

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL

DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA

Y BIOQUÍMICA



Actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña".

Ayacucho - 2012

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR:

Bach. LEÓN GÓMEZ, LISBETH

AYACUCHO - PERÚ

2012

DEDICATORIA

A mis padres Santiago y María, a
mis hermanos David y Yanet

A ustedes amigos, Cyndy, Yozely,
Ever, Nelson y Manfred,

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; forjador de excelentes profesionales al servicio de la sociedad y del país.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica y sus docentes quienes contribuyeron con mi formación académica.

A mis asesores Mg. Enrique AGUILAR FELICES y Q.F. Nelson BELLIDO ALIAGA, por compartir sus conocimientos y dedicadas orientaciones que hicieron posible el desarrollo y culminación de esta investigación.

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

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Aspectos botánicos	5
2.3. Radicales Libres	8
2.4. Antioxidantes	14
2.5. Compuestos Fenólicos	16
III. MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1. Lugar de Ejecución	20
3.2. Definición de la población y muestra	20
3.3. Diseño metodológico	21
3.3.1. Recolección de muestra	21
3.3.2. Técnicas de Extracción de ácidos fenólicos	21
3.3.3. Aislamiento de ácidos fenólicos	22
3.4. Pruebas espectrales	23
3.5. Pruebas cromatográficas	23
3.6. Determinación de la actividad antioxidante	24
3.7. Análisis de datos	26
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES	42
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	49

Actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja brevicalex* Epling "wayra muña". Ayacucho - 2012

Autora: Bach. LEÓN GÓMEZ, Lisbeth

Asesores: Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES

Q.F. Nelson BELLIDO ALIAGA

RESUMEN

El presente trabajo de investigación básico descriptivo se realizó con la finalidad de determinar la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja brevicalex* Epling "wayra muña" durante los meses de mayo a octubre 2012, en el Área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en el Laboratorio de Control de Calidad del Instituto Quimioterápico (IQFARMA) de la ciudad de Lima. La muestra fue colectada en el distrito de Quinua del departamento de Ayacucho, durante los meses de marzo y abril en estado de floración. El aislamiento de los ácidos fenólicos se realizó por cromatografía en capa fina, la identificación con técnicas espectrales y por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo de captación de los radicales libres DPPH. Se logró identificar al ácido cafeico, clorogénico, ferúlico y rosmarínico mediante espectros ultravioleta, infrarrojo y corroborado por la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), siendo el ácido rosmarínico el más importante. Los ácidos fenólicos demostraron tener capacidad antioxidante similar a la vitamina C, ácido ferúlico, cafeico y clorogénico, no hallándose diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$), pero sí a las concentraciones ensayadas ($p < 0,05$). Se concluye que el ácido rosmarínico es el principal ácido fenólico aislado, seguido del ferúlico, del clorogénico y trazas del ácido cafeico, quienes demostraron capacidad antioxidante dependiente de su concentración y de su estructura química.

Palabras clave: Antioxidante, Ácidos fenólicos, *Satureja brevicalex* Epling.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, se sabe que tanto por la radiación, así como por la ingesta de algún contaminante o incluso como consecuencia de nuestro metabolismo, surgen algunas moléculas que nos pueden provocar daño. A estas se les conoce como especies oxígeno reactivas (ROS), que se asocian a enfermedades como cáncer, problemas cardiacos o al natural envejecimiento humano. Entre los problemas que originan figuran: destrucción de paredes celulares, inactivación de enzimas, debilitamiento de la capacidad defensiva, alteración del sistema inmunológico e incluso daño del material genético (Neira y Yuri, 2004).

Cuando la defensa antioxidante, no es cien por ciento eficiente, incrementa la formación de radicales libres en el organismo; a esto se denomina estrés oxidativo. Se cree que muchos de los efectos colaterales de los medicamentos se relacionan con un aumento en el daño oxidativo, causado por el exceso de radicales libres, los que producirían daño celular. Ante el estrés oxidativo, el organismo debe responder con una defensa antioxidante extra, ya que el estrés oxidativo severo puede causar la muerte de la célula. En las frutas, las legumbres y algunos vegetales se encuentran muchas sustancias capaces de atrapar radicales libres, mejorando nuestra defensa antioxidante, reportándose

que son capaces de detener o prevenir el desarrollo de tumores y los efectos bioquímicos asociados con la progresión de los mismos; este potencial se atribuye, principalmente, a sus propiedades antioxidantes (Zavaleta y Col., 2005).

Los compuestos fenólicos son un grupo muy grande de metabolitos secundarios que provienen del metabolismo del ácido shikimico. Se caracterizan por ser polifenoles y hasta la fecha se conocen dos clases de ácidos fenólicos. Todos tienen en una u otra manera cierto interés biológico, sin embargo, los ácidos hidroxicinámicos tienen gran interés por sus propiedades antioxidantes ya que han demostrado ser fuertes atrapadores de radicales libres y al mismo tiempo son capaces de inhibir la formación de estos últimos al enlazarse con iones de metales de transición (Pallavi y Col., 2004).

Satureja brevicallix Epling, es una especie medicinal nativa de los andes sudamericanos ampliamente conocida por sus propiedades analgésicas y digestivas (Mostacero y Mejía, 2002) (Carhuapoma, 2002).

El interés por estudiar esta especie es iniciado por Soto (1999) quién evalúa su actividad analgésica y reporta por primera vez en su composición química la presencia de compuestos fenólicos. Sin embargo, hasta ahora ha despertado mayor interés más por sus propiedades aromáticas y el contenido de aceites esenciales, llegándose a determinar exactamente su composición, el porcentaje de cada uno de sus componentes y algunas propiedades biológicas (Carhuapoma, 2002).

Siendo *Satureja brevicallix* Epling, una especie ampliamente utilizada en nuestra región y conociéndose la presencia de los compuestos fenólicos, en el presente trabajo de investigación se ha propuesto aislarlos mediante técnicas

cromatográficas, proponer su estructura química, utilizando técnicas espectrales ultravioleta e infrarroja, corroborando con la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y determinar su actividad antioxidante, relacionándolo con su estructura química.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epling “wayra muña”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar los ácidos fenólicos de las hojas de *Satureja breviculix* Epling “wayra muña”.
- Realizar pruebas cromatografías por capa fina, espectrofotometría ultravioleta y HPLC para identificar los ácidos fenólicos de las hojas de *Satureja breviculix* Epling “wayra muña”.
- Relacionar la estructura química de los ácidos fenólicos con la actividad antioxidante.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Soto (1999), determinó la actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *S. brevicalyx* Epling en 400 mg/kg de peso aproximando tal actividad comparada a la del ácido acetilsalicílico, pero de menor actividad que el ketorolaco. Diez (2003), estudió la actividad antiespasmódica sobre intestino aislado de cobayo, de una infusión acuosa al 5% de hojas y sumidades floridas de *S. brevicalyx* Epling, mostrando acción antiespasmódica frente al N-butilbromuro de hioscina. Palomino (2005), demostró que el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *S. brevicalyx* Epling posee capacidad de captación de radicales libres, en relación a la vitamina C. Además no halló diferencia estadísticamente significativa en los niveles de lipoperoxidación, glutatión y proteínas hepáticas, utilizados como medida de estrés oxidativo. Carhuapoma (2007), estudió la actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante de su aceite esencial. Mendoza (2007), demostró la actividad hepatoprotectora del extracto acuoso de sus hojas, atribuyéndole dicha actividad a los flavonoides, por su capacidad antioxidante, es decir, como agente neutralizador de los radicales libres, generadores del daño hepático y Aguilar

(2010), 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.

2.2 Aspectos botánicos

2.2.1 Descripción botánica de la familia Lamiaceae

Familia compuesta con 224 géneros y 5 600 especies, se caracterizan por ser plantas herbáceas (anuales o perennes), los tallos y las ramas cuadrangulares o tetragonal generalmente con aceite esencial, aromático, hojas opuestas enteras, simples, pinnati-partidas o raramente compuestas, pecioladas o sésiles, sin estipulas, mayormente pinnatinervias. Inflorescencia cimosa con pocas o muchas flores que se reúnen en pseudo espigas o capítulos. Flores hermafroditas solitarias a menudo sésiles, zigomorfas o raramente actinomorfas, con o sin bracteolas, Cáliz con cinco sépalos soldados, corola con cinco pétalos generalmente bilabiados, dos a cuatro estambres libres, gineceo con ovario súpero bicarpelar, un estilo y dos estigmas, fruto tetraquenio, descompuestos en cuatro núculas (muy raramente carnosas), semillas con endospermo escaso (Bracko y Zarucchi, 1993) (Font Quer, 1988) (Mostacero y Mejía, 1993).

2.2.2 Descripción del género *Satureja*

Son plantas herbáceas anuales o permanentes de unos 70 a 90 cm de altura, algo tiesas y un tanto ásperas al tacto, solo leñosas en la base. Son plantas con hojas enfrentadas, estrechas y agudas, con los bordes enteros y ciliados. Las flores son blancas o rosadas y nacen de las axilas de las hojas superiores para formar ramilletes terminales con las flores echadas todas a un lado, las flores son muy pequeñas de 3,5 a ocho mm, se encuentran divididas en cinco dientes

puntiagudos con quince nervios muy realzados y cinco dientes triangulares de 0,5 mm. En las hojas de alguna de las especies de *Satureja* se distinguen numerosos hoyitos, en cada uno de los cuales se aloja una glándula repleta de esencia, la cual comunica a la *Satureja* el intenso aroma que despide (Font Quer, 1988) (Mostacero y Mejía, 1993).

2.2.3 Distribución geográfica del género *Satureja*

El género *Satureja* se desarrolla especialmente en las montañas secas pedregosas, en las laderas o colladas y toda suerte de matorrales de los terrenos calcáreos de gran parte de España (Font Quer, 1988). Cuenta con unas 200 especies en el mundo, todas estas especies son de regiones templadas y tropicales de ambos hemisferios de la Tierra. En el Perú se han identificado unas 26 especies, de las cuales 20 son endémicas. La *Satureja brevicalyx* Epling es una especie endémica de las regiones alto andinas sureñas del Perú (Brako y Zarucchi, 1993 citado por Carhuapoma, 2007) (Chumacero y Col., 2003) (Mostacero y Mejía, 1993).

2.2.4 *Satureja brevicalyx* Epling

2.2.4.1 Clasificación taxonómica de la *Satureja brevicalyx* Epling

La determinación botánica fue realizada según el sistema de clasificación de Cronquist. A. (1988), citado en el certificado del Herbarium Huamangensis a cargo de la Blga. Laura Aucasime Medina de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH (Anexo N° 1), y se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUB CLASE	: Asteridae
ORDEN	: Lamiales

FAMILIA	: Lamiaceae
GÉNERO	: <i>Satureja</i>
ESPECIE	: <i>Satureja brevicalyx</i> Epling
NOMBRE VULGAR	: "inca muña", "wayra muña"

Sinonimia vulgar. "urqu muña", "sacha muña", "salqa muña" "cjunumuña", "konoc" y "orégano de los incas". (Chumacero y Col., 2003) (Carhuapoma, 2002).

2.2.4.2 Descripción botánica

Es de porte arbustivo perennifolio, erguido de uno a 1,5 m de altura, aromática y pubescente. Hojas muy pequeñas, espatuladas, sésiles, verticiladas y opuestas, de margen entero. Flores blancas, solitarias, axilares, tetrámeras, bilabiadas; cáliz gamosépalo; corola gamopétala; androceo con estambres didínamos; gineceo con ovario súpero, estilo apical y estigma simple. Florece en primavera y verano (Chumacero y Col., 2003) (Carhuapoma, 2002).

2.2.4.3 Distribución geográfica

En el Perú *Satureja brevicalyx* Epling crece en territorios alto andinos mayormente entre los 3 500 y 3 800 m.s.n.m. de clima frío, creciendo de manera silvestre en las montañas y faldas de los cerros junto con el ichu, es de predilección por laderas de suelos areno-arcillosos y pedregosos. Los lugares peruanos donde esta planta se desarrolla se encuentra en Cuzco, Apurímac, Huancavelica, Junín y en mayor cantidad y siendo vernácula y aborigen del departamento de Ayacucho (Magallanes y Col., 1994) (Brako y Zarucchi, 1993; citado por Carhuapoma, 2007) (Carhuapoma, 2002) (Chumacero y Col., 2003) (Mostacero y Mejía, 1993).

2.2.4.4 Etnobotánica y etnofarmacología

Según informaciones etnobotánicas y etnofarmacológicas es usada para resolver

problemas gastrointestinales y para la corrección de desórdenes menstruales. Es digestivo, carminativo, contra la gastritis, flatulencia y antiespasmódica. También es usado como analgésico soasando las hojas en caso de dolores musculares y tortícolis (Soto, 1999) (Chumacero y Col., 2003) (Carhuapoma, 2002).

2.2.4.5 Composición química

El extracto hidroalcohólico evidencia los siguientes metabolitos: resinas, azúcares reductores, catequinas, lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, flavonoides y aceite esencial. (Soto, 1999) Carhuapoma (2002), realizó un estudio detallado de la composición química del aceite esencial reportando la presencia de pulegona (27,2%), linalol (20,3%), mentona (11,1%), isomentona (8,3%), β -cariofileno (6,5%) y otros compuestos en menor proporción. Aguilar (2010), caracterizó a los flavonoides apigenina, la naringenina, siendo la apigenina el flavonoide más importante y ácidos fenólicos de estructura desconocida.

2.3 Radicales libres (RL)

Los radicales libres son moléculas que en su estructura presentan un electrón desapareado o impar en el orbital extremo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química que contrario a la normal tendencia espontánea de los electrones localizados en los átomos y moléculas a la formación de parejas es desapareado. Esta condición química lo hace muy inestable; de vida efímera; extraordinariamente reactivo, puesto que el electrón impar o solitario "busca desesperadamente una pareja" para salir del desequilibrio atómico. Para lograr su objetivo, sustrae un electrón a cualquier molécula vecina, lo que en química quiere decir que "oxida" la molécula, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en otro radical libre ansioso por

captar un electrón. Se genera así una reacción en cadena que dañara a una diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez y Col., 2001) (Ríos de Molina, 2003).

2.3.1 Formación de los radicales libres

Los radicales libres se forman por fuentes exógenas o endógenas:

2.3.1.1 Fuentes endógenas

Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Son componentes normales de células y tejidos, existiendo una poza de radicales libres particular en cada estirpe celular y en algunos tipos celulares permiten la mejor adaptación a su hábitat (Rodríguez y Col., 2001).

Las estructuras subcelulares de generación de radicales libres incluyen principalmente las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana celular, el citoplasma y la del retículo endoplasmático (Velázquez y Col., 2004).

Los radicales libres son generados y utilizados por células como neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinofilos, y los fibroblastos para la eliminar organismos extraños como bacterias y virus (Velázquez y Col., 2004).

2.3.1.2 Fuentes exógenas

Los radicales libres también se producen en el organismo como respuesta a:

- Químicos. aumento de metales pesados, xenobióticos, componentes del tabaco.
- Drogas. Algunos fármacos.

- Físicos. radiaciones ionizantes, rayos ultravioleta, contaminación ambiental, humo de cigarrillos, hiperoxia,
- Orgánicos y metabólicos. Durante el proceso de digestión de los alimentos, dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia y ejercicios extenuantes (Guisado y Col., 2007).

2.3.2 Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) y Nitrógeno (ERON)

2.3.2.1 Las especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS). Son ubicuas, altamente reactivas, de tiempo de vida media muy corto, se producen en el metabolismo del oxígeno en todos los sistemas biológicos aeróbicos y reaccionan con todas las moléculas que se encuentran a su alrededor, empezando con aquellas que se encuentran muy cercanas a su sitio de formación (Luna, 2010).

En la molécula de O_2 se generan por su reducción parcial de las especies reactivas siguientes:

O_2^- = anión superóxido

OH = radical hidroxilo

H_2O_2 = peróxido de hidrógeno

1O_2 = oxígeno singlete

Radical hidroxilo, probablemente es la especie reactiva de oxígeno (ROS) más potente de todas. Inicia una cadena de reacciones que forman peróxidos lipídicos y radicales orgánicos, y se une directamente a determinados compuestos (Rodríguez y Col., 2001).

Anión superóxido, también es muy reactivo, pero posee una solubilidad limitada y no puede difundir muy lejos, puede generar los radicales mucho más reactivos hidroxilo e hidroperoxi, de forma no enzimática con el peróxido de hidrógeno en

la reacción de HaberWeiss (Rodríguez y Col., 2001).

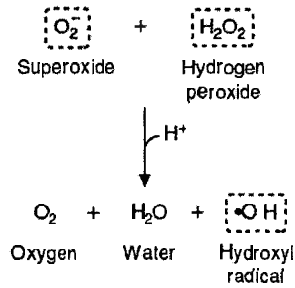


Figura N° 1. Reacción de Haber – Weiss (Rodríguez y Col., 2001)

Peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es estrictamente un radical libre pero por su capacidad de generar el hidroxilo (OH^\cdot) en presencia de metales como el hierro, se le incorpora como tal. Es un agente oxidante débil que se clasifica dentro de las especies reactivas de oxígeno (ROS) porque puede generar el radical hidroxilo (OH^\cdot).

Los metales de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ , catalizan la formación del radical hidroxilo del peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton (Rodríguez y Col., 2001).

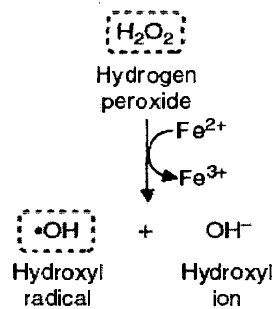


Figura N° 2. Reacción de Fenton (Rodríguez y Col., 2001).

Las ROS se están formando continuamente en la célula; aproximadamente, entre el 13 y el 15 % del oxígeno que consumimos se convierte en radicales libres de oxígeno.

Radiación Ionizante. Rompe el H_2O en $OH\cdot + H\cdot$ (Velázquez y Col., 2004).

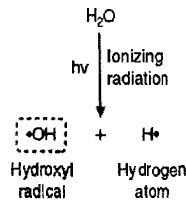


Figura N° 3. Producción de radicales libres mediante radiación ionizante (Rodríguez y Col., 2001).

2.3.2.2 Reacciones de los radicales de oxígeno con componentes celulares

Ataque a la membrana: formación de lípidos y radicales peróxido lipídicos. La cadena de reacciones se propaga cuando el O_2 se une al proceso, originando peróxidos lipídicos (Guisado y Col., 2007).

Proteínas y péptidos: La Arginina, Cisteína y Metionina, son particularmente susceptibles al ataque del radical $HO\cdot$ y al daño oxidativo (Guisado y Col., 2007).

