

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



**Actividad antioxidante de fracciones aisladas de las
hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba
santa". Ayacucho—2013.**

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

**PRESENTADO POR:
BACH. LÓPEZ URBANO, NERY**

**AYACUCHO – PERÚ
2013**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D.Nº 102-13-UNSCH–FCB-D

Bach. Nery López Urbano

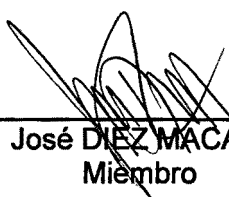
En la ciudad de Ayacucho siendo el día uno del mes de agosto del año dos mil trece, se reunieron en el Aditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, siendo las cuatro de la tarde, los miembros del jurado calificador bajo la presidencia del Dr. Segundo Tomás Castro Carranza e integrada por los siguientes docentes: Mg. Jesús De La Cruz Arango, Mg. Enrique Javier Aguilar Felices, Mg. José Manuel Diez Macavilca y el Dr. Edwin Carlos Enciso Roca quien actúa también como secretario docente, para recepcionar la sustentación de la tesis: Actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa". Ayacucho – 2013, presentada por la bachiller Nery López Urbano, quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutica.

Como primer acto el presidente dio las recomendaciones a la sustentante para su exposición la que no debe exceder de los cuarenta y cinco minutos. Culminada la exposición el presidente solicitó a los miembros del jurado calificador su participación para realizar sus observaciones, aclaraciones y preguntas que crean por conveniente para realizar la evaluación. Los miembros del jurado calificador participaron en el siguiente orden: Mg. José Manuel Diez Macavilca, Mg. Jesús De La Cruz Arango, Mg. Enrique Javier Aguilar Felices, Dr. Edwin Carlos Enciso Roca como asesor y finalmente el presidente el Dr. Segundo Tomás Castro Carranza.

Culminada la exposición y la fase de participación de los miembros del jurado calificador, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar temporalmente el auditorio para que los miembros del jurado calificador puedan deliberar sus calificaciones en privado. De lo deliberado se obtuvo lo siguiente:

Jurado calificador	Exposición	Respuestas	Promedio
Mg. José Díez Macavilca	17	17	17
Mg. Jesús De La Cruz Arango	17	17	17
Mg. Enrique Aguilar Felices	17	17	17
Dr. Edwin C. Enciso Roca	17	17	17
Promedio final			17

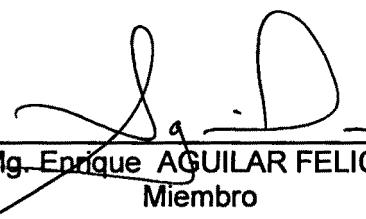
De la evaluación realizada la sustentante obtuvo la nota promedio de diecisiete (17) de lo cual dan fé los miembros del jurado calificador estampando su firma al pie de la presente culminó el acto de sustentación siendo las cinco y treinta de la tarde.



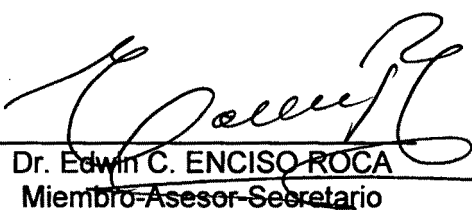
Mg. José Díez MACAVILCA
Miembro



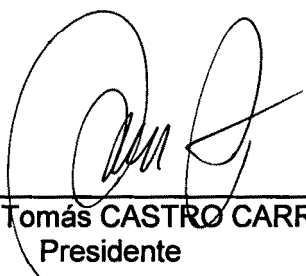
Mg. Jesús DE LA CRUZ ARANGO
Miembro



Mg. Enrique AGUILAR FELICES
Miembro



Dr. Edwin C. ENCISO ROCA
Miembro-ASESOR-SECRETARIO



Dr. Segundo Tomás CASTRO CARRANZA
Presidente

DEDICATORIA

A Dios.

A mis queridos padres Marcial
e Indalecia y a mis hermanos.

A mi novio David.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *alma mater* forjadora de profesionales competentes, por brindarme las facilidades para estudiar y hacer realidad mis objetivos.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica por acogerme y brindarme una carrera profesional.

A la plana de profesores de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica y de Biología, por transmitirme sus conocimientos y experiencias en forma incondicional.

A mi asesor Dr. Q.F. Edwin Carlos Enciso Roca por su constante colaboración y apoyo profesional.

Al Mg. Enrique Javier Aguilar Felices y al Biólogo Tomás Y. Miranda Tomasevich por su apoyo en la ejecución y culminación del presente trabajo de investigación.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente han contribuido a la materialización 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	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. <i>Cestrum auriculatum</i> L Heritier “hierba santa”	5
2.3. Radicales libres	7
2.4. Antioxidantes	11
2.5. Compuestos fenólicos	15
2.6. Flavonoides	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Lugar de ejecución	22
3.2. Definición de la población y muestra	22
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	22
3.3.1. Recolección e identificación de la muestra	22
3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico	23
3.3.3. Fraccionamiento del extracto hidroalcohólico	23
3.3.4. Tamizaje fitoquímico	24
3.4. Identificación	24
3.4.1. Cromatografía en capa fina (CCF)	24
3.4.2. Prueba espectral	24
3.4.3. Determinación de la actividad antioxidante	25
3.5. Análisis de datos	26
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	38
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de antioxidantes	14
Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes según el sitio de acción	14
Tabla 3. Metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa"	28
Tabla 4. Metabolitos secundarios de las fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa"	29
Tabla 5. Coloración y fluorescencia de las fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa"	30
Tabla 6. Longitud de onda de las fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa"	31
Tabla 7. Porcentaje de captación del radical libre DPPH por efecto de las fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa"	32

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Agentes oxidantes derivados del metabolismo celular	9
Figura 2.	Reacción de sales de hierro generando radicales oxidantes	10
Figura 3.	Mecanismo antirradicalaria de las moléculas antioxidantes	12
Figura 4.	Sistemas antioxidantes	15
Figura 5.	2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides	18
Figura 6.	Reacción de reducción del DPPH	25

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de la clasificación taxonómica de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa"	44
Anexo 2. Flujograma de obtención del extracto etanólico	45
Anexo 3. Flujograma del fraccionamiento del extracto hidroalcohólico	46
Anexo 4. Tamizaje fitoquímico según el modelo de Miranda (2002)	47
Anexo 5. Recolección de la muestra	48
Anexo 6. Concentración del extracto hidroalcohólico en el rotavapor	49
Anexo 7. Extracción líquido – líquido del extracto hidroalcohólico	50
Anexo 8. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico y de las fracciones	51
Anexo 9. Tubos de ensayo con la prueba de captación de radical libre DPPH del extracto hidroalcohólico y de las fracciones	52
Anexo 10. Sembrado y desarrollo de la placa cromatográfica (CCF)	53
Anexo 11. Revelado de las placas cromatográficas con luz ultravioleta con y sin NH ₃ del extracto hidroalcohólico y de las fracciones	54
Anexo 12. Coloración y fluorescencia de los estándares revelados con cloruro férrico y luz ultravioleta	55
Anexo 13. Cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico y diferentes fracciones revelados con cloruro férrico al 1%	56
Anexo 14. Porcentaje de captación del radical libre DPPH del extracto etanólico y las fracciones a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml	57
Anexo 15. Porcentaje de captación del radical libre DPPH por efecto de los estándares	58
Anexo 16. Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH	59
Anexo 17. Curva espectral al ultravioleta de las fracciones de acetato de etilo y acuoso	60
Anexo 18. Matriz de consistencia	61

RESUMEN

Los radicales libres son componentes normales de la célula y tejidos al elevarse o disminuirse las concentraciones fisiológicas puede acarrear importantes alteraciones funcionales, son numerosas las patologías que han sido asociadas con este desbalance entre oxidantes y antioxidantes como: enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativos, aterosclerosis, enfermedad de alzheimer, diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas y determinadas formas del cáncer. El presente trabajo de investigación básico descriptivo se realizó con la finalidad de determinar la actividad antioxidantes de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa", durante los meses de febrero a julio del 2013, en los Laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La muestra fue recolectada en la localidad de Huamanguilla, departamento de Ayacucho, durante el mes de enero, obteniendo el extracto hidroalcohólico de las hojas y el fraccionamiento por extracción líquido – líquido con diferentes solventes: éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo; con los cuales se realizó el tamizaje fitoquímico, complementado con cromatografía en capa fina y prueba espectral ultravioleta; la actividad antioxidante, se evaluó mediante el ensayo de captación de radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). El extracto presenta flavonoides, taninos y/o fenoles, alcaloides, lactonas y/o cumarinas, triterpenos y/o esteroides, catequinas y saponinas; mediante ensayos cromatográficas se confirmó la presencia de flavonoides observándose manchas con la luz ultravioleta y en prueba espectral ultravioleta flavonoides y fenilpropanoides. El extracto hidroalcohólico y la fracción acuoso presentaron mayor 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, seguido por la fracción acetato de etilo y la fracción clorofórmico. En conclusión se afirma que las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" tienen actividad antioxidante.

Palabras Clave: *Cestrum auriculatum* L' Heritier, fracciones aisladas, actividad antioxidante.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser usados en la industria de alimentos, cosméticos y en la atención de la salud para prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres en nuestro organismo.¹

En los últimos años se han destacado un gran interés por los radicales libres y su relación con el envejecimiento celular. Los radicales libres son especies químicas, atómicas o moleculares, con un electrón desapareado en su órbita más externo. Este tipo de configuración electrónica hace que sean muy inestables y altamente reactivos, pudiendo alterar estructuras biológicas fundamentales como lípidos de membranas, ácidos nucleicos y proteínas. Todo ello se traduce en un aumento del estrés oxidativo, que está directamente relacionado con el envejecimiento celular y algunos procesos fisiológicos como: enfermedades cardiovasculares, crónicas, neurodegenerativos, cataratas y determinadas formas del cáncer. Para neutralizar a los radicales libres, nuestro organismos poseen sistemas fisiológicos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, pero el estilo de vida actual está inclinando la balanza hacia un aumento del estrés oxidativo, por ello es recomendable el aporte de antioxidantes exógenos bien a través de la dieta, suplementos de vitaminas y

minerales o mediante el consumo de plantas medicinales por sus metabolitos secundarios presentes como: fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, esteroides y carotenoides.²

El envejecimiento celular es un proceso inevitable que se caracteriza por una disminución general en las funciones fisiológicas, lo que conduce a la morbilidad y a la muerte. Es un proceso multifactorial controlado por una combinación de factores genéticos y ambientales.³

Las evidencias experimentales sugieren que los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (EROS) pueden estar relacionados con un gran número de enfermedades. Como las plantas producen gran cantidad de fracciones químicas que actúan como antioxidantes para controlar el estrés oxidativo causado por la radiación solar y el oxígeno, pueden servir de fuente para la obtención de nuevos compuestos antioxidantes.⁴

Si bien los organismos vivos soportan multitudinarios factores endógenos y exógenos de estrés oxidativo, también poseen numerosos sistemas de defensa antioxidantes regulables, enzimáticos (superóxido dismutasa, la catalasa, la GSH-peroxidasa, las quinonas reductasas y hemoxigenasa) y no enzimáticos (Se, Zn, vitaminas C, E y carotenoides) que conforman la defensa antioxidante frente a las EROS, pero que no siempre resultan ser una barrera efectiva.⁵

Estudios recientes demuestran que ciertos productos de las plantas incluyen sustancias fenólicas como flavonoides y taninos. Estas sustancias antioxidantes naturales tienen normalmente una fracción fenólica en su estructura molecular. Los ácidos orgánicos, carotenoides y taninos pueden actuar como antioxidantes o tener efectos sinérgicos cuando se utilizan conjuntamente con antioxidantes fenólicos. Los antioxidantes fenólicos tienen un gran poder destructor de radicales libres.⁴

En este sentido nos enfocamos en el estudio de la actividad antioxidante de las diferentes fracciones de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa", para lo cual se utilizó al DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) como un radical libre estable, el cual se enfrentó con los diferentes fracciones aisladas (extracto etanólico, fracción etéreo, fracción clorofórmico, fracción acetato de etilo y fracción acuoso), dando como resultados positivos la disminución de la coloración del DPPH, que va de un color violáceo hasta el desvanecimiento de dicha coloración en comparación con los estándares de la vitamina C, quercetina, ácido salicílico y ácido tánico a las mismas condiciones.

Objetivo general

- Evaluar la actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa".

Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa".
- Comparar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En estudios realizados de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa", demostró su actividad antimicrobiana y antiinflamatorio.⁶ Así mismo, realizó estudio en nuestra casa superior de estudio sobre: tamizaje fitoquímico y su actividad antipirética del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum*; los metabolitos secundarios encontrados son flavonoides, taninos y/o fenoles, alcaloides, lactonas y/o cumarinas, triterpenos y/o esteroides, saponinas y una buena actividad antipirética, a una dosis de 250 mg/kg (50%) en comparación al metamizol (60%) y a los tratamientos de 100 mg/kg (20%) y 500 mg/kg (40%).⁷ Otro estudio sobre el efecto sinérgico de los extractos etanólicos de las hojas de *Borago officinales* "borraja" y el *Cestrum auriculatum* "hierba santa" en el tratamiento de la piresis en conejo, donde demostró que los principios activos de la "borraja" y "hierba santa" tiene un efecto antipirético moderado, pero cuando están mezclados, muestra un efecto antipirético mucho más marcado que cuando se le estudia por separado. La explicación se da porque ambas plantas presentan metabolitos secundarios en común como: triterpenos y/o esteroides, flavonoides, fenoles y/o taninos, que pueden tener estructura química o algún radical en sus estructuras moleculares lo que estaría potenciando el efecto antipirético.⁸

Así mismo, se realizaron investigaciones del género *Cestrum* de la especie *Cestrum nocturnum* “galán de noche”, demostrando su actividad antiepiléptica en el modelo de las convulsiones inducidas por isoniácida a diferencia del diazepam, el cual bloqueó totalmente las convulsiones en los tres modelos conductuales.⁹ Otro estudio de la misma especie: sobre polvos, extractos y fracciones de hojas de *Cestrum nocturnum* y su actividad antifúngica demostrando éste efecto en dos aislamientos de *Fusarium* spp.¹⁰

2.2. *Cestrum auriculatum* L' Heritier “hierba santa”

2.2.1. Clasificación taxonómica (Sistema de clasificación de Cronquist. A. 1988)

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	SOLANALES
FAMILIA	:	SOLANACEAE
GÉNERO	:	<i>Cestrum</i>
ESPECIE	:	<i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier
N.V	:	“hierba santa”

Fuente: Herbarium Humangenensis de la Facultad de Ciencias Biológicas, 2013 (Anexo 1).

