Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
- Pérdida de un protón de una molécula.
- Ruptura hemolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace¹⁶.

Los radicales libres pueden llevar a cabo uno de los siguientes tipos de reacciones:

- Ceder su electrón desapareado (radical reductor).
- Aceptar un electrón de la molécula estable para estabilizar el electrón desapareado (radical oxidante).
- Unirse a una molécula estable.

En cualquiera de los tres casos, la situación resultante es la génesis de otro radical químicamente agresivo. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados en cada una de estas macromoléculas⁶.



Figura 1. La superación de los sistemas pro-oxidantes por los antioxidantes favorece la instauración del estrés oxidativo¹⁷.

Si bien el oxígeno es vital para nuestra vida, éste por formación natural adquiere un carácter tóxico para nuestro organismo por la formación de radicales libres, que causan reacciones de óxido reducción en cadena, dañando diversas estructuras lipídicas, protéicas e incluso al ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN)¹⁸. Aproximadamente el dos por ciento del oxígeno de

la respiración se transforma en el radical anión superóxido el que al poseer un electrón desapareado no tiene capacidad para salir de la mitocondria de la célula, debido a que la membrana interna de la mitocondria es impermeable a este radical.

Las especies reactivas incluyen a las de oxígeno (ERO), las especies reactivas de hierro (ERI), las especies reactivas de cobre (ERC), así como a las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Las especies reactivas se forman como productos del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células¹⁹.

En este sentido, cuando se activan las células fagocíticas, incrementan su consumo de oxígeno con la consecuente formación del anión superóxido; así mismo, los metales de transición, como el hierro y el cobre pueden reaccionar con el ascorbato formando el radical hidroxilo que viene a ser también un radical libre²⁰. A estos radicales libres que derivan del oxígeno se les denomina más propiamente "especies reactivas de oxígeno" (ERO), para diferenciarlos de las "especies reactivas de nitrógeno" (ERN), que comprenden al óxido nítrico y al dióxido nítrico²¹.

Tabla 1. Tipos de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno de interés biológico²².

Especies Reactivas	Símbolo	Vida media (seg.)	Reactividad/Comentario
Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)			
▪ Superóxido	$O_2^{\cdot -}$	10^{-6}	Generado en la mitocondria, en el sistema cardiovascular y en otros sistemas
▪ Radical Hidróxilo	OH^{\cdot}	10^{-9}	Altamente reactivo, generado por el flujo de electrones del hierro. Se

				forma en iguales condiciones en nuestro cuerpo.
▪ Peróxido de Hidrógeno	H_2O_2	Estable		Formado en nuestro cuerpo por un gran número de reacciones, produciendo compuestos como el OH^*
▪ Radical peróxilo	ROO^*	Segundos		Muy reactivo, formado partir de lípidos, proteínas, ADN, azúcares, etc., durante el daño oxidativo.
▪ Hidroperóxido orgánico	$ROOH$	Estable		Reacciona con iones de metales de transición para producir ROS
▪ Oxígeno singlete	1O_2	10^{-6}		Altamente reactivo, formado durante la fotosensibilización y reacciones químicas.
▪ Ozono	O_3	Segundos		Presente en la atmósfera como un contaminante atmosférico, puede reaccionar con varias moléculas produciendo 1O_2
Especies Reactivas de Oxígeno (RNS)				
▪ Óxido nítrico	NO^*	Segundos		Neurotransmisor y regulador de la presión sanguínea, puede producir potentes oxidantes los estados patológicos.
▪ Peroxinitrito	$ONOO^-$	10^{-3}		Formado del NO y del superóxido, altamente reactivo.
▪ Acido peroxinitroso	$ONOOH$	pocos segundos		Forma protonada del $ONOO^-$
▪ Dióxido de nitrógeno	NO_2	Segundos		Formado durante la contaminación atmosférica.

2.3.1. Fuentes biológicas de radicales libres

a) Mitocondrias

Constituye la fuente principal de radicales libres. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de

producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar adenosina trifosfato (ATP)¹³. En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo en más del 95% de estas reacciones un total de cuatro electrones de moléculas con producción de dos moléculas de H₂O. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar uno o dos electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres²³.

b) Peroxisomas

Organelas del citosol muy ricas en oxidasas y que generan H₂O₂, el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua.

c) Leucocitos polimorfonucleares

Constituyen una fuente importante, cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleukinas, etc). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de O₂ que en presencia de hierro se transforma en el altamente tóxico OH[•]. Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios¹³.

d) Xantina deshidrogenasa

Predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas (isquemia, entre otros), genera O₂[•]. No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis²⁴.

2.3.2. Factores para la producción de radicales libres

- Químicos: Aumento de metales pesados, xenobióticos, componentes del tabaco.
- Drogas: Adriamicina.
- Físicos: Radiaciones ultravioleta, hiperoxia.
- Orgánicos y metabólicos: Dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia - reperusión y ejercicios extenuantes¹³.

2.3.3. Sistemas de defensa biológica contra los radicales libres

Estas defensas se efectúan en cinco niveles:

a) Primer nivel. Consiste en la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano.

b) Segundo nivel. Lo constituyen enzimas especializadas en captar el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Estas son la superóxido dismutasa (SOD), metaloenzima que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. La SOD fue descubierta por Fridovich en 1975.

c) Tercer nivel. Dado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno. La catalasa, que se encuentra en los peroxisomas y cataliza la reacción de dismutación. Superóxido dismutasa (SOD), una familia de enzimas antioxidantes responsables para la dismutación de los radicales superóxidos y la formación de peróxido de hidrógeno.

Glutación peróxidasa (GSH-Px dependiente del Se) y la catalasa (CAT dependiente del Fe), ambos reducen el peróxido de hidrógeno hasta H₂O. Como resultado, la reacción de superóxidos con moléculas biológicas y el potencial para la producción de radicales más poderosos, se encuentra enormemente reducido.

d) Cuarto nivel. Aquí el radical hidroxilo producido en el ciclo de Haber-Weiss puede ser neutralizado por la vitamina E (tocoferol), que es un antioxidante efectivo y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente importante. También la vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical OH[•].

e) Quinto nivel. Una vez producido el daño molecular, existe un quinto nivel de defensa que consiste en la reparación. Está demostrado que los radicales libres son capaces de provocar rupturas de la cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) y aun de inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética¹³.

En adición a los procesos evolutivos dirigidos a evitar la producción de desechos reactivos derivados del metabolismo oxidativo, otro muy importante fue el desarrollo de la habilidad para sintetizar o acumular antioxidantes, moléculas que pueden reaccionar y aniquilar especies reactivas de oxígeno antes de que éstas puedan infligir daño oxidativo a componentes vitales tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o membranas de la célula. El resultado fue la creación de diferentes tipos de moléculas antioxidantes. Entre las más exitosas de estas moléculas en plantas se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C) que es un antioxidante soluble en agua y el antioxidante tocoferol (vitamina E) que es soluble en lípido. La manera más eficaz de eliminar especies tóxicas indeseables es por la vía catalítica²⁵.

En relación con la participación de los radicales libres en el envejecimiento es necesario considerar tres factores fundamentales: la producción de oxidantes, el nivel de defensa antioxidante y la extensión del daño por oxidantes²⁶.

2.4. Antioxidantes

Un antioxidante es toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato¹⁶.

El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma original por la acción de otros antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los radicales libres.

De las numerosas clasificaciones de los antioxidantes, se recomienda adoptar la que los divide en: exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimentaria y endógena que son sintetizados por la célula. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado radical libre o hacia varios. La vitamina E, el beta caroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos. La vitamina E es considerada la más importante protectora de las moléculas lipídicas.

a) Vitamina C: Neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales hidroxilos, captura anión hiperóxidos y regenera la forma oxidada de vitamina E.

b) Vitamina E: Neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres hidroxilos, neutraliza peróxidos y captura anión superóxido.

c) Betacaroteno: Neutraliza el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)¹³.

e) Polifenoles: Interfiere en la oxidación de los lípidos o de otras biomoléculas por la rápida donación de un átomo de hidrógeno a los radicales libres. El fenol

por sí mismo es inactivo como antioxidante, pero, los compuestos orto- y para-difenólicos poseen actividad antioxidante, la cual incrementa con la sustitución de sus átomos de hidrógeno por grupos etil- o n-butiril²⁷.

Los compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides, son un grupo de sustancias naturales que se encuentran en el reino vegetal. Se han descubierto más de 4,000 especies diferentes de flavonoides, encontrándose en frutas, verduras, semillas, tallos y flores y son, por tanto, constituyentes importantes de la dieta humana. Los flavonoides más abundantes en la dieta son los flavanoles (catequinas, proantocianidinas), las antocianinas y los productos de oxidación derivados de ellos. La principal fuente de polifenoles son: frutas y bebidas (zumos de frutas, vino, té y cerveza) y en menor cantidad, verduras, legumbres y cereales. Como media, una dieta mixta occidental proporciona aproximadamente 1 g de flavonoides por día²⁸.

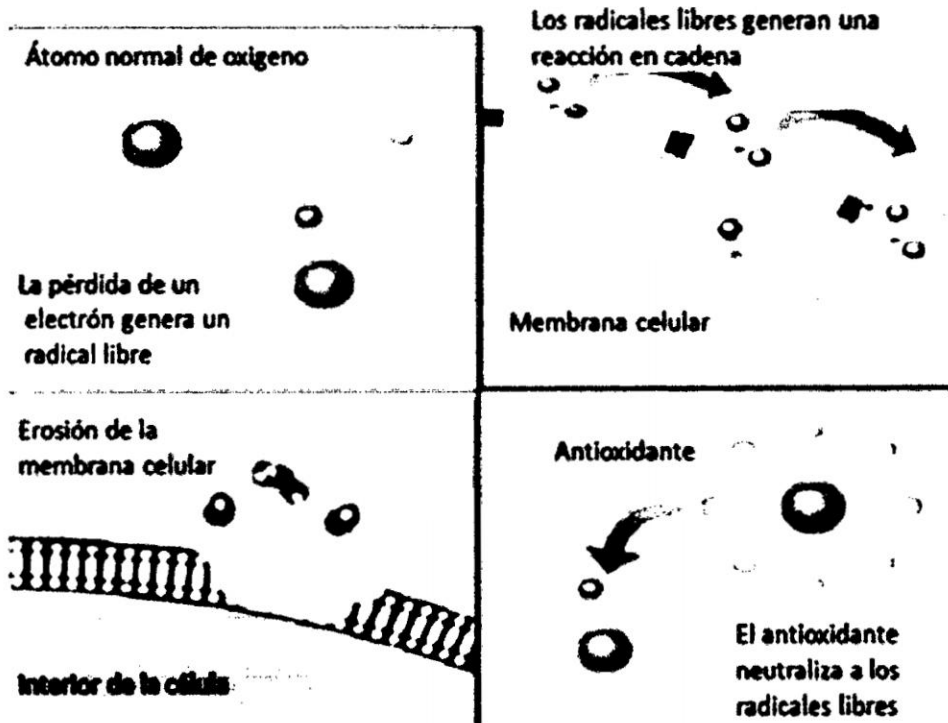


Figura 2. Acción antioxidante²⁹.

2.5. Flavonoides

2.5.1. Generalidades

Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo, entre ellos, los flavonoides. Estos compuestos, productos de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico, intervienen en los vegetales en la formación de pigmentos, en la protección frente a la radiación ultravioleta, en la defensa durante la interacción planta-patógeno y, posiblemente, modificando la acción de distintas hormonas (auxinas y citoquininas), se ha demostrado, además que los flavonoides de las plantas causan la activación de los genes bacterianos implicados en la formación de nódulos (*Rhizobium*) y en la transformación de plantas (*Agrobacterium*)³⁰.

2.5.2. Estructura química y clasificación

Los flavonoides son fenoles de tipo diaril-propano ($Ar-C_3-Ar$) unidos, la mayoría, a una cadena de azúcar: están constituidos por un anillo bencénico condensado a una -pirona (o sus derivados) sustituida en posición 2 por un radical fenilo³⁰.

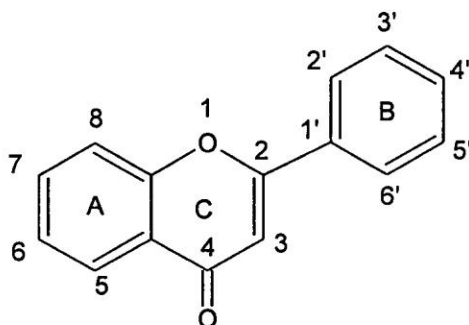


Figura 3. 2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides³¹.

En todas las clases de flavonoides, la biosíntesis justifica la frecuente presencia de al menos tres hidróxilos fenólicos en C-5, C-7 y C-4' de la genina, aunque algunos de ellos puede faltar. Todos los flavonoides – más de 4,000 - poseen un origen biosintético común y, por este motivo, un mismo elemento estructural

básico, un encadenamiento 2-fenilcromano. Se pueden reagrupar en una docena de clases según el grado de oxidación del núcleo piránico central, que puede estar abierto y vuelto a ciclar en una estructura furánica (dihidrofuranona):

- 2-fenilbenzopirilios; por ejemplo los antocianos;
- 2 fenilcromonas;
 - flavonas, flavanoles y sus dímeros
 - flavanonas y dihidroflavanoles (derivados 2,3-dihidrogenados)
- 2-fenilcromanos;
 - flavanos
 - flavan-3-oles, flavan-3,4-dioles
- Chalconas y dihidrochalconas;
- 2-bencildencumaranonas (=auronas)³¹.

2.5.3. Biosíntesis

Todos los flavonoides derivan sus esqueletos carbonados de dos compuestos básicos procedentes del metabolismo de los hidratos de carbono: malonil CoA y un éster del CoA con un ácido hidroxicinámico.

Su formación tiene lugar por condensación de tres moléculas de malonil CoA con el 4-cumaroil CoA, catalizado por una chalcona sintetasa. El compuesto resultante (4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona) constituye el intermediario común a todos los flavonoides. La acción estéreo-específica de una chalcona isomerasa da lugar al primer flavonoide, una (2S) - flavanona. El mecanismo que conduce a la transformación de las flavanonas en flavonas e isoflavonas no está claramente establecido. Los dihidroflavanoles son originados por hidroxilación directa de flavanonas en posición 3 en presencia de la dioxigenasa, flavanona-3-hidroxilasa. Estos dihidroflavanoles son intermediarios biosintéticos en la

formación de flavonoles, leucoantocianidinas, catequinas, proantocianidinas y antocianidinas³⁰.