DNA: Las ROS son la fuente principal del daño al DNA, generando Oxi-guanina. (Guisado y Col., 2007).

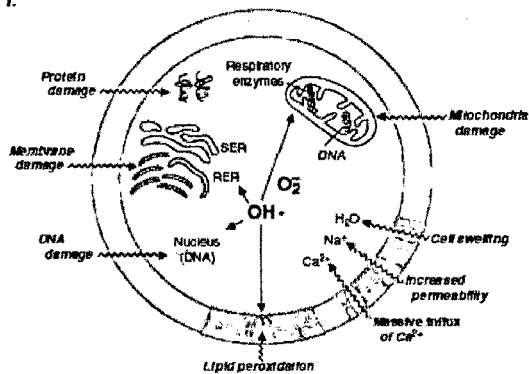


Figura N° 4. Daño celular provocado por los radicales libres (Boveris y Col., 2000).

El superóxido y el radical hidroxilo inician la peroxidación de lípidos en las membrana, celular, mitocondrial, nuclear y del retículo endoplásmico. El aumento de la permeabilidad celular provoca una entrada de calcio, que causa un daño mitocondrial adicional. Los grupos sulfhidrido de la cisteína y otros

residuos de aminoácidos de las proteínas se oxidan y degradan. El DNA nuclear y el mitocondrial pueden oxidarse, produciéndose roturas en sus cadenas y otros tipos de daño (Boveris y Col., 2000).

2.3.2.3 Las especies reactivas de nitrógeno (ERN o RNOS)

Incluyen al óxido nítrico (NO) y a los radicales peroxinitrito (ONOO•) entre las más importantes, y que participan en diferentes procesos biológicos, como en el funcionamiento de los tejidos vasculares (Halliwell, 1995).

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que contiene oxígeno y, como en el caso del O₂, es tan necesario como tóxico, tiene un electrón único y debido a ello se une a otros compuestos con electrones únicos, como el Fe³⁺, a altas concentraciones, se combina con el O₂ o con el superóxido para formar especies químicas reactivas y tóxicas que contienen oxígeno y nitrógeno (RNOS) (Boveris, 2005).

A concentraciones muy altas el NO se combina con el O₂⁻ para formar peroxinitrito (ONOO⁻), o con el O₂ para formar N₂O₃.

Óxido Nítrico Sintasa (NOS): Presenta 3 isoenzimas:

nNOS: neuronal: regulada por Ca₂⁺

eNOS: endotelial: regulada por Ca₂⁺

iNOS: inducible: regulada por transcripción del gen.

El N₂O₃, nitrosila grupos sulfhidrilos o similares.

Peroxinitrito (ONOO⁻), es un fuerte oxidante de lípidos; nitra anillos aromáticos (nitrotirosina o nitroguanosina) (Boveris, 2005).

2.3.2.3.1 Toxicidad de las especies reactivas de nitrógeno RNOS

Son agentes nitrantes y nitrosilantes, peroxidan los lípidos mitocondriales, rompen el DNA de doble cadena y modifican las bases del DNA (Boveris, 2005).

2.4 Antioxidantes

Los antioxidantes son un grupo de moléculas reconocidas por su capacidad para neutralizar los radicales libres, estas sustancias han surgido como una alternativa para combatir las deficiencias asociadas al estrés oxidativo, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células o extracelular (López y Echevarri, 2007).

Un antioxidante puede ser definido como una sustancia, que al estar presente, retarde o inhiba significativamente la oxidación de los radicales libres (Gramza y Korczak, 2005).

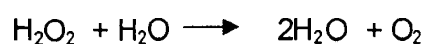
2.4.1 Clasificación de los antioxidantes

Las sustancias antioxidantes se han clasificado en dos principales sistemas:

2.4.1.1 Antioxidantes endógenos. Que son sintetizados por las células, las cuales pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos (Rodríguez y Col., 2001).

Dentro de los antioxidantes enzimáticos podemos encontrar:

- Glutación peroxidasa (GP). Es una enzima selenio dependiente que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en agua, que utiliza como agente reductor al glutatión reducido. Existen al menos 3 formas de GP seleno dependientes que difieren en su ubicación y en su especificidad de sustrato: una forma intracelular o celular, una extracelular o plasmática y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos que, por lo general, está asociada a la membrana celular (Rodríguez y Col., 2001).
- Catalasa. Esta enzima está presente en los peroxisomas, cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.



- **Superóxido dismutasa.** Metaloenzima intracelular o extracelular responsable de remover los radicales superóxidos para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Necesita la presencia de zinc, cobre, magnesio, fierro, manganeso, dependiendo de la isoenzima.
- **Glutación.** Poderoso antioxidante que protege contra los efectos dañinos de metales pesados, tabaco y alcohol. Limita la actividad de los radicales libres peróxido aniónico, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, y proteínas oxidadas (Rodríguez y Col., 2001).

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos podemos encontrar:

- **Melatonina.** Es una antioxidante potente que altera la actividad de la enzima superóxido dismutasa, glutación peroxidasa, y glutación reductasa e inhiben la actividad de la sintasa de óxido nítrico. Es capaz de neutralizar el radical hidroxilo, radical peróxido, oxígeno singlete y proteínas oxidadas.
- **Estrógenos.** Neutralizan radicales libres lipofílicos, disminuyendo la peroxidación lipídica de las membranas celulares.
- **Ácido úrico, albumina.** capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena (Rodríguez y Col., 2001).

2.4.1.2 Antioxidantes exógenos. Especialmente útil cuando el sistema endógeno se satura. Está determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres; los cuales intervienen logrando retrasar la producción de los radicales libres. Dentro de estos podemos encontrar los compuestos fenólicos, la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides (Zamorra, 2007).

A lo largo de los años un gran número de estudios han sugerido que el consumo de frutas, verduras, granos, hierbas y otros alimentos pueden reducir el riesgo de

enfermedades cardiovasculares y de cáncer, potencialmente atribuidos a los compuestos fenólicos (Proteggente y Col., 2003), los cuales además muestran otras actividades biológicas como antibacteriales, anti- cancerígenas, antiinflamatorias y antivirales, antialérgicas (Autoi y Col., 2005). Los antioxidantes fenólicos en hierbas son principalmente compuestos de ácidos fenólicos, flavonoides y catequinas (Shahidi, 2004). Algunos compuestos fenólicos contenidos en las plantas tienen la capacidad de quitar la peroxidación lipídica, prevenir daño oxidativo al ADN y atrapar las ERO, tales como superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Rodríguez y Col., 2001).

2.5 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo considerable de compuestos que pueden definirse, de una forma concisa y desde el punto de vista químico como compuestos orgánicos presentes en la naturaleza que poseen, al menos, un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo unidos a él (esos grupos funcionales pueden ser sustituidos por ésteres, metil-éster, glicósidos, etc.), aunque una definición más precisa se basa en su origen metabólico como aquellas sustancias derivadas del metabolismo de la ruta del shikímico y de los fenilpropanoide (Villar del Fresno, 1999).

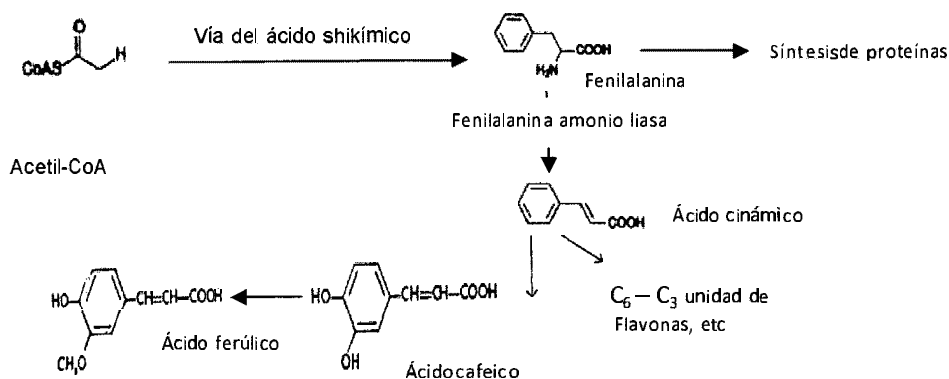


Figura N° 5. Origen metabólico de los ácidos fenólicos (Villar del Fresno, 1999) y (Muñoz y Col., 2007).

Los compuestos polifenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, principalmente en forma de subproductos generados por el metabolismo, apareciendo como metabolitos secundarios en todas las plantas.

Estos compuestos pueden acumularse como productos finales de dos rutas bioquímicas distintas: la ruta del shikímico, o la ruta del acetato.

La naturaleza química de los compuestos polifenólicos es muy heterogénea y engloba un amplio surtido de disposiciones estructurales de familias de polifenoles que pueden englobar desde estructuras libres a conjugadas (estructuras polifenólicas unidas a otras sustancias de distinta naturaleza). Así, los flavonoides son compuestos polifenólicos que reflejan un gran número de estos diseños estructurales. Los ácidos hidroxicinámicos también constituyen un ejemplo representativo de estructuras que están asociadas con otras sustancias, no necesariamente polifenoles, en la naturaleza (Muñoz y Col., 2007).

2.5.1 Clasificación de los ácidos fenólicos

2.5.1.2 Derivados del ácido hidroxibenzoico

Se encuentra ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pudiéndose encontrar libres o combinados en forma de heterósidos o ésteres. Alguno de ellos, como el ácido gálico, juegan un importante papel en la constitución de los taninos hidrolizables, también pueden encontrarse los aldehídos, derivados metoxilados y algunos alcoholes (Villar del Fresno, 1999).

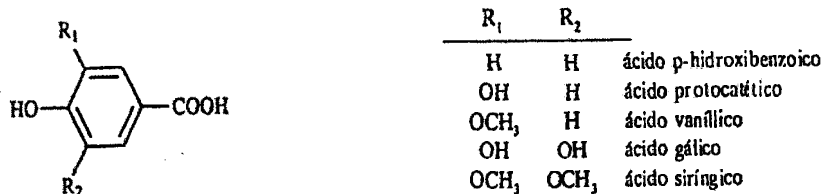


Figura N° 6. Estructura química del ácido hidroxibenzoico (Villar del Fresno, 1999).

2.5.1.1 Ácidos hidroxicinámicos

Constituyen el grupo más ampliamente distribuido de los compuestos también conocidos como fenilpropanoides. Entre ellos hay cuatro estructuras básicas que existen en su estado natural libre y se corresponden con los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinapínico. Al igual que otros compuestos polifenólicos, la mayoría de estas estructuras se encuentran en el reino vegetal químicamente asociados a otros tipos de compuestos. Un ejemplo claro de importancia universal lo constituye la esterificación del ácido cafeico con el ácido quínico para formar una estructura ampliamente distribuida en comestibles, conocido como ácido clorogénico (Castañeda y Col., 2008).

Muchas funciones biológicas están íntimamente relacionadas con la presencia de estos compuestos en las plantas y comprenden propiedades antibióticas y relacionadas con la inhibición del crecimiento y germinación (Villar del Fresno, 1999).

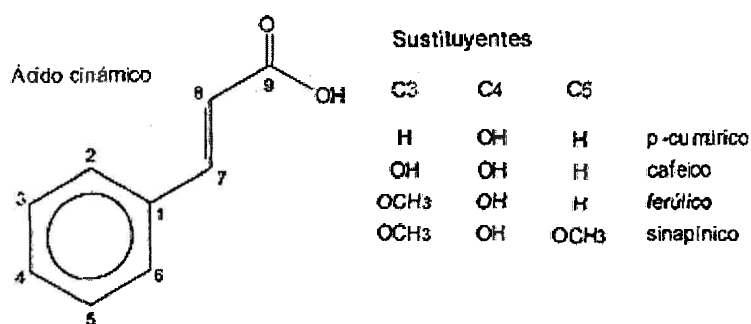


Figura N° 7. Estructura química del ácido hidroxicinámico (Villar del Fresno, 1999).

2.5.2 Mecanismo antioxidante de los ácidos fenólicos

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y

captar radicales libres, aunque en ocasiones también pueden promover reacciones de oxidación in vitro.

La captación de radicales libres, depende de la estructura química de la molécula, ya que, el principal determinante es el número y la localización de los grupos hidroxilo donadores de electrones. Al ceder un electrón al radical libre, la molécula se queda con un electrón desapareado, que se estabiliza gracias a la deslocalización de los dobles enlaces (Siquet y Paiva, 2006).

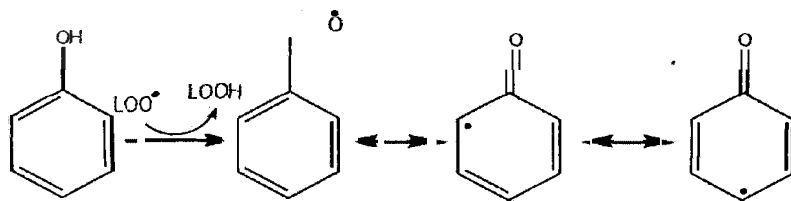


Figura N° 8. Mecanismo antioxidante de los compuestos fenolicos (Siquet y Paiva, 2006).

Los compuestos fenólicos actúan como prooxidantes quelando metales, de manera que mantienen o incrementan su actividad catalítica o bien reduciendo metales, incrementando así su capacidad para formar radicales libres de los peróxidos (Decker, 1997).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en el Laboratorio de Control de Calidad del Instituto Quimioterápico (IQFARMA) de la Ciudad de Lima, durante los meses de mayo a octubre del 2012.

3.2 Definición de la población y muestra

Población. Hojas de la especie de *Satureja breviculix* Epling “wayra muña”; colectadas en el distrito de Quinua del departamento de Ayacucho, durante los meses de marzo y abril en estado de floración. Se colectaron las hojas en buen estado de conservación:

Muestra. La muestra estuvo constituida por un kilogramo de hojas de *Satureja breviculix* Epling “wayra muña”. Una parte fue utilizada para la identificación botánica por la Biga, Laura Aucasime del *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas.

3.3 Diseño metodológico

3.3.1 Recolección de muestra

Se procedió a recolectar las hojas frescas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña" del distrito de Quinua en horas de la mañana. Luego se escogió las hojas no dañadas ni maltratadas, se distribuyó en una habitación ventilada sobre papel periódico para su secado, aproximadamente por una semana hasta la eliminación de la humedad, siendo seguidamente pulverizadas en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo seco de color verde oscuro, almacenándose en frascos limpios y secos para la extracción de los ácidos fenólicos y las pruebas biológicas correspondientes (Anexo N° 3).

3.3.2. Técnicas de extracción de ácidos fenólicos

Para el aislamiento de ácidos fenólicos se utilizó 500 g de muestra seca y molida, primero se hizo una extracción hidroalcohólica con tres litros de etanol al 80%, realizando una doble extracción (se maceró en frascos de color ámbar por un periodo de una semana, durante el proceso se agitó el frasco periódicamente para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra, seguidamente se procedió a la filtración, y se añadió nuevamente tres litros de etanol al 80% y se maceró por una semana, y se filtró; reuniéndose los filtrados (obteniendo la solución hidroalcohólica total), seguidamente se procedió a la evaporación a sequedad en un evaporador rotatorio BUCHI 3000 (Anexo N° 5). El extracto seco fue resuspendido en agua destilada, desengrasando con éter de petróleo utilizando un embudo de separación, sucesivamente se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo, acetato de etilo y metanol (Anexo N° 6). Los ácidos fenólicos se concentran en la fracción de acetato de etilo y la fracción metanólica, los mismos que fueron evidenciados con la prueba de cloruro férrico

(Miranda y Cuellar, 2000) (Anexo N° 7).

3.3.3. Aislamiento de los ácidos fenólicos

Se utilizaron técnicas cromatográficas realizándose una cromatografía en columna flash y como diluyente una mezcla de cloroformo y metanol en las proporciones de 10:0 (fracción 1); 9:1 (fracción 2); 8:2 (fracción 3); 7:3 (fracción 4); 6:4 (fracción 5); 5:5 (fracción 6); 4:6 (fracción 7); 3:7 (fracción 8); 2:8 (fracción 9); 1:9 (fracción 10); 0:10 (fracción 11) respectivamente (Anexo N° 8).

Las fracciones que contienen ácidos fenólicos fueron evidenciadas mediante las pruebas de cloruro férrico al 5% y amoníaco al 25%, demostrándose su presencia en las fracciones 1; 2; 3; 4; 5; 6 (Anexos N° 14 y 15).

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Con las fracciones obtenidas se realizó la siembra teniendo como sistema cromatográfico (Anexos N° 9 y 10).

Sistema cromatográfico

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

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

Volumen de inyección: 20 µL

Revelador: Luz Ultravioleta, amoníaco, cloruro férrico.

Con la fracción de acetato de etilo y las fracciones 1 y 4 que evidenciaron diferentes tipos de ácidos fenólicos 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 (4:1:5). La siembra se realizó en banda con el propósito de aislar los ácidos fenólicos, 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 de acetato de etilo denominadas fracción aislada 1 y fracción aislada 2 y 02 bandas de las fracciones 1 y 2 denominadas fracción aislada 1 y fracción aislada 3 (Anexos N° 13 y 16) (Aguilar 2010).

3.4 Pruebas espectrales

Las 3 bandas obtenidas en el procedimiento anterior y los estándares de ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido ferúlico) fueron leídas en un Espectrofotómetro AGILENT CARY 60 UV-VIS, teniendo como sistema Espectrofométrico.

Celda: Cuarzo de un cm

Longitud de onda: 200 nm a 500 nm

Blanco: Metanol

Registrándose los máximos picos de absorción de las tres bandas, para su *interpretación* se utilizó los máximos picos de absorción de los estándares y el reporte de (Bandoniene y Col., 2005).

Asimismo, se realizó la lectura en un espectrofotómetro FT-IR de alta resolución AGILENT CARY 660, reportándose los resultados en transmitancias vs cm^{-1} (Anexo N° 17).

3.5 Pruebas cromatográficas

3.5.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Según la metodología de Zavaleta y Col. (2005) para el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), las muestra utilizadas fueron, el extracto total, la fracción de acetato de etilo y las fracciones aisladas 1, fracción aislada 2, fracción aislada 3 y los estándares de ácidos fenólicos, para esto, se inyectó una muestra de la mezcla de tres compuestos ácido clorogénico, ácido

cafeico, ácido ferúlico). Y una inyección de cada uno de las fracciones.

Teniendo como sistema cromatográfico:

Equipo: HPLC, Merck Hitachi - Lachrom Elite (Anexo N° 18)

Columna: PurospherStar RP-18e 25 cm x 4,6 mm de 5 µm

Longitud de onda: 260 nm y 370 nm

Volumen de inyección: 5 µL

Temperatura: Ambiente y 40 °C

Fase móvil: Canal A (Agua a pH 2,5 con ácido ortofosfórico) y Canal B (acetonitrilo).