2.2.2. Descripción botánica

Es una planta arbustiva de unos 2,5 - 3 metros de alto, tallos ramificados desde la base, las hojas simples, alternas y pecioladas, generalmente con presencia de aurículas en la base del peciolo, oblongo lanceolada de borde entero y ápice agudo, glabrescente en ambas caras. Inflorescencia en verticilos terminales y axilares, flores cortamente pedunculadas, heteroclamídeas, pentámeras y bisexuales; cáliz formado por cinco sépalos soldados en la base y dentados en el

ápice, corola tubular formado por cinco pétalos de color verde–amarillento con cinco lóbulos en el ápice, cinco estambres libres y ovario súpero, bicarpelar y multiseminados; Fruto baya de forma ovoide verde cuando están inmaduros, tornándose de un color azul oscuro al madurar.¹¹

Otros nombres atribuidos: hierba hedionda, eckuack, chamo, tundio, etc.⁸

2.2.3. Hábitat y distribución geográfica

Habita en las riberas de los canales de regadío de la costa y la sierra entre 200 a 3 400 m.s.n.m. Cusco: valle de Urubamba; Huánuco: Tomaiquichua; Junín: Dos de mayo, Pichis; Loreto; Yurimaguas.¹²

Crece al estado silvestre en la costa, sierra y selva en la ribera de los ríos y riachuelos y lugares húmedos formando parte de la vegetación ribereña.¹¹

2.2.4. Composición química

Los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier “hierba santa” son: alcaloides, lactonas, cumarinas, triterpenos y/o esteroides, taninos y/o fenoles, flavonoides, saponinas y mucílagos.⁷

Así mismo, contiene taninos, saponinas, heterósidos, gomas, almidón, mucilagos, azúcares orgánicos.¹²

2.2.5. Propiedades farmacológicas

Es utilizada contra el reumatismo, fiebre, sarpullido de bebés, cólicos, resfrío, caspa, hemorroides, bronquitis, dermatitis, sarampión, insomnio, inflamaciones, sedante, analgésico muscular, astringente, depurativo y digestivo. Así mismo, tiene otros usos como: ornamental, decoloración de ambientes, ritos mágicos y de tinte a los frutos, azul o morado oscuro.⁸⁻¹³

En medicina popular es considerada como febrífuga, astringente, antihemorroidal; la infusión de las hojas se usa en baño como refrigerante; en las erupciones del cuero cabelludo, contra la caspa, para lavados de heridas.¹⁴

2.3. Radicales libres

Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado (aquel que ocupa una órbita atómica o molecular por sí mismo), pueden existir de forma independiente y que, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Ésta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida.¹⁵

Los radicales libres son producidos por funciones celulares normales o bien pueden ser inducidos por diferentes factores ambientales o fisiológicos como son las radiaciones ionizantes, radiación ultravioleta, ejercicio físico extenuante o por descenso de la capacidad de los sistemas endógenos antioxidantes. Dentro de estos radicales libres se incluye el radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$), el anión superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO). Estas especies, debido a su alta reactividad química, pueden conducir a la peroxidación de lípidos, oxidación de algunas enzimas, oxidación y degradación proteica, así como daño mutagénico al ácido desoxirribonucleico (ADN).¹⁶

La generación de RL no se ha de relacionar siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos. En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término especies reactivas del oxígeno (EROS) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertibles en oxidantes. De forma análoga existen especies reactivas del nitrógeno (ERN), del cloro (ERC) y del bromo (ERBr).¹⁵

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero es fuente de radicales libres, que si no se neutralizan de forma adecuada pueden tener efectos deletéreos sobre la función celular. Se dice que existe "estrés oxidativo" cuando existe una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida.¹⁷

En 1954 una investigadora argentina¹⁷ sugirió por primera vez que las EROS eran agentes tóxicos y generadores de patologías, estableciendo tres postulados básicos:

- Los RL constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales ionizantes.
- El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes producían los efectos tóxicos.
- La producción de RL es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis.

Los radicales libres son componentes normales de la célula y tejidos, existiendo una poza particular en cada estirpe celular y en algunos tipos celulares permiten la mejor adaptación a su hábitat. Al elevarse o disminuirse las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno puede acarrear importantes alteraciones funcionales.¹⁸

Son numerosas las patologías que han sido asociadas con este desbalance entre oxidantes y antioxidantes; aterosclerosis, cáncer, enfermedad de alzheimer, diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas, situaciones de injuria por isquemia y repercusión en los tejidos, el síndrome de distrés respiratorio, etc.¹⁷

2.3.1. Principales fuentes de radicales libres

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de EROS y ERNS que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el

metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, el ozono y ciertos medicamentos. Aunque la exposición a los EROS procedentes de fuentes exógenas sea extremadamente elevada, la exposición a fuentes endógenas es mucho más importante y extensa, debido a que es un proceso que se da forma continua en las células de nuestro organismo a lo largo de la vida.

2.3.1.1. Fuentes endógenas de radicales libres

Podemos distinguir cuatro fuentes endógenas que originan la mayoría de agentes oxidantes producidos por las células: ¹⁹

- a. En el transcurso normal de la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen O_2 reduciéndolo en varias etapas a H_2O . Inevitablemente, a lo largo de este proceso aparecen subproductos como el $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $OH^{\cdot}$.

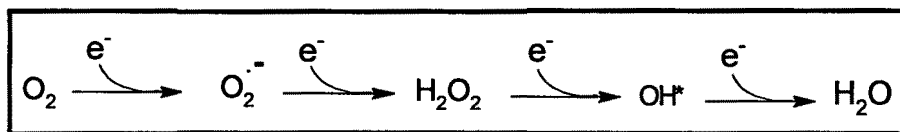


Figura 1. Agentes oxidantes derivados del metabolismo celular.

- b. Las células fagocíticas (leucocitos, neutrófilos, macrófagos y eosinófilos) al activarse por medio de mediadores proinflamatorios o de productos bacterianos, víricos o de parásitos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo (literalmente una "explosión" oxidativa) en el que se producen grandes cantidades de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $OH^{\cdot}$. Las infecciones crónicas llevan a una actividad fagocítica continua que provoca una inflamación crónica que es el principal factor de riesgo del cáncer.
- c. Los peroxisomas, orgánulos encargados de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas produce, H_2O_2 como subproducto, que es degradado de forma natural por la enzima catalasa. Bajo ciertas condiciones, algunos de los

peróxidos escapa la degradación y se libera a otros compartimentos celulares provocando un incremento del daño por oxidación en el ADN.

- d. Las enzimas del complejo Citocromo P450, son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. La inducción de estas enzimas previene los efectos de toxicidad aguda de agentes extraños al organismo, pero también produce subproductos oxidantes que pueden dañar el ADN.

2.3.1.2. Fuentes exógenas de radicales libres

Entre las principales fuentes exógenas de radicales libres destacan.¹⁹

- Los óxidos de nitrógeno del humo de tabaco.
- Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos.

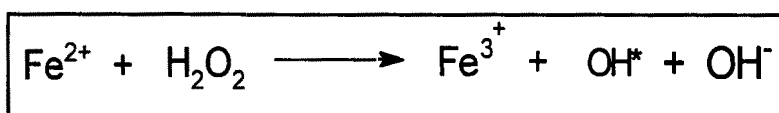


Figura 2. Reacción de sales de hierro generando radicales oxidantes.

- Los alimentos que ingerimos a través de la dieta, especialmente los de origen vegetal, que se oxidan en mayor o menor grado generando diferentes tipos de oxidantes como peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición.

2.4.2. ¿Cómo actúan exactamente los radicales libres?

El mecanismo de ataque a las estructuras biológicas se inicia cuando el radical libre le sustrae un átomo de hidrógeno o alternatively un electrón, a la molécula diana, lo que convertirá al electrón no apareado del radical en un par de electrones más estables. Dado que desde el punto de vista electroquímica la molécula que pierde el hidrógeno o el electrón se oxida, los radicales libres se conocen como (pro) oxidantes.¹⁵

2.4. Antioxidantes

Un "antioxidante" es "cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato". 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.³⁻¹⁵

Los antioxidantes constituyen un grupo de sustancias que, cuando están presentes en bajas concentraciones (en relación con otros compuestos oxidables), inhiben o retrasan los procesos oxidativos, a través de un mecanismo que suele conllevar su propia oxidación. Los suplementos antioxidantes, o los alimentos que contienen antioxidantes, pueden ser usados para reducir los daños oxidativos relacionados con la edad y con enfermedades como la arteriosclerosis, diabetes, cáncer, cirrosis, etc.²⁰

La función y efecto que tienen los antioxidantes en la salud es evitar la oxidación de sustancias que puedan provocar alteraciones fisiológicas, estudios recientes demuestran que la expresión antioxidante enzimática y su actividad se ven drásticamente reducidas en la mayoría de las enfermedades cutáneas.¹⁶

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción. Para que un antioxidante (AH) tenga actividad antirradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino (RH) después de reaccionar con la especie radical ($R^\cdot$). Esta reacción se basa en una transmisión redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria (Figura 2). Como resultado de esta transferencia, se formará un radical derivado del antioxidante ($A^\cdot$) que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad.¹⁵

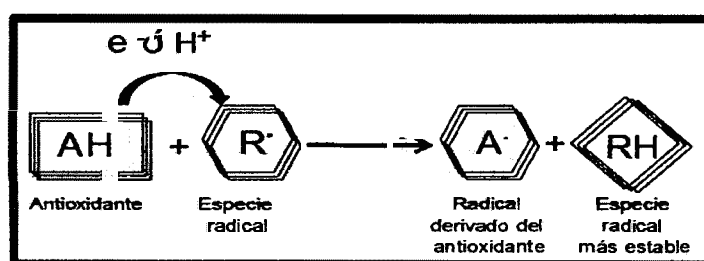


Figura 3. Mecanismo antirradicalario de las moléculas antioxidantes.¹⁵

El antioxidante al reaccionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Tienen diferentes mecanismos de acción; unos impiden la formación de los RL y/o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los RL (sistema barredor) y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación). Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado radical libre o hacia varios, puede actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción.³

2.4.1. Los productos naturales como los antioxidantes

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y extintores de oxígeno. Además, algunos ácidos fenólicos tienen un potencial de quelación de metales.²¹

Los resultados de estudios epidemiológicos y científicos muestran que el factor nutricional juega un papel importante en la prevención de las consecuencias de la actividad de los radicales libres en el organismo. Una dieta rica en antioxidantes naturales puede influir significativamente en el aumento de reactivo potencial antioxidante del organismo y disminuir el riesgo de algunas

enfermedades de origen radicales libres. Se considera que un nivel adecuado de antioxidantes suministrado en la dieta induce procesos inmunológicos y aumenta la capacidad defensiva de las células en forma adecuada.²²

2.4.2. Sistema de defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente – membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas: lípidos, proteínas, ADN, etc. funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen.²³

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen RL. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los RL. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en

concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un RL.¹⁷

2.4.3. Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes se clasifican en endógenos, fabricados por la propia célula, y exógenos, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes.¹⁸⁻²¹

Antioxidantes exógenos: Son antioxidantes que provienen de la dieta, tales como la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el β - caroteno (provitamina A), el cobre, el selenio, el zinc, el manganeso, los polifenoles, los licopenos, los ácidos egálicos, los flavonoides, la quercetina, las catequinas y los taninos.²⁴

Tabla 1. Clasificación de antioxidantes.²¹

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Beta caroteno	Ácido tióctico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas:	Hierro
Licopeno	Superóxido dismutasa (SOD)	selenio
	Catalasa	
	Glutación peroxidasa	

Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes según el sitio de acción.²³