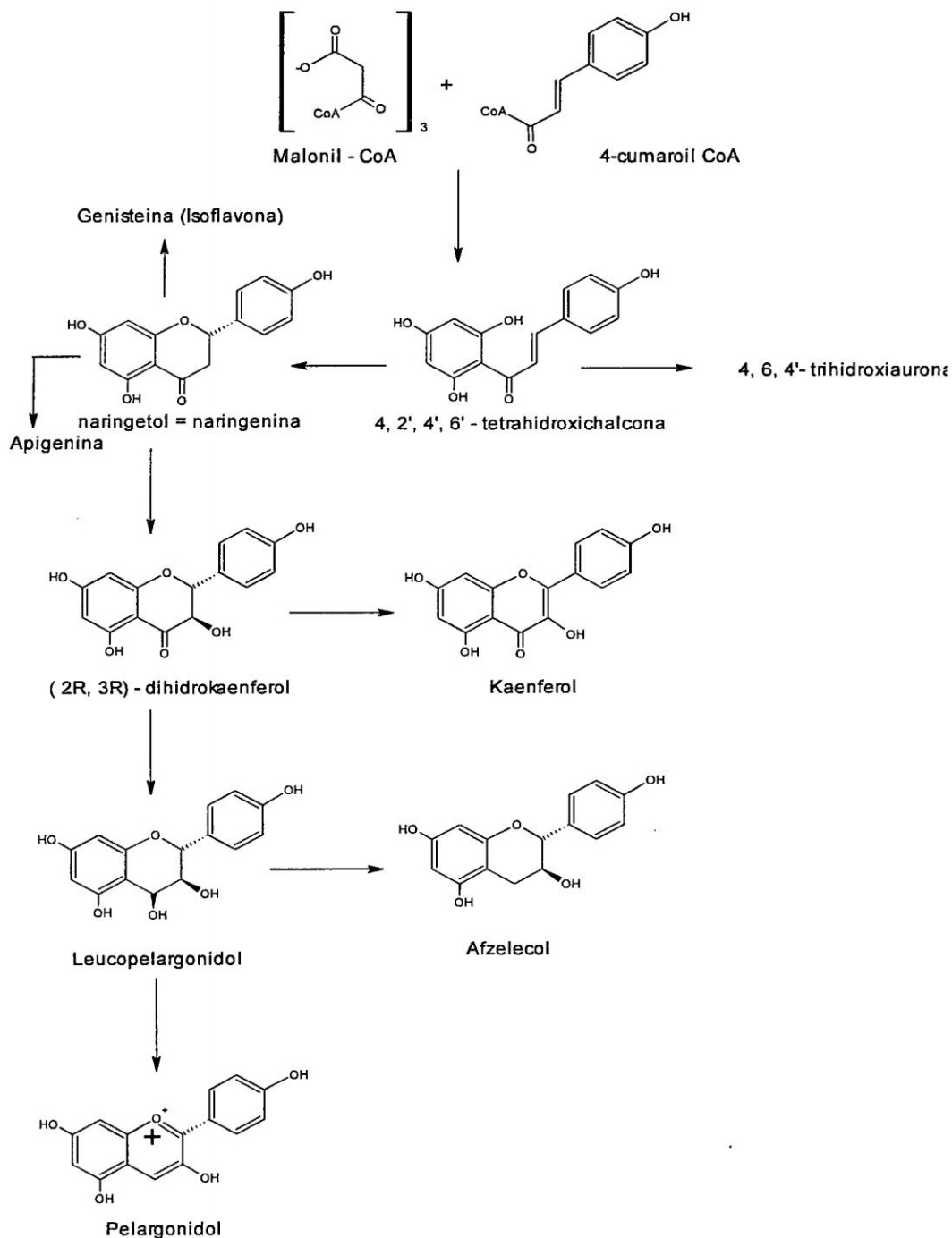


Figura 4. Origen biosintético de los Flavonoides³¹.

2.5.4. Acción antioxidante de los flavonoides

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Aunado a esto, se ha visto que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A₂; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa. Con respecto a su estructura, los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y es potenciado este efecto por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH^{*} libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4. Además, las agliconas se muestran más potentes en sus acciones antilipoperoxidativas que sus correspondientes glicósidos. Conforme a lo anterior mencionado, la quercetina es el flavonoide que reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante, pues ésta es cinco veces mayor que la de las vitaminas C y E, además de poseer una hidrosolubilidad similar a esta última. Existe efecto sinérgico con las vitaminas aludidas. Pues el ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones durante más tiempo. Por su parte la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E. Los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. Bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células. Donde se ha corroborado la protección antioxidante de los flavonoides en: queratinocitos, fibroblastos dérmicos,

ganglios sensoriales, endotelio, tejido nervioso y en lipoproteínas de baja densidad³².

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ácido desoxirribonucleico (ADN); quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria.

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, tenemos:

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C.
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

La función antioxidante de la quercetina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo.

Por otra parte, la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E, con lo cual también presenta efectos sinergizantes. Así, se ha demostrado que el flavonoide inhibe la fotooxidación de la vitamina E en la membrana celular de las células

sanguíneas en presencia de hematoporfirina como fotosensibilizador. Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son, por ejemplo, bien patentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina-butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa. Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro.

Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas. De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares³³.

Relación Estructura-Actividad (REA) biológica de los flavonoides

1. El enlace doble 2-3 de las flavonas y flavonoles es esencial para la actividad antialérgica.
2. Los 3- y 7-O-glicósidos tienen menor actividad.
3. Entre más grupos hidroxilos existan en las posiciones 3', 4', 5, 6 y 7, la actividad es más fuerte.
4. Los flavonoles tipo pirogalol (3',4',5'-trihidroxilados), presentan menor actividad que los tipo pirogalol (4'-hidroxilados) o catecol (3',4'-dihidroxilados).
5. Las actividades de las flavonas son más fuertes que las de los flavonoles.
6. En los flavonoles 3-O-metilados se disminuye la actividad.

7. Varias flavonas y flavonoles con grupos metoxilos en 4' y en 7, no siguen las reglas 3, 4 y 5.

Se estudió la REA entre varios flavonoides y el cáncer de seno encontrándose que el enlace doble entre C-2 y C-3, el anillo B ligado al C-2, el grupo hidroxilo en C-5, la no hidroxilación en C-3 y la presencia de sustituyentes apolares en C-6, C-7, C-8 ó C-4', son características estructurales importantes para la interacción entre los flavonoides y la proteína resistente al cáncer de mama (BCRP).

En cuanto a la acción antioxidante de los flavonoides, se ha propuesto que el enlace doble C-2 y C-3, el carbonilo C-4, y los hidroxilos en C-3 y C-5, son esenciales para la acción antioxidante de los flavonoides. Existen otros estudios sobre REA de los flavonoides, que evalúan la REA entre varios flavonoides naturales y sintéticos, con actividad contra el virus del sida³³.

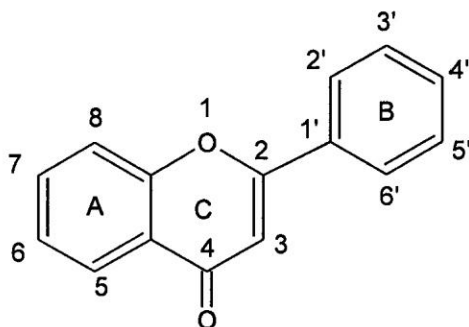


Figura 3. 2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides³¹.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del lugar de estudio

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los Laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho y en el Laboratorio de Control de Calidad de Laboratorios Farminindustria S.A. de la ciudad de Lima, durante los meses de enero a junio del 2012.

3.2. Población y muestra

Población. Raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" del centro poblado de Mayupampa, distrito de Chiara, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho ubicada a 3,500 a 3,800 msnm; durante los meses de enero y febrero en estado de floración.

Muestra. La muestra estuvo constituida por dos kilogramos de raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" recolectadas por conveniencia (Anexo 5). Una parte de la muestra fue utilizada para la identificación botánica por la Blga. Laura Aucasime del *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas (Anexo 1).

3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1. Recolección de la muestra

Se recolectó y seleccionó las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", éstas se secaron a temperatura ambiente en una habitación ventilada aproximadamente por una semana hasta la eliminación de la humedad. Luego se pulverizó la muestra en un molino de cuchillas hasta obtener un polvo seco de color guindo oscuro, almacenándose en frascos limpios y secos para el aislamiento de flavonoides y pruebas biológicas correspondientes.

3.3.2. Técnica de Extracción de Flavonoides

Se pesó aproximadamente 500 g para realizar la extracción hidroalcohólica con tres litros de etanol al 80%, en frascos de color ámbar por una semana, durante el proceso se agitó el frasco periódicamente para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se filtró y se volvió a macerar la muestra con tres litros de etanol al 80% y se dejó por otra semana (realizando una doble extracción), se filtró y reunió los filtrados, obteniendo así la solución hidroalcohólica total; seguidamente se procedió a concentrar el extracto en un evaporador rotatorio BUCHI 3000 (Anexo 6).

El extracto seco fue resuspendido en agua destilada, desengrasando con éter de petróleo utilizando un embudo de separación, luego se realizó la extracción líquido-líquido con acetato de etilo (Anexo 7). Los flavonoides se concentran en la fracción de acetato de etilo (fracción flavónica), el mismo que fue evidenciado con la prueba de Shinoda³⁰ (Anexo 8).

3.3.3. Aislamiento de Flavonoides

3.3.3.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se realizó la siembra de la fracción flavónica según las siguientes condiciones (Anexos 9 y 10):

Fase estacionaria	: Placa cromatográfica 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
Fase Móvil	: Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)
Volumen de inyección	: 25 µL
Revelador	: Vapores de amoniaco y luz Ultravioleta (UV).

Luego del revelado de la placa cromatográfica, ésta se llevó a calentar en una estufa a 110°C por 10 min, posteriormente se evaluó las placas al visible y en la cámara UV a 366 nm³⁴.

Con la fracción flavónica se realizó una cromatografía en capa fina en una placa cromatográfica de 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck) y como sistema de solvente butanol: ácido acético: agua (BAW) en las proporciones de (4:1:5). La siembra se realizó en banda con el propósito de aislar los flavonoides, siendo localizados con la ayuda de la luz ultravioleta. Cada una de las bandas fue recuperada, disuelta en metanol y filtrada; obteniéndose 02 bandas de la fracción flavónica denominadas fracción aislada 1 y fracción aislada 2. Cada fracción fue resuelta por HPLC³⁵ (Anexos 15).

3.4. Pruebas Cromatográficas

3.4.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Para el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), las muestras utilizadas fueron, las fracciones obtenidas en el procedimiento anterior y los estándares de quercetina y rutina. Se realizó una inyección de cada una de las fracciones, teniendo en cuenta las siguientes condiciones:

Sistema Cromatográfico:

Equipo	: HPLC, Merck Hitachi - Lachrom Elite
Columna	: ProntoSil Hypersorb ODS 250 mm x 4,6mm (5µm). DL 164
Flujo	: 1 ml/min

Longitud de onda	: 257nm, 279 nm, 368nm.
Volumen de Inyección	: 5 µL
Temperatura	: 30°C
Fase Móvil	: Metanol : Acetonitrilo : Agua (40:15:45)

Se filtró la fase móvil por membrana de nylon de 0,45 µm y se trasvasó a un frasco apropiado. Se registraron los cromatogramas e identificaron los picos por comparación con los cromatogramas de los estándares según los tiempos de retención³⁶ (Anexos 13, 14 y 15).

3.5. Pruebas espectrales

Las dos bandas obtenidas en el procedimiento anterior fueron removidas y eluídas con metanol, y leídas en un Espectrofotómetro Ultravioleta Génesis 6 en el rango de 200 a 400 nm, en celda de cuarzo de un cm y teniendo como blanco el metanol, registrándose los máximos picos de absorción, para su interpretación se utilizó el reporte de Mabry *et al*³⁷.

3.6. Determinación de la Actividad Antioxidante

Método: Actividad Secuestradora del Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)³⁸.

Fundamento:

Para determinar la capacidad antioxidante se emplea al radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), el cual por su estabilidad, es destruido solamente por antioxidantes, de tal manera que el mejor compuesto destructor del DPPH será el mejor antioxidante.

La técnica empleando el DPPH que tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, se basa en la desaparición de dicho color hacia el amarillo pálido por la reacción de la sustancia antioxidante, pudiendo cuantificarse la reacción

8. Luego se diluyó la solución A con metanol en una proporción 1:2 (solución B) para obtener una concentración final de 50 µg/ml, y en una proporción de 1:10 (solución C) para obtener una concentración final de 1 µg/ml.

9. Con las soluciones B y C se procedió igual a los puntos 6 y 7.

10. Se siguió el mismo procedimiento para determinar la actividad secuestradora de la vitamina C (Merk), quercetina (Merk) y rutina (Merk).

Cálculos:

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

Dónde:

Ac: Absorbancia del control DPPH

Am: Absorbancia de la muestra

Ab: Absorbancia del blanco de la muestra

AA: Actividad Antioxidante

3.7. Análisis de Datos

Los resultados de la actividad antioxidante fueron organizados en tablas y una matriz para calcular la media y la desviación estándar. La significancia estadística fue determinado mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) a una nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

IV. RESULTADOS

Tabla 2. Características cromatográficas de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho-2012.