Y el programa de gradiente como sigue:

Programa de gradiente

Tiempo (min)	% canal A	% Canal B	Flujo (mL/ min)
0,0	100	0	1,0
3,0	80	20	1,0
23,0	60	40	1,0
28,0	100	0	1,0
30	100	0	1,0

Se registraron los cromatogramas e identificaron los picos por comparación con los cromatogramas de los estándares según tiempos de retención (Anexos N° 31 al 42).

3.6 Determinación de la actividad antioxidante

3.6.1 Actividad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil

Fundamento

Según el método de Castañeda y Col. (2008) para determinar la capacidad antioxidante, es aquel que emplea al radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil), 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.

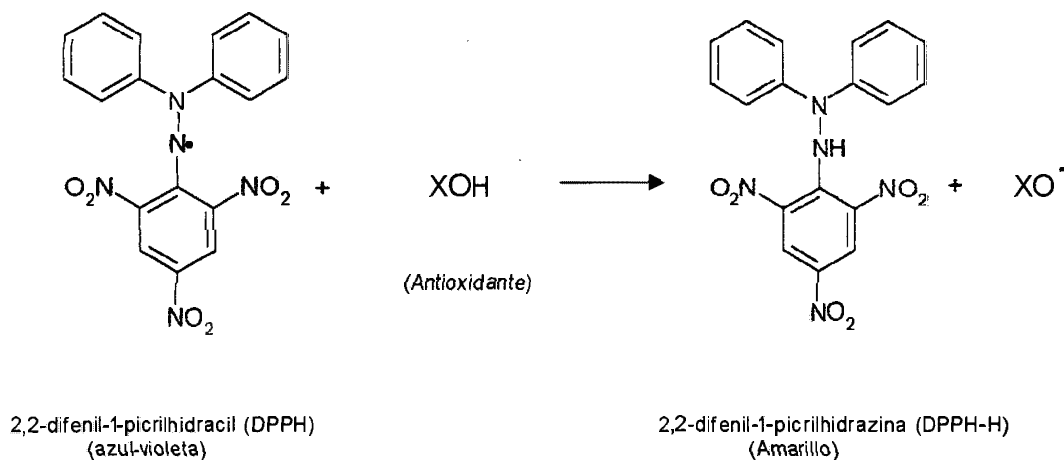


Figura N° 6. Reacción química del radical libre DPPH (Sakakibara y Col., 2003).

El radical libre DPPH sustrae un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (Antioxidante), producto de este cambio se desarrolla un cambio de color, de azul-violeta a amarillo, al disminuir la concentración del radical libre DPPH (Sakakibara y Col., 2003).

Procedimiento

Para el ensayo se utilizó lo siguiente:

- Una solución metanólica de DPPH de 20 µg/mL.
- Una solución metanólica de la fracción de acetato de etilo de 300 µg/mL (sol. A).
- Un blanco con metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.

- Un blanco de muestra con 0,75 mL de muestra (sol. A) y 1,5 ml de metanol.
- Un patrón de referencia (estándar) con 1,5 mL de DPPH y 0,75 mL de agua destilada.
- La muestra con 0,75 mL de solución A y 1,5 mL de DPPH obteniéndose una concentración final de 100 µg/mL, dejar a temperatura ambiente por cinco minutos y leer a 515 nm en el espectrofotómetro.
- Diluir la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:2 (sol. B) para obtener una concentración final de 50 µg/mL y luego en una proporción de 1:10 (sol. C) para obtener una concentración final de 10 µg/mL.
- Con las soluciones B y C se procede igual que en el caso anterior.
- Se siguió el mismo procedimiento para determinar la actividad secuestradora de la vitamina C (Merck) y del ácido fenólico estándar ácido clorogénico (Sigma Aldrich), ácido cafeico (Merck) y ácido ferúlico (Merck).

Cálculos:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \frac{A_1 - (A_2 - A_3)}{A_1} \times 100$$

Dónde:

A_1 : Absorbancia del patrón de referencia

A_2 : Absorbancia de la muestra

A_3 : Absorbancia del blanco de la muestra.

3.7 Análisis de datos

Los datos serán organizados en cuadros y una matriz para calcular la media y la desviación estándar, asimismo, serán graficados en forma de histogramas. La significancia estadística será determinada mediante el análisis de varianza múltiple.

IV. RESULTADOS

TABLA N° 1. Características químicas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja breviculix* Epling “wayra muña”. Ayacucho, 2012

Metabolitos Secundarios	Reacción	Resultado	Observación	Fluorescencia al ultravioleta (366 nm)		
				Sin NH ₃	Con NH ₃	Con FeCl ₃
Ácidos fenólicos	Cloruro férrico	+++	Verde Azulado	Azul	celeste	Verde azulado
Flavonoides	Shinoda	+++	Rojo	Marrón	Marrón	rojo
Taninos	Precipitación	-	Ninguna precipitación	-	-	-

Leyenda:

+++	Abundante
++	Moderado
+	Leve
-	Ausente

TABLA N° 2. Características químicas del fraccionamiento de ácidos fenólicos de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña". Ayacucho, 2012

Fracciones	Prueba de Shinoda	Prueba de FeCl ₃ 1%	Fluorescencia al ultravioleta (366 nm)	
			Sin NH ₃	Con NH ₃
F1	+++	+++	Azul	Celeste
F2	+++	+++	Azul	Celeste
F3	+++	+++	Azul	Celeste
F4	+++	+++	Azul	Celeste
F5	+++	+++	Azul	Celeste
F6	+	++	Azul	Celeste
F7	+	++	Azul	Celeste
F8	+	-	Azul	Celeste
F9	+	-	Azul	Celeste
F10	-	-	Azul	Celeste
F11	-	-	Azul	Celeste

Leyenda:

+++	Abundante
++	Moderado
+	Leve
-	Ausente

TABLA N° 3. Características cromatográficas de las fracciones de ácidos fenólicos de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña". Ayacucho, 2012

Fracciones	R _F	NH ₃	FeCl ₃	Fluorescencia al ultravioleta (366 nm)	
				NH ₃	Sin NH ₃
Fracción de Acetato de Etilo	0,854	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azulino
	0,759	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azul
Fracción metanólica	0,759	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azul
	0,506	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Celeste fluorescente
F1	0,506	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Celeste fluorescente
F3	0,506	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Celeste fluorescente
F4	0,506	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Celeste fluorescente
F5	0,506	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Celeste fluorescente
F6	0,506	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Celeste fluorescente
F7	0,759	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azul
F8	0,759	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azul
F9	0,759	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azul
F10	0,759	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azul
F11	0,759	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azul
F12	0,759	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azul
Ácido Clorogénico	0,505	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Celeste fluorescente
Ácido Ferúlico	0,854	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azulino
Ácido Caféico	0,807	Amarillo limón	Verde azulado	Celeste	Azul

TABLA Nº 4. Características espectrales ultravioleta e infrarrojo del fraccionamiento de ácidos fenólicos de las hojas de *Satureja breviculix* "wayra muña". Ayacucho, 2012

Fracciones	Sub-fracciones	Datos Espectrales	
		Ultravioleta (nm)	Infrarrojo (cm ⁻¹)
Acetato de etilo	Fracción Aislado 1	328,5 ; 290,5 ; 206	3427, 3222, 2968, 2838, 2558, 2360, 2163, 1641, 1597, 1513, 1433, 1376, 1272, 1201, 1176, 1114, 1032, 970, 935, 905, 849, 801
	Fracción Aislado 2	322,297,235,219	3426, 2832, 2360, 1686, 1660, 1592, 1512, 1462, 1429, 1377, 1323, 1266, 1200, 1163, 1111, 1029,942, 849,801, 751
F 1 y 4	Fracción Aislado 1	328,5 ; 290,5 ; 206	3427, 3222, 2968, 2838, 2558, 2360, 2163, 1641, 1597, 1513, 1433, 1376, 1272, 1201, 1176, 1114, 1032, 970, 935, 905, 849, 801
	Fracción Aislado 3	325,290,205	3312, 2160, 2031, 1977, 1684, 1637, 1600, 1516, 1441, 1284, 1249, 1181, 1111, 1086, 1034, 970, 907,817, 739

TABLA Nº 5. Características por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de las fracciones de ácidos fenólicos de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña". Ayacucho, 2012

Fracciones	Ácidos Fenólicos	Tiempo de Retención (min)	
		260nm	370nm
Extracto Total	Ácido Clorogénico	9,265	9,288
	Ácido Caféico	10,375	10,370
	Ácido Ferúlico	13,858	13,913
	Ácido Rosmarínico	15,775	15,802
Fracción de Acetato de Etilo	Ácido Caféico	10,598	-
	Ácido Ferúlico	14,112	13,918
	Ácido Rosmarínico	16,010	15,805
Fracción Aislado 1	Ácido Rosmarínico	15,955	15,783
Fracción Aislado 2	Ácido Ferúlico	13,780	13,808
Fracción Aislado 3	Ácido Clorogénico	9,102	9,123
Estándar - 1	Ácido Clorogénico	9,412	9,145
Estándar - 2	Ácido Caféico	10,665	10,392
Estándar- 3	Ácido Ferúlico	14,117	13,827

TABLA N° 6. Porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH por parte de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja brevicalex* "wayra muña". Ayacucho, 2012

µg/mL Repeticiones	Controles															Ácidos Fenólicos de la <i>Satureja brevicalex</i>		
	Vitamina C			Ácido clorogénico			Ácido caféico			Ácido férulico			100 (%)	50 (%)	10 (%)			
	100 (%)	50 (%)	10 (%)	100 (%)	50 (%)	10 (%)	100 (%)	50 (%)	10 (%)	100 (%)	50 (%)	10 (%)	100 (%)	50 (%)	10 (%)			
1	97,765	95,903	94,972	96,834	94,227	81,378	98,324	95,345	93,110	98,324	94,600	84,544	96,462	94,786	61,639			
2	97,765	95,903	94,786	97,207	94,041	80,819	98,138	95,345	93,482	98,138	94,413	85,102	96,276	94,600	62,197			
3	97,579	96,276	94,786	97,021	93,855	81,378	98,510	95,158	93,669	98,324	94,600	85,847	96,462	94,972	61,825			
Promedio ± DE	97,703 ±0,107	96,027 ±0,215	94,848 ±0,107	97,021 ±0,187	94,041 ±0,186	81,192 ±0,323	98,324 ±0,186	95,283 ±0,108	93,420 ±0,285	98,262 ±0,107	94,538 ±0,110	85,164 ±0,654	96,400 ±0,107	94,786 ±0,186	61,887 ±0,284			

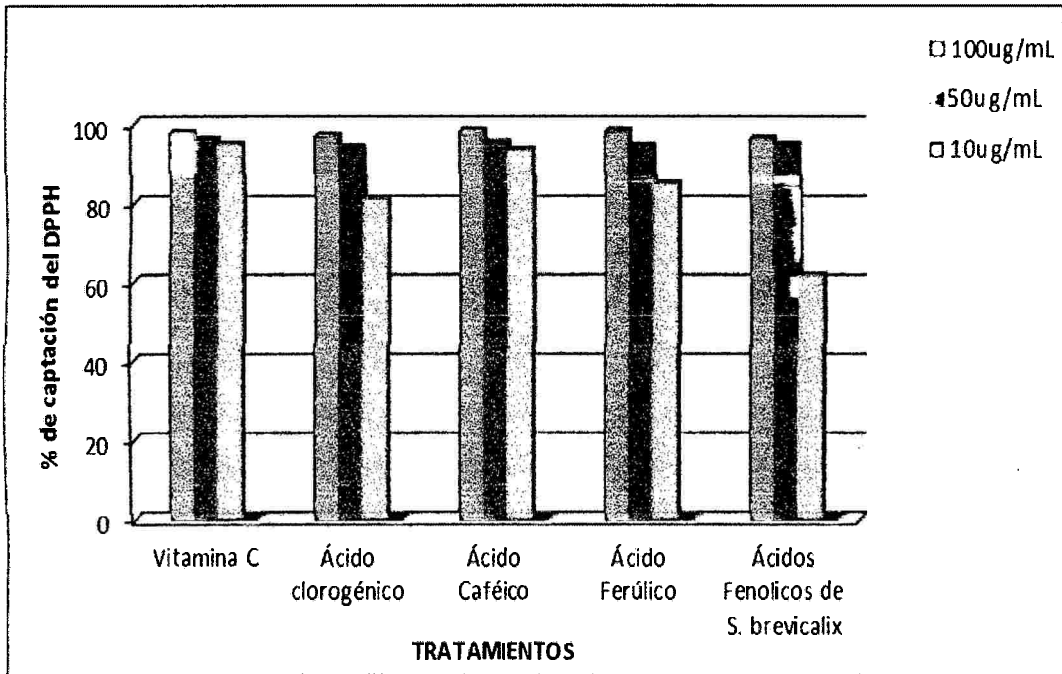


GRÁFICO Nº 1. Porcentaje de captación del radical libre DPPH por parte de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja brevicallix* "wayra muña" según vitamina C y los estándares de ácido. Ayacucho, 2012

V. DISCUSIÓN

Para lograr el objetivo de aislar los ácidos fenólicos, se procedió a realizar diferentes extracciones líquido – líquido del extracto etanólico: la primera, que consistió en una extracción con éter de petróleo con la finalidad de eliminar las grasas y la clorofila, la segunda extracción con cloroformo para la eliminación de terpenos y sesquiterpenos contenidos en el extracto vegetal; la tercera con acetato de etilo, para extraer compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos); la cuarta extracción se realizó con metanol para la separación de ácidos fenólicos (compuestos químicos de interés), quedando como residuo la fase acuosa (Aguilar, 2010).

La utilización de la cromatografía en columna para la separación de los flavonoides es un procedimiento descrito por Lock de Ugaz (1994), utilizando la mezcla de cloroformo, un solvente medianamente polar y el metanol, un solvente altamente polar. Las proporciones utilizadas permiten separar a los ácidos fenólicos de otros compuestos, principalmente los flavonoides que también son solubles en acetato de etilo y metanol. Las 11 fracciones obtenidas fueron diferenciadas por las prueba de cloruro férrico al 5%, que produce un color verde azulado característico de los ácidos fenólicos y la coloración amarilla con el

amoníaco. Se realizaron pruebas adicionales con el ensayo de Shinoda, para detectar la presencia de flavonoides, la capacidad reductora con el radical libre DPPH y el color de la fluorescencia a la luz ultravioleta (Anexos N° 11, 12, 14 y 15).

De la Tabla N° 1 y los Anexos N° 11 y 12, se presenta las características químicas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja brevicalix* Epling "wayra muña", donde se observa la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides, descartando la presencia de taninos, donde los compuestos fenólicos dan una coloración verde azulado, con cloruro férrico 5%, a luz ultravioleta dan una coloración azul y en presencia de amoníaco una coloración celeste fluorescente, mientras que los flavonoides van de una coloración roja a rosada, con la reacción de Shinoda, y a la luz ultravioleta dan una coloración amarilla a marrón.

De la Tabla N° 2 y los Anexos N° 14 y 15, se deduce que las fracciones 1, 2, 3, 4, 5 contienen ácidos fenólicos de manera abundante y en las fracciones 6 y 7 hay presencia de compuestos fenólicos de forma moderada, mientras que en las fracciones 8, 9, 10, 11 no hay presencia de compuestos fenólicos.

Con las fracciones de acetato de etilo y con las fracciones 1 al 11 se procedió a determinar las diferencias y semejanzas entre ellas a través de una cromatografía en capa fina, utilizándose como patrón de referencia a los ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido ferúlico) y como revelador luz ultravioleta. Observándose en la Tabla N° 3 y los Anexos N° 12 y 16 el comportamiento de cada una de las fracciones. En la fracción de Acetato de etilo (Anexo N° 13), se observa dos manchas de color azul fluorescentes, la primera en la parte superior con un R_F de 0,854 semejante al del estándar ácido ferúlico

que presenta un R_F de 0,854 y la segunda con un R_F de 0,759, identificando 2 componentes diferentes de ácidos fenólicos. En las fracciones 1 al 6 se observa una mancha de color azul fluorescente con un R_F de 0,505 semejante al del estándar ácido clorogénico que presenta un R_F de 0,505. Y en las fracciones 7 al 11 se pueden observar dos manchas de color azul fluorescentes, la primera en la parte superior con un R_F de 0,759 y la segunda con un R_F de 0,505. Afirmando que existe 3 ácidos fenólicos diferentes (Anexo N° 16).

El análisis de las fracciones aislada se realizó por espectrofotometría UV-VIS (Tabla N° 4), logrando separar tres componentes: La primera (fracción aislada 1) con una fluorescencia azul que corresponde al R_F de 0,759, mostrando absorbancias máximas al ultravioleta a 328, 290, 206 nm (Anexo N° 21), la segunda (fracción aislado 2) con una fluorescencia de color azul que corresponde al R_F de 0,854 mostrando absorbancias máximas a 322, 297, 235, 219 nm (Anexo N° 22), semejantes al del estándar ácido ferúlico (322, 297, 235, 219 nm) y la tercera (fracción aislado 3) con una fluorescencia azul que corresponde al R_F de 0,505 mostrando absorbancias máximas de 325, 290, 205 nm (Anexo N° 23). Asimismo, las pruebas del infrarrojo señalan picos máximos (Tabla N° 4) para cada una de las fracciones aislados, en el que se demuestran presencia de un grupo fenólico, función ácido, enlace éster y grupo funcional carboxílico. Con estos datos se puede asumir que el compuesto de la fracción aislado 1 corresponde al ácido rosmarínico (Bandoniene y col., 2005), siendo este el más importante ya que se encuentra en mayor proporción (como es demostrado por la mancha celeste intensa cuando es revelado con cloruro férrico al 5% en presencia de luz ultravioleta), la fracción aislado 2 corresponde al ácido ferúlico y la fracción aislado 3 corresponde al ácido clorogénico.

Para el análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) a 260 y 370 nm (Tabla N° 5), se utilizó el extracto total obteniendo: el ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico con tiempos de retención de 9,265, 10,375, 13,858 minutos respectivamente y 15,775 minutos del componente mayoritario asumiendo por los análisis anteriores como el ácido rosmarínico (Anexos N° 31 y 32). Asimismo se realizaron corridas cromatograficas de la fracción de acetato de etilo obtenido la presencia de ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico con tiempos de retención de 10,598 , 14,112 , 16,010 minutos respectivamente (Anexos N° 33 y 34). La fracción aislado 1 presenta un tiempo de retención de 15,955 minutos correspondiente al ácido rosmarínico (Anexos N° 37 y 38). La fracción aislado 2 y 3 muestran tiempos de retención semejantes a los estándares ácido ferúlico y ácido clorogénico (Anexos N° 39 al 42). Teniendo en cuenta la presencia del ácido cafeico en el extracto total, el cual no se pudo realizar el aislamiento ya que la cantidad que se encuentra en el material vegetal es *mínima*, dificultando su separación.

