

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

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



**Actividad antioxidante de las fracciones aisladas de
las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P
“chinchilcoma”. Ayacucho – 2012.**

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

**PRESENTADO POR:
Bach. BELLIDO MUJICA, GABRIELA**

**AYACUCHO – PERÚ
2013**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela De Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D.Nº: 096-13-UNSCH-FCB-D

Bach. GABRIELA BELLIDO MUJICA

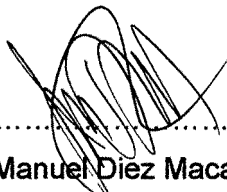
En la ciudad de Ayacucho a los 26 días del mes de julio del año dos mil trece, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, siendo las cuatro y diez minutos de la tarde los miembros del jurado calificador bajo la presidencia del Mg. José Manuel Diez Macavilca e integrado por los siguientes docentes: Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo, Mg. Enrique Javier Aguilar Felices (asesor) y Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista; actuando como secretaria docente la Blga. Rosa Cortez Saavedra para recepcionar la sustentación de la tesis titulada: *Actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas y flores de Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma". Ayacucho - 2012, presentada por la bachiller en Farmacia y Bioquímica Gabriela Bellido Mujica, quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutica.

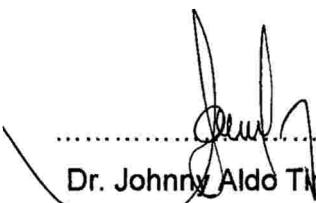
Como primer acto el presidente dio las recomendaciones a la sustentante para su exposición la que no debe exceder del tiempo reglamentario (45 minutos). Culminada la exposición el presidente solicitó a los miembros del jurado calificador su participación para realizar sus observaciones, aclaraciones y preguntas que crean conveniente para realizar la evaluación. Los miembros del jurado calificador participaron en el siguiente orden: Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista, Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo, Mg. José Manuel Diez Macavilca y finalmente el Mg. Enrique Javier Aguilar Felices como asesor. Culminada la exposición y la fase de participación de los miembros del jurado calificador, el presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar temporalmente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH para que los miembros del jurado calificador puedan deliberar sus calificaciones en privado. De lo deliberado se obtuvo lo siguiente:

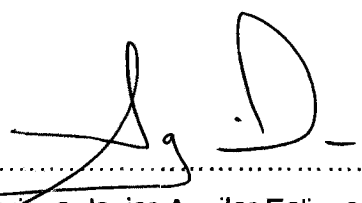
JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	RPTA. A PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. José Díez Macavilca	18	18	18
Dr. Johnny Tinco Jayo	17	17	17
Mg. Enrique Aguilar Felices	18	18	18
Mg. Saturnino Tenorio Bautista	17	17	17
PROMEDIO FINAL			18

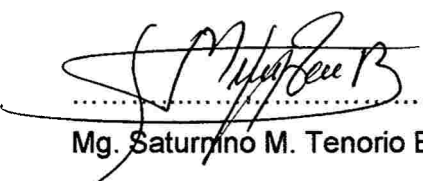
De la evaluación realizada la sustentante obtuvo la nota promedio de DIECIOCHO (18) de lo cual dan Fe los miembros del jurado calificador estampando su firma al pie de la presente.

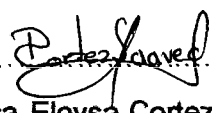
Culminó el acto de sustentación siendo las cinco y cuarenta y cinco minutos de la tarde.


.....
Mg. José Manuel Díez Macavilca
Presidente-Miembro


.....
Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo
Miembro


.....
Mg. Enrique Javier Aguilar Felices
Miembro-Asesor


.....
Mg. Saturnino M. Tenorio Bautista
Miembro


.....
Blga. Rosa Eloya Cortez Saavedra
Secretaria Docente

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres y mis hermanas.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, fuente de sabiduría y enseñanza, por acogerme durante mi formación profesional.

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

Mi profundo agradecimiento a mi asesor Mg. QF. Enrique Javier Aguilar Felices, por su apoyo constante en la culminación de esta investigación.