Fracciones	Rf	Visualización visible	Fluorescencia al ultravioleta (366 nm)	
			SinNH ₃	Con NH ₃
Fracción flavónica	0,855	Amarillo limón	púrpura	Se intensifica la coloración
	0,630	Amarillo limón	púrpura	Se intensifica la coloración
Quercetina	0,861	Amarillo limón	púrpura	Se intensifica la coloración
Rutina	0,636	Amarillo limón	púrpura	Se intensifica la coloración

Tabla 3. Características espectrales en el espectro ultravioleta visible de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Fracciones	Sub-fracciones	Longitud de onda de máxima absorbanca (nm)	
		Banda II	Banda I
Fracción flavónica	Fracción aislado 1	257, 296	374
	Fracción aislado 2	259	363

Tabla 4. Tiempos de retención de las fracciones flavónicas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Fracciones	Tiempo de Retención (min)	
	257,4 nm	368,8 nm
Fracción aislado 1	6,679	6,664
Fracción aislado 2	3,388	3,388
Quercetina	7,376	7,386
Rutina	3,363	3,363

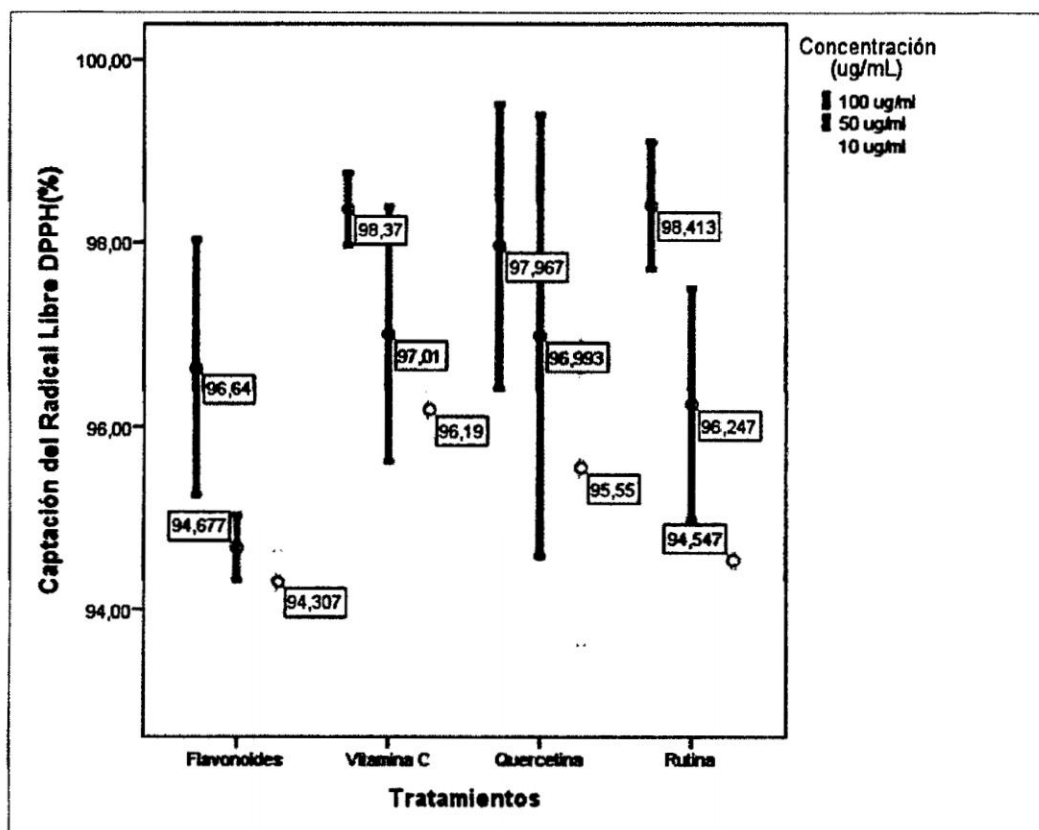


Figura 6. Porcentaje de captación del radical libre DPPH de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" según vitamina C y los estándares de quercetina y rutina. Ayacucho - 2012.

V. DISCUSIÓN

Con la finalidad de aislar los flavonoides objeto del presente estudio, se procedió a realizar una extracción líquido-líquido del extracto etanólico, primero con éter de petróleo, para eliminar las grasas, pigmentos y otros metabolitos, después se extrajo con acetato de etilo para extraer los flavonoides, quedando como residuo la fase acuosa. Se verificó la presencia de flavonoides con la reacción de Shinoda, resultando positivo para la fracción flavónica, y ligeramente en la fracción acuosa, por lo que podemos asumir que el mayor contenido de flavonoides se encuentra en esta fracción (Anexo 8).

Mediante ensayos cromatográficos preliminares, se confirmó la presencia de flavonoides observándose manchas con luz ultravioleta a 366 nm. Los flavonoides detectados en la fracción flavónica fueron aislados y purificados mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa, las manchas caracterizadas fueron recuperados del silicagel con metanol, lográndose aislar 02 fracciones. Cada fracción fue resuelta por HPLC. Las estructuras químicas de las fracciones aisladas por la cromatografía fueron elucidadas mediante correlaciones químicas con los datos obtenidos por espectro UV visible en metanol y por comparación con espectros dados en la literatura por Mabry *et al*³⁷ sugiriéndose la estructura de los flavonoides.

Los flavonoides corresponden a compuestos fenólicos con probable estructura flavónica. Las flavononas, flavonas y flavonoles dan coloraciones rojas a rosadas con la prueba de Shinoda y el color amarillo intenso que forman cuando se adiciona amoníaco, son pruebas características para identificar a los flavonoides³⁴.

En este sentido, en la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica se muestran la presencia de 02 manchas cuando se observa a la luz ultravioleta, utilizándose como patrón de comparación a los flavonoides estándar de rutina y quercetina. La superior de color púrpura con una Relación de Frentes (Rf) de 0,855 y la segunda de color púrpura con Rf de 0,630 semejantes a los estándares de quercetina y rutina que presentan un Rf de 0,861 y 0,636 respectivamente, por lo tanto, se deduce que se trata de dos compuestos diferentes.

Según Lock de Ugaz³⁴ la detección de los flavonoides por cromatografía de papel y capa delgada pueden hacerse por el color que desarrollan en UV, apareciendo como manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otras, las cuales se intensifican o cambian de color luego de su exposición a vapores de amoníaco, cual se pudo apreciar en el presente trabajo (Tabla 2 y Anexo 10).

El análisis de las fracciones aisladas se realizó por espectrofotometría UV visible (Tabla 3), logrando separar dos componentes: La primera (fracción aislada 1) con una fluorescencia púrpura intensa que corresponde al compuesto con un Rf de 0,855, mostrando absorbancias máximas al ultravioleta a 257, 296, 374 nm (Anexo 11), la segunda (fracción aislado 2) con una fluorescencia de color púrpura intensa que corresponde al compuesto con un Rf de 0,630 mostrando absorbancias máximas a 259, 363 nm (Anexo 12). Con estos datos se puede asumir que el compuesto de la fracción aislado 1 corresponde a un derivado de la rutina y la fracción aislado 2 corresponde a un derivado de la quercetina,

siendo la quercetina la más importante ya que se encuentra en mayor proporción (como es demostrado por la mancha púrpura intensa cuando es revelado con vapores de amoníaco en presencia de luz ultravioleta).

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste en dos máximos de absorción en los rangos de 240 – 285 nm (banda II, BII) y 300 – 550 nm (banda I, BI). Podría indicarse como característica que en dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavonas la banda I es de baja intensidad (más baja de la banda II)³⁴.

Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas se muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-OH-sustituidos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm^{34,37}. Espectrofotométricamente observamos que la fracción aislado 1 muestra una longitud de onda: 257, 296 y 374 nm y la fracción aislado 2 muestra una longitud de onda: 259 y 363 nm, lo cual se puede atribuir en ambos casos que se trata de un flavonol (Tabla 3, Anexo 11 y 12).

Para el análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) a 257,4 y 368,8 nm (Tabla 4), se realizó la corrida cromatográfica de las dos fracciones. Las fracciones aisladas 1 y 2 muestran tiempos de retención de 3,388 y 6,679 min, respectivamente y son semejantes a los tiempos de retención de los estándares de quercetina (7,376 min) y rutina (3,363 min) (Anexos 13, 14 y 15). Con los cromatogramas obtenidos de los componentes a 257,4 nm y 368,8 nm se puede asumir que la longitud de onda óptima para su lectura es la de 257,4 nm, ya que a esta longitud de onda se puede observar cromatogramas con áreas superiores y significativos.

Zu Y *et al*⁶ realizaron la determinación simultánea por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) de flavonoides y otros compuestos fenólicos del extracto de espino amarillo de *Hippophae rhamnoides L.* reportando la presencia de catequina, rutina, quercetina y kaempferol, detectados en la longitud de onda de 279 nm para la catequina, 257 nm para el rutina, 368 nm para quercetina, kaempferol, con tiempos de retención de 3,8; 5,2; 7,3; 10,9 min respectivamente, los cuales son similares a los reportados en el presente trabajo, por lo tanto, se asume que los flavonoides aislados en el presente trabajo corresponden a la quercetina y rutina respectivamente.

Los flavonoides aislados demostraron tener actividad antioxidante al captar el radical libre DPPH tal como se muestra en la Anexo 16 y Figura 6. Las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml tuvieron una actividad antioxidante superior al 90%, mientras que la vitamina C a las mismas concentraciones tuvo una actividad secuestradora del radical libre DPPH ligeramente superior y los flavonoides estándar rutina y quercetina fueron ligeramente superiores a los flavonoides aislados de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". El análisis estadístico demostró que existen diferencias estadísticas entre la actividad antioxidante de los flavonoides de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", la vitamina C, la rutina y quercetina tanto por grupo de tratamiento y concentración (Anexo 16 y 17).

En todos los casos los flavonoides contenidos en la fracción flavónica, mostraron actividad antioxidante dependiente de la concentración, a mayor concentración, mayor actividad antioxidante, pero mostraron ligeras diferencias cuando se compara con la vitamina C, los flavonoides estándar quercetina y rutina, tal como se muestra en sus respectivas pruebas estadísticas, donde existe significancia en las concentraciones ensayadas.

Jayo C⁹, realizó un estudio comparativo de la actividad antioxidante del extracto metanólico de cuatro cultivares de *Oxalis tuberosa* Mol. "oca" sobre el DPPH, obteniendo como resultado una actividad antioxidante 92.72% del cultivar rosado al estado crudo, seguido del amarillo (77,68%), jaspeado (69,26%) y violáceo (61,38%); y al estado de cocción el violáceo presentó mayor actividad (68.96%) seguido del jaspeado (67,22%), rosado (57,14%) y amarillo (41,71%). No se encontró diferencias estadísticamente significativas en cuanto al cultivo y al efecto de la cocción, concluyéndose que los cuatro cultivares evaluados tienen actividad antioxidante y no son influenciados por el tipo de cultivar y el efecto de la cocción. Estos resultados son ligeramente inferiores a los obtenidos en la presente investigación.

Aguilar E⁷, demostró la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña", caracterizando a los flavonoides como apigenina y la naringenina, siendo la apigenina el flavonoide más importante. Se obtuvo como resultado una actividad antioxidante superior al 90% en las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, mientras que la vitamina C a las mismas concentraciones tuvo una actividad secuestradora del radical libre DPPH ligeramente superior y el flavonoide estándar rutina fue ligeramente inferior a los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix*. Estos resultados son similares a los obtenidos en la presente investigación.

Por lo tanto las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", tienen actividad antioxidante superior al 90%. Siendo la concentración de 100 µg/ml con mejor actividad antioxidante.

VI. CONCLUSIONES

1. Los flavonoides aislados de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pachata" presentaron actividad antioxidante a las concentraciones de 100 µg/ml fue 96,64%, 50 µg/ml fue 94,68% y a 10 µg/ml fue 94,31% respectivamente ($p < 0,05$).
2. Se identificaron los flavonoides por cromatografía en capa fina, espectroscopia ultravioleta y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) caracterizados como quercetina ($R_f = 0,855$) y rutina ($R_f = 0,630$), con tiempos de retención de 6,679 min y 3,388 min, similares a los obtenidos de los estándares de quercetina (7,376 min) y rutina (3,363 min) respectivamente.
3. Se logró determinar la concentración óptima de los flavonoides, siendo la concentración de 100 µg/ml la que demostró mayor actividad antioxidante.
4. Los flavonoides aislados presentaron actividad antioxidante por ser agliconas muy hidroxiladas, siendo la quercetina el flavonoide que reúne mejor actividad antioxidante.

VII. RECOMENDACIONES

1. Proseguir con el estudio de la actividad antioxidante de los flavonoides aislados de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" cuantificando cada uno de los componentes por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
2. Realizar la formulación de los flavonoides en presentaciones farmacéuticas sólidas (cápsulas, cremas) para su empleo como sustancia antioxidante.
3. Validación de la técnicas de aislamiento e identificación de los ácidos fenólicos aislados de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara".
4. Realizar estudios de toxicidad de la raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara".