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C

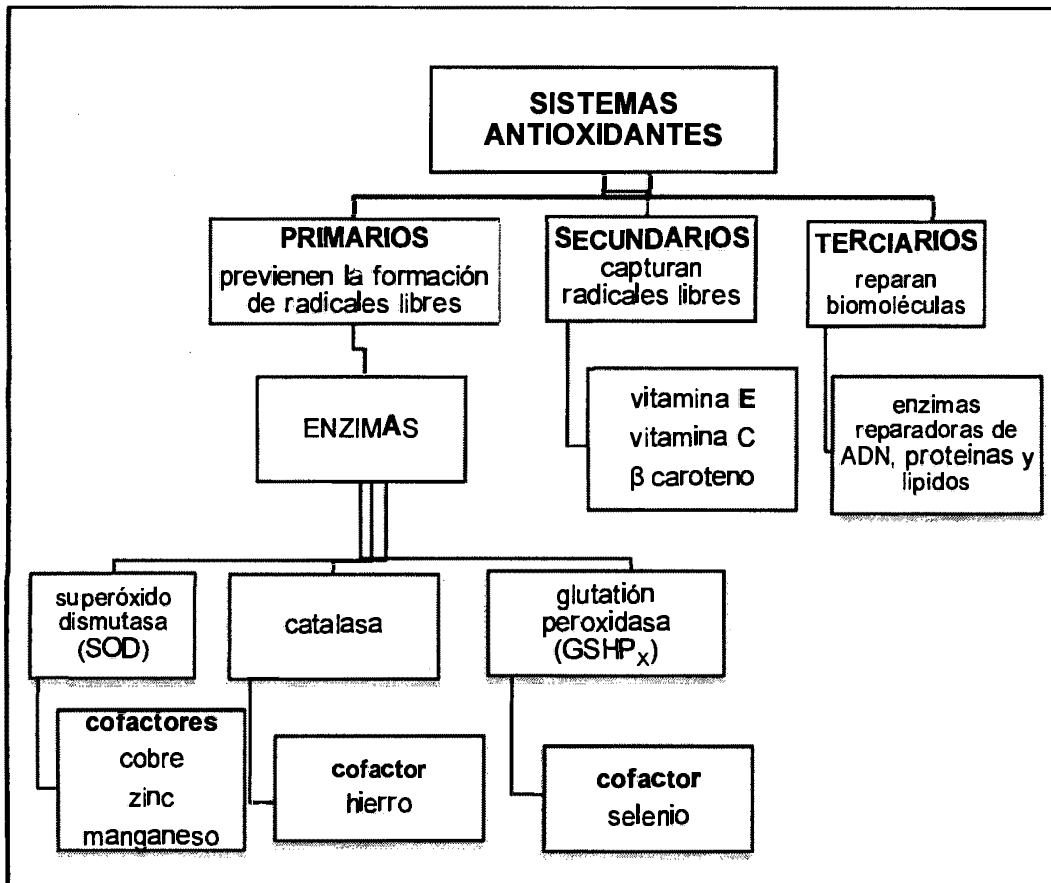


Figura 4. Sistemas antioxidantes.²⁵

2.5. Compuestos fenólicos

Son grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinado con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua.²⁶

Las estructuras fenólicas son metabolitos secundarios que pueden proceder de la ruta del ácido shikímico o de ruta acetato.²⁷

- Proceden de la ruta del ácido shikímico: fenoles sencillo, ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos, etc.), cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas y taninos.
- Proceden de la ruta de los acetatos o ruta del ácido mevalónico, los siguientes derivados fenólicos: antraquinonas y heterósidos antracénicos.

Los compuestos fenólicos en las plantas se reconocen como compuestos importantes que confieren estabilidad frente a la oxidación. Los compuestos fenólicos antioxidantes naturales puede ser: un grupo lipófilo, tocoferoles y un grupo hidrófilo, incluyendo fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. A pesar de que los químicos han elucidado las estructuras de miles de compuestos fenólicos, todavía hay muchos compuestos que aún no han sido completamente caracterizados y se les conoce como extractos fenólicos. Los flavonoides, taninos y ácidos fenólicos son los principales compuestos fenólicos.²¹

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividad, son constituyentes importantes de las plantas y que a su vez les otorga múltiples efectos benéficos. Están presentes generalmente en forma de glucósidos en los extractos de las frutas, hierbas, vegetales, cereales y otros materiales de plantas ricos en polifenoles lo que ha permitido su utilización por la industria alimentaria no solo por las características organolépticas que le confieren a las frutas y verduras sino que retardan la oxidación de los lípidos y mejoran la calidad nutricional de los alimentos. En adición a esto, los polifenoles presentan una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo la actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antihipertensiva, estrogénica, antioxidante y efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares. Especialmente estos componentes pueden ejercer efecto antioxidante como el secuestro de radicales libres, donan moléculas de hidrogeno, barren moléculas de superóxido, quelan metales de transición; estas propiedades son atribuidas principalmente al grupo hidroxilo presente en su anillo bencénico.²⁸

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a

patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiación UV, entre otros. Esta síntesis se da a partir de la fenilalanina por la vía del shikimato. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina, por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, etc). Los compuestos fenólicos son un gran grupo de antioxidantes naturales.²⁹ Los fenoles sencillos son poco frecuentes y están en la planta en forma de heterósidos. Los ácidos fenólicos se pueden clasificar en derivados del ácido benzoico y derivados de ácido cinámico.²⁷

2.6. Flavonoides

2.6.1. 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 vegetales (auxinas y citoquinas).³⁰

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo.³¹

Los flavonoides están ampliamente extendidos en todo el reino vegetal constituyendo la mayoría de los pigmentos amarillos (flavonas, flavonoles, chalcona, auronas), rojas y azules (antocianos) de flores y algunos frutos.³⁰

Son particularmente abundantes en las plantas vasculares. Destacan las familias Asteraceae, Rutaceae, Fabaceae, Umbelliferae, Lamiaceae, entre otras, por el

contenido y diversidad estructural de flavonoides que existen en ellas.³⁰

2.6.2. Origen

Los flavonoides y los compuestos relacionados (antocianinas, catequinas y leucoantocianidinas) proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y de la ruta de los policéticos.²⁷

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.³²

2.6.3. Estructura química

Los flavonoides son fenoles de tipo diaril-propano (Ar-C3-Ar) unidos, la mayoría, a una cadena de azúcar.³²

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6, común en la mayoría de los flavonoides. Y gracias a las variaciones del pirano se logran clasificar.³³

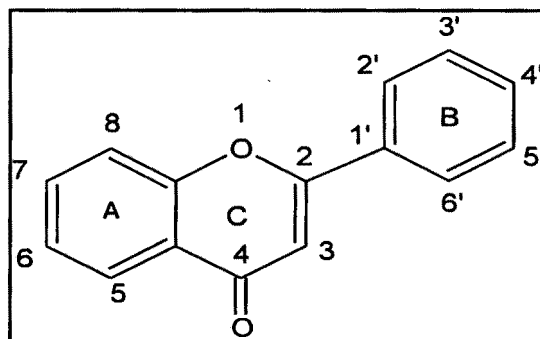


Figura 5. 2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides.³²

2.6.4. Tipos

Dependiendo del grado de oxidación del anillo piránico central pueden diferenciarse varios tipos.³⁰

- 2(3)-fenilbenzopirano: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, chalconas (isómero de flavanonas con anillo piránico abierto) y auroras

(homólogos de flavonas con heterociclo pentagonal.

- 2-fenilbenzopirano: 3-flavanoles; 3,4-flavanodiolos (leucoantocianinos).
- 2-fenilbenzopirilo (flavilio): antocianina.

2.6.5. Propiedades farmacológicas

Poseen propiedades terapéuticas como: antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas. Entre todas, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han sido blancos de un sin número de estudios principalmente de corte clínico y nutricional, teniendo en cuenta que a menudo dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos comúnmente recomendados en todo el mundo, como es el caso de las combinaciones vitamínicas (vitamina E más vitamina C y β - caroteno), no producen los efectos esperados o estos resultan dañinos, por lo que para lograr una mejor acción antioxidante se prefiere incluir en la dieta una mezcla de flavonoides y taninos.³¹

Así mismo protectores de la pared vascular o capilar, antirradicales libres, antiespasmódicos, antihemorrágico, antihepatotóxico, diuréticos y anti fúngicos.²⁷

Los flavonoides, en general, no parecen ser tóxicos. Consumidos en la dieta habitual en cantidades apreciables (alrededor de un gramo diario, por término medio) podrían proporcionar a nuestro organismo a niveles significativos para ejercer algunas acciones farmacológicas de la amplia gama que poseen. Con el fin de estudiar la posible asociación entre el consumo de flavonoides con la dieta y la potencial reducción de la morbilidad y mortalidad coronaria, se ha llevado a cabo un estudio de cohorte con 5133 pacientes, durante más de veinte años. El análisis estadístico de los datos han permitido determinar una relación inversa entre la ingestión de flavonoides y mortalidad por enfermedad coronaria, lo que podría deberse a que el efecto antioxidante de los flavonoides ejerza una

protección de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), previniendo o retrasando el desarrollo de la aterosclerosis.³⁰

2.6.6. Relación estructura actividad antioxidante

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.³³

2.7. Saponinas

Las saponinas son heterósidos (azúcar más aglicón) que se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene. Se forma espuma debido a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua. Son por lo tanto tensioactivos naturales. Según el número de uniones de las unidades glucídica al aglicón se denominan: Saponinas monodesmosídicas: el azúcar o azúcares se unen por una posición al aglicón: el OH de la posición 3. Saponinas bidesmosídicas: el azúcar o azúcares se unen por dos puntos al aglicón. Se clasifican según la naturaleza del aglicón. Las que tienen triterpénico se denominan saponinas triterpénicas y las que tienen con estructura esteroídica se denominan saponinas esteroídicas.²⁷

2.8. Terpenoides y esteroides

Los triterpenos y esteroides son sustancias ubicuas en el reino vegetal y comparten mucho de su estructura química, ya que provienen de la misma ruta biosintética. Bajo el nombre de triterpenos se conoce aquellos compuestos de 30 átomos de carbono producido por ciclación de escualeno. Sus rasgos estructurales y funcionales son semejantes a los de los terpenos más elementales, presentando un esqueleto policíclico formado por condensación de

6 unidades de isopreno activo con bajo grado de instauración. Se ha de señalar que también existen triterpenos lineales. Los esteroides, en particular los fitosteroles pueden considerarse como un tipo especial de triterpenoides con un esqueleto ciclo-pentano-perhidrofenantreno dotado de una cadena alquílica en C-17, dos metilos en C-10 y C-13, y que carecen de las sustituciones en 4 (*gem*-demetil) y 14 (metil) características de los triterpenos en general.³⁰

El término terpenoide se refiere a un grupo de sustancias que tienen un origen biosintético común y que siguen la llamada "regla del isopreno".²⁶

2.9. Taninos

Están constituidos por un amplio de compuesto hidrosolubles con estructura polifenólicos, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosas, gelatinas). Esta capacidad para precipitar es la base de sus dos propiedades principales: su capacidad de curtir la piel y su poder astringente.²⁷

Sus propiedades más conocidas y avaladas por la experimentación son debido a su capacidad para formar complejos con varias sustancias; pero además su actividad antioxidante, basada en la captura de radicales libres. Utilizados desde la antigüedad por su propiedad astringente en uso interno y externo.³⁰

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de febrero a julio del 2013.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1 Población

Hojas de la especie *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa", que crece en la localidad de Huamanguilla a 3 276 m.s.n.m. provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

3.2.2 Muestra

Constituyó 500 g de hojas secas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa", recolectadas en la localidad de Huamanguilla.

3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1. Recolección e identificación de la muestra

Las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" fueron recolectadas en horas de la mañana, en buen estado de conservación, durante el mes de enero, luego fueron limpiadas, secadas y guardadas en bolsas de tela de color oscuro.³⁴

La muestra recolectada fue trasladada a los Laboratorios del Área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y fueron desecados a temperatura ambiente, posteriormente fue pulverizada utilizando un molino de cuchillas, para obtener un polvo seco que fue almacenándose en frascos ámbar. Con una parte de la planta se procedió a la identificación botánica por los especialistas del Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, encargada por la bióloga Laura Aucasime Medina (Anexo 1).

3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico

Una vez triturada las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa", se utilizó 500 g de muestra molida y luego se procedió a realizar una extracción hidroalcohólico con tres litros de etanol al 80% con 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 filtrar, añadiendo nuevamente tres litros de etanol al 80% y macerando por una semana se filtró otra vez; reuniendo los filtrados se obtuvo la solución de hidroalcohólico total. Seguidamente se procedió a la evaporación a sequedad (Anexo 2).

3.3.3. Fraccionamiento del extracto hidroalcohólico

Una vez obtenida el extracto etanólico se redisolvió en agua destilada y luego se procedió a fraccionar en el embudo de separación con diferentes solventes; primero desengrasando con éter de petróleo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos, a este extracto se llevó a sequedad (fracción etéreo). Prosiguiéndose con la extracción líquido-líquido con cloroformo, recogiendo la fase clorofórmica y llevando a sequedad (fracción clorofórmico) y finalmente se realizó una extracción con acetato de etilo, el cual

se evaporó a sequedad (fracción acetato de etilo) y la fracción que queda es la fracción acuosa³⁵ (Anexo 3).

3.3.4. Tamizaje fitoquímico

La caracterización fitoquímica se basó en el agrupamiento de metabolitos estructuralmente semejantes, para identificarlos por su comportamiento químico frente a reacciones estandarizadas. Se realizaron las pruebas de coloración y precipitación²⁶⁻³⁶ (Anexo 4).

3.4. Identificación

3.4.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Las soluciones estándares que se emplearon son: Vitamina C, ácido salicílico, quercetina y el ácido tánico de 0,2 mg/ml.

Sistema cromatográfico

Fase estacionaria: placa de cromatografía 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck).

Fase móvil: butanol: ácido acético: agua (4:1:5).²⁶

Volumen de inyección: 20 µl.

Revelador: luz ultravioleta (CAMAG 366 – 254 nm), amoníaco y cloruro férrico.

3.4.2. Prueba espectral

Preparación de las soluciones estándares

Solución estándar es ácido tánico en metanol a concentración de 0,2 mg/ml.

Preparación de solución de la muestra

Los extractos de cada una de las fracciones se disolvieron en metanol en una fiola de 50 ml.

Sistema espectrofotométrico: Equipo Génesis 6

Celda: Cuarzo de 1 cm.

Longitud de onda: 200 nm a 500 nm.

Blanco: Metanol.

Se registraron los espectros e identificaron los máximos picos de absorción en comparación con el espectro del estándar.