Con los cromatogramas obtenidos de los componentes a 370 nm y 260 nm se pudo asumir que la longitud de onda óptima para su lectura es la de 260 nm, ya que a esta longitud de onda se puede observar cromatogramas con áreas superiores y significativos.

Así mismo, en el Anexo N° 24 podemos observar que los ácidos fenólicos (clorogénico, cafeico y ferúlico) no muestran diferencia significativa al espectro ultravioleta-visible, por lo tanto para realizar una mejor diferenciación de los compuestos se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), (Anexos N° 35 y 36), en el que se pudo observar la diferenciación de los tres componentes según tiempos de retención relativos.

Kemertelidze y Col. (2004), realizaron el aislamiento de flavonoides y otros compuestos fenólicos de las hojas de *Satureja hortensis*, reportando la presencia de apigenina, luteolina, cinarosido, luteolin 7- β -D-glucoronido, luteolin 7-rutinosido, ácido rosmarínico y ácido clorogénico. Los espectros ultravioleta reportados para el ácido rosmarínico ($\lambda_{nm} = 287, 325$) y ácido clorogénico ($\lambda_{nm} = 270, 336$) son similares a los reportados en el presente trabajo, por tanto, se asume que los ácidos fenólicos aislados en el presente trabajo corresponden a los ácidos fenólicos rosmarínico y clorogénico respectivamente.

Bandoniene y Col. (2005), realizaron la determinación de ácido rosmarínico de la salvia y hojas de borraja por cromatografía líquida de alta eficiencia y diferentes métodos de detección. Reportando el espectro del ácido rosmarínico a 330 y 290 nm, similar al obtenido en el presente trabajo.

Los ácidos fenólicos aislados demostraron tener actividad antioxidante al captar el radical libre DPPH tal como se muestra en el Gráfico N° 1 y la Tabla N° 6. Las concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ tuvieron una actividad antioxidante superior al 90%, mientras que a 10 $\mu\text{g/mL}$ tuvo una actividad de 60% y la vitamina C a las mismas concentraciones tuvo una actividad secuestradora del radical libre DPPH ligeramente superior y el estándar ácido cafeico fue ligeramente inferior a la vitamina C, seguido por el ácido ferúlico y el ácido clorogénico respectivamente. A las concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja brevicallix* no demuestran diferencias estadísticas entre la actividad secuestradora de la vitamina C y los ácidos cafeico, ferúlico y clorogénico. Pero si existe una diferencia en la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo N° 19).

Por lo tanto, podemos afirmar que los ácidos fenólicos aislados a 100 $\mu\text{g/mL}$ y 50

$\mu\text{g/mL}$ tienen una actividad secuestradora del radical libre DPPH semejante a la vitamina C y a los estándares ácidos cafeico, ferúlico y clorogénico.

Aguilar (2010), realizó la actividad antioxidante de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix* obteniendo resultados semejantes al trabajo realizado a 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, pero superior a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ obteniendo un porcentaje mayor a 90%, atribuyendo esta actividad a los flavonoides naringenina y apigenina.

Momtaz y Abdollahi (2010), en una revisión actualizada sobre las propiedades farmacológicas de varias especies del género *Satureja* refieren su alto contenido de compuestos fenólicos y la demostración de su actividad antioxidante. Pérez y Gallardo (2010), evaluaron un extracto metanólico de las hojas de *Satureja macrostema* sobre el DPPH, obteniendo como resultado una actividad secuestradora de un 89,7% a 100 $\mu\text{g/mL}$ menores al ácido ascórbico (97%), atribuyéndole esta actividad a los flavonoides del tipo flavona. Estos resultados son ligeramente inferiores a los obtenidos en la presente investigación.

VI. CONCLUSIONES

1. Los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja brevicallix* Epling "wayra muña" presentaron actividad antioxidante a las concentraciones de 100 µg/mL fue 96,40%, 50 µg/mL fue 94,80% y a 10 µg/mL fue 61,90%, respectivamente ($p < 0,05$).
2. Se logró aislar cuatro ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico y el ácido clorogénico), de las hojas de *Satureja brevicallix* Epling "wayra muña".
3. Se identificó por espectroscopia ultravioleta, infrarrojo y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) cuatro ácidos fenólicos, caracterizados como el ácido cafeico ($R_F = 0,807$), clorogénico ($R_F = 0,505$), ferúlico ($R_F = 0,854$) y rosmarínico ($R_F = 0,759$), con tiempos de retención de 10,375 minutos, 9,265 minutos, 14,112 minutos, 16,010 minutos, respectivamente. El más importante fue el ácido rosmarínico.
4. Los ácidos rosmarínico, ferulico, clorogénico y cafeico presentaron actividad antioxidante por la presencia en su estructura de grupos fenólicos libres.

VII. RECOMENDACIONES

1. Proseguir con el estudio de la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña" cuantificando cada uno de los componentes por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
2. Realizar la formulación de los ácidos fenólicos 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 hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña".
4. Realizar estudios de toxicidad de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña".

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aguilar, E.** 2010. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epi. "Wayra muña". Informe de investigación en desarrollo de potenciales económicas y bionegocios. Área de recursos biológicos y terapéuticos. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas. UNSCH. Ayacucho
2. **Autoi, A., Mansouri, A., Boskou, G., Kelafas, P.** 2005. Actividad antioxidante y compuestos fenólicos de infusión de te herbal. Instituto Mediterráneo de agronomía de Chania. Revista Food Chemistry Vol. 89, pp.: 27-39. Chania - Grecia
3. **Bandoniene, D., Murcovick, M., Venskutonis, P.** 2005. Determinación de Ácido Rosmarínico de la Salvia y Hojas de Borraja por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia y Diferentes Métodos de Detección. Instituto de Tecnología y Alimentos Químicos. Australia.
4. **Boveris, A.** 2005. La Evolución del Concepto de Radicales Libres en Biología y Medicina. Artículo N° 45 de la Academia Iberoamérica de Farmacia. Sevilla – España.
5. **Boveris, A., Costa, L., Junquera, V.** 2000. Envejecimiento mitocondrial. Ciencia e Investigación. Artículo N° 42 Academia Iberoamérica de Farmacia. Sevilla – España.
6. **Brack, A.** 1999. Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de Las Casas". Cusco - Perú
7. **Brako, L., Zarucchi, J.** 1993. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Monografía del Sistema Botánico. Missouri Botanical Garden. Vol 45, pp: 1-128. Estados Unidos

8. **Carhuapoma, M.** 2002. Taxonomía de las plantas medicinales Aromáticas Nativas de la Provincia de Huamanga y sus Perspectivas Económicas. UNSCH. Ayacucho – Perú.
9. **Carhuapoma, M.** 2007. Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña". Tesis para optar el Grado Doctor en Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima - Perú
10. **Castañeda, C., Ramos, E., Ibañez, V.** 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Medico – Vol. 8 N°1. Lima - Perú
11. **Chumacero, A., Iparraguire, D., Riofrío, O., Salas, E.** 2003. Género *Satureja* (Lamiaceae) en la etnomedicina andina. Facultad de Biología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima - Perú
12. **Decker, E.** 1997. Fenoles: prooxidantes y antioxidantes. Revista nutricional. España –Vol 12. pp.: 45-62. España
13. **Diez, J.** 2003. Efecto antiespasmódico de la "wayra muña" *Satureja brevicalyx* Epl. sobre íleo aislado de rata. Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. Ayacucho - Perú
14. **Font Quer, P.** 1988 Plantas medicinales. 7 ma. edición. Editorial Labor S.A. España.
15. **Guisado, I., Guisado, R., Bordés, R., García, M., Tristán, J.** 2007 Oxidación y Producción de Radicales Libres. Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. España
16. **Gramza, A., Korczak, J.** 2005. Constituyentes del té *Camellia sinensis*

- como antioxidantes del sistema lipídico. Ciencia y Tecnología. Lima - Perú
17. **Halliwell, B.** 1995. Radicales libre, antioxidantes y enfermedad humana. *The Lancet* Vol. 26, N° 2; pp.:38-45. Gran Bretaña
 18. **Kemertelidze, E., Sagareishvili, T., Syrov, V., Khushbaktova.** 2004. Chemical composition and pharmacological activity of garden savory (*Satureja hortensis* L.). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. Vol. 38, N° 6 - pp: 319– 325. Georgia
 19. **Korc, I., Bidegain, M., Martell, M.** 1995. Radicales Libres. Bioquímica y Sistemas Antioxidantes. *Revista Médica*. Vol.15 .Uruguay.
 20. **Lopez, R., Echevarri, F.** 2007. ¿Son seguros y efectivos los antioxidantes? Ciencia y Tecnología. Lima - Perú
 21. **Lock de Ugaz, O.** 1994. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de los productos naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.
 22. **Luna, A.** 2010. Envejecimiento humano una visión transdisciplinaria. Mecanismos endógenos de generación de especies reactivas de oxígeno y respuesta celular antioxidante ante el estrés oxidativo. *Revista del Instituto de geriatría*. 1ra. Edición. - pp: 93-102. México.
 23. **Magallanes, C., Aucasime, L., Romero, M.** 1994. "Estudio ecológico y etnobotánica de las plantas medicinales y altoandinas de Quinua y Chiara. Facultad de Ciencias Biológicas. Área de Botánica. UNSCH. Ayacucho - Perú.
 24. **Mendoza, J.** 2007. Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epi. "wayra muña" en ratas. Tesis para optar Título de Químico Farmacéutico. UNSCH. Ayacucho – Perú.

25. **Miranda, M., Cuellar, A.** 2000. Manual de Practicas de Laboratorio – Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Habana– Cuba
26. **Montaz, S., Abdollahi M.** 2010. An Update on Pharmacology of *Satureja* Species; From Antioxidant, Antimicrobial, Antidiabetes and Anti-hyperlipidemic to Reproductive Stimulation. International Journal of Pharmacology. Vol. 6 N° 4 – pp: 346 – 353.
27. **Mostaceros, J., Mejia, F.** 1993. Taxonomía de Fanerógamas Peruanas. CONCYTEC. Lima - Perú
28. **Muñoz, A., Ramos-Escudero, F., Alvarado, C.** 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina Humana. USMP. Lima - Perú
29. **Murillo, E.** 2002. Actividad antioxidante de bebidas de frutas y de Té comercializadas en Costa Rica. Universidad de Panamá/Instituto de Alimentación y Nutrición (IANUT). Panamá
30. **Neira, A., Yuri, J.** 2004. El valor nutritivo de la Fruta. Boletín Técnico. Pomaceas. Universidad de Talca. Vol 4. No 4. Chile
31. **Palomino, R.** 2005. Efecto antioxidante del extracto acuoso liofilizado de las hojas de las *Satureja brevicalyx Epl.* "wayra muña". Tesis para optar título de Químico Farmacéutico. UNSCH. Ayacucho - Perú.
32. **Pallavi, A., Balaraman, R.** 2004. Actividad antioxidante de una formulación herbomineral, en daños renales y cardiacos inducidos experimentalmente. Departamento de Farmacia. Facultad de Ingeniería y Tecnología. Universidad M.S. de Badora. India.

33. **Perez, R., Gallardo, Y.** 2010. Antioxidant and hepatoprotective effects of the metanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacognosy Magazine*. Vol. 6 N° 22 - pp: 125-131.
34. **Proteggente, A., Rice – Evans, C., Seman, S., Van de Put, F.** 2003. Relación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de frutas y verduras. *Revista Médica New York*. Vol. 10. Estados Unidos.
35. **Ríos de Molina, M.** 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química viva*. Vol. 2, pp: 73-80. Buenos Aires – Argentina.
36. **Rodríguez, J., Menéndez, J., Trujillo, Y.** 2001. Radicales libres en la biomédica y estrés oxidativo. Instituto Superior de Medicina Militar. Cuba
37. **Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K.** 2003. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. *J. Agric. Food Chcm.* 51, pp: 571-581. España
38. **Shahidi, F.** 2004. Comida Funcional. Rol en la prevención y promoción de enfermedades. *Ciencia Química* Vol. 1. España.
39. **Siquet, C., Paiva, F.** 2006. Antioxidantes y ácidos fenólicos. Relación estructura actividad. Lima - Perú
40. **Soto, M.** 1999. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad analgésica en diferentes extractos de la *Satureja brevicalyx Epi*. "wayra muña". Tesis para optar título de Químico Farmacéutica. UNSCH. Ayacucho - Perú
41. **Velasquez, M., Prieto, B., Contreras, R.** 2004. El Envejecimiento y los Radicales Libres. *Revista Ciencia*. Universidad Autónoma de Mexico.
42. **Villar del Fresno, A.** 1999. *Farmacognosia General*. Editorial Sintesis, S.A. España.

43. **Zamorra, S.** 2007. Antioxidantes y micronutrientes. Revista chilena de Nutrición –Vol. 8 pp.: 28-35. Chile
44. **Zavaleta, J., Muñoz, A., Blanco, T., Alvarado-Ortíz, C., Loja, B.** 2005. Capacidad Antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. Revista Horizonte Médico. 2005, 2(5):29-38. Lima - Perú

IX. ANEXOS

ANEXO N°1



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. **Lisbeth, LEÓN GÓMEZ**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de CRONQUIST. A. (1988), y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	LAMIALES
FAMILIA	:	LAMIACEAE
GENERO	:	Satureja
ESPECIE	:	<i>Satureja breviculix Epi.</i>
Nombre vulgar.	:	"inca muña", wayra muña"

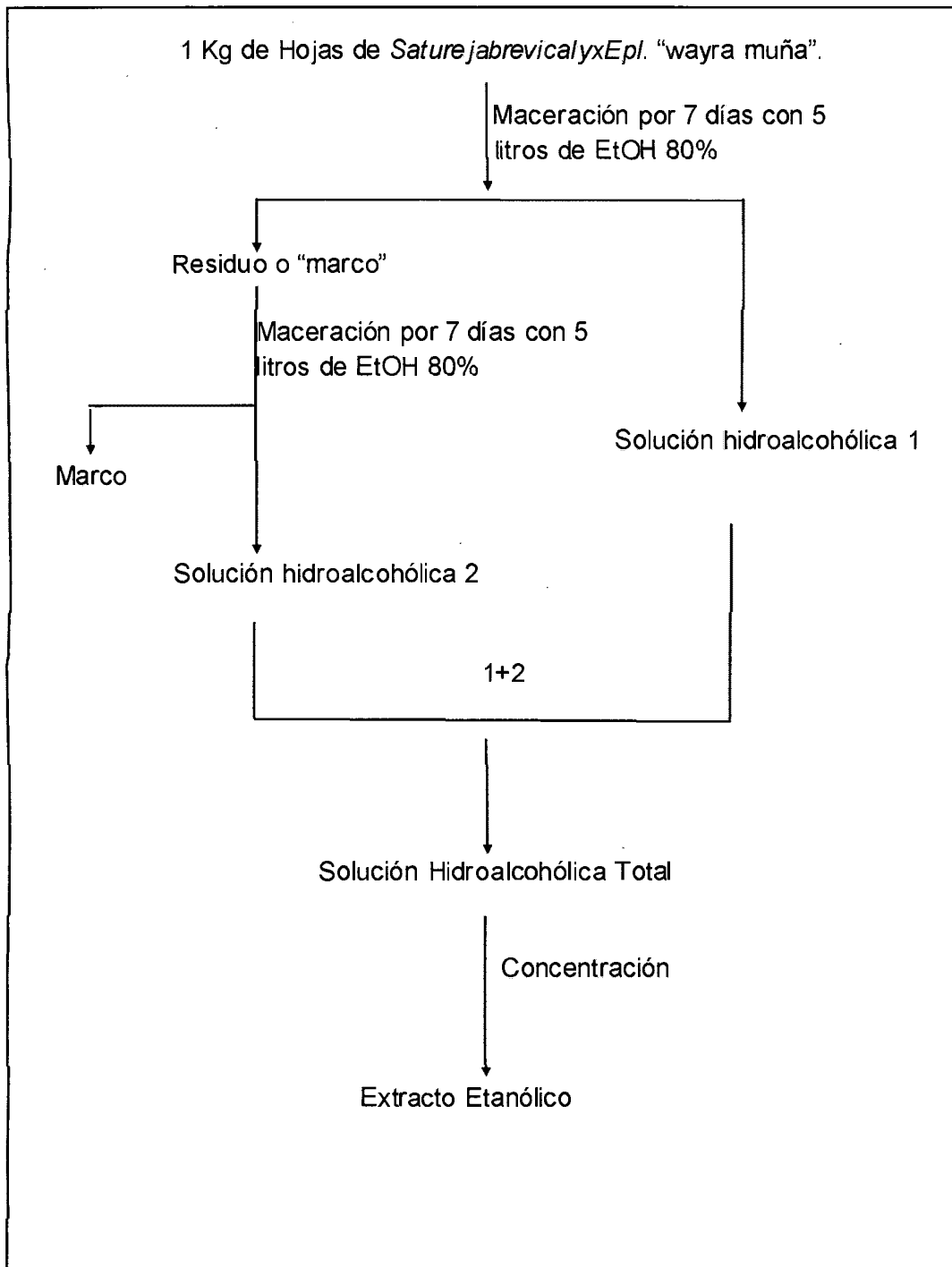
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 12 de Julio del 2012