A los Químicos Farmacéuticos José Diez Macavilca y Johnny Aldo Tinco Jayo, docentes de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, por sus orientaciones y apoyo en la ejecución del presente trabajo de investigación.

A todas aquellas personas que brindaron su apoyo durante la ejecución del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCOTEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. <i>Mutisia acuminata</i> R&P “chinchilcoma”	5
2.3. Radicales libres	7
2.4. Antioxidantes	11
2.5. Compuestos fenólicos	12
III. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1. Lugar de trabajo de investigación	17
3.2. Población y muestra	17
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	17
3.3.1. Recolección de muestra	17
3.3.2. Preparación del extracto etanólico	18
3.3.3. Técnica de obtención de fracciones	18
3.4. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico y pruebas químicas	18
3.5. Cromatografía en capa fina (CCF)	19
3.6. Contenido de fenoles totales	19
3.7. Determinación de la actividad antioxidante	21
3.8. Análisis de datos	22
IV. RESULTADOS	23
V. DISCUSIÓN	29
VI. CONCLUSIONES	35
VII. RECOMENDACIONES	36
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	24
Tabla 2. Características químicas de las diferentes fracciones de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	25
Tabla 3. Características cromatográficas de las diferentes fracciones de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	26
Tabla 4. Contenido de fenoles totales de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	27

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Daño a biomoléculas por radicales libres	10
Figura 2. Rutas de síntesis de compuestos fenólicos	12
Figura 3. Estructura química del ácido hidroxibenzoico (a) y el ácido hidroxicinámico (b)	14
Figura 4. Núcleo básico de un flavonoide	15
Figura 5. Estructura química de los flavonoides	15
Figura 6. Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos	16
Figura 7. Reacción de compuestos fenólicos con el reactivo Folin-Ciocalteu	20
Figura 8. Reacción del DPPH con el antioxidante	21
Figura 9. Porcentaje de la actividad secuestradora del radical libre DPPH según tratamientos	28

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de clasificación taxonómica de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	42
Anexo 2. Esquema de la obtención de las fracciones, ensayos químicos y cromatográficos	43
Anexo 3. Características de los metabolitos secundarios	44
Anexo 4. Hojas y flores de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	45
Anexo 5. Fracción etanólica de las hojas y flores de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	46
Anexo 6. Desengrasado de la fracción etanólica de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	47
Anexo 7. Tamizaje fitoquímico y reacción de Shinoda de la fracción etanólica de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	48
Anexo 8. Pruebas químicas realizadas en la fracciones de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	49
Anexo 9. Sembrado de la placa cromatográfica de capa fina 20 x 20 y desarrollo de la cromatografía de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	50
Anexo 10. Cromatografía en capa fina de la fracciones (1, 2, 3, 4, 5); frente a los estándares quercetina (I) y ácido cafeico (II)	51
Anexo 11. Cromatografía en capa fina de las fracciones, reveladas con cloruro férrico (I), DPPH (II) y luz UV (III)	52
Anexo 12. Reacción de las fracciones con el Reactivo Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	53
Anexo 13. Absorbancias de las fracciones obtenidas de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	54
Anexo 14. Curva de calibración del ácido clorogénico	55
Anexo 15. Porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH según las fracciones de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	56
Anexo 16. Análisis de varianza factorial del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH por parte de las fracciones de <i>Mutisia acuminata</i> R&P "chinchilcoma"	57
Anexo 17. Matriz de consistencia	58

RESUMEN

El estrés oxidativo está asociado con patologías de altas incidencias en el hombre, entonces la búsqueda de antioxidantes naturales reviste una extraordinaria importancia.

El presente trabajo de investigación fue desarrollado con la finalidad de determinar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”, desarrollado en los laboratorios del Área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los meses de diciembre del 2012 a abril del 2013.