3.4.3. Determinación de la actividad antioxidante

3.4.3.1. Método de la actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

3.4.3.2. Fundamento

Uno de los métodos para determinar la capacidad antioxidante es aquel que emplea al radical DPPH, el cual por su estabilidad es destruido solamente por antioxidantes, de tal manera que el mejor compuesto destructor del DPPH será el mejor antioxidante.³⁵

La técnica empleada de DPPH consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul - violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radical libres.³⁷

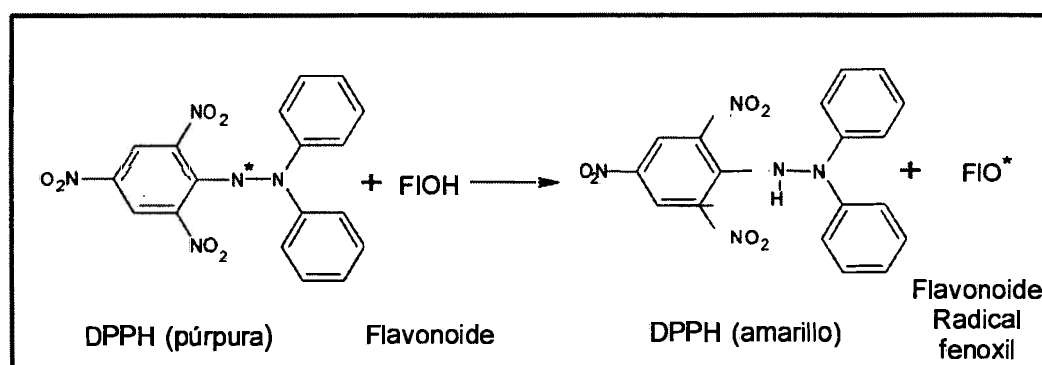


Figura 6. Reacción de reducción del DPPH.

3.4.3.3. Procedimiento

Para el ensayo se utilizó el siguiente procedimiento:

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

- Una solución metanólica de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" a 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, se dejó a temperatura ambiente por cinco minutos y se realizó la lectura a 517 nm en el espectrofotómetro.
- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 (sol. B) para obtener una concentración final de 50 µg/ml y luego en una proporción de 1: 9 (sol. C) para obtener una concentración final de 10 µg/ml.
- Con las soluciones B y C se procedió igual que en el caso anterior.

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

3.5. Análisis de datos

Los resultados de la actividad antloxidante fueron organizados en tablas y una matriz para calcular la media y la desvlación 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 3. Metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier "hierba santa".

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico al 1%	+++	Coloración verde negro
Taninos	Solución de gelatina (clara de huevo)	+++	Forma precipitado
Catequina	Carbonato de sodio + luzUV	+++	Coloración verde carmelita a luz UV
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman – Burchard	++	Coloración verde oscuro en dos fases
Saponinas	Espuma	+++	Formación de espuma
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+	Coloración rojo
Flavonoides	Shinoda	+	Coloración naranja bajo
Alcaloides	Dragendorff	+	Precipitado naranja
	Mayer	+	Precipitado crema
	Wagner	+	Turbidez definida

Leyenda:

(-) : Ausente

(+) : Poco

(++) : Moderado

(+++): Abundante

Tabla 4. Metabolitos secundarios de las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier "hierba santa".

Fracciones	Ensayos	Resultados	Metabolitos secundarios	Observaciones
Clorofórmico	Espuma	++	Saponinas	Formación de espuma
	Cloruro férrico al 1%	+	Compuestos fenoles	Coloración verde negro
	Lieberman–Burchard	++	Triterpenos y/o esteroides	Coloración verde oscuro en dos fases
	Carbonato de sodio + luzUV	+	Catequina	Coloración verde carmelita
	Dragendorff, Mayer Wagner	+	Alcaloides	Precipitado
Acetato de etilo	Espuma	++	Saponinas	Formación de espuma
	Cloruro férrico al 1%	+++	Fenoles y/o taninos	Coloración verde negro
	Solución de gelatina (clara de huevo)	+	Taninos	Precipitado
	Shinoda	+	Flavonoides	Coloración naranja bajo
	Carbonato de sodio + luzUV	++	Catequina	Coloración verde carmelita
	Dragendorff, Mayer Wagner	+	Alcaloides	Precipitado
Acuoso	Espuma	+++	Saponinas	Formación de espuma
	Cloruro férrico al 1%	+++	Fenoles y/o taninos	Coloración verde negro
	Solución de gelatina (clara de huevo)	++	Taninos	Precipitado
	Shinoda	+	Flavonoides	Coloración naranja bajo
	Carbonato de sodio + luzUV	+++	Catequina	Coloración verde carmelita
	Dragendorff, Mayer Wagner	+	Alcaloides	Precipitado

Leyenda:(-): Ausente,(+): Poco,(++): Moderado,(+++): Abundante.

Tabla 5. Coloración y fluorescencia de las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa".

Fracciones	Visualización visible	Cloruro férrico al 1%	Fluorescencia al ultravioleta	
			Sin NH ₃	Con NH ₃
Etanólico	Amarillo limón	Verde	Amarillo, celeste, violeta	Se intensifica la fluorescencia.
Etéreo	Amarillo limón	-	Fluorescencia muy bajo	-
Clorofórmico	Amarillo limón	Verde	Azulino, amarillo	Se intensifica la fluorescencia.
Acetato de etilo	Amarillo limón	Verde	Celeste, violeta	Se intensifica la fluorescencia.
Acuoso	Amarillo limón	Verde	Celeste, violeta, amarillo	Se intensifica la fluorescencia.

Tabla 6. Longitud de onda de las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa".

Fracciones	Longitud de onda de máxima absorbancia (nm)	
	Banda II	Banda I
Acetato de etilo	270	323
Acucso	269	329
Ácido tánico	218	278

Tabla 7. Porcentaje de captación del radical libre DPPH por efecto de las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa".

% de captación de DPPH														
Etanólico			Etéreo			Clorofórmico			Acetato de etilo			Acuoso		
Repeticiones	100	50	100	50	10	100	50	10	100	50	10	100	50	10
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
1	90,89	84,41	65,32	36,25	36,60	71,80	57,97	40,46	71,63	56,22	47,99	90,89	82,31	65,50
2	92,64	84,59	64,97	39,58	36,08	71,80	56,39	40,63	70,75	56,04	46,41	90,72	83,19	66,02
3	93,17	84,24	64,97	33,45	35,38	71,45	58,14	40,63	72,50	55,87	47,11	91,07	82,84	65,32
Promedio	92,24	84,41	65,09	36,43	36,02	71,69	57,50	40,57	71,63	56,04	47,17	90,89	82,78	65,62

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se propuso demostrar que los extractos obtenidos de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa", presentan actividad antioxidante, los cuales son los responsables de las actividades farmacológicas. Para la detección y clasificación de fracciones con actividad antioxidante fue necesario elegir el método que permita rapidez, facilidad de aplicación a una variedad de muestra que sea relativamente económico y fácilmente reproducible. Se eligió el método de neutralización del radical libre DPPH, el cual permite estimar la capacidad de captación de radicales libres por antioxidantes fenólicos principalmente.¹

Para la extracción de los diversos metabolitos se realizó extracción líquido - líquido donde se utilizó diferentes solventes: el éter de petróleo con la finalidad de eliminar las grasas, ceras, pigmento y otros metabolitos, la segunda extracción con cloroformo que tiene como finalidad extraer a los terpenos y sesquiterpenos, la tercera extracción con acetato de etilo que tiene la finalidad de extraer compuestos fenólicos y finalmente nos queda como residuo la fracción acuosa que también fue estudiado para evaluar la actividad antioxidante.³⁸

Tabla 3, 4 y Anexo 8, el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico y las fracciones aisladas es desarrollado según la técnica de Lock de Ugaz²⁶ y

Miranda³⁶ lo cual reportan la presencia de taninos y/o fenoles, flavonoides, lactonas y/o cumarinas, saponinas, triterpenos y/o esteroides, catequinas y alcaloides; éstos metabolitos concuerdan con el trabajo de tamizaje realizado por Santillán.⁷

El ensayo cualitativo para detectar los taninos son cloruro férrico al 1 por ciento y gelatina: para taninos hidrolizables es precipitado azul y taninos condensados es precipitado verde y con la solución de gelatina (clara de huevo) forma precipitado característico^{26, 27}, por lo tanto el extracto etanólico y las fracciones de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" pertenece a los taninos condensados (Tabla 3 y 4, Anexo 8).

Los taninos están constituidas por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructuras polifenólicos, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, celulosas, gelatinas). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus propiedades principales: curtir la piel y su poder astringente.²⁷

Mediante ensayos cromatográficas preliminares, se confirmó la presencia de flavonoides observándose manchas con luz ultravioleta (CAMAG) 366 nm y así mismo revelándose con FeCl₃ al 1 por ciento para compuestos fenólicos. Los flavonoides y los compuestos fenólicos fueron detectados en el extracto etanólico, fracción clorofórmica, fracción acetato de etilo y la fracción acuoso. Las manchas caracterizadas fueron: amarillo, celeste, violeta, azulinos y la clorofila, por la fluorescencia roja característica²⁶⁻³⁸ (Anexo 11 y 13).

Según Lock de Ugaz²⁸ la detección de los flavonoides por cromatografía de papel y capa delgada pueden hacerse por el color que desarrollan en la ultravioleta, apareciendo como manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otra, las cuales se intensifican o cambian de fluorescencia luego de su exposición a vapores de amoníaco, cual se pudo apreciar en la parte experimental (Tabla 5 y Anexo 11).

Los flavonoides detectados en la fracción de acetato de etilo y la fracción acuosa fueron aislados y purificados mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa, las manchas caracterizadas fueron recuperados del silicagel con metanol, lográndose aislar dos fracciones y cuatro fracciones respectivamente.³⁵ Por la concentración mínima de los flavonoides no se muestran curvas bien definidas, las estructuras químicas de las fracciones aisladas por la cromatografía fueron elucidadas mediante correlaciones químicas con los datos obtenidos por espectro ultravioleta en metanol y por comparación con espectros dados en la literatura por Mabry et al³⁹ sugiriéndose la estructura de flavonoides y fenilpropanoides (precursor de los flavonoides) (Anexo 17).

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).²⁶

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 cinamoilo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático a (funcionalidad benzoilo), 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.²⁶⁻³⁹ Espectrofotométricamente observamos que cada extracto posee diferente longitud de onda, en la cromatografía realizada la fracción acetato de etilo muestra longitud de onda: 270 y 323 nm y la fracción acuosa muestran longitud de onda: 269 y 329 nm, lo cual se puede atribuir en ambos casos que se trata de un dihidroflavonas, dihidroflavonoles, isoflavona y flavona (Tabla 6, Anexo 17).

Por último el ácido tánico (estándar) presenta longitud de onda: 218 y 278 nm, la primera banda II debido a un anillo aromático (funcionalidad benzoilo) (Tabla 6, Anexo 17).

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el método de captación del radical libre 1,1- difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), donde se observó que los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto etanólico y las fracciones clorofórmico, acetato de etilo y acuoso mostraron actividad antioxidante dependiente de la concentración, pero mostraron una diferencias cuando se compara con la quercetina, vitamina C y el ácido tánico tal como se muestra en sus respectivas pruebas estadísticas (Tabla 7 y Anexo 9, 14, 15 y 16), el análisis de varianza muestra que no existe diferencia significativa entre los diferentes fracciones realizados, pero no con las sustancias de comparación, es decir tiene una actividad antioxidante comparativamente similar a la quercetina, vitamina C y ácido tánico (Anexo 16). Se utiliza el estándar de vitamina C (Ácido ascórbico) porque es un poderoso antioxidante soluble en agua (hidrosoluble); figura en primera línea en la defensa antioxidante del plasma. Es un poderoso inhibidor de la oxidación de los lípidos, protector de los efectos del tabaco, actúa contra las enfermedades cardíacas, el cáncer y otros trastornos degenerativos.⁴⁰ Estudios recientes demostraron que ciertos productos de las plantas como flavonoides y taninos son sustancias antioxidantes naturales que tienen normalmente una fracción fenólica en su estructura molecular lo que atribuye un gran poder destructor de radicales libres.⁴

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular, la cual influye en la facilidad con la que un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático puede ser donado a un radical libre y en la habilidad del fenol de soportar un electrón no apareado. La estructura O-dihidroxi en el

anillo B se considera determinante en la neutralización radical y/o el potencial oxidativo.⁴⁰

Es así que en 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, esto debido a que los diferentes solventes utilizados arrastraron diferentes metabolitos que presentan actividad antioxidante, los más polares como el agua o etanol para glicósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas.²⁶ es así que los solventes utilizados para su extracción son seleccionados de acuerdo con la polaridad de los flavonoides. Los glicósidos y las geninas más polares, tales como flavonas hidroxiladas, flavonoles, auronas y chalconas son generalmente aislados a partir del material vegetal por extracción con acetona, alcohol, agua o mezcla de éstos. Las geninas altamente metiladas (menos polares) son usualmente extraídas con solventes tales como cloroformo, éter o acetato de etilo.²⁶

Por lo tanto las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa", tiene actividad antioxidante, siendo el extracto hidroalcohólico y la fracción acuosa con mayor actividad antioxidante.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico y las fracciones: clorofórmico, acetato de etilo y acuoso de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" presentaron actividad antioxidante.
2. Los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico y de las fracciones de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" son: flavonoides, taninos y/o fenoles, lactonas y/o cumarinas, alcaloides, triterpenos y/o esteroides, catequinas y saponinas. Y mediante ensayos cromatografías preliminares, se confirmó la presencia de flavonoides observándose manchas con la luz ultravioleta y en pruebas espectrales flavonoides y fenilpropanoides.
3. El extracto hidroalcohólico y la fracción acuosa presentaron una buena actividad antioxidante.