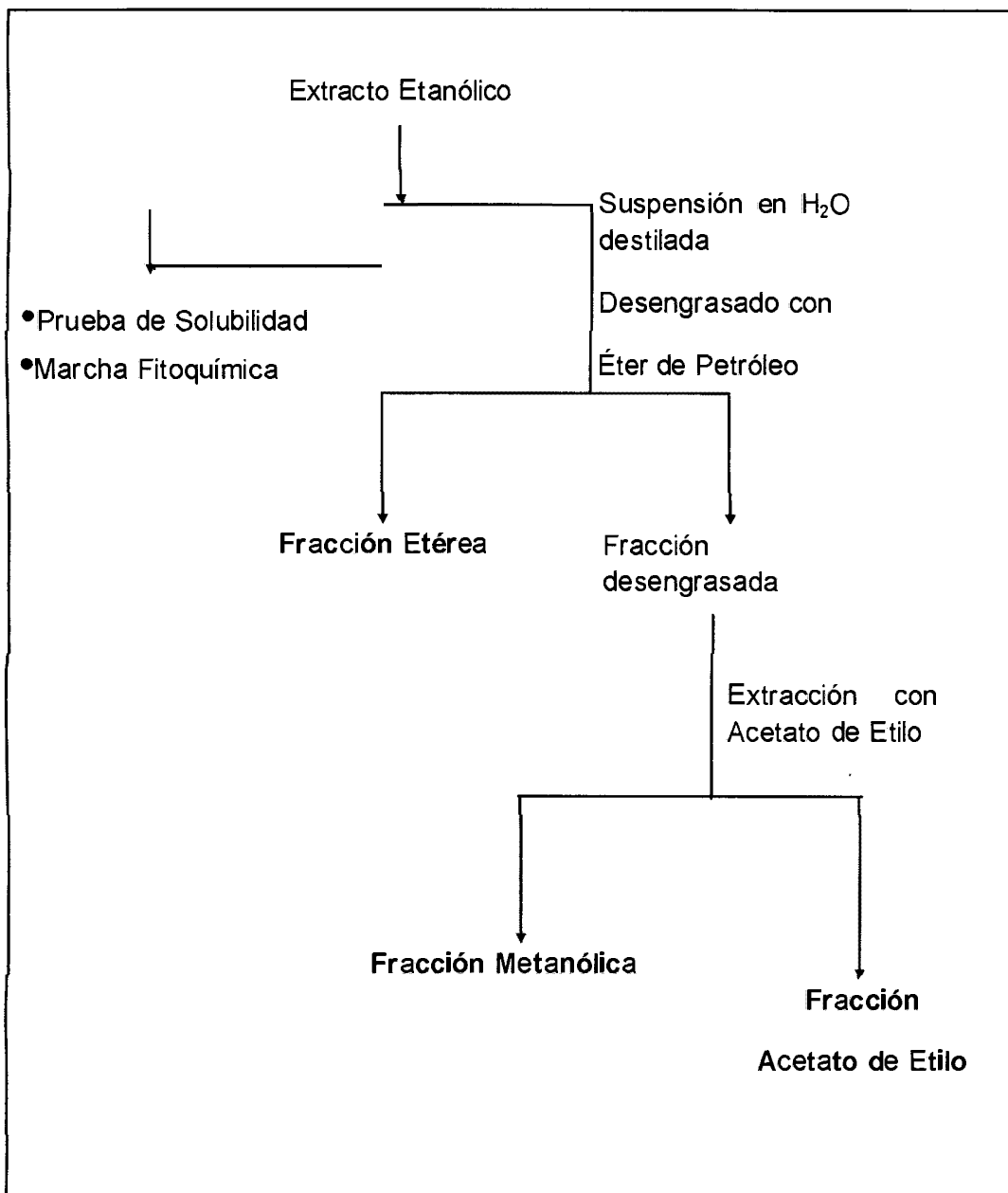
UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Dña. Laura Apacana Medina
JFE

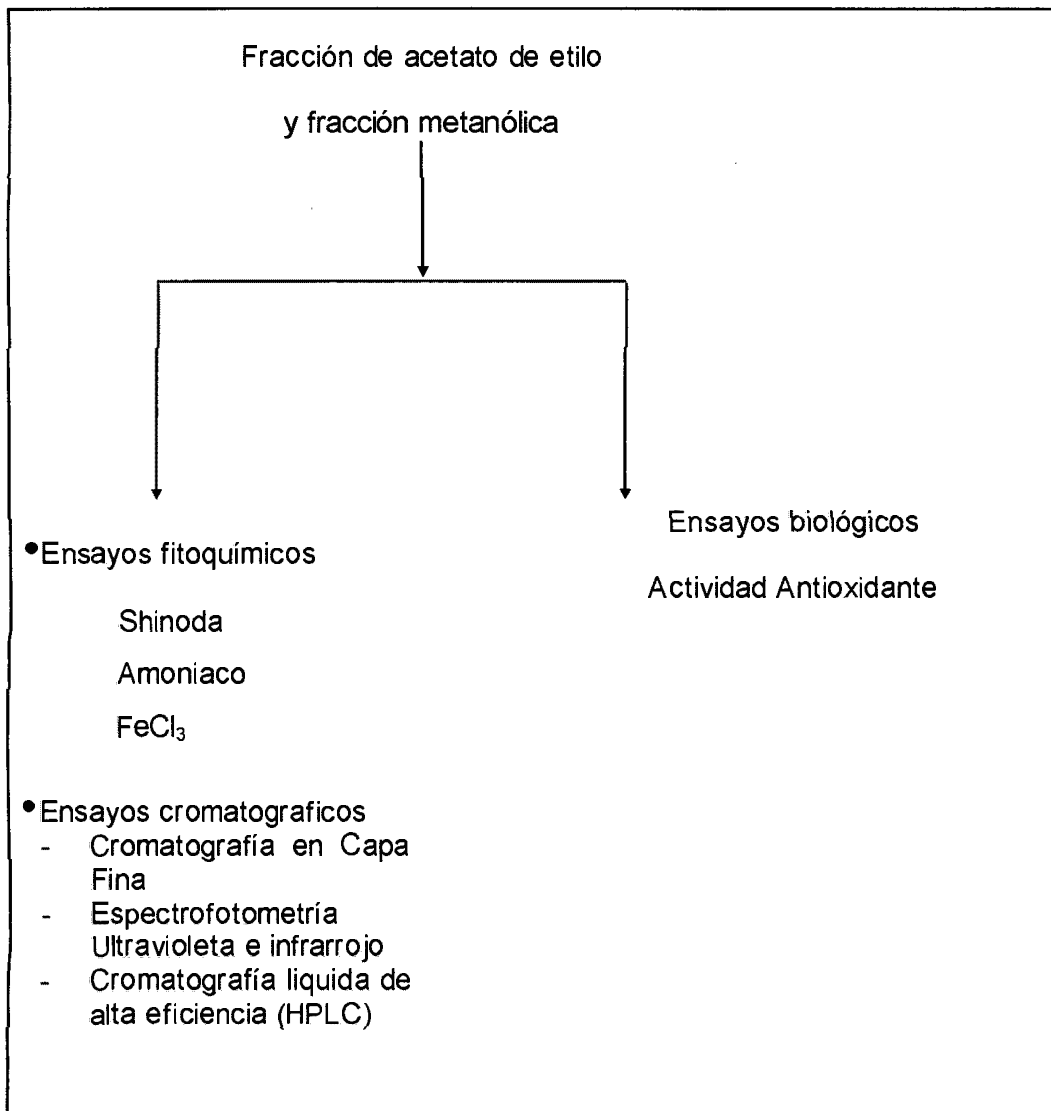
ANEXO Nº 2. Esquema de la obtención del Extracto etanólico de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epling "wayra muña".



ANEXO N° 3. Esquema del fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas de *Satureja brevicallix* Epling "wayra muña".



ANEXO Nº 4. Esquema de las pruebas fitoquímicas, cromatográficas y biológicas de la fracción de acetato de etilo de las hojas de *Satureja brevicallix* Epling "wayra muña".



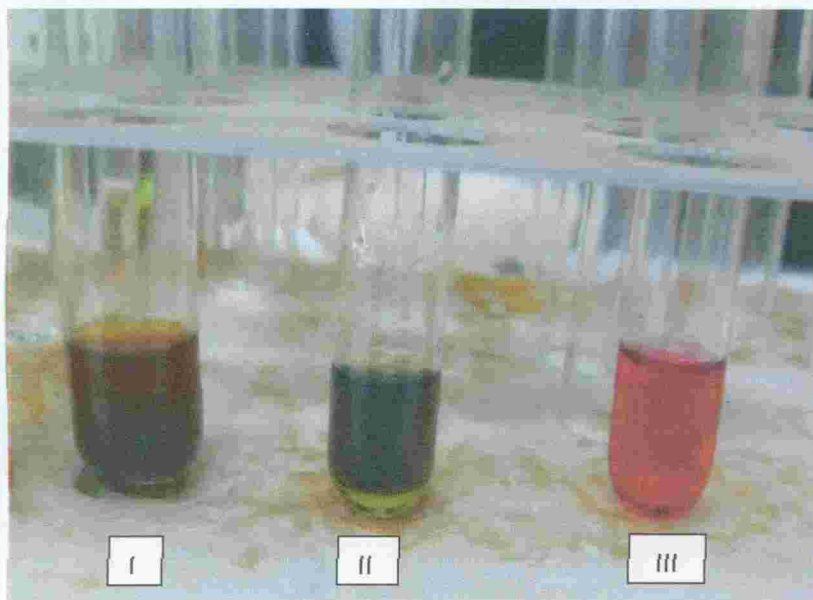
ANEXO Nº 5. Concentración del extracto hidroalcohólico en rota vapor BUCHI-R3000 de las hojas de *Satureja brevicallix* Epling "wayra muña".



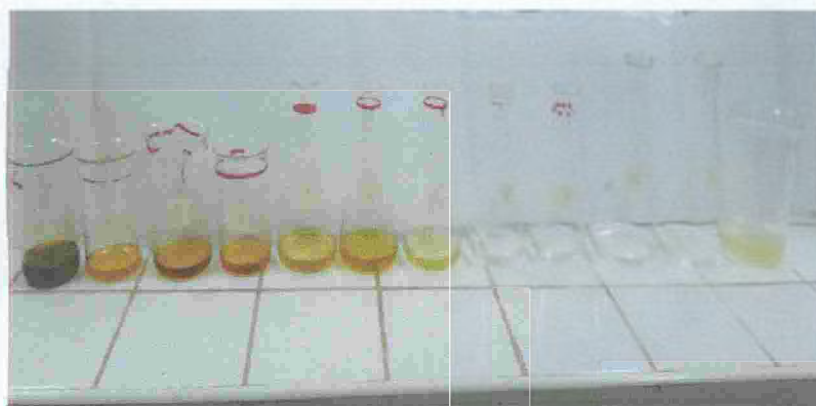
ANEXO Nº 6. Extracción Líquido-Líquido del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja brevicallix* Epling "wayra muña".



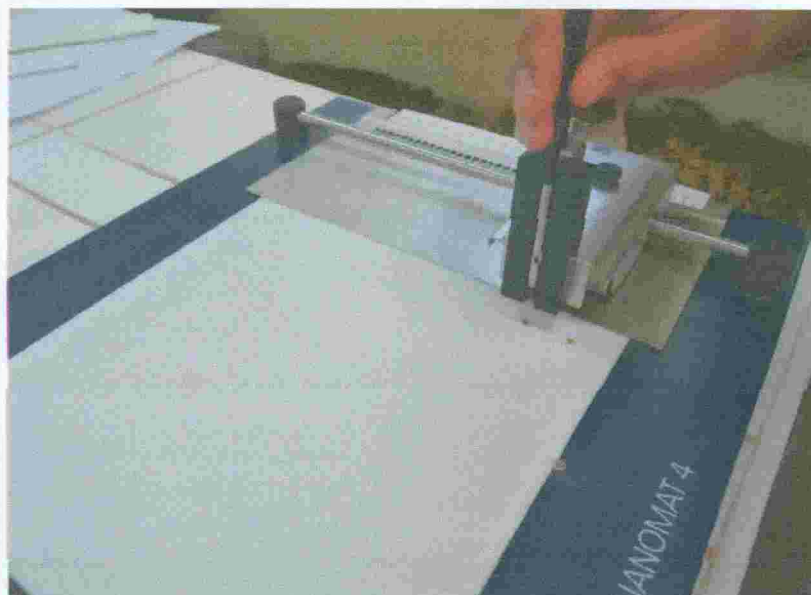
ANEXO Nº 7. Reacción de Shinoda a las fracciones de éter de petróleo (I), cloroformo (II) y acetato de etilo (III) de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña".



ANEXO Nº 8. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna flash.



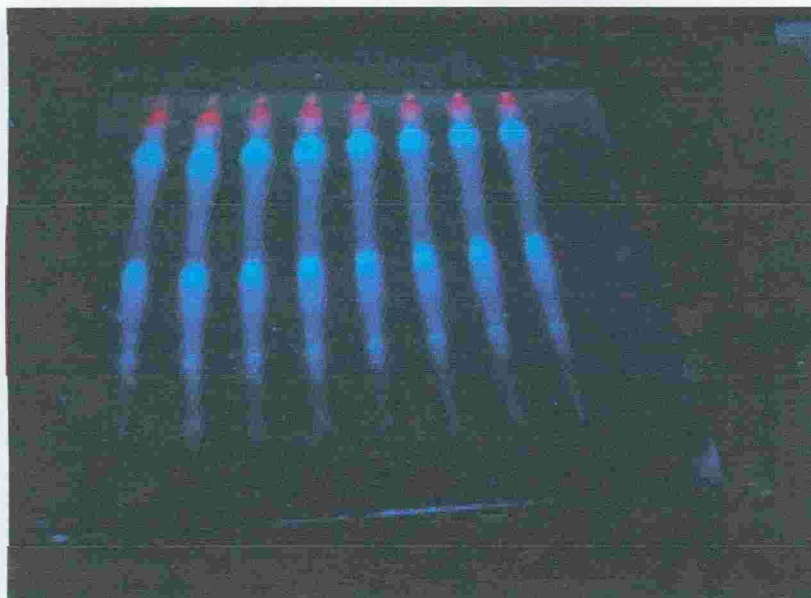
ANEXO Nº 9. Sembrado en placa cromatográfica de capa fina 20 x 20 conteniendo silicagel G 254 (Merck).



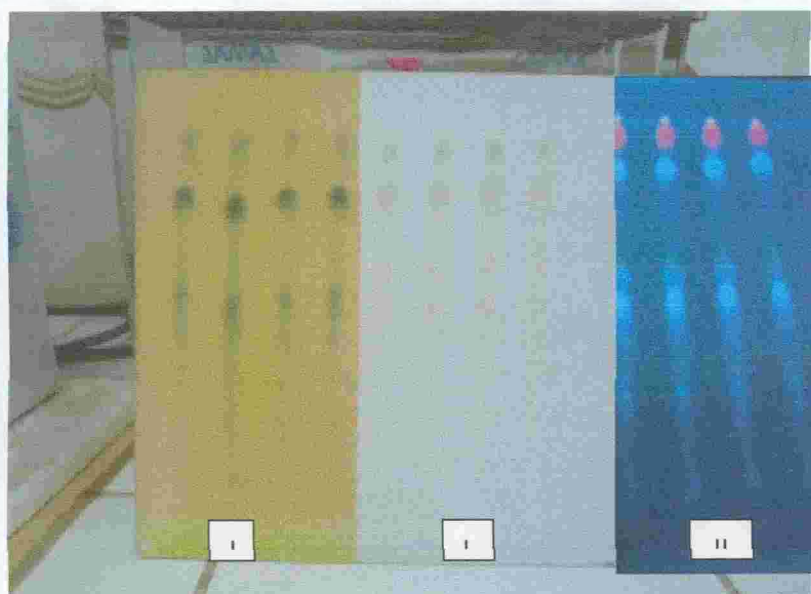
ANEXO Nº 10. Desarrollo de la cromatografía de capa fina del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña".



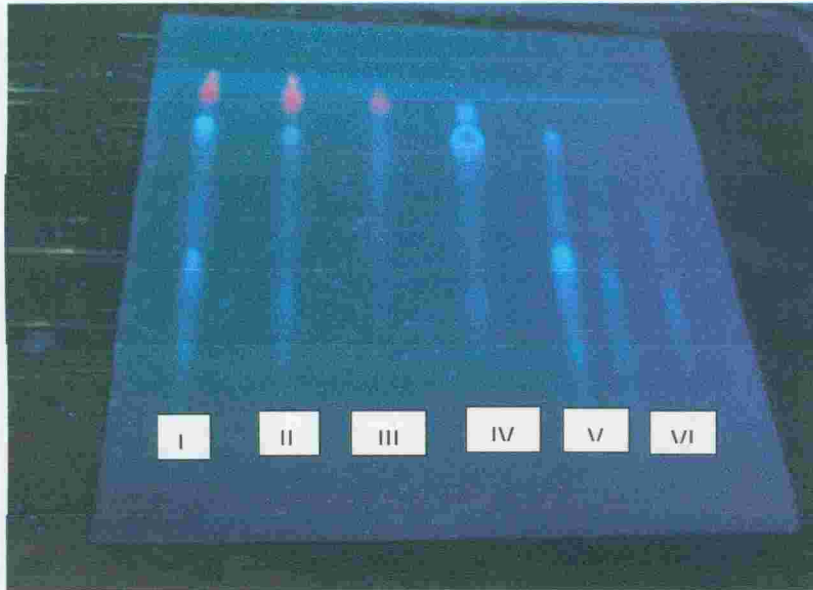
ANEXO Nº 11. Cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja breviculix* Epling “wayra muña”, reveladas con luz ultravioleta.



ANEXO Nº 12. Cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja breviculix* Epling “wayra muña”, reveladas con cloruro férrico al 5 % (I), amoníaco (II) y luz ultravioleta (III).



ANEXO Nº 13. Cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico total (I), fracción de eter de petroleo (II), fracción cloroformica (III), Fracción de acetato de etlio (IV), fracción metanólica (V), fracción acuosa (VI).



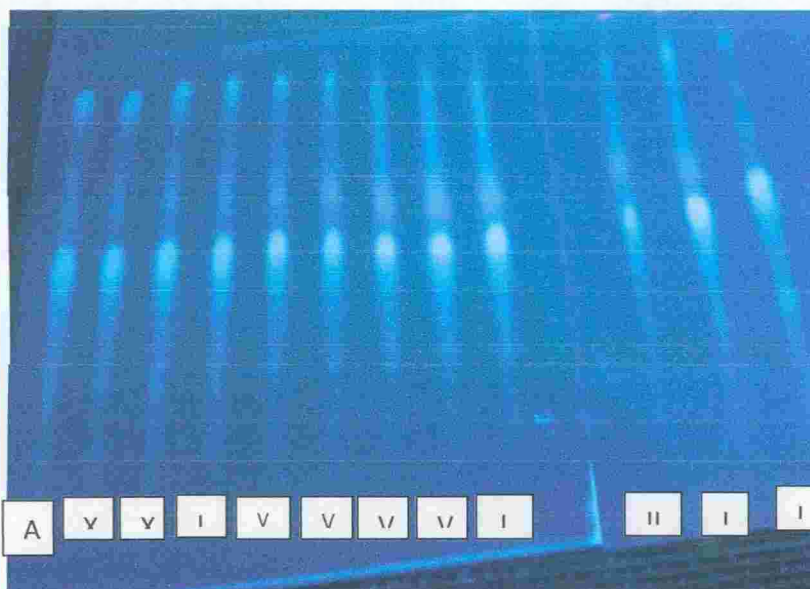
ANEXO Nº 14. Reacción de Shinoda.



ANEXO Nº 15. Reacción con cloruro férrico al 5%.