La muestra fue colectada en el centro poblado de Huascahura, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, las fracciones aisladas se obtuvieron por extracción con solventes de diferente polaridad: etanol, éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y agua, así mismo, se sometió a un tamizaje fitoquímico, pruebas cromatográficas, cuantificación de fenoles totales usando el reactivo de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante mediante el ensayo de captación del radical libre, 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).

Los metabolitos secundarios hallados fueron: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, flavonoides, quinonas, catequinas, saponinas, azúcares reductores, taninos y/o fenoles, aminoácidos libres, triterpenos y/o esteroides. La cromatografía en capa fina identificó distintos compuestos fenólicos, en la cuantificación de fenoles totales, la fracción de acetato de etilo presentó mayor contenido de compuestos fenólicos equivalentes de ácido clorogénico (17,85 mg%). Las cinco fracciones aisladas demostraron tener actividad secuestradora del radical libre DPPH superior al 50%. Se concluye que las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma” tienen actividad antioxidante, siendo la fracción de acetato de etilo la que presentó los metabolitos secundarios con mayor actividad antioxidante.

Palabras clave: Antioxidante, fracciones aisladas, *Mutisia acuminata* R&P.

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 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, se sabe que por causas ambientales, así como, por ingesta de algún contaminante o incluso como consecuencia de nuestro metabolismo estos pueden producir daño oxidativo en los componentes celulares, incluyendo lípidos, proteínas e incluso al ADN. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante.¹

Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas y su papel principal es terminar con las reacciones de oxidación e inhibir otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos, la salud de las personas se relaciona con el adecuado balance oxidativo, es decir, que los radicales libres y antioxidantes se equilibren en modo tal que se minimice el daño.²

Las evidencias epidemiológicas, en los últimos años, asocian el consumo de

vegetales con una menor incidencia de enfermedades crónicas, indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos vegetales que, además de contener nutrientes, contengan sustancias fisiológicamente activas que cumplan, al igual que los nutrientes esenciales, una función beneficiosa en la reducción de ciertas enfermedades. A estos alimentos, se les ha denominado antioxidantes naturales.³

Estos antioxidantes naturales se encuentran presentes, prácticamente en todas las plantas sintetizando una gran cantidad de moléculas orgánicas como consecuencia de su metabolismo secundario, los compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos, flavonoides y otros metabolitos están asociados a propiedades antioxidantes.

La característica antioxidante de los compuestos fenólicos radica en la gran facilidad que poseen para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre, estos compuestos han demostrado ser fuertes atrapadores de especies reactivas como el radical peróxido de hidrógeno, anión superóxido y el radical hidroxilo que es el más potente.⁴

La región andina de nuestro país posee una variada flora y dentro de ella, muchas especies con reconocida actividad benéfica para la salud. En el afán de contribuir a la búsqueda de fuentes de antioxidantes naturales se seleccionó a la especie *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”, que viene a ser una especie nativa muy usada en diferentes partes del territorio nacional, así como en nuestra localidad, dado que crece libremente, representa una gran alternativa para la prevención de algunas enfermedades como problemas hepáticos, renales, úlceras gástricas, tumores internos.⁵

Sin embargo, es necesario confirmar y estudiar sus posibilidades como alternativa, así pues nos avocamos al estudio que presenta ciertas características en cuanto a la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de

las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma", por lo que al desarrollar el presente trabajo se persigue los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma".

Objetivos Específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma".
- Realizar pruebas cromatográficas por capa fina, en las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia Acuminata* R&P "chinchilcoma".
- Determinar el contenido de fenoles totales en las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia Acuminata* R&P "chinchilcoma".
- Comparar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma".