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramos IM, Batista GC, Gómez MB, Zamora PA. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. Rev. Investigación en Salud. [revista en internet] Abril 2006. [acceso en Junio 2012]; 7(1): 7-15.
Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invsal/isg-2006/isg061b.pdf>
2. Martínez-Flores S, Gonzáles-Gallego J, Culebras JM, Tuñon J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. [revista en internet] Agosto 2002. [acceso en Julio 2012]; 17(6):271-278. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
3. De la Cruz J, Aucasime L, Ramírez A. Plantas medicinales alto andinas de las zonas de Ayacucho – Huancavelica. Ayacucho: Fondo Editorial PERÚ LNG; 2006.
4. Ayala AR. Actividad antiulcerosa del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara” [Tesis de pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 2010.
5. Romero M. Estudio botánico, fenológico, fitoquímico y farmacológico de la pacha tara [Instituto de Investigación]. Ayacucho: Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH; 1994.
6. Carhuapoma M. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” [Tesis de Maestría]. Lima: UNMSM; 2006.
7. Aguilar E. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epl. “wayra muña” [Informe de investigación]. Ayacucho: Instituto de investigación de Ciencias Biológicas. UNSCH; 2010.
8. López N. Actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier “hierba santa” [Tesis de pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 2013.
9. Jayo C. Estudio comparativo de la actividad antioxidante del extracto metanólico de cuatro cultivares de *Oxalis tuberosa* Mol. “oca” [Tesis de pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 1996.
10. Romero M, De la Cruz J. Estudio etnobotánico de plantas medicinales con propiedades gastrointestinales en la provincia de Huamanga 1996 [Instituto de Investigación]. Ayacucho: Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH; 1997.
11. Mostaceros LJ, Mejía CF. Taxonomía de Fanerógamas Peruanas. Lima: CONCYTEC; 2002.
12. Slanis AC, Grau A. El género *Hypseocharis* (Oxalidaceae) en la Argentina. Darwiniana [revista en internet] 2001. [acceso en julio 2012]; 39(3-4): 343-352. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/669/66939411.pdf>
13. Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev. Cubana Med. Milit. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto” [revista en internet] 2001. [acceso Marzo de 2013]; 30(1):36-44. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/mil07100.pdf
14. Mayor R. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. Rev. Inst. Med. Trop. [revista en internet] 2010. [acceso en Julio 2013]; 5 (2): 23-29. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>
15. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismo de protección. Atenea 494 [revista en internet] Julio 2006. [acceso en Agosto de 2012]; págs. 161-172. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=32849410>

16. Maldonado SO, Jiménez VEN, Guapillo VMRB, Ceballos RGM, Méndez BE. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev. Med. UV [revista en internet] Octubre 2010. [acceso en Julio de 2012]; págs. 33-39. Disponible en: http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf
17. Barbosa KBF, Bressan J, Zulet MA, Martínez JA. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. An. Sist. Sanit. Navar. [revista en internet] 2008. [acceso en Agosto de 2012]; 31(3):259-280. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v31n3/revision2.pdf>
18. Miquel J, Ramírez-Bosca A. Estrés Oxidativo y Suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. ArsPharm [revista en internet] 2004. [acceso en Agosto de 2012]; 1:44-57. Disponible en: <http://www.ugr.es/~ars/abstract/vol45/91-109.pdf>
19. Martínez DC, Rugenio VC, Rivas AS. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev. Fac. Med. UNAM [revista en internet] Noviembre-Diciembre 2003. [acceso en agosto de 2012]; 46(6).Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no46-6/RFM46606.pdf>
20. Korc I, Bidegain M, Martell M. Radicales libres bioquímica y sistemas antioxidantes. Implicancia en la patología neonatal. Rev. Med. Uruguay [revista en internet] 1995. [acceso en Octubre de 2012]; 11(2):121-135. Disponible en: <http://www.rmu.org.uy/revista/1995v2/art6.pdf>
21. Céspedes ME, Rodríguez CK, Llópiz JN, Cruz N. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. Rev. Cubana Invest. Biomed. [revista en internet] 2000. [acceso en Agosto de 2012]; 19(3):186-90. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol19_3_00/ibi07300.pdf
22. Devagasayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane K, Ghaskadbi S, Lele RD. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. J Assoc. Physicians India [revista en internet] 2004. [acceso Agosto de 2013]; 52:794-804. Disponible en: <http://www.panelamonitor.org/media/docrepo/document/files/free-radicals-and-antioxidants-in-human-health.pdf>
23. Acosta AG, Frías de León MG, Reyes MR, Vargas HV, Suárez-Cuenca JA. Radicales libres y mecanismos de daño tisular en la diabetes mellitus. Rev. Fac. Med. UNAM [revista en internet] Mayo – Junio 2011. [acceso en agosto de 2012]; 54(3). Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2011/un113f.pdf>
24. Venereo GJ. Daño Oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. Rev. Cubana Med. Milit. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto" [revista en internet] 2002. [acceso en agosto de 2012]; 31(2):126-33. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v31n2/mil09202.pdf>
25. Hernández-Saavedra D, Mc Cord JM. Evolución y Radicales libres. Importancia del estrés oxidativo en la patología humana. Rev. Med. Ins. Mex. Seguro Soc. [revista en internet] Febrero 2007. [acceso en agosto de 2012]; 45(5):477-484. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2007/im075j.pdf>
26. Rodríguez CK, Céspedes ME. Estrés oxidativo y envejecimiento. Rev. Cubana Invest. Biomed. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón" [revista en internet] 1999. [acceso en agosto de 2012]; 18(5):67-76. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol18_2_99/ibi01299.pdf

27. Miranda ZML. Influencia de los procesos de germinación y fermentación en la capacidad antioxidante y contenido en vitamina C y E de *Lupinus albus* var. Multolupa [Tesis de pregrado]. Lima: UNMSM; 2003.
28. Tiskow G. Radicales Libres en Biología y Medicina: Una breve revisión. Gac. Cient. Vet. [revista en internet] 1996. [acceso en Agosto de 2012]; 1:44-57. Disponible en:
<http://www.ucla.edu/ve/dveterin/departamentos/CienciasBasicas/gcv/2530int2530er2530no/articulos/documasp/~vol1num1art3dic96.pdf>
29. Aguirre-Joya JA, Zugasti-Cruz A, Belmares-Cerda R, Aguilar CN, De la Garza-Toledo H. Actividad antioxidante de algunas plantas tropicales, subtropicales y semidesérticas. Rev. Cient. Universidad Autónoma de Coahuila [revista en internet] 2012. [acceso en agosto de 2013]; 4(7):1-7. Disponible en:
<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM7/3>
30. Villar de Fresno M. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España. 1999.
31. Bruneton J. Farmacognosia: Fitoquímica. Terpenos y esteroides. 2ªed. España: Editorial Acribia; 2001.
32. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Fac. Med. UNAM [revista en internet] Marzo-Abril 2009. [acceso Febrero de 2013]; 52 (2):
Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>
33. Martínez MA. Flavonoides. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía; 2005.
34. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de los productos naturales. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
35. Toso RE, Skliar MI. Aislamiento, Identificación y Cuantificación de Compuestos con Actividad Gastroprotectora presentes en *Centaurea solstitialis*. Rev. Cient. Vet. U.N.L. Pam. [revista en internet] 2002. [acceso en Noviembre de 2012]; 5:17-27. Disponible en:
<http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n04a03toso.pdf>
36. Zu Y, Li C, Fu Y, Zhao C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [revista en internet] Abril 2006. [acceso Febrero de 2013]; 41:714–719. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520013>
37. Mabry T, Markham K, Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin; 1970.
38. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico [revista en internet] Julio 2008. [acceso Febrero de 2013]; 8(1). Disponible en:
http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_I/Art4_Vol8_N1.pdf.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 5. Certificado de identificación botánica de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho-2012.



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. Luz Pilar, PALOMINO NOA, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	GERANIALES
FAMILIA	:	OXALIDACEAE
GENERO	:	<i>Hypseocharis</i>
ESPECIE	:	<i>Hypseocharis bilobata</i> Killip.
N.V.	:	"pacha tara"

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

Ayacucho, 05 de Abril del 2012

Dpto. Ciencias Biológicas
EPE

Anexo 2

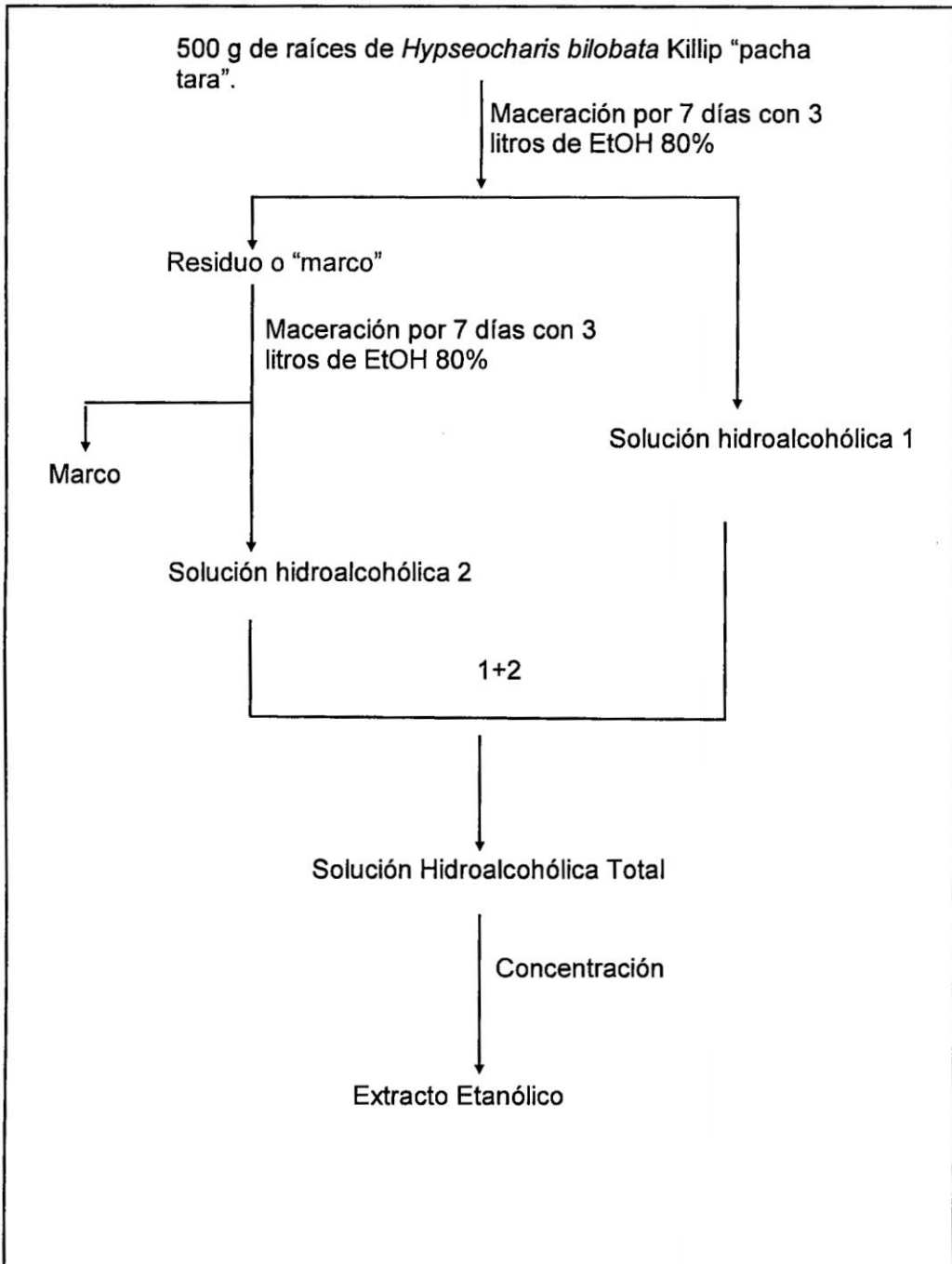


Figura 7. Flujograma de obtención del extracto etanólico de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho-2012.

Anexo 3

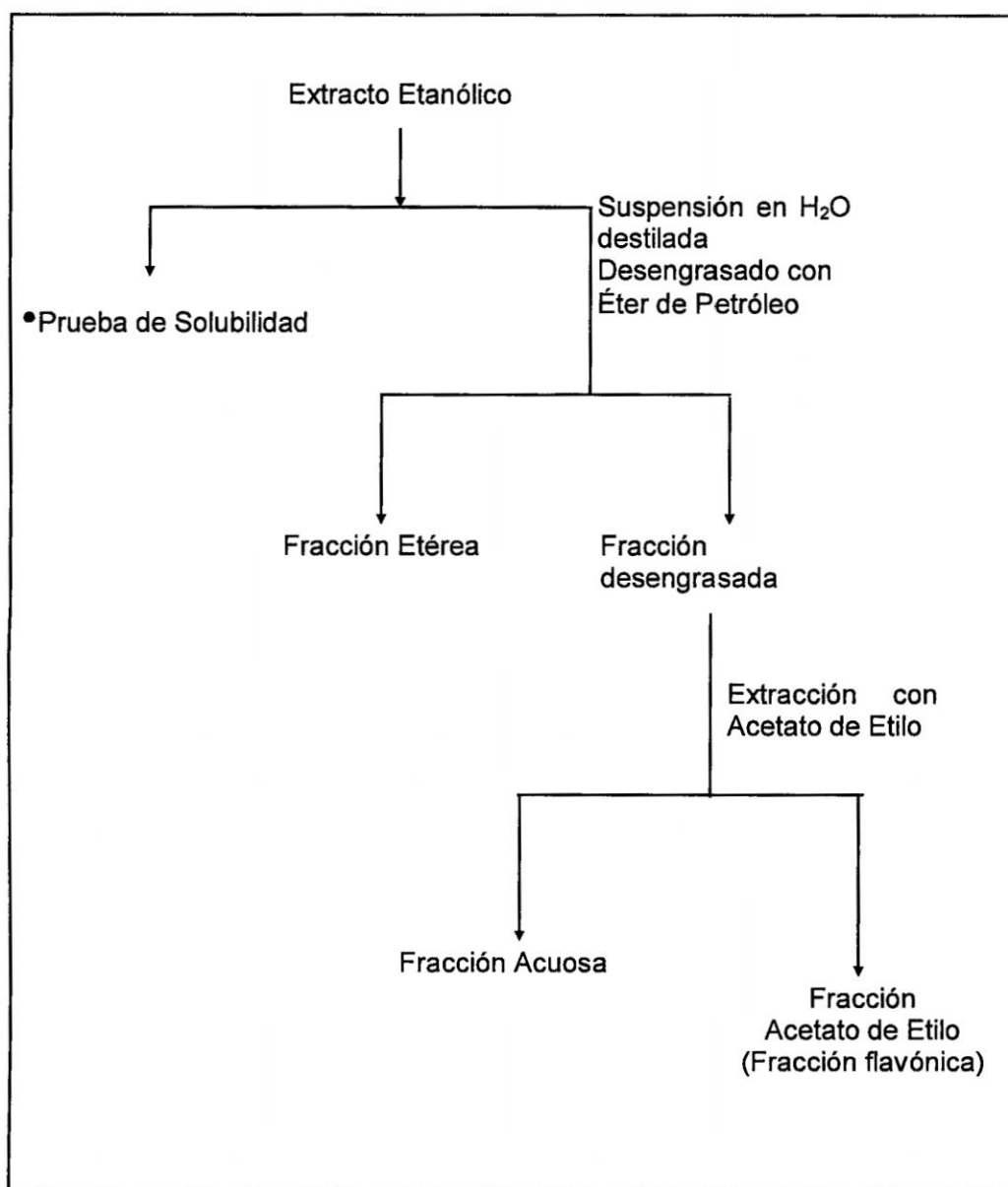


Figura 8. Flujograma de fraccionamiento del extracto etanólico de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho-2012.