ANEXO Nº 16. Cromatografía en capa fina de las 12 fracciones que contienen ácidos fenólicos reveladas a la luz ultravioleta.



ANEXO Nº 17. Equipo (espectrofotómetro FT-IR de alta resolución Cary 660).



ANEXO Nº 18. Programación del cromatografo líquido de alta eficiencia (HPLC – Merck Hitachi Lachrom Elite).



ANEXO N° 19. Análisis de varianza del porcentaje de la Actividad secuestradora del DPPH por parte de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja brevicallix* Epling "wayra muña".

ANOVA^{ab}

			Método único				
			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Captación del DPPH(%)	Covariables	Tratamientos	400.178	1	400.178	10.506	.003
	Efectos principales	Concentración	2011.968	2	1005.984	26.411	.000
	Modelo		2412.146	3	804.049	21.109	.000
	Residual		1218.862	32	38.089		
	Total		3631.009	35	103.743		

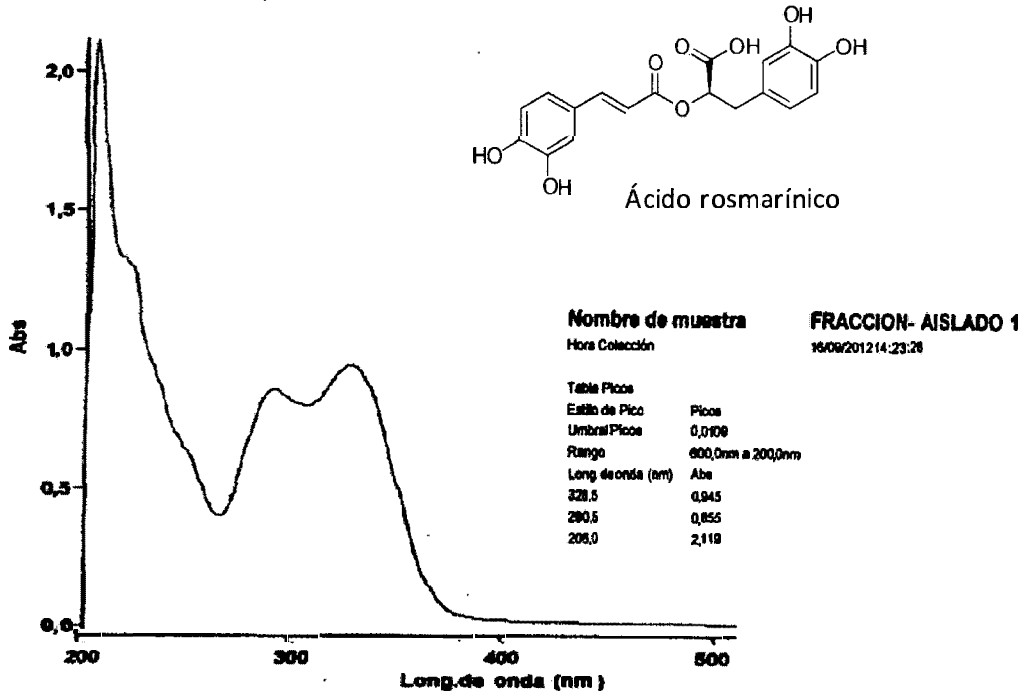
a. Captación del DPPH(%) por Concentración con Tratamientos

b. Todos los efectos introducidos simultáneamente

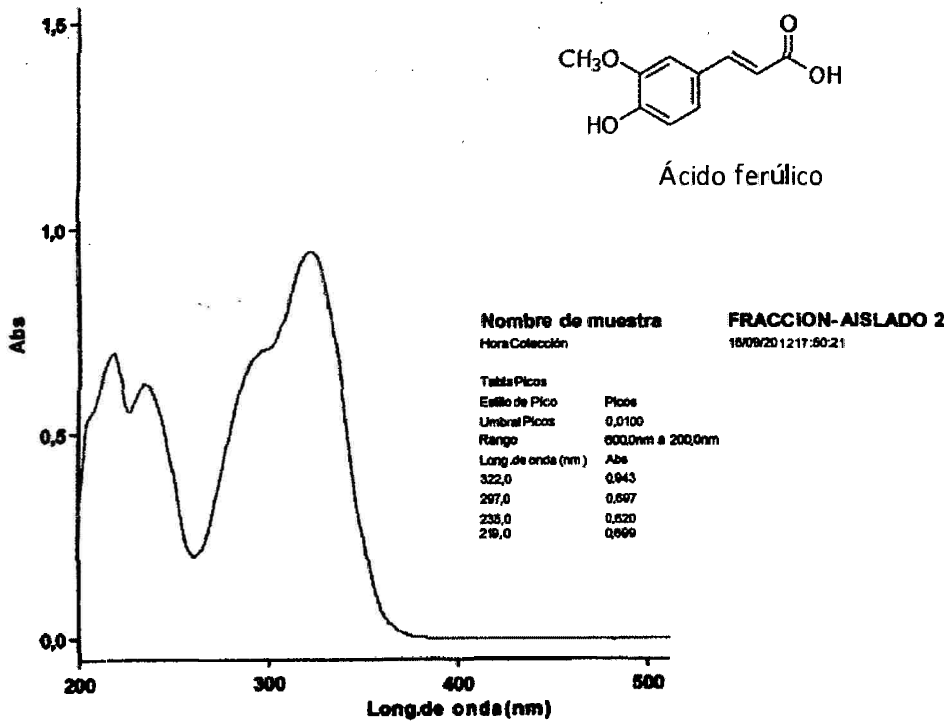
ANEXO N° 20. Lecturas realizadas en el espectrofotómetro Agilent Cary 60 - para determinar la Actividad secuestradora del DPPH por parte de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja brevicallix* Epling "wayra muña".

muestras	Lecturas a 515 nm				
	Concentración (µg/mL)	Absorbancia			Blanco Absorbancia
		Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	
DPPH	20	0,537	0,537	0,537	-
Vitamina C	100	0,012	0,012	0,013	0,000
	50	0,022	0,022	0,020	
	10	0,027	0,028	0,028	
Ácido Clorogénico	100	0,018	0,016	0,017	0,001
	50	0,032	0,033	0,034	
	10	0,101	0,104	0,102	
Ácido Cafeico	100	0,011	0,012	0,010	0,002
	50	0,025	0,026	0,024	
	10	0,038	0,036	0,035	
Ácido ferúlico	100	0,010	0,011	0,010	0,001
	50	0,031	0,032	0,031	
	10	0,085	0,082	0,081	
Ácidos fenólicos	100	0,024	0,025	0,024	0,005
	50	0,033	0,034	0,032	
	10	0,211	0,208	0,210	

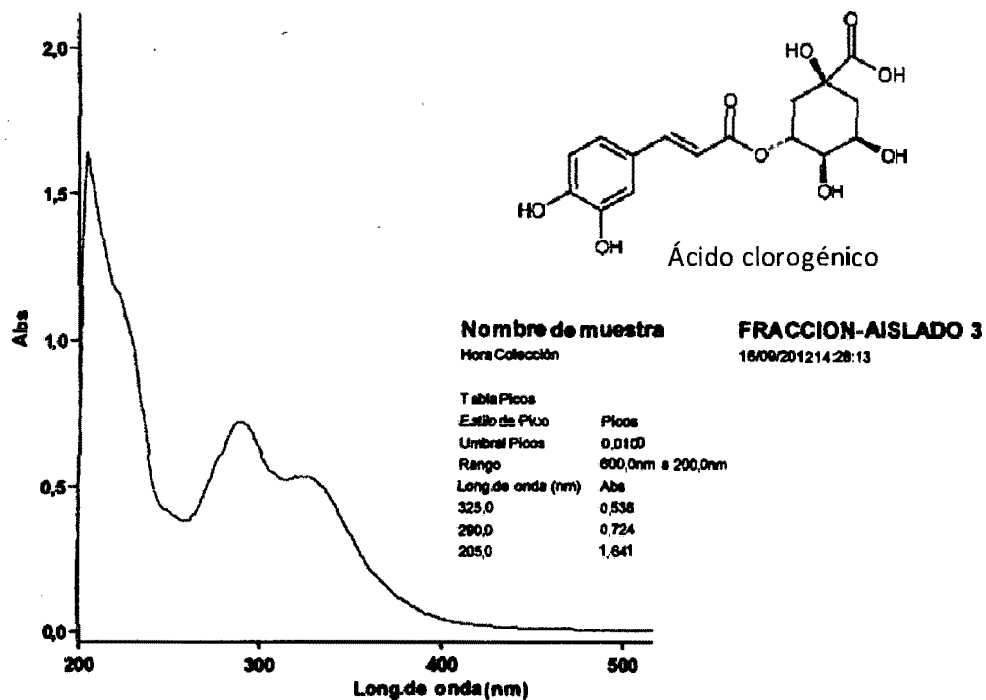
ANEXO Nº 21. Espectro ultravioleta de la fracción aislado 1



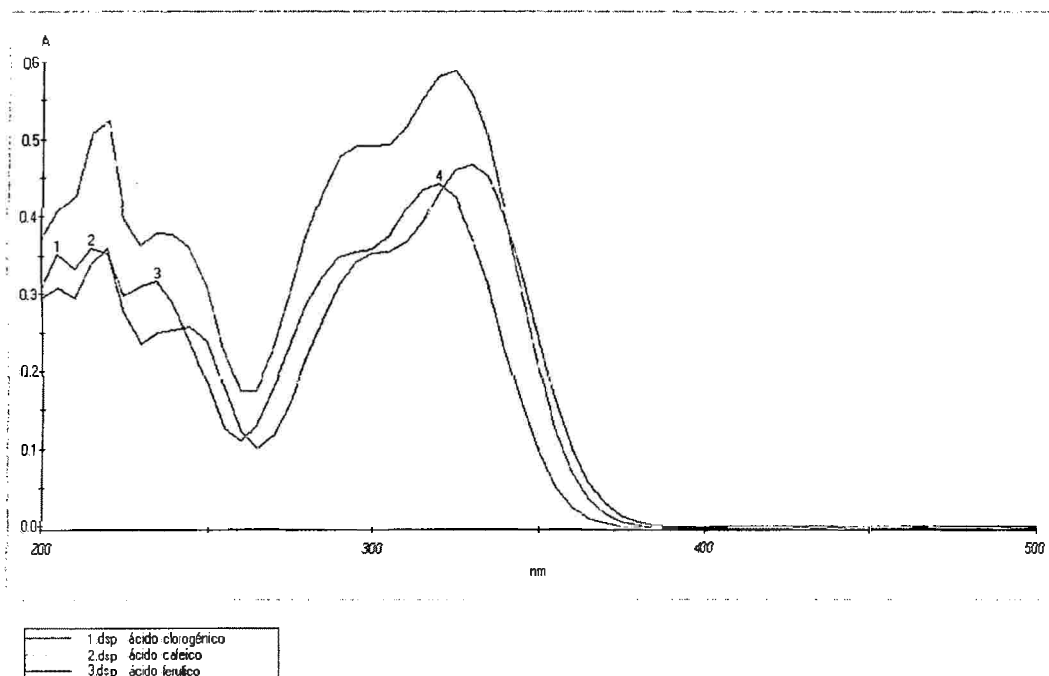
ANEXO Nº 22. Espectro ultravioleta de la fracción aislado 2



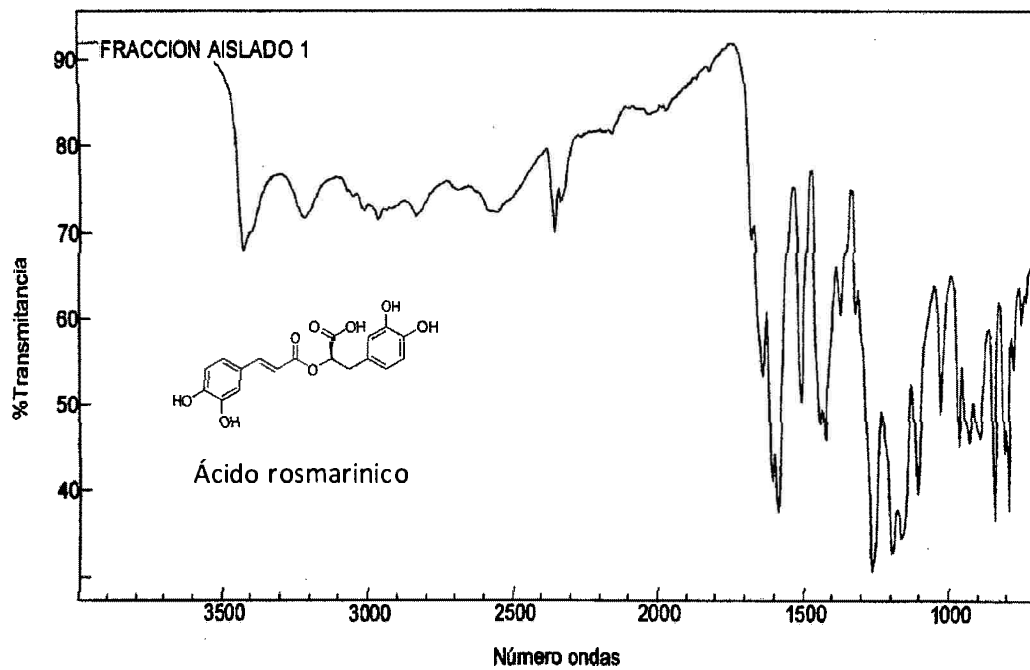
ANEXO Nº 23. Espectro ultravioleta de la fracción aislado 3



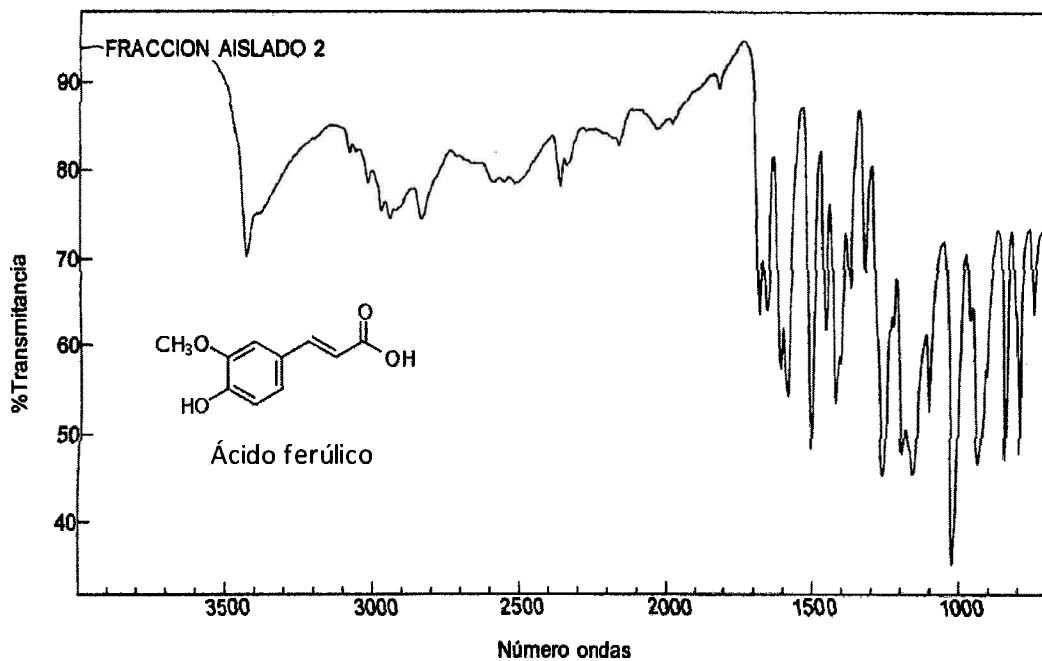
ANEXO Nº 24. Espectro ultravioleta de los estándares de ácidos fenólicos ácido clorogénico (1), Ácido cafeico (2), ácido ferúlico (3)



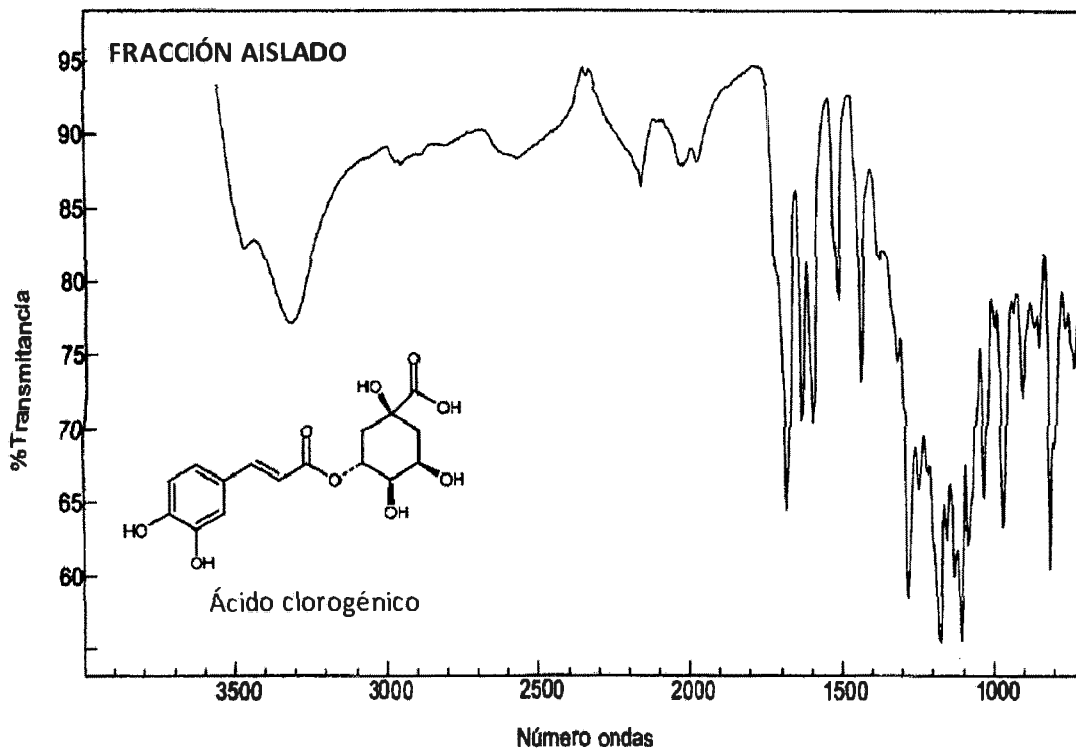
ANEXO Nº 25. Espectro infrarrojo de la fracción aislado