VII. RECOMENDACIONES

1. Proseguir con los estudios de la actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro* de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" puesto que demostró tener actividad antioxidante.
2. Aislar los compuestos fenólicos responsables de dicha actividad, por métodos más específicos como por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), resonancia magnética nuclear de protones RMN-H¹ y resonancia magnética nuclear de carbono 13 RMN-C¹³.
3. Realizar estudios de toxicidad de las hojas y frutos de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa".
4. Realizar estudios de las hojas de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa" en ensayos con infusión y cocimiento.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Castillo Romero P. Estudio químico y de actividad antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.). [Tesis Magistral]. Lima. Universidad PUCP; 2004.
2. López V, Akerreta S, Caverio R, Calvo I. Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. Fitoterapia [revista en internet] 2007. [acceso 20 de febrero del 2013]; 7 (1): 43-47. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RF7-1-Navarra.pdf>.
3. Criado Dabrowska C, Moya Mir MS. Vitaminas y antioxidantes. Ed. Sanidad y Ediciones, S.L. Barcelona. Actuaciones el médico; 2009.
4. Bafna A, Mishra S. Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn. Ars Pharm [revista en internet] 2005. [acceso 15 marzo del 2013]; 46 (2): 125-138. Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/316.pdf>
5. Murillo E, Lombo O, Tique M, Méndez J. 2007. Potencial Antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms (FABACEAE). Información Tecnológica [revista en internet] 2007. [acceso 25 de febrero del 2013]; 18 (6): 65-74. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642007000600009&script=sci_arttext
6. Aguado Cruzado IB. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de *Cestrum auriculatum* L. 'Heritier. "hierba santa" [Tesis pregrado]. Lima: UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2003.
7. Santillán Mendoza R. Tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad antipirética del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* "hierba santa" [Tesis pregrado]. Ayacucho. UNSCH; 2004.
8. Ylesca Gutiérrez C. Efecto sinérgico de los extractos etanólico de las hojas de *Borago officinales* L. "borraja" y de *Cestrum auriculatum* L. "hierba santa" en el tratamiento de la piresis en conejos [Tesis pregrado]. Ayacucho. UNSCH; 2005.
9. Buznego M, Pérez H. Efectos agudos del extracto del *Cestrum nocturnum* "galán de noche" sobre diferentes modelos de epilepsia experimental. Cubana de Plantas Medicinales [revista en internet] 2002. [acceso 21 de febrero del 2013]; 7(2):73-77. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol7_2_02/pla03202.pdf
10. Bautista S, Barrera L, Hernández A, Velázquez M, Alia I, Guillén D. Polvos, extractos y fracciones de hojas de *Cestrum nocturnum* L. y su actividad antifúngica en dos aislamientos de *Fusarium* spp. UDO Agrícola [revista en internet] 2008. [acceso 05 de mayo del 2013]; 8(1):42-51. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08006>
11. Aucasime Medina L. Certificado de clasificación taxonómica de Herbarium Huamangensis y descripción botánica de *Cestrum auriculatum* L. Heritier "hierba santa". FCB.UNSCH. Ayacucho; 2013.
12. Palacios Vaccaro J. plantas medicinales nativas del Perú. consejo nacional de ciencias y tecnología CONCYTEC. Perú. 1997.
13. Pietrellini F. plantas medicinales en un piso alto y mesoandino: estudio etnobotánica de la zona d Puquio – Ayacucho. Ayacucho: asociación huirto; 2007.
14. Mostacero León J, Mejía Coico F. Taxonomía de fanerógamas peruanas. Editorial CONCYTEC. Perú; 1993.
15. Ugartondo Vasadevall V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente

- al estrés oxidativo en modelos celulares. [Tesis pregrado]. España. Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia; 2009.
16. López A, Fernando C, Lazarova Z, Bañuelos R, Sánchez S. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. Anacem. [revista en internet] recibido el 13 de enero de 2012, Aceptado el 15 de marzo de 2012. [acceso 14 de febrero del 2013]; 6 (1). Disponible en: <http://revista.anacem.cl/web/wp-content/uploads/2012/04/Antioxidantes-un-paradigma-en-el-tratamiento-de-enfermedades.pdf>
 17. Mayor R. 2010. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. Inst. Med. Trop. [revista en internet] 2010. [acceso 11 de mayo del 2013]; 5 (2): 23-29. Disponible en: <http://scielo.ics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>
 18. Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Med Milit Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto" [revista en internet] 2001. [acceso 22 de marzo del 2013]; 30(1):36-44. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/mil07100.pdf
 19. Enciso Roca E. Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides extraídos de las hojas de *Jungia rugosa* Less "matico de puna" [Tesis Doctoral]. Lima. UNMSM; 2010.
 20. Vaya J, Aviram M. Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents. [revista en internet] 2001 Mayo. [acceso 14 de marzo del 2013]; 1(1):99-117. Disponible en: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmciema/2001/00000001/00000001/art00007?crawler=true>
 21. Maestri M, Nepote V, Lamarque A, Zygodlo J. Productos naturales como antioxidantes. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal - CONICET – UNC. Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina; 2006. Disponible en: http://www.trnres.com/ebook/uploads/imperato/T_1231133728Imperato-5.pdf
 22. Sikora E, Cieslik E, Topolska K. Las fuentes de antioxidantes naturales. Nutrición de la Universidad de Agricultura de Cracovia. Polonia. Acta Sci.Pol. Desarrol. Aliment [revista en internet] 2008. [acceso 24 de febrero del 2013]; 7 (1), 5-17. Disponible en: http://www.food.actapol.net/pub/1_1_2008.pdf
 23. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Med Milit [revista en internet]. 2002. [acceso 19 de febrero del 2013]; 31(2):126-133. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v31n2/mil09202.pdf>
 24. Quintanar M, Calderón J. Capacidad antioxidante total: Bases y aplicaciones. Educación Bioquímica REB [revista en internet] 2009. [acceso 20 Febrero del 2013]; 28(3):89-101. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49016098004>
 25. Toma Zarate JP. Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja bredicaliyx* "Wayra muña" sobre el cerebro de ratas Albinas Holtzman recién nacidas en un modelo de hipoxia isquémica. [Tesis pregrado]. Ayacucho. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2008.
 26. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontifica Universidad Católica del Perú. 2ª Ed. Lima. Fondo Editorial; 1994.
 27. Kuklinski C. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 2000.

28. Muñoz A, Ramos F. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. Horizonte Médico [revista en internet] Junio 2007. [acceso 10 de febrero del 2013]; 7(1): 23-31. Disponible en: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2007_I/Art3_Vol7_N1.pdf
29. Muñoz A, Ramos D, Alvarado C, Castañeda, B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Soc Quím [revista en internet] 2007 Julio. [acceso 20 de febrero del 2013]; 73(3): 142-149. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v73n3/a03v73n3.pdf>
30. Villar de Fresno M. Farmacognosia general: Síntesis. España; 1999.
31. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Invest Biomed [revista en internet] 2003. [acceso 04 de mayo del 2013]; 22(1) 48-57. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.pdf
32. Bruneton J. Plantas Medicinales. Fitoquímica y Farmacognosia. España: Acribia Zaragoza. S. A. España. 2001.
33. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Fac. Med. UNAM [revista en internet] 2009 Marzo-Abril. [acceso 15 de febrero del 2013]; 52 (2): Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>.
34. Rojas salcedo F. Determinación del efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Baccharis tricuneata* "yana taya". [Tesis pregrado]. Ayacucho. UNSCH; 2009.
35. Aguilar Felices E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis Magistral]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
36. Miranda Martínez M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana. Cuba; 2002.
37. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico [revista en internet] 2008 Julio. [acceso 19 de febrero del 2013]; 8(1). Disponible en: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_I/Art4_Vol8_N1.pdf.
38. Aguilar Felices E. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix* Epl. "Wayra Muña". Informe de investigación en desarrollo de potenciales económicas y bionegocios. Área de recursos biológicos y terapéuticos. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas. Ayacucho. UNSCH; 2010.
39. Mabry T, Markham K, Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin; 1970.
40. Calderón Hidalgo P. Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento. [Tesis pregrado]. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 8. Certificado de la clasificación taxonómica de *Cestrum auriculatum* L' Heritier "hierba santa".



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

CERTIFICA

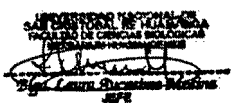
Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Nery, LÓPEZ URBANO, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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	:	SOLANALES
FAMILIA	:	SOLANACEAE
GENERO	:	Cestrum
ESPECIE	:	<i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier
N.V.	:	"hierba santa"

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

Ayacucho, 05 de Febrero del 2013



JEFE

Anexo 2

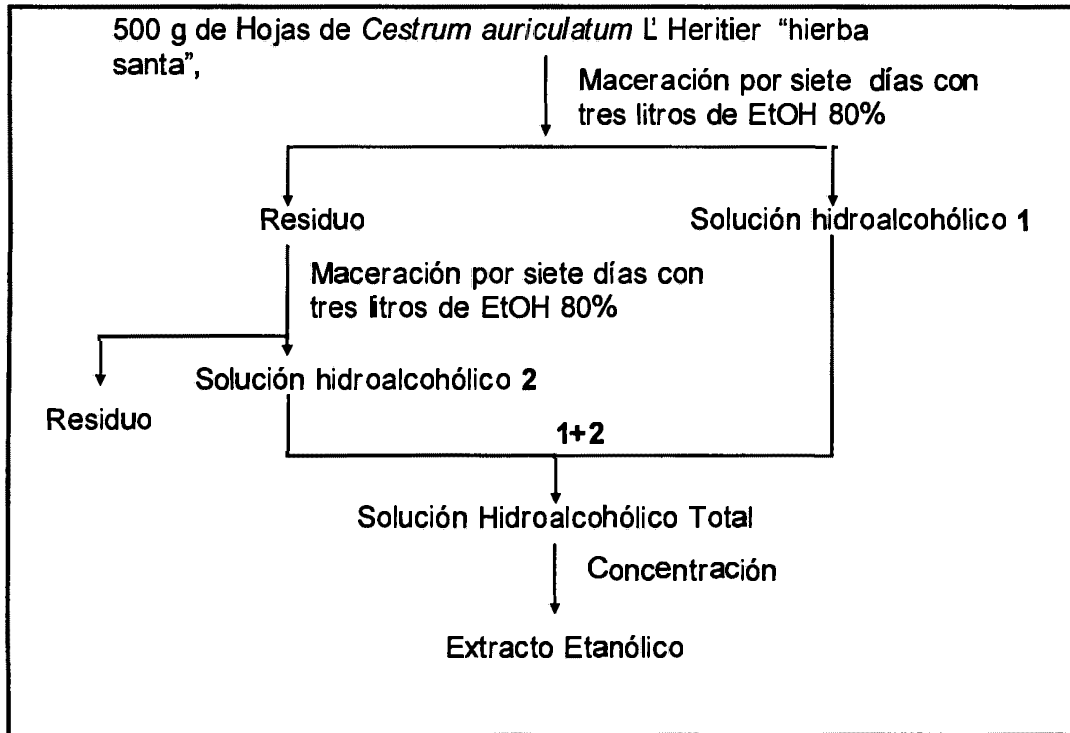


Figura 7. Flujograma de obtención del extracto etanólico.

Anexo 3

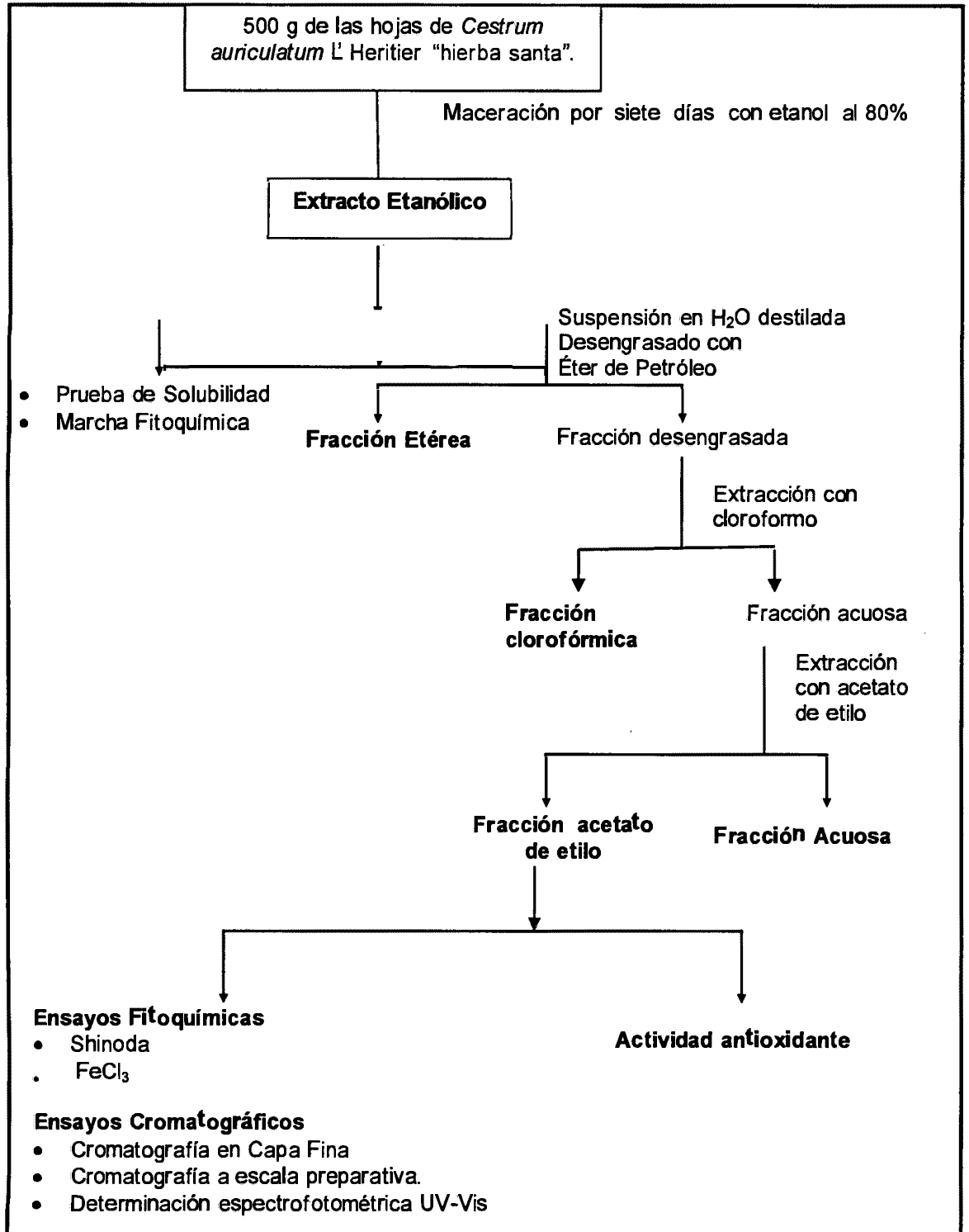


Figura 8. Flujograma del fraccionamiento del extracto hidroalcohólico.