Anexo 4

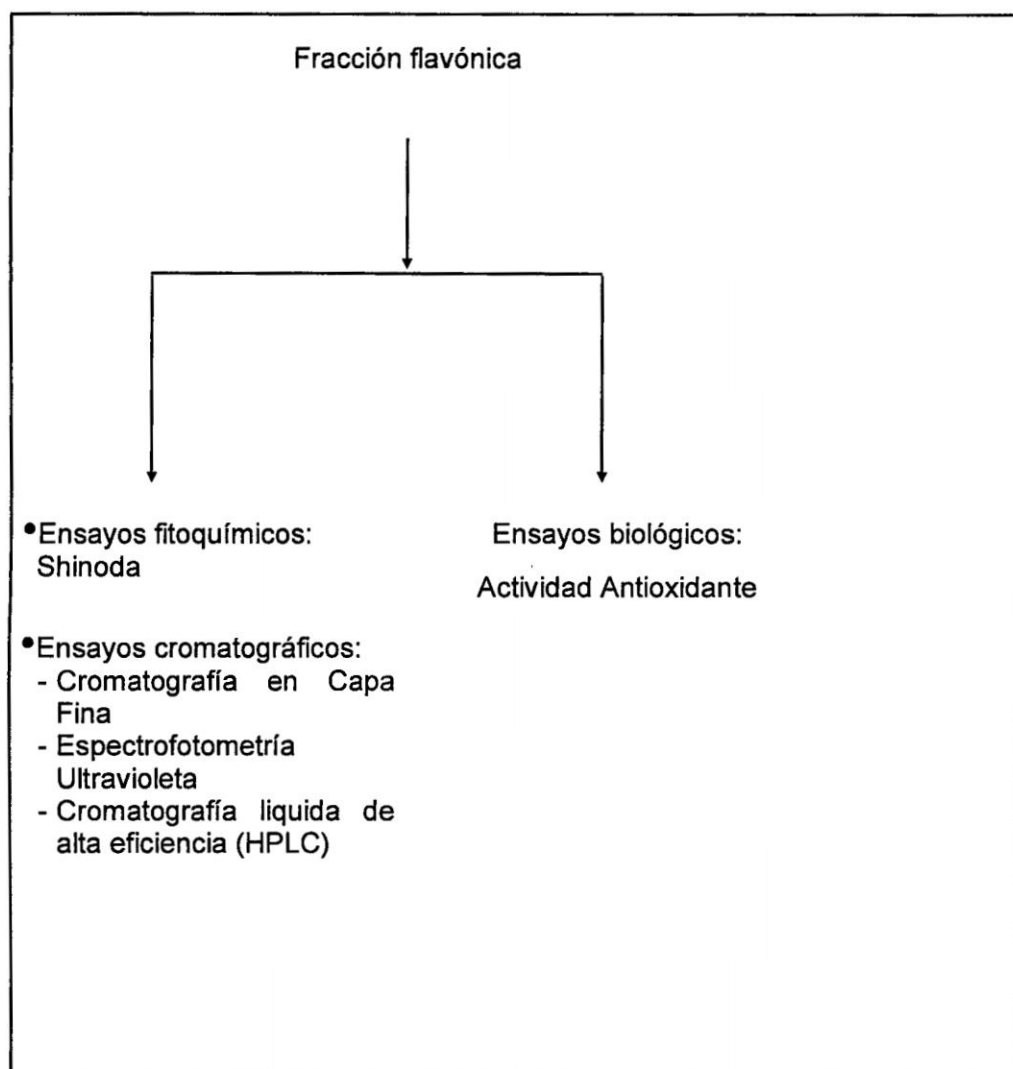


Figura 9. Esquema de pruebas fitoquímicas, cromatográficas y biológicas de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho – 2012.

Anexo 5



Figura 10. Recolección de la muestra de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho – 2012.

Anexo 6



Figura 11. Equipo de evaporador rotatorio BUCHI 3000. Ayacucho - 2012.

Anexo 7

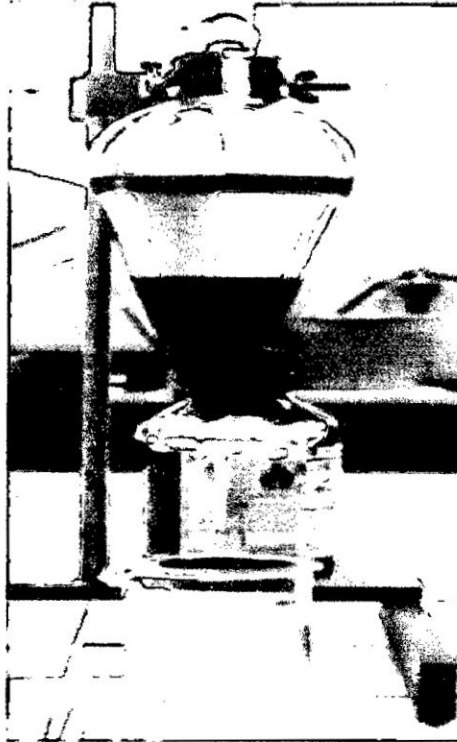


Figura 12. Extracción líquido - líquido del extrato etanólico de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Anexo 8

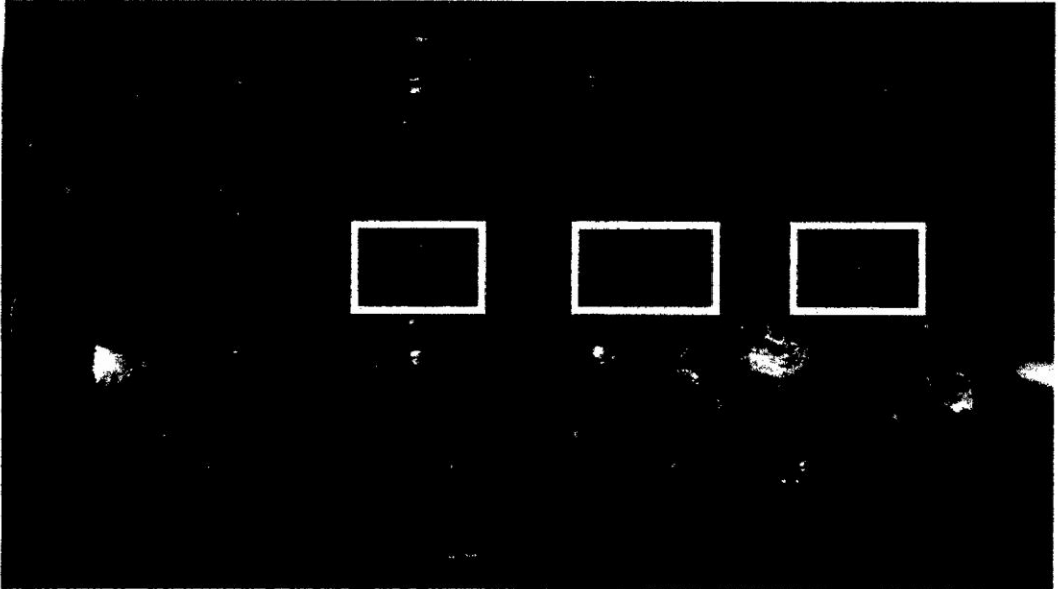


Figura 13. Placa de toques con la prueba de Shinoda. Fracción flavónica (A), quercetina (B) y rutina (C) de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pachata". Ayacucho - 2012.

Anexo 9

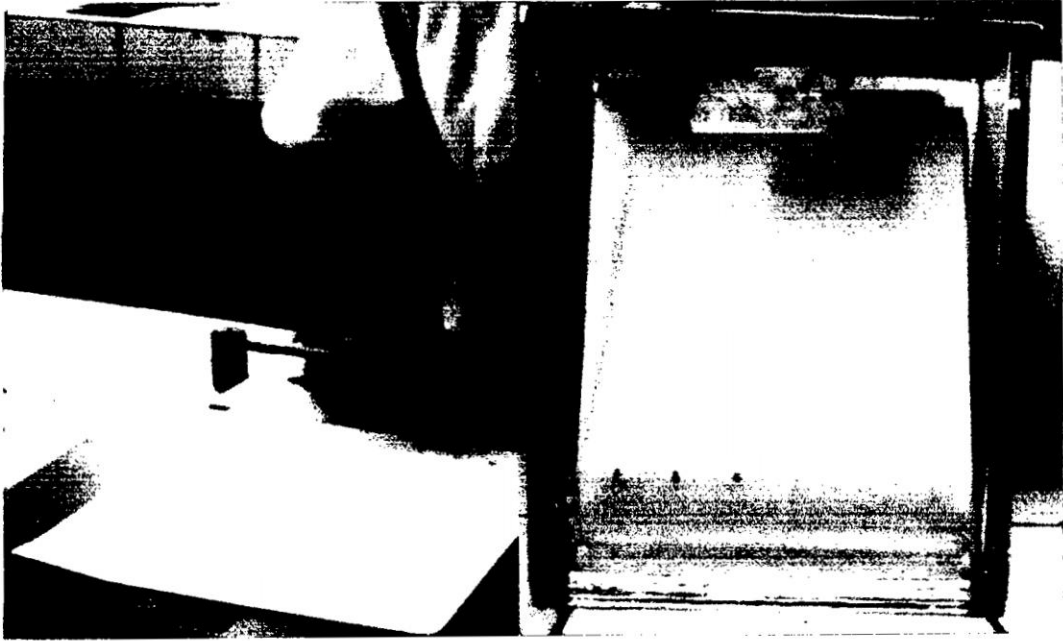


Figura 14. Sembrado y desarrollo de la cromatografía de capa fina de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Anexo 10

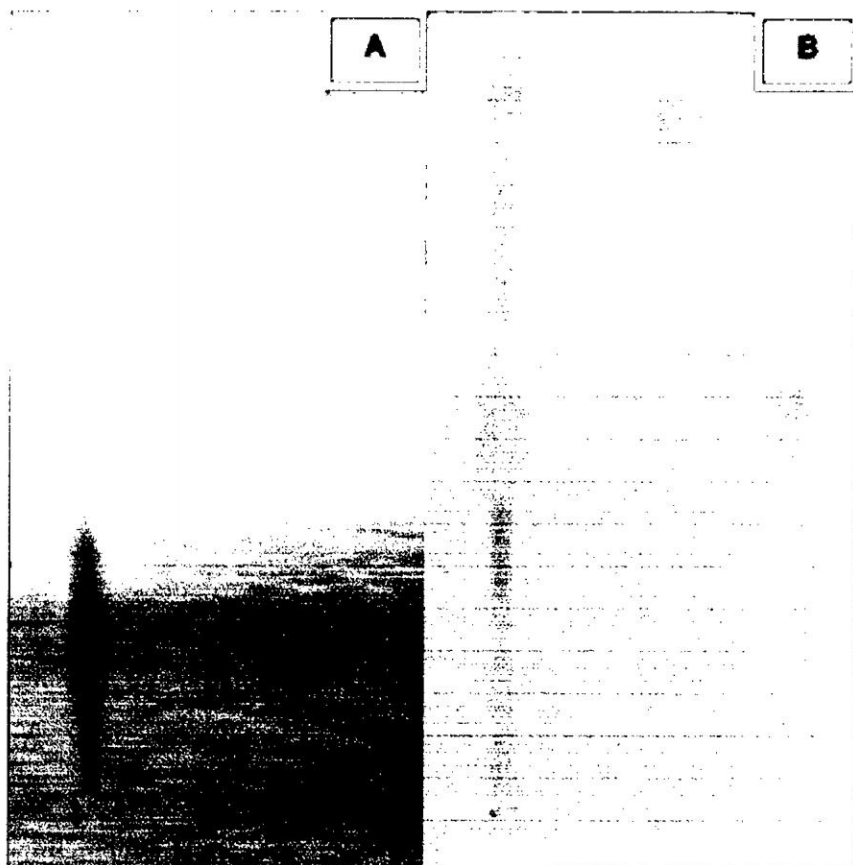
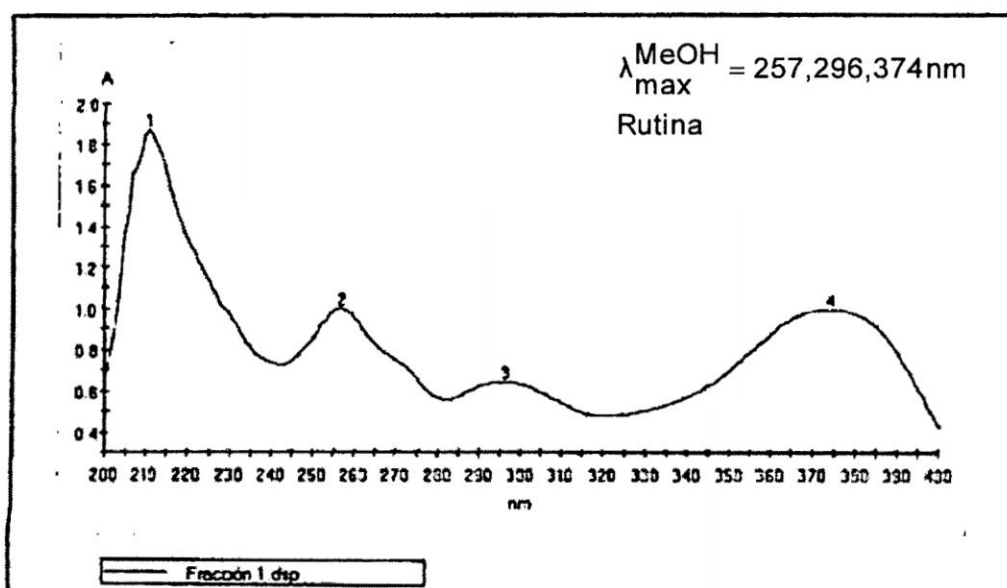


Figura 15. Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica; Vapores de NH_3 (A), Luz Ultravioleta 366 nm (B). Fracción flavónica (I), Quercetina (II) y Rutina (III) de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho-2012.