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

En cuanto a los trabajos de investigación realizados a las diferentes especies de *Mutisia*, podemos mencionar:

Eliminadores de radicales libres de *Mutisia friesiana* (Asteraceae) y *Sanicula graveolens* (Apiaceae), el extracto soluble en agua, presenta actividad secuestradora de radicales libres en el ensayo de decoloración de DPPH, esto concluyó al aislamiento de derivados del ácido cafeico y quercetina.⁶

Caracterización de dos flavonoides de *Mutisia acuminata* "chinchilcoma" y estudiaron su efecto sobre el plasma humano.⁷

Aislamiento de flavonoides de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* (Asteraceae).⁸

Aislamiento de compuestos fenólicos, cromonas y cumarinas de *Mutisia acuminata* y el estudio de la actividad biológica del compuesto 11, 12-dihidroxi-5-metilcoumestano en la prueba del leucocito-5-lipoxigenasa y en el sistema primario de cultivos de hepatocitos.⁹

Actividad antiinflamatoria tópica de hidrogeles a partir de extractos de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma".¹⁰

Actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y acuoso de *Mutisia acuminata* R&P contra bacterias y hongos.¹¹

Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma” en ratas.¹²

Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas.¹³

2.2 *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”

2.2.1 Clasificación taxonómica

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	: ASTERIDAE
ORDEN	: ASTERALES
FAMILIA	: ASTERACEAE
GÉNERO	: <i>Mutisia</i>
ESPECIE	: <i>Mutisia acuminata</i> R&P
NOMBRE COMÚN	: “chinchilcoma”

Fuente: Constancia emitida por el *Herbarium Huamangensis* (Anexo 1).

2.2.2 Descripción bótánica

Arbusto de 60–120 cm de altura. Tallo ramoso desde la base, cuyas ramas son flexuosas. Hojas alternas, pinnaticompuestas, peciolo 1-2 cm de largo, raquis o nervadura principal que termina en zarcillo bífido o trifido, limbo 9-11 cm de largo, 10-14 pares de folíolos lanceolados, acuminados en el ápice, atenuado en la base, haz glabrescente. Inflorescencia en capítulos terminales, solitarios, pedunculados, involucro cilíndrico acampanado, brácteas involucrales, las externas gradualmente más pequeñas y agudas en el ápice, las internas oblongo-lanceoladas. Flores rojo-naranjas, las marginales presentan corola bilabiada de 60-70 mm de largo, labio externo desarrollado forma la lígula, labio interno pequeño filiforme, el tubo de la corola mide 40-50 mm de largo por 1,5

mm de diámetro. Flores del disco amarillo naranja hermafroditas de 60-65 de largo total, bilabiadas, labio externo trifido, labio interno bifido, presentan el androceo con 5 estambres unidos por las anteras y el gineceo presenta ovario infero. Fruto aquenio 7-8 x 2-3 mm cilíndrico con numerosas cerdas alargadas plumosas que forma el pappus.^{14,15}

2.2.3 Nombres populares

Chinchilcoma, chinchilcuma, chinchircoma, chinchircuma, chincumpa, checchecta, chinchimani, chinchinmaqui, cinchis, mancopaqui, tinterma, tintilma, chinchilpo, chianchiarko, tintilkuma.^{5,16}

2.2.4 Distribución geográfica

Niveles medios de los Andes, principalmente en los valles interandinos del centro y sur del país, en suelos arcillosos, entre los 2000 y 3600 msnm, se desarrolla en bordes rocosos.^{5,14}

2.2.5 Estudio etnobotánico y etnofarmacológico

Según informaciones etnobotánicas y etnofarmacológicas es usada para resolver problemas hepáticos se recomienda el agua de cocimiento de ramas y hojas, en problemas renales ingerir infusiones de flores, en enfermedades respiratorias es útil el cocimiento de hojas y flores, en dolores cardíacos se recomienda masticar las flores, contra úlceras gástricas se recomienda tomar el jugo fresco, en mal de aire se aconseja tomar mate de hojas y flores y/o bañarse. También se usa para curar heridas superficiales, para el reumatismo, para dolores de cuerpo; se recomienda lavado con el agua de cocimiento de las hojas.^{5,16}

2.2.6 Composición química

En el extracto etanólico de las hojas se determinó la presencia de flavonoides, triterpenos y/o esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos y saponinas.¹⁰