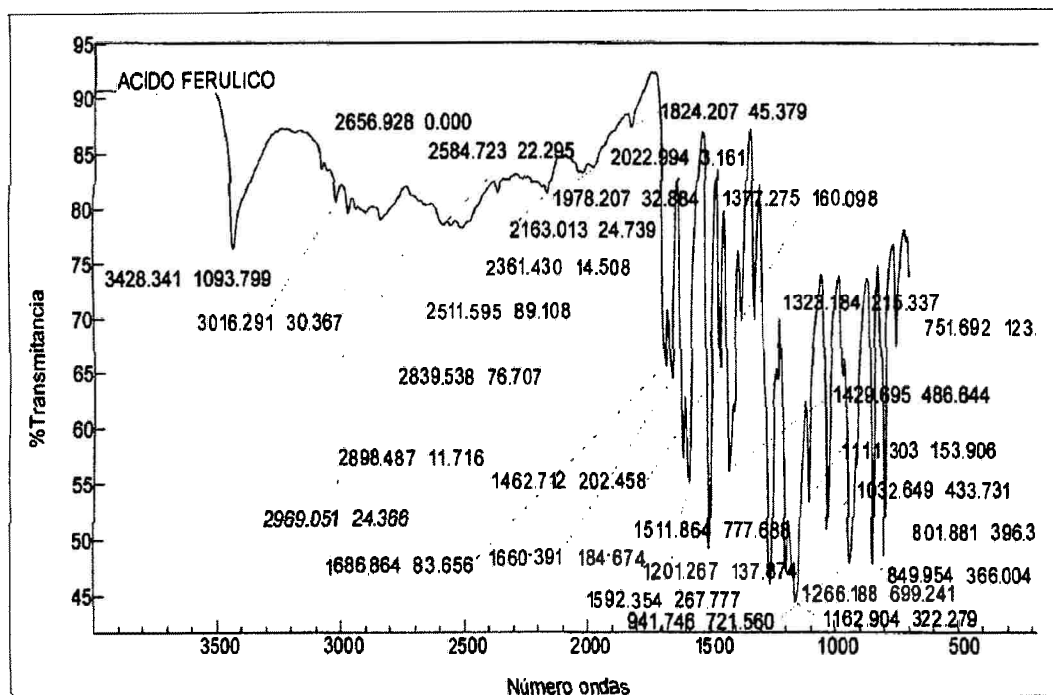
ANEXO Nº 26. Espectro infrarrojo de la fracción aislado 2



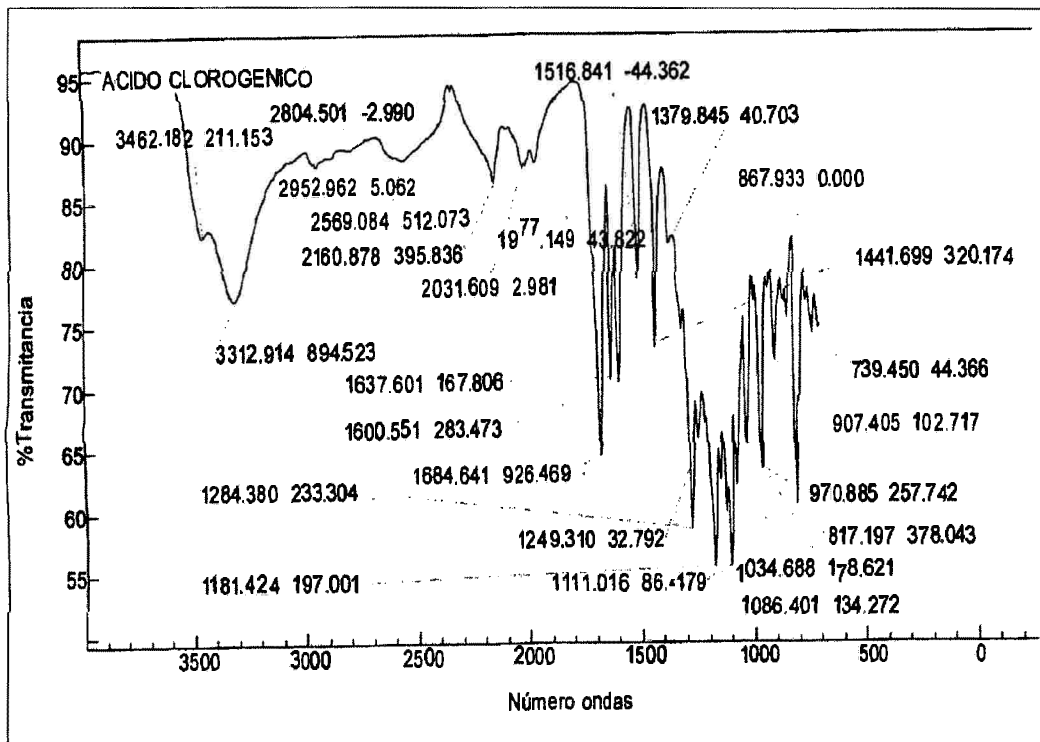
ANEXO Nº 27. Espectro infrarrojo de la fracción aislado 3



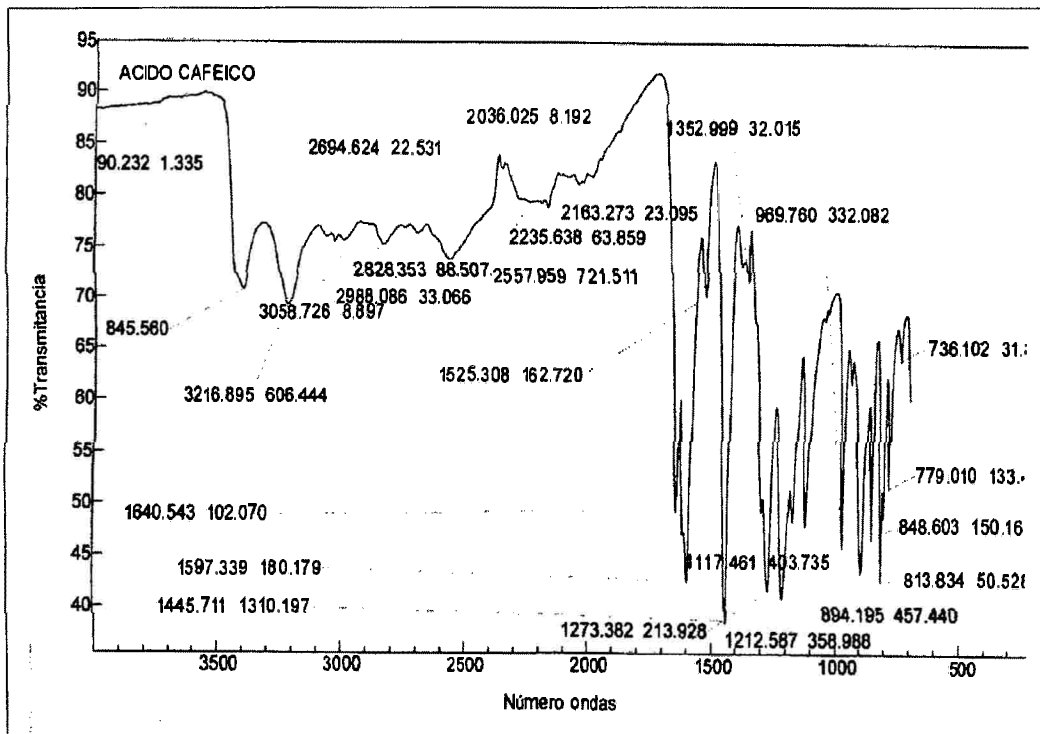
ANEXO Nº 28. Espectro infrarrojo de la fracción aislado 3



ANEXO Nº 29. Espectro infrarrojo del estándar ácido clorogénico



ANEXO Nº 30. Espectro infrarrojo del estándar ácido cafeico

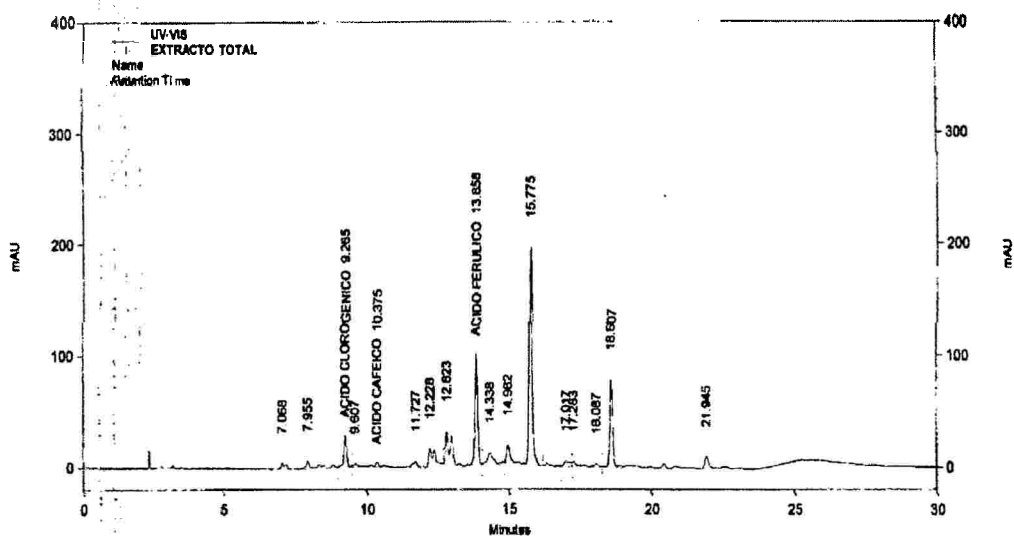


ANEXO Nº 31. Cromatograma resultante del extracto total de *Satureja brevicallix*

Epling "wayra muña mediante un sistema de HPLC determinados a 260nm

LCU2 (Offline) CC-UC-103
 C:\ACIDOS FENOLICOS\260nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALLIX\EXTRACTO TOTAL.dat

EXTRACTO TOTAL



UV-VIS Results

Name	Retention Time	Area	Area Percent
	7.068	237081	1.512
	7.955	174129	1.111
ACIDO CLOROGENICO	9.265	719647	4.591
	9.607	91912	0.586
ACIDO CAFEICO	10.375	103137	0.658
	11.727	236138	1.506
	12.228	789203	5.034
	12.823	1358801	8.668
ACIDO FERULICO	13.858	2526942	16.119
	14.338	597600	3.812
	14.982	515124	3.286
	15.775	5381376	34.328
	17.017	248458	1.585
	17.283	124958	0.797
	18.087	78694	0.502
	18.607	2108768	13.452
	21.945	384388	2.452

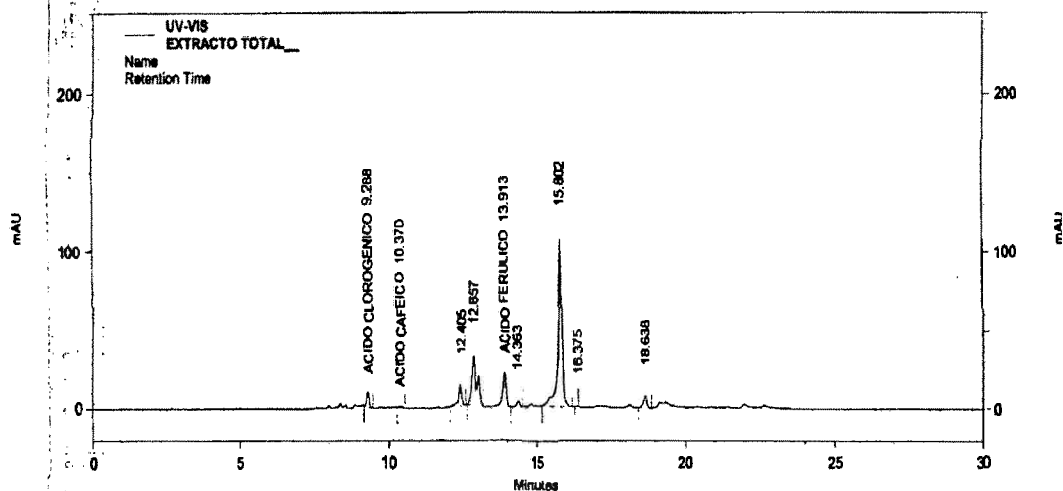
Totals		15676356	100.000
--------	--	----------	---------

ANEXO Nº 32. Cromatograma resultante del extracto total de *Satureja brevicalix*

Epling "wayra muña" mediante un sistema de HPLC determinados a 370nm.

LC02 (Offline) CC-UC-103
 C:\Method\ACIDOS FENOLICOS\370nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\EXTRACTO TOTAL.dat

EXTRACTO TOTAL



UV-VIS Results

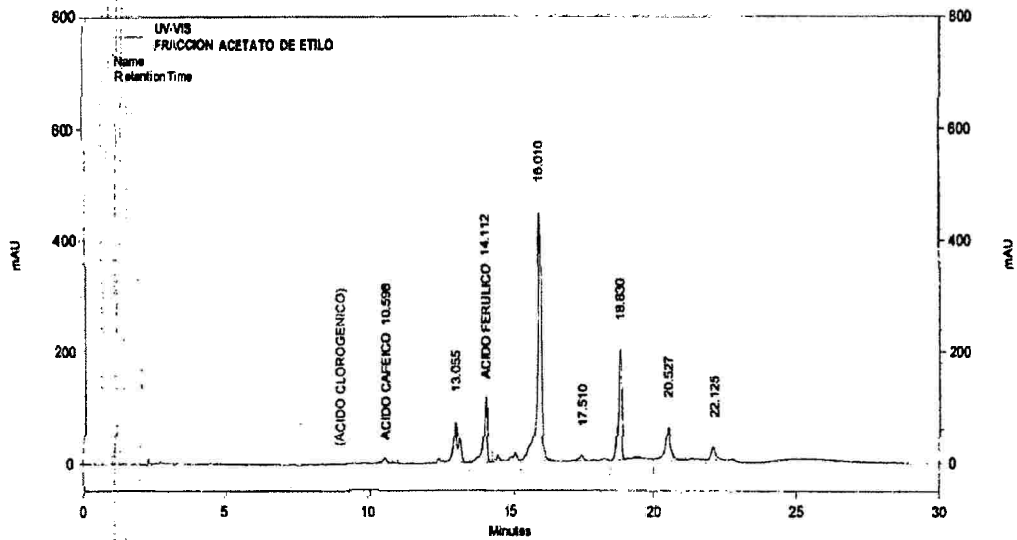
Name	Retention Time	Area	Area Percent
ACIDO CLOROGENICO	9.288	201005	2.801
ACIDO CAFEICO	10.370	30768	0.429
	12.405	367833	5.126
	12.857	1515692	21.121
ACIDO FERULICO	13.913	742833	10.351
	14.363	118995	1.658
	15.802	3953188	55.086
	16.375	5818	0.081
	18.638	240215	3.347

Totals		7176347	100.000
--------	--	---------	---------

ANEXO Nº 33. Cromatograma resultante de la fracción acetato de etilo mediante un sistema de HPLC determinados a 260nm

LCU2 (Offline) CC-UC-103
 C:\ACIDOS FENOLICOS\260nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\FRACCION ACETATO DE ETILO1.dat

FRACCION ACETATO DE ETILO



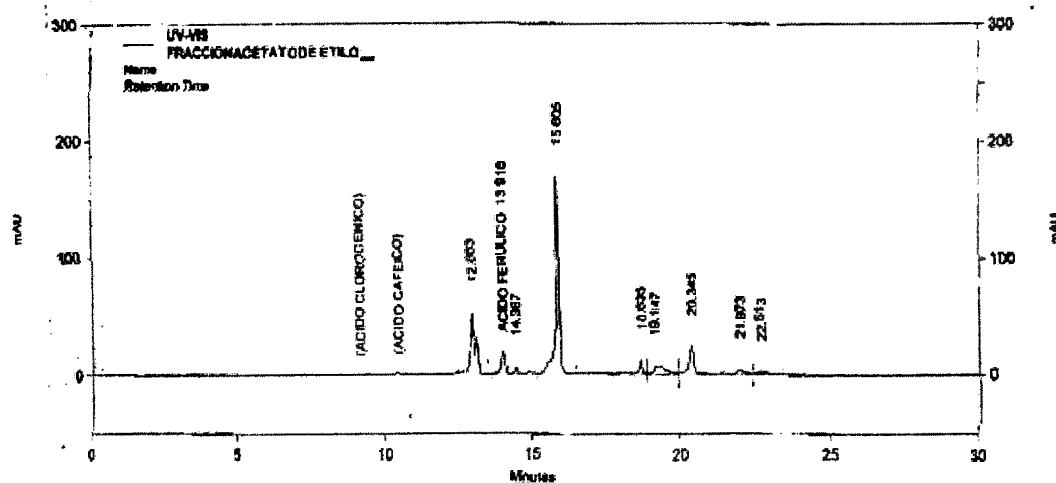
UV-VIS Results

Name	Retention Time	Area	Area Percent
ACIDO CLOROGENICO			
ACIDO CAFEICO	10.598	485694	1.352
	13.055	3480974	9.686
ACIDO FERULICO	14.112	3996674	11.121
	16.010	17595612	48.963
	17.510	342552	0.953
	18.030	6303418	17.540
	20.527	2720915	7.571
	22.125	1010798	2.813
Totals		35936637	100.000

ANEXO Nº 34. Cromatograma resultante de la fracción acetato de etilo mediante un sistema de HPLC determinados a 370nm.

LCU2 (Offline) CC-UC-103
 C:\Method\ACIDOS FENOLICOS\370nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\FRACCION ACETATO DE ETILO.dat

FRACCION ACETATO DE ETILO

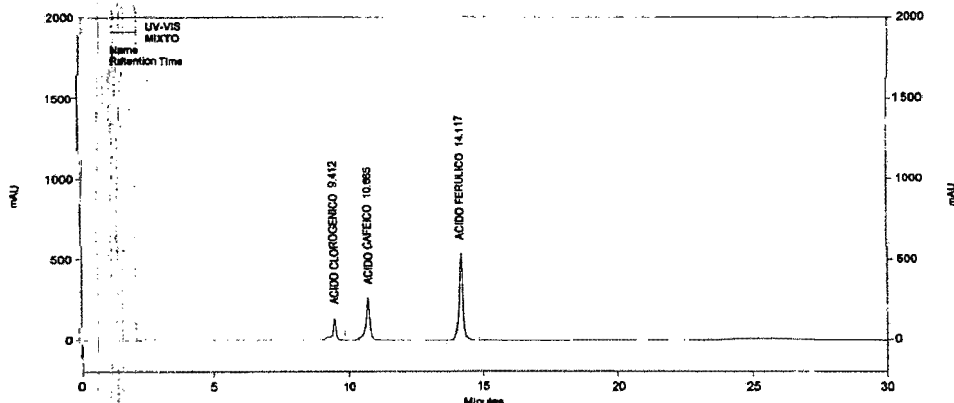


UV-VIS Results			
Name	Retention Time	Area	Area Percent
ACIDO CLOROGENICO			
ACIDO CAFEICO			
ACIDO FERULICO	12.863	2678572	22.212
	13.918	666308	5.141
	14.367	188516	1.455
	15.805	6470053	49.924
	18.635	363955	2.808
	19.147	795287	6.137
	20.345	1100092	8.488
	21.973	259016	1.999
	22.613	238019	1.837
Totals		12959818	100.000

ANEXO Nº 35. Cromatograma resultante de los estándares de los ácidos fenólicos mediante un sistema de HPLC determinados a 260nm.