Anexo4

Tabla 9. Tamizaje fitoquímico según el modelo de Miranda (2002).

Metabolitos secundarios	Ensayos con reactivos	Resultados
		Observación
Alcaloides	Dragendorff Mayer Hager Wagner	Formación de precipitado en todas las reacciones.
Lactonas y cumarinas	Baljet	Formación de una coloración roja.
Flavonoides	Shinoda	Coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo en la fase amilica.
Quinonas	Borntrager	La fase amoniaca es de color rojizo o rosada.
Catequinas	Catequinas	Coloración verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo.
Saponinas	Espuma	Formación de espuma en la superficie.
Azucares reductoras	Fehling	Formación de precipitado rojo ladrillo.
Taninos y fenoles	Cloruro férrico	Formación de una coloración negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Coloración azul violáceo.
Cardenólidos	Kedde	Coloración violácea.
Resinas	Resinas	Formación de precipitado.

Anexo 5

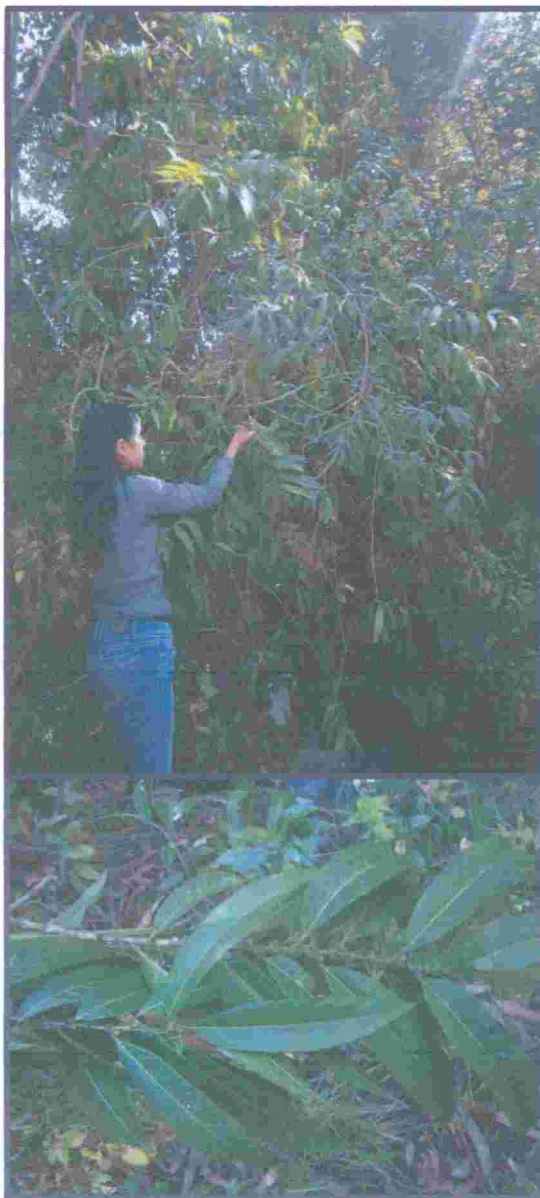


Figura 9. Recolección de la muestra.

Anexo 6



Figura 10. Concentración del extracto hidroalcohólico en el rotavapor.

Anexo 7



Figura 11. Extracción líquido – líquido del extracto hidroalcohólico.

Anexo 8



Figura 12. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico y de las fracciones.

Anexo 9



Figura 13. Tubos de ensayo con la prueba de captación de radical libre DPPH del extracto hidroalcohólico y de las fracciones.

Anexo 10



Figura 14. Sembrado y desarrollo de la placa cromatográfica (CCF).

Anexo 11

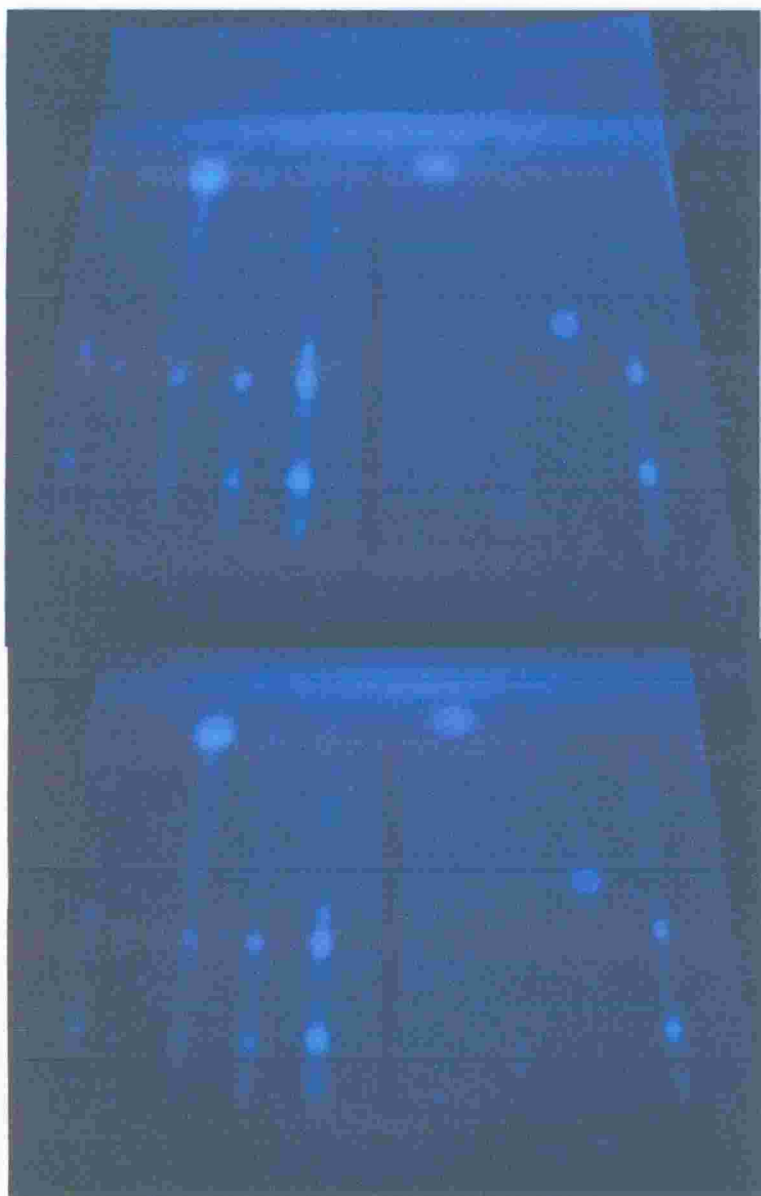


Figura 15. Revelado de las placas cromatográficas con luz ultravioleta con y sin NH_3 del extracto hidroalcohólico y de las fracciones.

Anexo 12

Tabla 10. Coloración y fluorescencia de los estándares revelados con cloruro férrico y luz ultravioleta.

Estándares	Visualización visible	Cloruro férrico al 1%	Fluorescencia al ultravioleta	
			Sin NH₃	Con NH₃
Ácido tánico	Amarillo limón	Negro	Negro	Se intensifica la fluorescencia.
Ácido salicílico	Amarillo limón	Rojo	Azulino	-
Quercetina	Amarillo limón	Marrón	Marrón, amarillo	Se intensifica la fluorescencia.
Vitamina C	Amarillo limón	Verde azulado	Verde amarillo	Se intensifica la fluorescencia.

Anexo 13

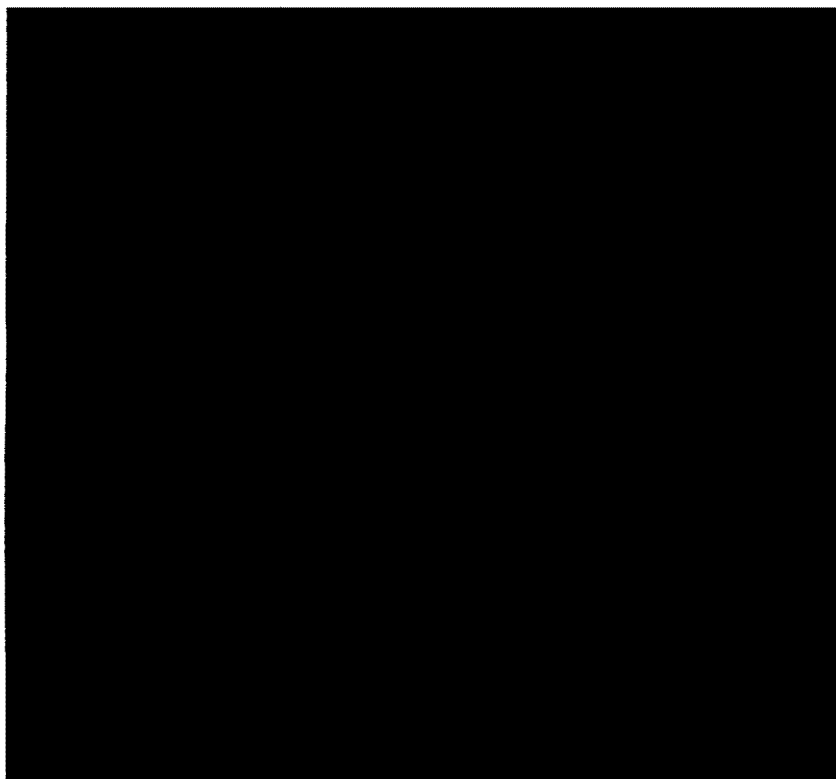


Figura 16. Cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico y diferentes fracciones revelados con cloruro férrico al 1%.

Anexo 14

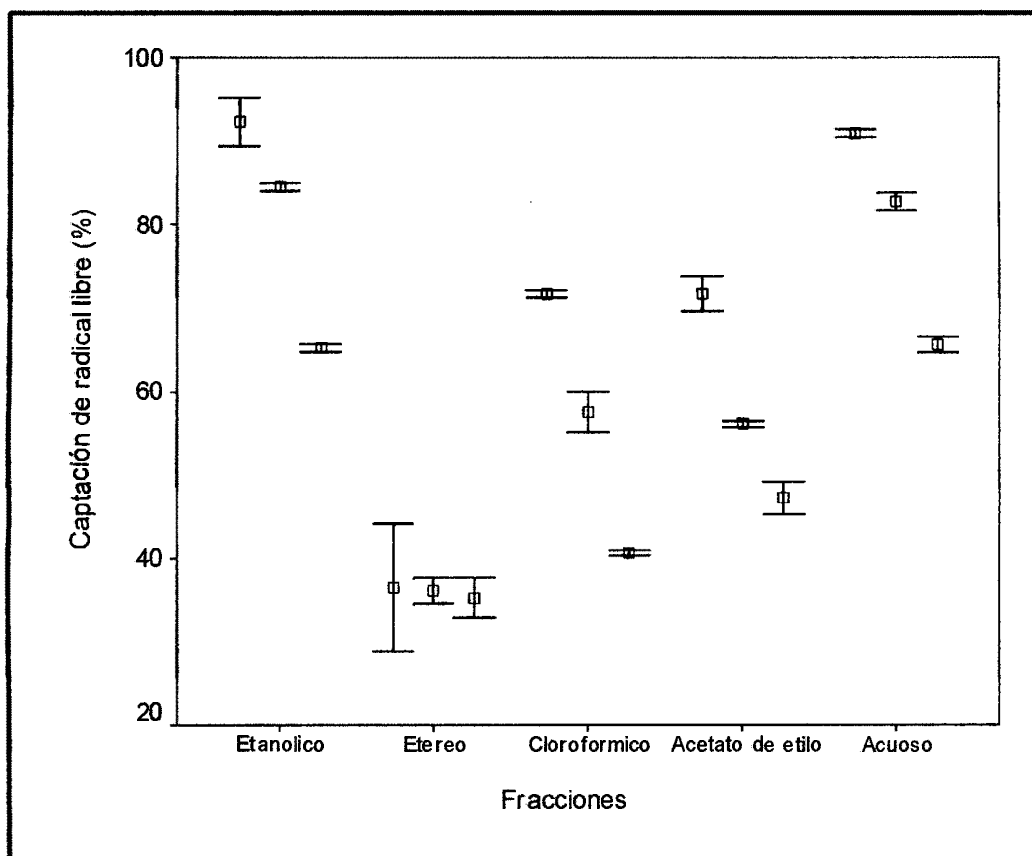


Figura 17. Porcentaje de captación del radical libre DPPH del extracto etanólico y las fracciones a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.

Anexo 15

Tabla 11. Porcentaje de captación del radical libre DPPH por efecto de los estándares.