Anexo 11

Spectrum: Fracción 1.dsp
Description:
Operator: user/FARMACOGNOSIA
Created: 12/07/2012 12:57:24 p.m.
Spectrophotometer: GENESYS 6
Serial number: 2M6K070001
Firmware: 1.200



Fracción 1.dsp

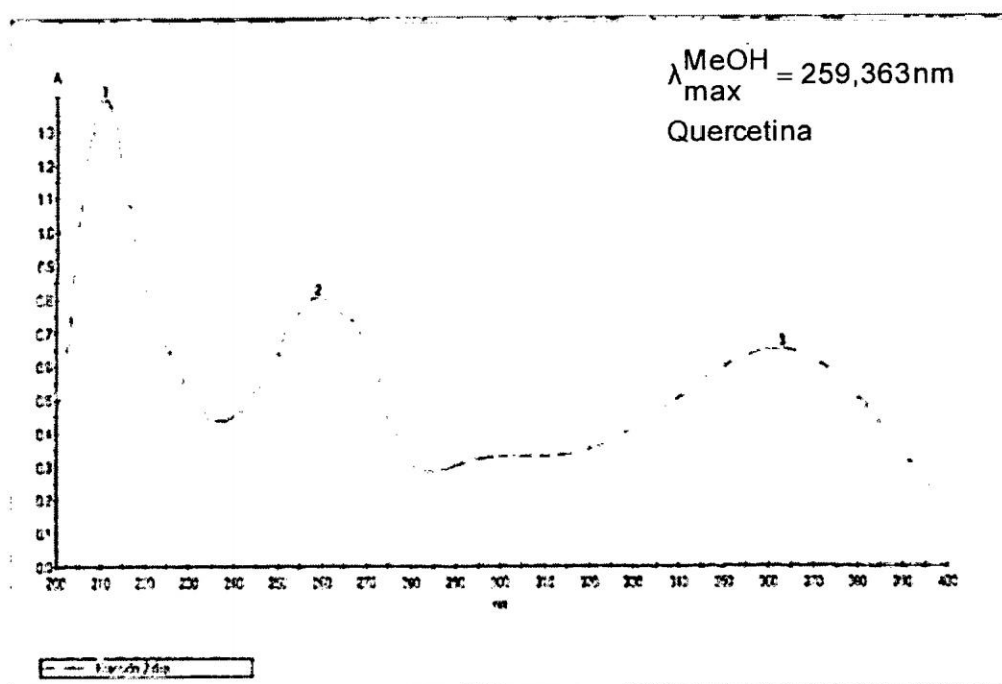
Máxima Threshold: 0,01 A

1 211nm; 1,871 A 2 257nm; 1,001 A 3 296nm; 0,643 A

4 374 nm 0,994 A

Figura 16. Curva espectral de la fracción aislado 1 de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Anexo 12



Fracción 2.dsp

Máxima Threshold: 0,01 A

1 211nm; 1,393 A 2 259nm; 0,803 A 3 363nm; 0,650 A

Figura 17. Curva espectral de la fracción aislado 2 de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Anexo 13

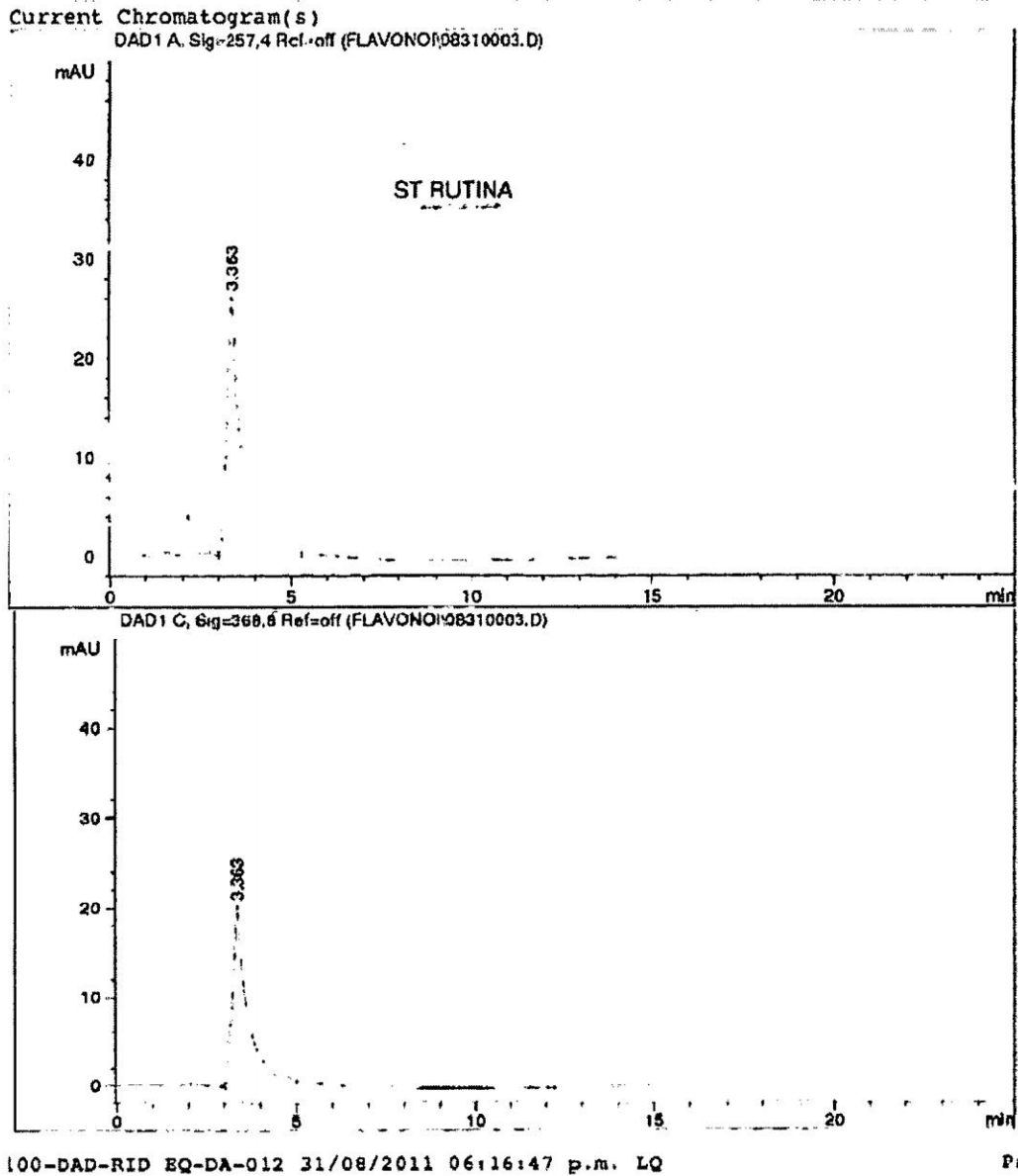


Figura 18. Cromatograma del estándar rutina determinado a 257,4 nm y 368,8 nm mediante un sistema de HPLC. Ayacucho - 2012.

Anexo 14

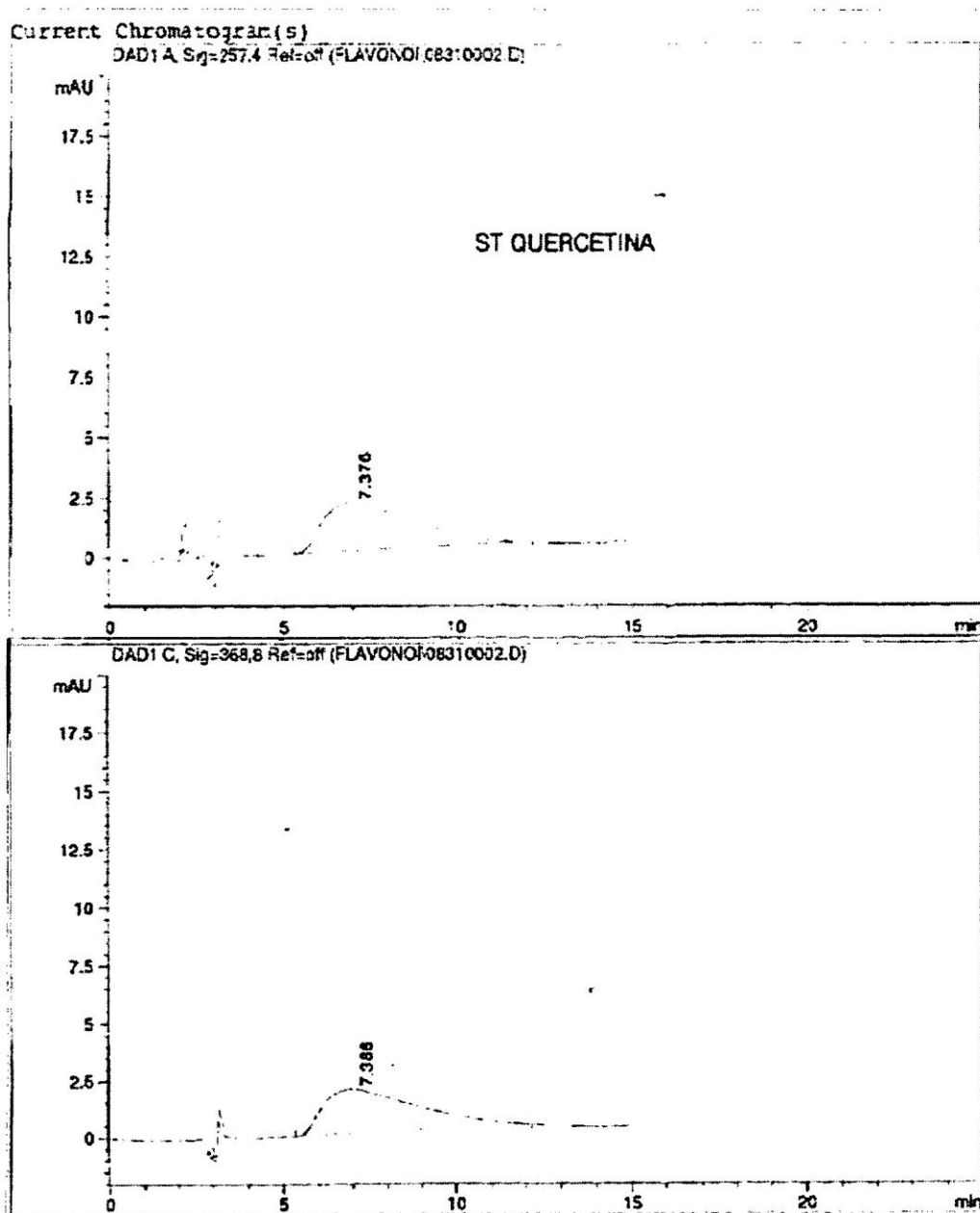


Figura 19. Cromatograma del estándar quercetina determinado a 257,4 nm y 368,8 nm mediante un sistema de HPLC. Ayacucho - 2012.

Anexo 15

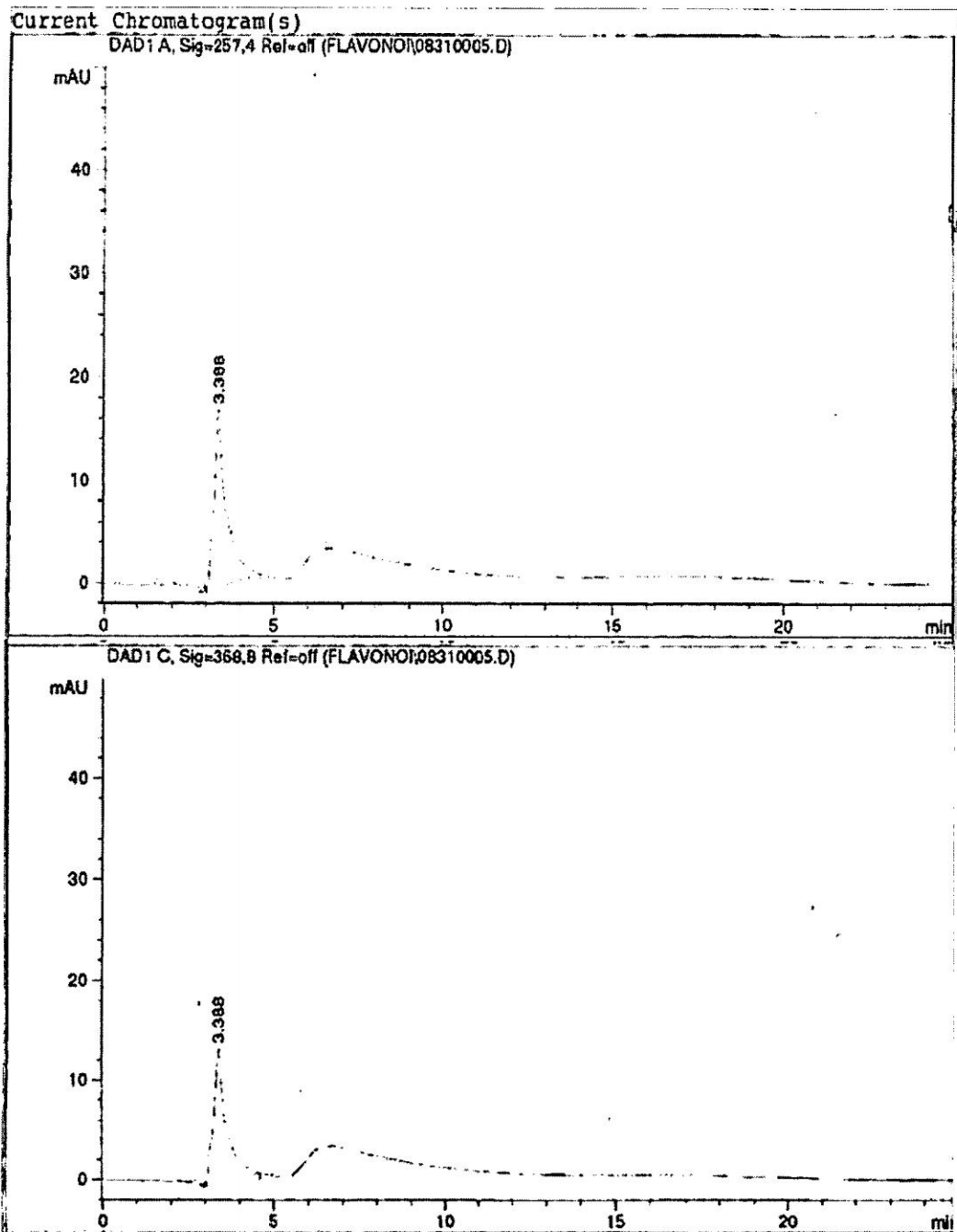


Figura 20. Cromatograma de la fracción aislado 1 y fracción aislado 2 determinados a 257,4 nm y 368,8 nm mediante un sistema de HPLC de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Anexo 16

Tabla 6. Porcentaje de captación del radical libre DPPH de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Fracción flavónica de <i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara".				Controles								
µg/mL				Vitamina C			Quercetina			Rutina		
	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	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml
Repeticiones												
1	96,52	94,71	94,43	98,21	96,89	96,10	98,28	98,11	96,17	98,72	96,70	94,41
2	96,15	94,52	94,32	98,37	96,52	96,32	98,37	96,50	95,79	98,17	96,34	94,54
3	97,25	94,80	94,17	98,53	97,62	96,15	97,25	96,37	94,69	98,35	95,70	94,69
Promedio ± DE	96,64±0,56	94,68±0,14	94,31±0,13	98,37±0,16	97,01±0,56	96,19±0,12	97,97±0,62	96,99±0,97	95,55±0,77	98,41±0,28	96,25±0,51	94,55±0,14

Anexo 17

Tabla 7. Análisis de varianza del porcentaje de captación del radical libre DPPH de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho – 2012.