LCU2 (Offline) CC-UC-103
 C:\ACIDOS FENOLICOS\260nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\MIXTO.dat

ESTANDAR MIXTO

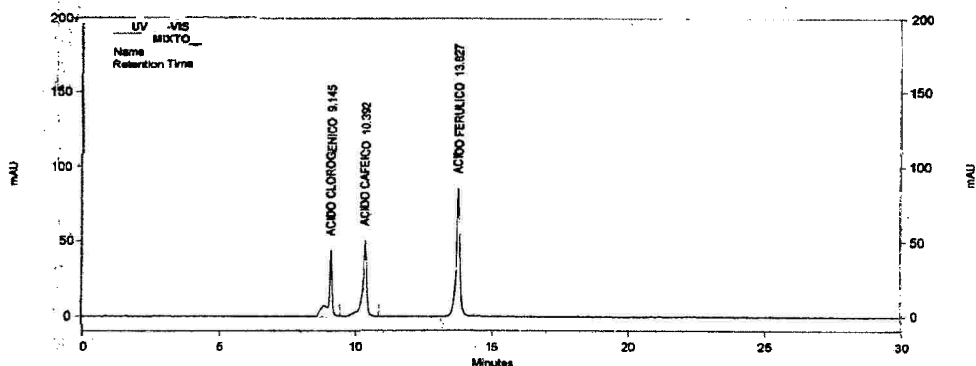


UV-VIS Results			
Name	Retention Time	Area	Area Percent
ACIDO CLOROGENICO	9.412	5158420	13.725
ACIDO CAFEICO	10.665	10828027	28.811
ACIDO FERULICO	14.117	21596345	57.463
Totals		37582792	100.000

ANEXO Nº 36. Cromatograma resultante de los estándares de los ácidos fenólicos mediante un sistema de HPLC determinados a 370nm.

LCU2 (Offline) CC-UC-103
 C:\Method\ACIDOS FENOLICOS\370nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\MIXTO.dat

ESTANDAR MIXTO

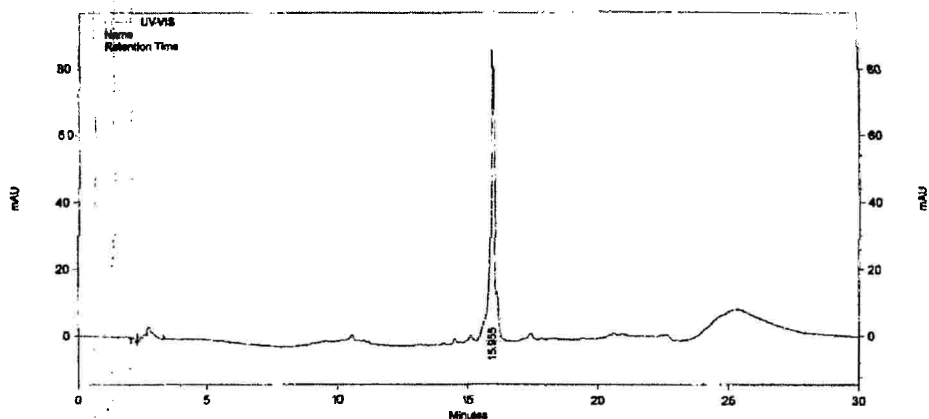


UV-VIS Results			
Name	Retention Time	Area	Area Percent
ACIDO CLOROGENICO	9.145	1598383	22.751
ACIDO CAFEICO	10.392	2070848	29.476
ACIDO FERULICO	13.827	3356353	47.773
Totals		7025584	100.000

ANEXO Nº 37. Cromatograma resultante de la fracción aislado 1 (ácido rosmarínico) mediante un sistema de HPLC determinados a 260nm.

LCU2 (Offline) CC-UC-103
 C:\ACIDOS FENOLICOS\260nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\FRACCION - AISLADO1.dat

FRACCION - AISLADO 1

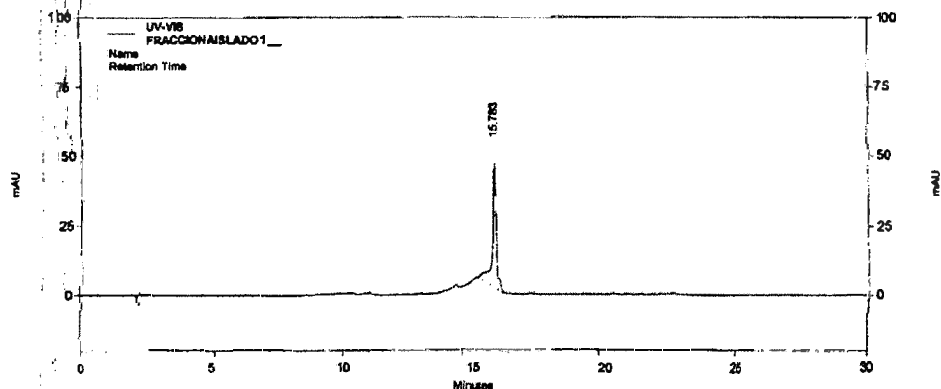


UV-VIS Results			
Name	Retention Time	Area	Area Percent
	15.955	3921766	100.000
Totals		3921766	100.000

ANEXO Nº 38. Cromatograma resultante de la fracción aislado 1 (ácido rosmarínico) mediante un sistema de HPLC determinados a 370nm.

LCU2 (Offline) CC-UC-103
 C:\Method\ACIDOS FENOLICOS\370nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\FRACCION AISLADO1.dat

FRACCION AISLADO1

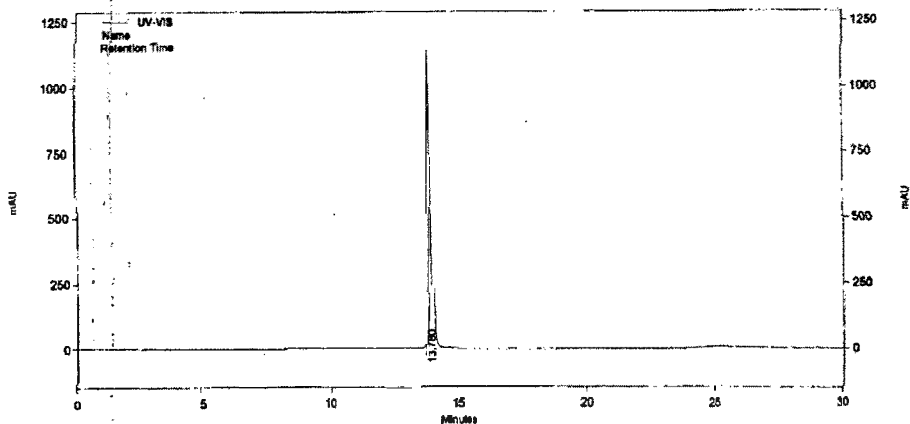


UV-VIS Results			
Name	Retention Time	Area	Area Percent
	15.783	1833403	100.000
Totals		1833403	100.000

ANEXO Nº 39. Cromatograma resultante de la fracción aislada 2 (ácido ferúlico)
mediante un sistema de HPLC determinados a 260nm.

LCU2 (Offline) CC-UC-103
C:\ACIDOS FENOLICOS\260nm.met
C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\FRACCION - AISLADO2.dat

FRACCION - AISLADO 2

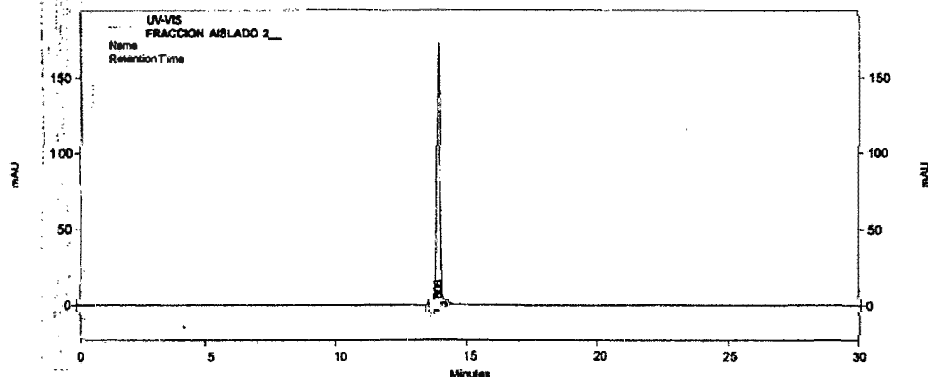


UV-VIS Results			
Name	Retention Time	Area	Area Percent
	13.780	37357613	100.000
Totals		37357613	100.000

ANEXO Nº 40. Cromatograma resultante de la fracción aislado 2 (ácido ferúlico)
mediante un sistema de HPLC determinados a 370nm.

LCU2 (Offline) CC-UC-103
C:\Method\ACIDOS FENOLICOS\370nm.met
C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\FRACCION AISLADO2.dat

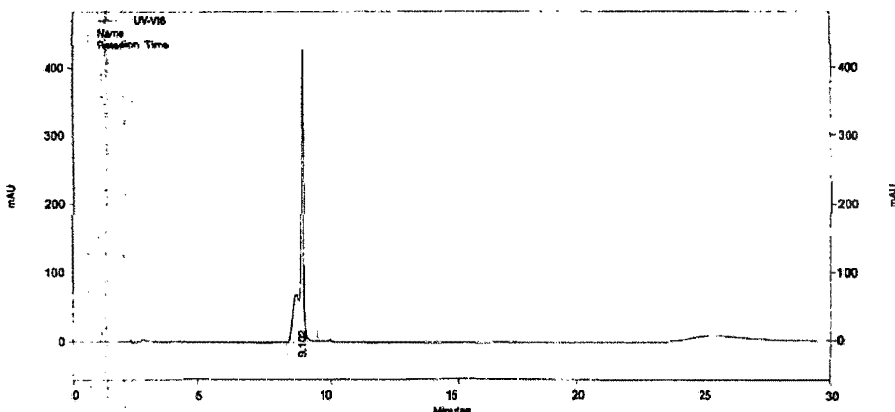
FRACCION AISLADO1 2



UV-VIS Results			
Name	Retention Time	Area	Area Percent
	13.808	5700378	100.000
Totals		5700378	100.000

ANEXO Nº 41. Cromatograma resultante de la fracción aislado 3 (ácido clorogénico) mediante un sistema de HPLC determinados a 260nm.

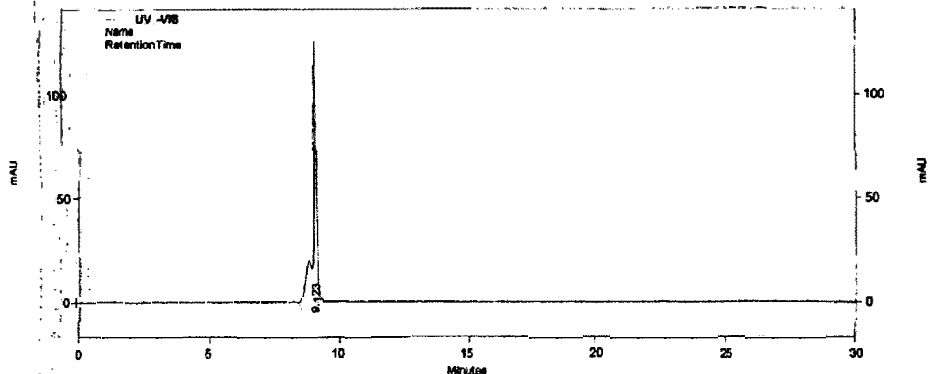
LCU2 (Offline) CC-UC-103
 C:\ACIDOS FENOLICOS\260nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\FRACCION - AISLADO3.dat
 FRACCION - AISLADO 3



UV-VIS Results			
Name	Retention Time	Area	Area Percent
	9.102	15423946	100.000
Totals		15423946	100.000

ANEXO Nº 42. Cromatograma resultante de la fracción aislado 3 (ácido clorogénico) mediante un sistema de HPLC determinados a 370nm

LCU2 (Offline) CC-UC-103
 C:\Method\ACIDOS FENOLICOS\370nm.met
 C:\Sequence\ACIDOS FENOLICOS\16-09-2012.seq
 C:\Data\ACIDOS FENOLICOS\SATUREJA BREVICALIX\FRACCION AISLADO3.dat
 FRACCION AISLADO 3



UV-VIS Results			
Name	Retention Time	Area	Area Percent
	9.123	4499686	100.000
Totals		4499686	100.000

ANEXO N° 43: Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
Actividad Antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de <i>Satureja brevicallix</i> Epling "wayra muña". Ayacucho - 2012.	¿Tendrá actividad antioxidante los ácidos fenólicos aislados de las hojas de <i>Satureja brevicallix</i> Epling "wayra muña"?	<p>Objetivo General</p> <p>Evaluar la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de <i>Satureja brevicallix</i> Epling "wayra muña".</p> <p>Objetivos específicos.</p> <p>Aislar los ácidos fenólicos de las hojas de <i>Satureja brevicallix</i> Epling "wayra muña".</p> <p>Realizar pruebas cromatográficas por vista para identificar los ácidos fenólicos de <i>Satureja brevicallix</i> Epling "wayra muña".</p> <p>Relacionar la estructura química de los ácidos fenólicos con la actividad antioxidante.</p>	<p><i>Satureja brevicallix</i> Epling "wayra muña" es una especie medicinal nativa utilizada tradicionalmente para aliviar dolores de cabeza por la "enfermedad del aire" y las hojas de <i>Satureja brevicallix</i> Posee propiedades antioxidantes (Palomino, 2004), hepatoprotectoras (Mendoza, 2007) y Soto (1999), reporta la presencia de flavonoides por lo que es menester caracterizarlos químicamente y evaluar sus propiedades biológicas.</p> <p>Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo considerable de compuestos que pueden definirse, de una forma concisa y desde el punto de vista químico como compuestos orgánicos presentes en la naturaleza que poseen, al menos, un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo unidos a él (esos grupos funcionales pueden ser sustituidos por ésteres, metil-éster, glicósidos, etc). Los compuestos fenólicos actúan como prooxidantes quelando metales, de manera que mantienen o incrementan su actividad catalítica o bien reduciendo metales, incrementando así su capacidad para formar radicales libres de los peróxidos (Decker, 1997).</p>	<p>Los ácidos fenólicos aislados de <i>Satureja brevicallix</i> Epling "wayra muña" tienen actividad antioxidante</p>	<p>Variable independiente:</p> <p>Los ácidos fenólicos extraídos de las hojas de <i>Satureja brevicallix</i> Epling "wayra muña"</p> <p>Indicadores:</p> <p>Ácidos fenólicos para la actividad antioxidante: 100 ug/mL</p> <p>Ácidos fenólicos para la actividad antioxidante: 50 ug/mL</p> <p>Ácidos fenólicos para la actividad antioxidante: 10 ug/mL</p> <p>Variable dependiente:</p> <p>Actividad antioxidante</p> <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> Actividad antioxidante: Porcentaje (%) de captación de radicales libres. 	<p>Tipo: Descriptivo</p> <p>Nivel: Analítico</p> <p>Población: <i>Satureja brevicallix</i> Epling "wayra muña" que crece en el distrito de Quinua</p> <p>Muestra: 1 Kg de Hojas</p> <p>Unidad Experimental: Ácido fenólicos serán aislados y su estructura química elucidada siguiendo la metodología descrita por Aguilar (2010) y Zavaleta (2005).</p>

Acta de Sustentación de Tesis
Resolución Decanal N° 466-2012-FCB-D.
Bach. Lisbeth León Gómez

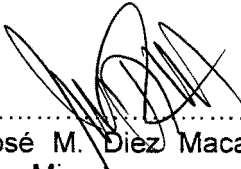
En la ciudad de Ayacucho, siendo las tres de la tarde del jueves trece de diciembre del dos mil doce en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la presidencia del Doctor Tomás Castro Carranza, en condición de Decano de la Facultad, con la asistencia de los miembros: Magister José Manuel Diez Macavilca, Doctor Edwin Enciso Roca, Magister Enrique Aguilar Felices (Asesor) y la Magister Edna León Palomino (cuarto jurado calificador) y actuando como secretaria Docente la Magister Maricela López Sierralta, para recepcionar la tesis: Actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epling "wayra muña". Ayacucho – 2012 presentado por la Bachiller Lisbeth León Gómez, quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutica.

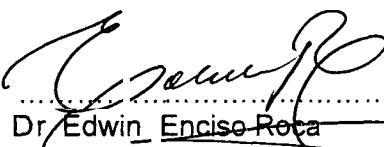
El Decano inicia el acto de sustentación autorizando a la sustentante su exposición en un tiempo no mayor a cuarenta y cinco minutos. Luego del cual los miembros del jurado calificador, realizaron las preguntas, observaciones y aclaraciones que crean conveniente. Luego el decano solicita a la sustentante y público en general para que abandonen el auditorio dejando al jurado calificador para que pueda deliberar y emitir la calificación correspondiente:

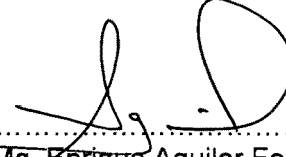
Jurado calificador	Exposición	Respuestas	Promedio
Mg. José Manuel Diez Macavilca	19	19	19
Dr. Edwin Enciso Roca	18	18	18
Mg. Enrique Aguilar Felices	19	19	19
Mg. Edna León Palomino	17	17	17
		Promedio total:	18

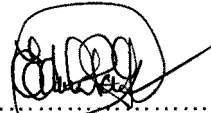
De la evaluación realizada la sustentante obtiene la calificación promedio de dieciocho (18) de la cual dan fe los miembros del jurado calificador, estampando su firma al pie de la presente, culminando la sustentación siendo las cinco de la tarde.



.....
Dr. Tomás Castro Carranza
Presidente


.....
Mg. José M. Diez Macavilca
Miembro


.....
Dr. Edwin Enciso Roca
Miembro


.....
Mg. Enrique Aguilar Felices
Miembro – Asesor


.....
Bga. Edna León Palomino
Cuarto- miembro


.....
Mg. Maricela López Sierralta
Secretario – Docente