Repeticiones	Ácido tánico			Vitamina C			Quercetina		
	100	50	10	100	50	10	100	50	10
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
1	97,72	96,67	96,67	97,90	97,72	96,67	98,330	96,00	96,91
2	97,55	96,85	96,50	98,25	97,37	96,85	97,75	97,41	97,22
3	97,72	96,67	96,67	98,07	97,55	96,67	97,70	97,75	95,50
promedio	97,66	96,73	96,61	98,07	97,55	96,73	97,91	97,00	96,50

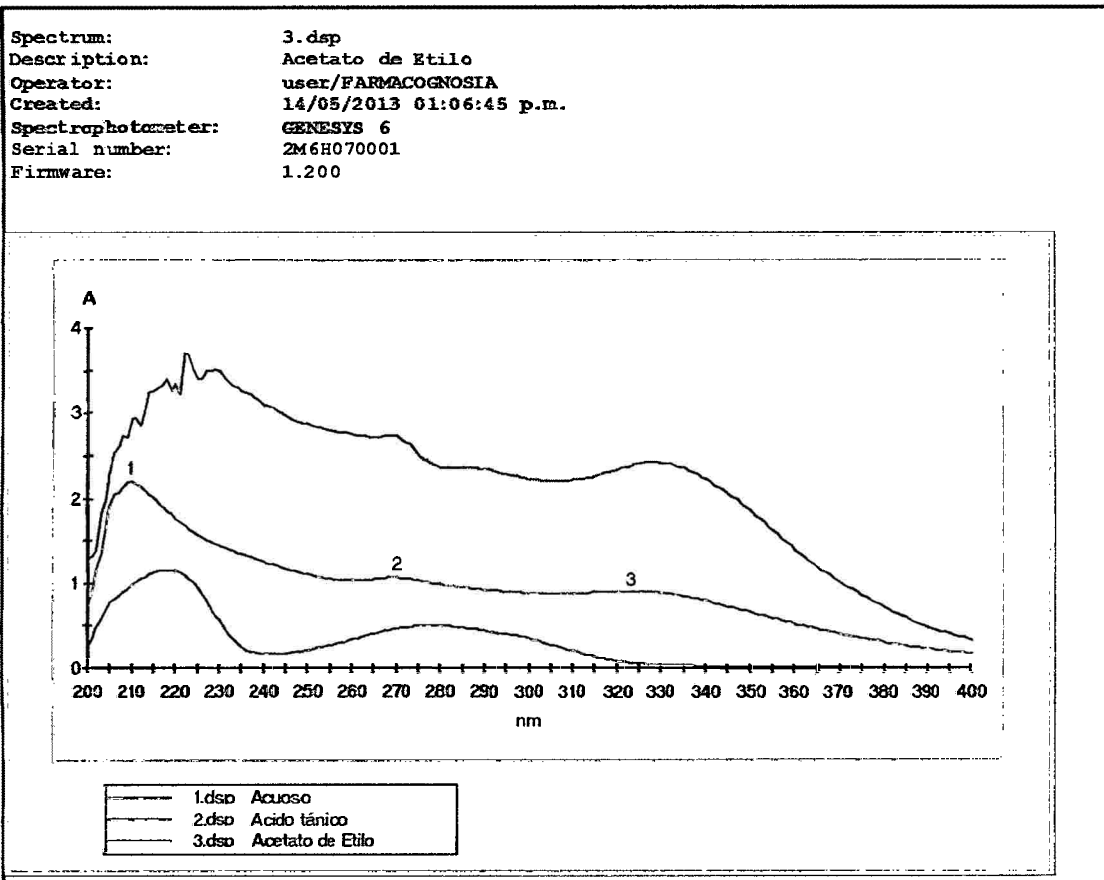
Anexo 16

Tabla 12. Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH.

ANOVA						
			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F Sig
Captación de radical libre(%)	Covariables	Fracciones	388,835	1	388,835	1,221 0,276
	Efectos principales	Concentración (µg/ml)	3611,533	2	1 805,766	5,669 0,007
	Modelo		4 000,368	3	1 333,456	4,187 0,011
	Residual		13 058,748	41	318,506	
	Total		17 059,116	44	387,707	

- Captación de radical libre(%) por concentración (µg/ml) con fracciones
- todos los efectos introducidos simultáneamente

Anexo 17



1. dsp Acuoso

Máxima	Threshold: 0,01 A				
1 208nm;	2,729A	2 211 nm;	2,950A	3 218 nm;	3,393 A
4 220nm;	3,335A	5 222nm;	3,699A	6 229 nm;	3,508A
7 269nm;	2,733A	8 329nm;	2,413		

2. dsp Ácido tánico

Máxima	Threshold: 0,01 A		
1 218 nm;	1,157 A	2 278 nm;	0,510 A

3. dsp Acetato de Etilo

Máxima	Threshold: 0,01 A				
1 210 nm;	2,199 A	2 270 nm;	1,066 A	3 323 nm;	0,902 A

Figura 18. Curva espectral al ultravioleta de la fracciones de acetato de etilio y acuoso.

Anexo 18

Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
Actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier	¿Tendrán actividad antioxidante las fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier	Objetivo general • Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa".	Las fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa" tienen actividad antioxidante.	Variable independiente - Fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa". Indicadores - Concentración de 100 µg/ml. - Concentración de 50 µg/ml.	<i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa", es una planta arbustiva, tallos ramificados desde la base, las hojas simples, alternas pecioladas, generalmente con presencia de aurículas en la base del pecíolo. Inflorescencia terminales y axilares, flores con cortamente pedunculadas, heteroclamídeas, pentámeras y bisexuales, ovario súpero, fruto baya.¹¹ Radical libre Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos.¹⁵ Antioxidantes Un "Antioxidante" es "cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de este sustrato".³⁻¹⁵	Tipo de Investigación: Básico- Descriptivo. Régimen de Investigación Libre La población: Constituida por la especie <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa" que crece en la localidad de Huamanguilla a 3 276 m.s.n.m. provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. La muestra: Estará censitada por 500 g de hojas secas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa" recolectadas en buen estado. Diseño metodológico Se realizará fracciones aisladas de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> L' Heritier "hierba santa", en las cuales se comparará su actividad antioxidante mediante el método de Casañeda et al.³⁷ Determinación de la actividad antioxidante Actividad Secuestradora del Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) Análisis de datos Mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95%.

Actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”. Ayacucho – 2013.

Nery López Urbano¹, Edwin Carlos Enciso Roca¹
¹ Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

Los radicales libres son componentes normales de la célula y tejidos al elevarse o disminuirse las concentraciones fisiológicas puede acarrear importantes alteraciones funcionales como: enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativos, inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes y determinadas formas del cáncer. El presente trabajo de investigación básico descriptivo se realizó con la finalidad de determinar la actividad antioxidantes de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”, durante los meses de febrero a julio del 2013, en los laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La muestra fue recolectada en la localidad de Huamanguilla, departamento de Ayacucho, durante el mes de enero, obteniendo el extracto hidroalcohólico de las hojas y el fraccionamiento por extracción líquido – líquido con diferentes solventes: éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo; con los cuales se realizó el tamizaje fitoquímico, complementado con cromatografía en capa fina y prueba espectral ultravioleta; la actividad antioxidante, se evaluó mediante el ensayo de captación de radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). El extracto presenta flavonoides, taninos y/o fenoles, alcaloides, lactonas y/o cumarinas, triterpenos y/o esteroides, catequinas y saponinas; mediante ensayos cromatográficos se confirmó la presencia de flavonoides observándose manchas con la luz ultravioleta y en prueba espectral ultravioleta flavonoides y fenilpropanoides. El extracto hidroalcohólico y la fracción acuoso presentaron mayor 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, seguido por la fracción acetato de etilo y la fracción cloroformo. En conclusión se afirma que las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa” tienen actividad antioxidante.

Palabras Clave: *Cestrum auriculatum* L Heritier, fracciones aisladas, actividad antioxidante.

SUMMARY

Free radicals are normal components of the cell and tissue to be raised or lowered physiological concentrations can have significant functional alterations such as cardiovascular disease, neurodegenerative, inflammatory diseases, autoimmune diseases and certain forms of cancer. This basic descriptive research was conducted in order to determine the antioxidant activity of fractions isolated from the leaves of *Cestrum auriculatum* Heritier L “holy herb”, during the months of February to July 2013, in the laboratories of the area of Pharmacy School of Biological Sciences, National University of San Cristobal de Huamanga. The sample was collected in the town of Huamanguilla, Ayacucho department, during the month of January, getting the hydroalcoholic extract of the leaves and fractionation by liquid - liquid extraction with different solvents: petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, with which phytochemical screening was supplemented with thin layer chromatography and ultraviolet spectral test, the antioxidant activity was evaluated by uptake assay free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). The extract has flavonoids, tannins and / or phenols, alkaloids, lactones and / or coumarins, triterpenes and / or steroids, catechins and saponins; using chromatographic assays confirmed the presence of flavonoids staining observed with ultraviolet light and ultraviolet spectral test flavonoids and phenylpropanoids. The alcoholic extract and aqueous fraction showed higher antioxidant activity 92.24%, 84.41%, 65.09% and 90.89%, 82.78%, 65.62% respectively at concentrations of 100 µg / ml , 50 µg / ml and 10 µg / ml, followed by ethyl acetate fraction and the chloroform fraction. In conclusion states that the fractions isolated from the leaves of *Cestrum auriculatum* Heritier L “holy herb” have antioxidant activity.

Key words: *Cestrum auriculatum* L Heritier, fractions isolated, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser usados en la industria de alimentos, cosméticos y en la atención de la salud para prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres en nuestro organismo.¹

En los últimos años se han destacado un gran interés por los radicales libres y su relación con el envejecimiento celular. Los radicales libres son especies químicas, atómicas o moleculares, con un electrón desapareado. Este tipo de configuración electrónica hace que sean muy inestables y altamente reactivos, pudiendo alterar estructuras biológicas fundamentales como lípidos de membranas, ácidos nucleicos y proteínas. Todo ello se traduce en un aumento del estrés oxidativo, que está directamente relacionado con el envejecimiento celular y algunos procesos fisiológicos como: enfermedades cardiovasculares, crónicas, neurodegenerativos, cataratas y determinadas formas del cáncer. Para neutralizar a los radicales libres, nuestro organismos poseen sistemas fisiológicos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, pero el estilo de vida actual está inclinando la balanza hacia un aumento del estrés oxidativo, por ello es recomendable el aporte de antioxidantes exógenos bien a través de la dieta, suplementos de vitaminas y minerales o mediante el consumo de plantas medicinales por sus metabolitos secundarios presentes como: fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, esteroides y carotenoides.^{2,3}

Las evidencias experimentales sugieren que los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (EROS) pueden estar relacionados con un gran número de enfermedades. Como las plantas producen gran cantidad de fracciones químicas que actúan como antioxidantes para controlar el estrés oxidativo causado por la radiación solar y el oxígeno, pueden servir de fuente para la obtención de nuevos compuestos antioxidantes.⁴

Si bien los organismos vivos soportan multitudinarios factores endógenos y exógenos de estrés oxidativo, también poseen numerosos sistemas de defensa antioxidantes regulables, enzimáticos (superóxido dismutasa, la catalasa, la GSH-peroxidasa y no enzimáticos (Se, Zn, vitaminas C, E y carotenoides) que conforman la defensa antioxidante frente a las EROS.⁵

Estudios recientes demuestran que ciertos productos de las plantas incluyen sustancias fenólicas, como flavonoides y taninos. Estas sustancias antioxidantes naturales tienen normalmente una fracción fenólica en su estructura molecular. Los ácidos orgánicos,

carotenoides, hidrolizados de proteínas y taninos pueden actuar como antioxidantes o tener efectos sinérgicos cuando se utilizan conjuntamente con antioxidantes fenólicos. Los antioxidantes fenólicos tienen un gran poder destructor de radicales libres.⁴

En este sentido nos enfocamos en el estudio de la actividad antioxidante de los diferentes fracciones de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”, para lo cual se utilizó al DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) como un RL estable, el cual se enfrentó con las diferentes fracciones obtenidas (extracto etanólico, fracción etéreo, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso), dando como resultados positivos la disminución de la coloración del DPPH, que va de un color violáceo hasta el desvanecimiento de dicha coloración en comparación con los estándares de la vitamina C, quercetina, ácido salicílico y ácido tánico a las mismas condiciones.

Objetivo general

- Evaluar la actividad antioxidante de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”.

Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”.
- Comparar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de febrero a julio del 2013.

Definición de la población y muestra

La población. Hojas de la especie *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”, que crece en la localidad de Huamanguilla a 3 276 m.s.n.m. provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

La muestra. Constituyó 500 g de hojas secas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”.

Diseño de investigación

Tipo: básico

Nivel: descriptivo

Metodología para la recolección de datos

Recolección de la muestra

Las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa” fueron recolectadas en horas de la mañana, en buen estado de conservación, durante el mes de enero, luego fueron limpiadas, secadas y guardadas en bolsas de tela de color oscuro.⁶

Preparación del extracto hidroalcohólico

Una vez triturada las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”, se utilizó 500 g de muestra molida y luego se procedió a realizar una extracción hidroalcohólico macerando en frascos de color ámbar por un periodo de una semana, durante el proceso se agitó el frasco periódicamente, seguidamente se procedió a filtrar y evaporar a sequedad.^{7,8}

Fraccionamiento del extracto hidroalcohólico

Una vez obtenida el extracto etanólico se redisolvió en agua destilada y luego se procedió a fraccionar en el embudo de separación con diferentes solventes; éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo y la fracción que queda es la fracción acuosa.⁷

Tamizaje fitoquímico

Se realizaron las pruebas de coloración y precipitación.^{9,10}

Identificación

- Cromatografía en capa fina (CCF).⁹
- Prueba espectral.⁹

Determinación de la actividad antioxidante

Método de la actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

Fundamento

La técnica empleada de DPPH consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color violáceo, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radical libre.⁷

Procedimiento

- Una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l
- Una solución metanólica de fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum*
- *auriculatum* L Heritier “hierba santa” a 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, se dejó a temperatura ambiente por cinco minutos y se realizó la lectura a 517 nm en el espectrofotómetro.

- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 (sol. B) para obtener una concentración final de 50 µg/ml y luego en una proporción de 1: 9 (sol. C) para obtener una concentración final de 10 µg/ml.
- Con las soluciones B y C se procedió igual que en el caso anterior.