Variable dependiente:		Captación del Radical Libre DPPH (%)				
Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	Hipótesis	334 610,187	1	334 610,187	15 113,338	0,000
	Error	44,280	2	22,140 ^a		
Grupos	Hipótesis	20,123	3	6,708	10,489	0,008
	Error	3,837	6	0,639 ^b		
Concentración	Hipótesis	44,280	2	22,140	34,623	0,001
	Error	3,837	6	0,639 ^b		
Grupos *	Hipótesis	3,837	6	0,639	2,579	0,045
Concentración	Error	5,950	24	0,248 ^c		

a. MS (Concentración)

b. MS (Grupos * Concentración)

c. MS (Error)

Anexo 18

Tabla 8. Matriz de Consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Actividad antioxidante de los flavonoides aislados de la raíz de <i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara". Ayacucho – 2012.	¿Tendrá actividad antioxidante los flavonoides aislados de la raíz de <i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara"?	<p>Objetivo General:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Evaluarla actividad antioxidante de los flavonoides aislados de la raíz de <i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara". <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Identificar los flavonoides mediante pruebas cromatografías por capa fina, espectrofotometría ultravioleta y HPLC de las raíz de <i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara". •Determinar la concentración que presenta mayor actividad antioxidante de los flavonoides aislados. •Relacionar la estructura química de los flavonoides con la actividad antioxidante. 	<p><i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara", es usada para resolver problemas de úlceras y gastritis, para la tos, como antiespasmódico y para la cicatrización de heridas estomacales (De la Cruz, 2006). Los flavonoides son metabolitos secundarios de los vegetales de origen biosintético mixto: el anillo A proviene de la ruta de la malonil coenzima A y el anillo B y la cadena C3 provienen de la ruta del ácido shikímico. Son fenoles de tipo diaril-propano (Ar-C3-Ar) unidos, la mayoría, a una cadena de azúcar; están constituidos por un anillo bencénico condensado a una y-pirona (o sus derivados) sustituida en posición 2 (3) por un radical fenilo. Sus propiedades biológicas están relacionadas con su Relación Estructura-Actividad biológica (REA), es así que la actividad antioxidante aumenta con el número de hidroxilos sustituidos. Esto hace que flavonas y sobre todo flavonoles se muestren como más activos. Algunos flavonoles, flavonas y biflavonas ejercen efecto antitumoral (Villar del Fresno, 1999).</p>	<p>Los flavonoides aislados de las raíces de <i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara" tienen actividad antioxidante.</p>	<p>Variable independiente: Los flavonoides aislados de las raíces de <i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara".</p> <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Flavonoides para la actividad antioxidante: 100 ug/ml • Flavonoides para la actividad antioxidante: 50 ug/ml • Flavonoides para la actividad antioxidante: 10 ug/ml. <p>Variable dependiente: Actividad antioxidante</p> <p>Indicadores: Actividad antioxidante: Porcentaje (%) de captación de radicales libres.</p>	<p>Tipo: Descriptivo</p> <p>Nivel: Analítico</p> <p>Población: <i>Hypseocharis bilobata</i> Killip "pacha tara" que crece en el centro poblado de Mayupampa, distrito de Chiara departamento de Ayacucho.</p> <p>Muestra: 2 Kg de raíces.</p> <p>Unidad experimental: Los flavonoides serán aislados y su estructura química elucidada según la metodología descrita por Aguilar (2010) y Yuangang Zu (2005).</p>

Actividad antioxidante de los flavonoides aislados de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara”. Ayacucho - 2012.

Luz Pilar Palomino Noa¹, Enrique Aguilar²

¹ Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

² Laboratorio Farmacognosia. Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

Los radicales libres, producidos normalmente durante el metabolismo aerobio se utilizan en diversos procesos fisiológicos como un mecanismo de defensa contra agentes infecciosos. Sin embargo, estas moléculas son altamente reactivas, capaces de dañar a las diversas biomoléculas de nuestras células. En este sentido, el presente trabajo de investigación básico descriptivo se realizó con el objetivo de determinar la actividad antioxidante de los flavonoides aislados de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara”, desarrollado en los laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en el laboratorio de Control de Calidad de Laboratorios Farminindustria (LF) de la ciudad de Lima durante los meses de enero a junio del 2012. Las raíces fueron recolectadas en el centro poblado de Mayupampa, distrito de Chiara del departamento de Ayacucho, durante los meses de enero y febrero en estado de floración y en buen estado de conservación. La actividad antioxidante se determinó mediante la captación del radical libre DPPH (1,1 difenil- 2 picrilhidrazilo). Se logró aislar e identificar los flavonoides quercetina y rutina mediante cromatografía en capa fina, espectro ultravioleta y corroborado por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), siendo la quercetina la más importante; con tiempos de retención de 6,679 min y 3,388 min que se asemejan a los valores de los estándares de quercetina y rutina de 7,376 min y 3,363 min., respectivamente. En todos los casos los flavonoides contenidos en la fracción flavónica demostraron actividad antioxidante de 96,64%; 94,68% y 94,31% dependiente de la concentración, a mayor concentración, mayor actividad antioxidante a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml respectivamente, similares a la vitamina C, quercetina y rutina, mostrando diferencias entre el grupo de tratamiento y la concentración ($p < 0,05$). Se concluye que las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip “pacha tara”, tienen actividad antioxidante superior al 90%, siendo la concentración de 100 µg/ml con mayor actividad antioxidante.

Palabras clave: actividad antioxidante, flavonoides, *Hypseocharis bilobata* Killip.

ABSTRACT

Free radicals, often produced during the aerobic metabolism are used in various physiological processes such as a defense mechanism against infectious agents. However, these molecules are highly reactive, can damage the various biomolecules of our cells. In this sense, this paper basic descriptive research was conducted in order to determine the antioxidant activity of flavonoids isolated from the roots of *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", developed in the laboratories of the Department of Pharmacy, Faculty of Science Biology of the National University of San Cristobal de Huamanga and laboratory Quality Control Farminindustria Laboratories (LF) of the city of Lima during the months of January to June 2012. Roots were harvested in the town center Mayupampa, Chiara district department of Ayacucho, in the months of January and February in bloom stage and in good condition. The antioxidant activity was determined by the uptake of the free radical DPPH (1,1-diphenyl- 2 picrilhidrazilo). It was possible to isolate and identify the flavonoids quercetin and rutin by thin layer chromatography, ultraviolet spectrum and corroborated by high efficiency liquid chromatography (HPLC), being the most important quercetin; retention times of 6,679 min and 3,388 min resembling values quercetin standards and routine 7,376 min and 3,363 min. respectively. In all cases the flavonoids contained in the flavonic fraction showed antioxidant activity of 96.64%; 94.68% and 94.31% depending on the concentration, the higher the concentration, the higher antioxidant activity at concentrations of 100 ug/ml, 50 ug/ml and 10ug/ml, respectively, similar to vitamin C, quercetin and rutin, showing differences between the treatment group and concentration ($p < 0.05$). We conclude that the roots of *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", have over 90% antioxidant activity, the concentration of 100 ug / ml with the highest antioxidant activity.

Key words: antioxidant activity, flavonoids, *Hypseocharis bilobata* Killip.

INTRODUCCIÓN

En nuestros días aumenta el número de enfermedades en cuya etiología estaría involucrado el estrés oxidativo, producido por el ataque oxidativo de los radicales libres que superan las defensas antioxidantes del cuerpo.

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). Dichas especies reactivas (ER) provocan daño oxidativo a las macromoléculas, que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes endógenos. Todo esto induce a que se presenten diversas enfermedades, como diabetes, alzheimer, aterosclerosis, procesos inflamatorios, parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, entre otros¹.

En este sentido, numerosas investigaciones han demostrado los efectos antioxidantes de compuestos fitoquímicos. Estos incluyen entre otros, a los flavonoides que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante².

Hypseocharis bilobata Killip "pacha tara" es una especie herbácea nativa que crece de manera silvestre en las zonas alto andinas, y es utilizada tradicionalmente como cicatrizante de heridas y para el alivio de úlceras y gastritis, entre otros usos, por su contenido en taninos y fenoles, flavonoides, entre otros; además de poseer otras actividades también importantes como antitusivas, antiespasmódicas^{3,4,5}.

Siendo *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", una especie utilizada en nuestra región y conociéndose la presencia de flavonoides, en el presente trabajo de investigación básico descriptivo se ha propuesto aislarlos mediante técnicas cromatográficas, proponer su estructura química, utilizando técnicas espectrales ultravioleta, corroborando con la cromatografía líquida de alta eficiencia

(HPLC) y determinar la actividad antioxidante de la fracción flavónica por medio de las ensayo del radical libre DPPH, relacionándolo con su estructura química.

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

Objetivo general

- Evaluar la actividad antioxidante de los flavonoides aislados de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara".

Objetivos específicos

- Identificar los flavonoides mediante pruebas cromatografías por capa fina, espectrofotometría ultravioleta y HPLC de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara".
- Determinar la concentración que presenta mayor actividad antioxidante de los flavonoides aislados.
- Relacionar la estructura química de los flavonoides con la actividad antioxidante.

MATERIAL Y MÉTODO

Población.

Raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" del centro poblado de Mayupampa, distrito de Chiara, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho ubicada a 3,500 a 3,800 msnm; durante los meses de enero y febrero en estado de floración.

Muestra.

La muestra estuvo constituida por dos kilogramos de raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" recolectadas por conveniencia. Una parte de la muestra fue utilizada para la identificación botánica por la Blga. Laura Aucasime del *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas.

DISEÑO METODOLÓGICO

1. Técnica de Extracción de Flavonoides

Se pesó aproximadamente 500 g para realizar la extracción hidroalcohólica con tres litros de etanol al 80%, en frascos de color ámbar por una semana, durante el proceso se agitó el frasco periódicamente para que el alcohol se

distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se filtró y se volvió a macerar la muestra con tres litros de etanol al 80% y se dejó por otra semana (realizando una doble extracción), se filtró y reunió los filtrados, obteniendo así la solución hidroalcohólica total; seguidamente se procedió a concentrar el extracto en un evaporador rotatorio BUCHI 3000.

El extracto seco fue resuspendido en agua destilada, desengrasando con éter de petróleo utilizando un embudo de separación, luego se realizó la extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Los flavonoides se concentran en la fracción de acetato de etilo (fracción flavónica), el mismo que fue evidenciado con la prueba de Shinoda⁶.

2. Aislamiento de Flavonoides

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se realizó la siembra de la fracción flavónica según las siguientes condiciones:

Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)

Fase Móvil: Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)

Volumen de inyección: 25 µL

Revelador: Vapores de amoníaco y luz Ultravioleta (UV).

Luego del revelado de la placa cromatográfica, ésta se llevó a calentar en una estufa a 110°C por 10 min, posteriormente se evaluó las placas al visible y en la cámara UV a 366 nm⁷.

Con la fracción flavónica se realizó una cromatografía en capa fina en una placa cromatográfica de 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck) y como sistema de solvente butanol: ácido acético: agua (BAW) en las proporciones de (4:1:5). La siembra se realizó en banda con el propósito de aislar los flavonoides, siendo localizados con la ayuda de la luz ultravioleta. Cada una de las bandas fue recuperada, disuelta en metanol y filtrada; obteniéndose 02 bandas de la fracción flavónica denominadas fracción aislada 1 y fracción aislada 2. Cada fracción fue resuelta por HPLC⁸.

3. Pruebas Cromatográficas

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Para el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), las muestras utilizadas fueron, las fracciones obtenidas en el procedimiento anterior y los estándares de quercetina y rutina. Se realizó una inyección de cada una de las fracciones, teniendo en cuenta las siguientes condiciones:

Sistema Cromatográfico:

Equipo: HPLC, Merck Hitachi - Lachrom Elite
Columna: Prontosil Hypersorb ODS 250 mm x 4,6mm (5µm). DL 164

Flujo: 1 ml/min

Longitud de onda: 257nm, 279 nm, 368nm.

Volumen de Inyección: 5 µL

Temperatura: 30°C

Fase Móvil: Metanol: Acetonitrilo : Agua (40:15:45)

Se filtró la fase móvil por membrana de nylon de 0,45 µm y se trasvasó a un frasco apropiado. Se registraron los cromatogramas e identificaron los picos por comparación con los cromatogramas de los estándares según los tiempos de retención⁹.

4. Pruebas espectrales

Las dos bandas obtenidas en el procedimiento anterior fueron removidas y eluidas con metanol, y leídas en un Espectrofotómetro Ultravioleta Génesis 6 en el rango de 200 a 400 nm, en celda de cuarzo de un cm y teniendo como blanco el metanol, registrándose los máximos picos de absorción, para su interpretación se utilizó el reporte de Mabry *et al*¹⁰.

5. Determinación de la Actividad Antioxidante

Método: Actividad Secuestradora del Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)¹¹.

Fundamento:

Para determinar la capacidad antioxidante se emplea al radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), el cual por su estabilidad, es destruido solamente por antioxidantes, de tal manera que el mejor compuesto destructor del DPPH será el mejor antioxidante.