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

Análisis de datos

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

RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico al 1%	+++	Coloración verde negro
Taninos	Solución de gelatina (clara de huevo)	+++	Forma precipitado
Catequina	Carbonato de sodio + luz UV	+++	Coloración verde carmelita a luz UV
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman–burchard	++	Coloración verde oscuro en dos fases
Saponinas	Espuma	+++	Formación de espuma
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+	Coloración rojo
Flavonoides	Shinoda	+	Coloración naranja bajo
Alcaloides	Dragendorff	+	Precipitado naranja
	Mayer	+	Precipitado crema
	Wagner	+	Turbidez definida

Leyenda: (-): Ausente, (+): Poco, (++) : Moderado, (+++): Abundante.

Tabla 2. Metabolitos secundarios de las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”.

Fracciones	Ensayos	Resultados	Metabolitos secundarios	Observaciones
Clorofórmico	Espuma	++	Saponinas	Formación de espuma
	Cloruro férrico al 1%	+	Compuestos fenóles	Coloración verde negro
	Lieberman – Burchard	++	Triterpenos y/o esteroides	Coloración verde oscuro en dos fases
	Carbonato de sodio + luz UV	+	Catequina	Coloración verde carmelita
	Dragendorff, Mayer	+	Alcaloides	Precipitado
Acetato de etilo	Wagner			
	Espuma	++	Saponinas	Formación de espuma
	Cloruro férrico al 1%	+++	Fenoles y/o taninos	Coloración verde negro
	Solución de gelatina	+	Taninos	Precipitado
	Shinoda	+	Flavonoides	Coloración naranja bajo
Acuoso	Carbonato de sodio + luz UV	++	Catequina	Coloración verde carmelita
	Dragendorff, Mayer	+	Alcaloides	Precipitado
	Wagner			
	Espuma	+++	Saponinas	Formación de espuma
	Cloruro férrico al 1%	+++	Fenoles y/o taninos	Coloración verde negro
	Solución de gelatina	++	Taninos	Precipitado
	Shinoda	+	Flavonoides	Coloración naranja bajo
	Carbonato de sodio + luz UV	+++	Catequina	Coloración verde carmelita
	Dragendorff, Mayer	+	Alcaloides	Precipitado
	Wagner			

Leyenda: (-): Ausente, (+): Poco, (++) Moderado, (+++) Abundante.

Tabla 3. Coloración y fluorescencia de las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”.

Fracciones	Visualización visible	Cloruro férrico a 11%	Fluorescencia al ultravioleta	
			Sin NH ₃	Con NH ₃
Etanólico	Amarillo limón	Verde	Amarillo, celeste, violeta	Se intensifica la fluorescencia.
Etéreo	Amarillo limón	-	Fluorescencia muy bajo	-
Cloro fórmico	Amarillo limón	Verde	Azulino, amarillo	Se intensifica la fluorescencia.
Acetato de etilo	Amarillo limón	Verde	Celeste, violeta	Se intensifica la fluorescencia.
Acuoso	Amarillo limón	Verde	Celeste, violeta, amarillo	Se intensifica la fluorescencia.

Tabla 4. Longitud de onda de las fracciones aisladas de las hojas de *Cestrum auriculatum* L Heritier “hierba santa”.

Fracciones	Longitud de onda de máxima absorbancia (nm)	
	Banda II	Banda I
Acetato de etilo	270	323
Acuoso	269	329
Ácido tánico	218	278

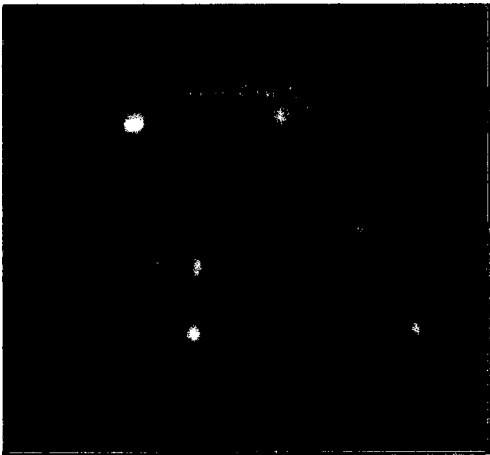


Figura 1. Revelado de las placas cromatográficas con la luz ultravioleta del extracto hidroalcohólico y de las fracciones.

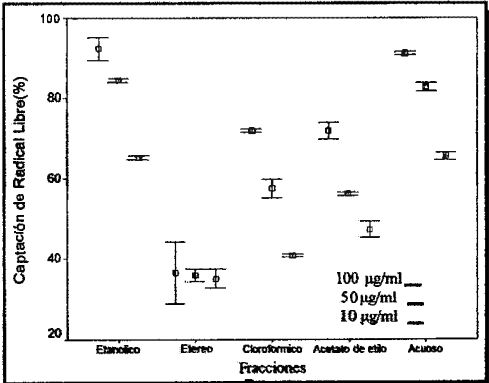


Figura 2. Porcentaje de captación del radical libre DPPH del extracto etanólico y las fracciones a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se propuso demostrar que los extractos obtenidos de las hojas de *Cestrum auriculatum* L. Heritier "hierba santa", presentan actividad antioxidante, los cuales son los responsables de las actividades farmacológicas.

Para la detección y clasificación de fracciones con actividad antioxidante fue necesario elegir el método que permita rapidez, facilidad de aplicación a una variedad de muestra que sea relativamente económico y fácilmente reproducible. Se eligió el método de neutralización del radical libre DPPH, el cual permite estimar la capacidad de captación de radicales libres por antioxidantes fenólicos principalmente.¹

Para la extracción de los diversos metabolitos se realizó extracción líquido - líquido donde se utilizó diferentes solventes: el éter de petróleo con la finalidad de eliminar las grasas, ceras, pigmento y otros metabolitos, la segunda extracción con cloroformo que tiene como finalidad extraer a los terpenos y sesquiterpenos, la tercera extracción con acetato de etilo que tiene la finalidad de extraer compuestos fenólicos y finalmente nos queda como residuo la fracción acuosa que también fue estudiado para evaluar la actividad antioxidante.⁸

Tabla 1 y 2 el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico y las fracciones aisladas es desarrollado según la técnica de Lock de Ugaz⁹ y Miranda¹⁰ lo cual reportan la presencia de taninos y/o fenoles, flavonoides, lactonas y/o cumarinas, saponinas, triterpenos y/o esteroides, catequinas y alcaloides; éstos metabolitos concuerdan con el trabajo de tamizaje realizado por Santillán.¹²

El ensayo cualitativo para detectar los taninos son cloruro férrico al 1 por ciento y gelatina: para taninos hidrolizables es precipitado azul y taninos condensados es precipitado verde y con la solución de gelatina (clara de huevo) forma precipitado característico^{9,13}, por lo tanto el extracto etanólico y las fracciones de las hojas de *Cestrum auriculatum* L. Heritier "hierba santa" pertenece a los taninos condensados (Tabla 1 y 2). Los taninos están constituidas por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructuras polifenólicos, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, celulosas, gelatinas). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus propiedades principales: curtir la piel y su poder astringente.¹³

Mediante ensayos cromatográficos preliminares, se confirmó la presencia de flavonoides observándose manchas con luz ultravioleta (CAMAG) 366 nm y así mismo revelándose con FeCl₃ al 1 por ciento para compuestos fenólicos. Los flavonoides y los compuestos fenólicos fueron detectados en el extracto etanólico, fracción

clorofórmica, fracción acetato de etilo y la fracción acuosa. Las manchas caracterizadas fueron: amarillo, celeste, violeta, azulinos y la clorofila, por la fluorescencia roja característica^{9,10} (Figura 1).

Según Lock de Ugaz⁹ la detección de los flavonoides por cromatografía de papel y capa delgada pueden hacerse por el color que desarrollan en la ultravioleta, apareciendo como manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otra, las cuales se intensifican o cambian de fluorescencia luego de su exposición a vapores de amoníaco, cual se pudo apreciar en la parte experimental (Tabla 3 y Figura 1).

Los flavonoides detectados en la fracción de acetato de etilo y la fracción acuosa fueron aislados y purificados mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa, las manchas caracterizadas fueron recuperados del silicagel con metanol, lográndose aislar dos fracciones y cuatro fracciones respectivamente.⁷ Por la concentración mínima de los flavonoides no se muestran curvas bien definidas, las estructuras químicas de las fracciones aisladas por la cromatografía fueron elucidadas mediante correlaciones químicas con los datos obtenidos por espectro ultravioleta en metanol y por comparación con espectros dados en la literatura por Mabry et al.¹⁴ sugiriéndose la estructura de flavonoides y fenilpropanoides (precursor de los flavonoides).

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).⁹

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 cinamoilo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático a (funcionalidad benzoilo), 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-sustituídos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm.^{9,14}

Espectrofotométricamente observamos que cada extracto posee diferente longitud de onda, en la cromatografía realizada la fracción acetato de etilo muestra longitud de onda: 270 y 323 nm y la fracción acuosa muestran longitud de onda: 269 y 329 nm, lo cual se puede atribuir en ambos casos que se trata de un dihidroflavonas, dihidroflavonoles, isoflavona y flavona (Tabla 4). Por último el ácido tánico (estándar) presenta longitud de onda: 218 y 278 nm, la primera banda

II debido a un anillo aromático (funcionalidad benzoilo) (Tabla 4).

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el método de captación del radical libre 1,1- difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), donde se observó que los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto etanólico y las fracciones clorofórmico, acetato de etilo y acuoso mostraron actividad antioxidante dependiente de la concentración, pero mostraron una diferencias cuando se compara con la quercetina, vitamina C y el ácido (Figura 2), el análisis de varianza muestra que no existe diferencia significativa entre los diferentes fracciones realizados, pero no con las sustancias de comparación, es decir tiene una actividad antioxidante comparativamente similar a la quercetina, vitamina C y ácido tánico. Se utiliza el estándar de vitamina C (Ácido ascórbico) porque es un poderoso antioxidante soluble en agua (hidrosoluble); figura en primera línea en la defensa antioxidante del plasma. Es un poderoso inhibidor de la oxidación de los lípidos, protector de los efectos del tabaco, actúa contra las enfermedades cardiacas, el cáncer y otros trastornos degenerativos.¹⁵ Estudios recientes demostraron que ciertos productos de las plantas como flavonoides y taninos son sustancias antioxidantes naturales que tienen normalmente una fracción fenólica en su estructura molecular lo que atribuye un gran poder destructor de radicales libres.⁴

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular, la cual influye en la facilidad con la que un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático puede ser donado a un radical libre y en la habilidad del fenol de soportar un electrón no apareado. La estructura O-dihidroxi en el anillo B se considera determinante en la neutralización radical y/o el potencial oxidativo.⁴⁰

Es así que en 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, esto debido a que los diferentes solventes utilizados arrastraron diferentes metabolitos que presentan actividad antioxidante, los más polares como el agua o etanol para glicósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas,⁹ es así que los solventes utilizados para su extracción son seleccionados de acuerdo con la polaridad de los flavonoides. Los glicósidos y las geninas más polares, tales como flavonas hidroxiladas, flavonoles, auronas y chalconas son

generalmente aislados a partir del material vegetal por extracción con acetona, alcohol, agua o mezcla de éstos. Las geninas altamente metiladas (menos polares) son usualmente extraídas con solventes tales como cloroformo, éter o acetato de etilo.⁹

Por lo tanto las hojas de *Cestrum auriculatum* L. Heritier "hierba santa", tiene actividad antioxidante, siendo el extracto hidroalcohólico y la fracción acuosa con mayor actividad antioxidante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castillo Romero P. Estudio químico y de actividad antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.). [Tesis Magistral]. Lima. Universidad PUCP; 2004.
2. López V, Akerreta S, Caverro R, Calvo I. Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. Fitoterapia [revista en internet] 2007. [acceso Febrero de 2013]; 7 (1): 43-47. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RF7-1-Navarra.pdf>.
3. Criado Dabrowska C, Moya Mir MS. Vitaminas y antioxidantes. Ed. Sanidad y Ediciones, S.L. Barcelona. Actuaciones el médico; 2009.
4. Bafna A, Mishra S. Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchoides* Gaertn. Ars Pharm [revista en internet] 2005. [acceso Febrero de 2013]; 46 (2): 125-138. Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/316.pdf>
5. Murillo E, Lombo O, Tique M, Méndez J. 2007. Potencial Antioxidante de Bauhinia Kalbreyeri Harms (FABACEAE). Información Tecnológica [revista en internet] 2007. [acceso Febrero de 2013]; 18 (6): 65-74. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642007000600009&script=sci_arttext
6. Rojas salcedo F. Determinación del efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Baccharis tricuneata* "yana taya". [Tesis pregrado]. Ayacucho. UNSCH; 2009.
7. Aguilar Felices E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis Magistral]. Lima. UNMSM; 2007.
8. Aguilar Felices E. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja brevicallix* Epl. "Wayra Muña". Informe de investigación en desarrollo de potenciales económicas y bionegocios. Área de recursos biológicos y terapéuticos. Instituto

- de Investigación de Ciencias Biológicas. Ayacucho. UNSCH; 2010.
9. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontifica Universidad Católica del Perú. 2ª Ed. Lima. Fondo Editorial; 1994.
 10. Miranda Martínez M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana. Cuba; 2002.
 11. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Médico* [revista en internet]. 2008 Julio. [acceso Febrero de 2013]; 8(1). Disponible en: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_I/Art4_Vol8_N1.pdf.
 12. Santillán Mendoza R. Tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad antipirética del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* “hierba santa” [Tesis pregrado] Ayacucho. UNSCH; 2004.
 13. Kuklinski C. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 2000.
 14. Mabry T, Markham K, Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin; 1970.
 15. Calderón Hidalgo P. Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento. [Tesis pregrado] Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007.