La técnica empleando el DPPH que tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, se basa en la desaparición de dicho color hacia el amarillo pálido por la reacción de la sustancia antioxidante, pudiendo cuantificarse la reacción espectrofotométricamente a 515 nm por diferencia de absorbancias, con lo que se determina el porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Procedimiento:

1. Se preparó 100 ml de una solución de DPPH en metanol de 20 mg/l.
2. Luego se preparó una solución metanólica de la fracción flavónica de 300 µg/ml (solución A).
3. El blanco se preparó con metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.
4. El blanco de muestra se preparó con 0,75 ml de muestra (solución A) y 1,5 ml de metanol.
5. Se preparó el patrón de referencia (estándar) con 1,5 ml de DPPH y 0,75 ml de agua destilada.
6. Luego se procedió a preparar la muestra con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH, obteniéndose una concentración final de 100 µg/ml, dejándose por 5 min y se leyó a 515 nm en el espectrofotómetro.
7. Se midió la absorbancia del patrón de referencia y del blanco de la muestra.
8. Luego se diluyó la solución A con metanol en una proporción 1:2 (solución B) para obtener una concentración final de 50 µg/ml, y en una proporción de 1:10 (solución C) para obtener una concentración final de 1 µg/ml.
9. Con las soluciones B y C se procedió igual a los puntos 6 y 7.
10. Se siguió el mismo procedimiento para determinar la actividad secuestradora de la vitamina C (Merk), quercetina (Merk) y rutina (Merk).

Cálculos:

$$\%AA = 100 - \frac{(A_m - A_b)}{A_c} \times 100$$

Dónde:

- Ac : Absorbancia del control DPPH
Am: Absorbancia de la muestra
Ab: Absorbancia del blanco de la muestra
AA: Actividad Antioxidante

6. Análisis de Datos

Los resultados de la actividad antioxidante fueron organizados en tablas y una matriz para calcular la media y la desviación estándar. La significancia estadística fue determinado mediante el

Análisis de Varianza (ANOVA) a una nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Tabla 2. Características cromatográficas de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho-2012.

Fracciones	Rf	Visualización visible	Fluorescencia al ultravioleta (366 nm)	
			SinNH ₃	Con NH ₃
Fracción flavónica	0,855	Amarillo limón	púrpura	Se intensifica la coloración
	0,630	Amarillo limón	púrpura	Se intensifica la coloración
Quercetina	0,861	Amarillo limón	púrpura	Se intensifica la coloración
Rutina	0,636	Amarillo limón	púrpura	Se intensifica la coloración

Tabla 3. Características espectrales en el espectro ultravioleta visible de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Fracciones	Sub-fracciones	Longitud de onda de máxima absorbancia (nm)	
		Banda II	Banda I
Fracción flavónica	Fracción aislado 1	257, 296	374
	Fracción aislado 2	259	363

Tabla 4. Tiempos de retención de las fracciones flavónicas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". Ayacucho - 2012.

Fracciones	Tiempo de Retención (min)	
	257,4 nm	368,8 nm
Fracción aislado 1	6,679	6,664
Fracción aislado 2	3,388	3,388
Quercetina	7,376	7,386
Rutina	3,363	3,363

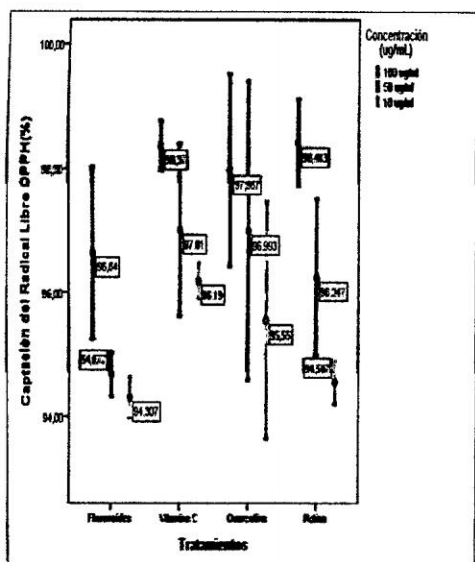


Figura 6. Porcentaje de captación del radical libre DPPH de la fracción flavónica de las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" según vitamina C y los estándares de quercetina y rutina. Ayacucho - 2012.

DISCUSIÓN

Con la finalidad de aislar los flavonoides objeto del presente estudio, se procedió a realizar una extracción líquido-líquido del extracto etanólico, primero con éter de petróleo, para eliminar las grasas, pigmentos y otros metabolitos, después se extrajo con acetato de etilo para extraer los flavonoides, quedando como residuo la fase acuosa. Se verificó la presencia de flavonoides con la reacción de Shinoda, resultando positivo para la fracción flavónica, y ligeramente en la fracción acuosa, por lo que podemos asumir que el mayor contenido de flavonoides se encuentra en esta fracción.

Mediante ensayos cromatográficos preliminares, se confirmó la presencia de flavonoides observándose manchas con luz ultravioleta a 366 nm. Los flavonoides detectados en la fracción flavónica fueron aislados y purificados mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa, las manchas caracterizadas fueron recuperados del silicagel con metanol, lográndose aislar 02 fracciones. Cada fracción fue resuelta por HPLC. Las estructuras químicas de las fracciones aisladas por la cromatografía fueron elucidadas

mediante correlaciones químicas con los datos obtenidos por espectro ultravioleta visible en metanol y por comparación con espectros dados en la literatura por Mabry *et al*¹⁰ sugiriéndose la estructura de los flavonoides.

Los flavonoides corresponden a compuestos fenólicos con probable estructura flavónica. Las flavononas, flavonas y flavonoles dan coloraciones rojas a rosadas con la prueba de Shinoda y el color amarillo intenso que forman cuando se adiciona amoniaco, son pruebas características para identificar a los flavonoides⁷.

En este sentido, en la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica se muestran la presencia de 02 manchas cuando se observa a la luz ultravioleta, utilizándose como patrón de comparación a los flavonoides estándar de rutina y quercetina. La superior de color púrpura con un Rf de 0,855 y la segunda de color púrpura con Rf de 0,630 semejantes a los estándares de quercetina y rutina que presentan un Rf de 0,861 y 0,636 respectivamente, por lo tanto, se deduce que se trata de dos compuestos diferentes.

Según Lock de Ugaz⁷ la detección de los flavonoides por cromatografía de papel y capa delgada pueden hacerse por el color que desarrollan en UV, apareciendo como manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otras, las cuales se intensifican o cambian de color luego de su exposición a vapores de amoniaco, la cual se pudo apreciar en el presente trabajo (Tabla 2).

El análisis de las fracciones aisladas se realizó por espectrofotometría UV visible (Tabla 3), logrando separar dos componentes: La primera (fracción aislada 1) con una fluorescencia púrpura intensa que corresponde al compuesto con una Relación de Frente (Rf) de 0,855, mostrando absorbancias máximas al ultravioleta a 257, 296, 374 nm, la segunda (fracción aislado 2) con una fluorescencia de color púrpura intensa que corresponde al compuesto con un Rf de 0,630 mostrando absorbancias máximas a 259, 363 nm. Con estos datos se puede asumir que el compuesto de la fracción aislado 1 corresponde a un derivado de la rutina y la fracción aislado 2 corresponde a un derivado de la quercetina, siendo la quercetina la más importante ya que se encuentra en mayor proporción (como es demostrado por la mancha púrpura intensa cuando es revelado con vapores de amoniaco en presencia de luz ultravioleta).

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste en dos máximos de absorción en los rangos de 240 – 285 nm (banda II, BII) y 300 – 550 nm (banda I, BI). Podría indicarse como característica que en dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavonas la banda I es de baja intensidad (más baja de la banda II)⁷.

Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamofilo, y la banda II, entre 250-280nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzofilo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas se muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-OH-sustituidos en 330-360 nm y los flavonoles en 350-385 nm^{7,10}. Espectrofotométricamente observamos que la fracción aislado 1 muestra una longitud de onda: 257, 296 y 374 nm y la fracción aislado 2 muestra una longitud de onda: 259 y 363 nm, lo cual se puede atribuir en ambos casos que se trata de un flavonol (Tabla 3).

Para el análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) a 257,4 y 368,8 nm (Tabla 4), se realizó la corrida cromatográfica de las dos fracciones. Las fracciones aisladas 1 y 2 muestran tiempos de retención de 3,388 y 6,679 min, respectivamente y son semejantes a los tiempos de retención de los estándares de quercetina (7,376 min) y rutina (3,363 min).

Con los cromatogramas obtenidos de los componentes a 257,4 nm y 368,8 nm se puede asumir que la longitud de onda óptima para su lectura es la de 257,4 nm, ya que a esta longitud de onda se puede observar cromatogramas con áreas superiores y significativos.

Zu Y *et al*⁹ realizaron la determinación simultánea por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) de flavonoides y otros compuestos fenólicos del extracto de espino amarillo de *Hippophae rhamnoides L.* reportando la presencia de catequina, rutina, quercetina y kaempferol, detectados en la longitud de onda de 279 nm para la catequina, 257

nm para el rutina, 368 nm para quercetina, kaempferol, con tiempos de retención de 3,8; 5,2; 7,3; 10,9 min respectivamente, los cuales son similares a los reportados en el presente trabajo, por lo tanto, se asume que los flavonoides aislados en el presente trabajo corresponden a la quercetina y rutina respectivamente.

Los flavonoides aislados demostraron tener actividad antioxidante al captar el radical libre DPPH tal como se muestra en la Figura 6. Las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml tuvieron una actividad antioxidante superior al 90%, mientras que la vitamina C a las mismas concentraciones tuvo una actividad secuestradora del radical libre DPPH ligeramente superior y los flavonoides estándar rutina y quercetina fueron ligeramente superiores a los flavonoides aislados de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara". El análisis estadístico demostró que existen diferencias estadísticas entre la actividad antioxidante de los flavonoides de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", la vitamina C, la rutina y quercetina tanto por grupo de tratamiento y concentración.

En todos los casos los flavonoides contenidos en la fracción flavónica, mostraron actividad antioxidante dependiente de la concentración, a mayor concentración, mayor actividad antioxidante, pero mostraron ligeras diferencias cuando se compara con la vitamina C, los flavonoides estándar quercetina y rutina, tal como se muestra en sus respectivas pruebas estadísticas, donde existe significancia en las concentraciones ensayadas.

Jayo C¹², realizó un estudio comparativo de la actividad antioxidante del extracto metanólico de cuatro cultivares de *Oxalis tuberosa* Mol. "oca" sobre el DPPH, obteniendo como resultado una actividad antioxidante 92.72% del cultivar rosado al estado crudo, seguido del amarillo (77,68%), jaspeado (69,26%) y violáceo (61,38%); y al estado de cocción el violáceo presentó mayor actividad (68.96%) seguido del jaspeado (67,22%), rosado (57,14%) y amarillo (41,71%). No se encontró diferencias estadísticamente significativas en cuanto al cultivo y al efecto de la cocción, concluyéndose que los cuatro cultivares evaluados tienen actividad antioxidante y no son influenciados por el tipo de cultivar y el efecto de la cocción. Estos resultados son ligeramente inferiores a los obtenidos en la presente investigación.

Aguilar E¹³, demostró la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de

las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña", caracterizando a los flavonoides como apigenina y la naringenina, siendo la apigenina el flavonoide más importante. Se obtuvo como resultado una actividad antioxidante superior al 90% en las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, mientras que la vitamina C a las mismas concentraciones tuvo una actividad secuestradora del radical libre DPPH ligeramente superior y el flavonoide estándar rutina fue ligeramente inferior a los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix*. Estos resultados son similares a los obtenidos en la presente investigación.

Por lo tanto las raíces de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara", tienen actividad antioxidante superior al 90%. Siendo la concentración de 100 µg/ml con mejor actividad antioxidante.

CONCLUSIÓN

1. Los flavonoides aislados de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" presentaron actividad antioxidante a las concentraciones de 100 µg/ml fue 96,64%, 50 µg/ml fue 94,68% y a 10 µg/ml fue 94,31% respectivamente ($p < 0,05$).
2. Se identificaron los flavonoides por cromatografía en capa fina, espectroscopia ultravioleta y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) caracterizados como quercetina ($R_f = 0,855$) y rutina ($R_f = 0,630$), con tiempos de retención de 6,679 min y 3,388 min, similares a los obtenidos de los estándares de quercetina (7,376 min.) y rutina (3,363 min.) respectivamente.
3. Se logró determinar la concentración óptima de los flavonoides, siendo la concentración de 100 µg/ml la que demostró mayor actividad antioxidante.
4. Los flavonoides aislados presentaron actividad antioxidante por ser agliconas muy hidroxiladas, siendo la quercetina el flavonoide que reúne mejor actividad antioxidante.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ramos IM, Batista GC, Gómez MB, Zamora PA. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. Rev. Investigación en Salud. [revista en internet] Abril 2006. [acceso en Junio 2012]; 7(1): 7-15. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invsal/isg-2006/isg061b.pdf>
2. Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. [revista en internet] Agosto 2002. [acceso en Julio 2012]; 17(6):271-278. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
3. De la Cruz J, Aucasime L, Ramírez A. Plantas medicinales alto andinas de la zonas de Ayacucho – Huancavelica. Ayacucho: Fondo Editorial PERÚ LNG; 2006.
4. Ayala AR. Actividad antiulcerosa del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Hypseocharis bilobata* Killip "pacha tara" [Tesis de pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 2010.
5. Romero M. Estudio botánico, fenológico, fitoquímico y farmacológico de la pacha tara [Instituto de Investigación]. Ayacucho: Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH; 1994.
6. Villar de Fresno M. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España.1999.
7. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de los productos naturales. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
8. Toso RE, Skliar MI. Aislamiento, Identificación y Cuantificación de Compuestos con Actividad Gastroprotectora presentes en *Centaurea solstitialis*. Rev. Cient. Vet. U.N.L. Pam. [revista en internet] 2002. [acceso en Noviembre de 2012]; 5:17-27. Disponible en: <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n04a03toso.pdf>
9. Zu Y, Li C, Fu Y, Zhao C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [revista en internet] Abril 2006. [acceso Febrero de 2013]; 41:714-719. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520013>

10. Mabry T, Markham K, Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin; 1970.
11. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico [revista en internet] Julio 2008. [acceso Febrero de 2013]; 8(1). Disponible en: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_I/Art4_Vol8_N1.pdf.
12. Jayo C. Estudio comparativo de la actividad antioxidante del extracto metanólico de cuatro cultivares de *Oxalis tuberosa* Mol. "oca" [Tesis de pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 1996.
13. Aguilar E. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epl. "wayra muña" [Informe de investigación]. Ayacucho: Instituto de investigación de Ciencias Biológicas. UNSCH; 2010.