En el extracto hidroalcohólico de las hojas se identificó taninos, fenoles, triterpenos y/o esteroides, aminoácidos, flavonoides, glicósidos cardiotónicos,

cumarinas, catequinas y saponinas.¹² De las hojas y flores se aislaron los flavonoides 5,3',4'-trihidroxi-7-gli-flavanona y 5,3'-dihidroxi-4'-O-metil-Rh-glucosil flavanona; quercetina, quercetina-3-glucoronido, isoramnetina-3-glucoronido y pelargonidina diglicósido.^{7,8}

Así mismo se identificaron varios compuestos entre ellos, quercetina-3-glucuronico, *L*-inositol, la arbutina, la cromona 2-hidroxi-5-metil-cromona-2-β-*D*-glucopiranosido y las cumarinas 11,12-dihidroxi-5-metilcoumestano, y 2',4':4,5-furocumarina.⁹

2.3 Radicales libres (RL)

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos, son de vida efímera y tienen alta inestabilidad ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, estas moléculas constan de átomos que se unen por enlaces químicos tienen protones cargados positivamente y electrones cargados negativamente que orbitan alrededor del átomo. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que lo pierde se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Los RL actúan por un lado como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos.^{17,18}

Los principales RL que se originan son los derivados de la respiración aerobia y se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO), cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplasmático, lo cual puede conducir a mutación y muerte celular.^{17,19}

2.3.1 Formación de los Radicales Libres

Fuentes endógenas: Son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos unos enzimáticos y otros de atrapamiento.^{18'19}

Las fuentes endógenas de especies reactivas incluyen: las mitocondrias, los peroxisomas, los lisosomas, las células fagocíticas y el citocromo P – 450.²⁰

Entre las células que generan y utilizan los radicales libres del oxígeno tenemos a los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales, están dotadas de diversas proteínas así como de vías metabólicas que generan especies agresivas, cuyo fin es lesionar y destruir elementos extraños.²¹

Fuentes exógenas: Los radicales libres se producen como respuesta a la: contaminación ambiental, radiación ionizante, luz ultravioleta, ciertas drogas, toxinas fúngicas, xenobióticos, reactivos, solventes industriales, componentes del tabaco, hiperoxia, algunas enfermedades como diabetes, procesos inflamatorios, fenómenos de isquemia.^{1'4}

2.3.2 Especies Reactivas del Oxígeno (ERO)

Las ERO son moléculas muy reactivas, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman. Se producen en el metabolismo del oxígeno en todos los sistemas biológicos aeróbicos y reaccionan con todas las moléculas que se encuentran a su alrededor, su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de oxido-reducción, incluyen tanto a los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertibles en oxidantes.^{22,23} Entre las ERO se encuentran:

Anión superóxido (O_2^-), se forma a partir de la captación de un electrón por una molécula de oxígeno.²²



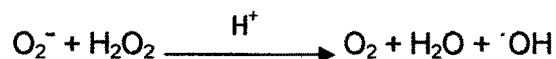
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se forma cuando el radical libre superóxido capta dos protones.²²



El peróxido de hidrógeno puede reaccionar vía reacción de Fenton con metales de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ y producir OH^- .²⁴



Radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$), es la ERO más potente, puede dañar a casi todas las moléculas que se encuentran en las células vivas, inicia una cadena de reacciones, aparece cuando el peróxido de hidrógeno se une al superóxido.²²



Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), especie ubicua que puede ser formado por absorción directa de radiación, por fotólisis (destrucción por acción de la luz) en aire contaminado, por irradiación de O_2^- o secundariamente a la excitación del óxido de nitrógeno luego de la absorción de energía radiante.²⁵

2.3.3 Daño celular producido por las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

a) Lípidos, se produce un mayor daño, ya que afecta la estructura de ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad celular, produciendo edema y muerte celular. Este daño puede desencadenarse por el oxígeno, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo que es el más dañino, una vez que se inicia este proceso toma forma de cascada, con producción de radicales libres que son los responsables de los efectos citotóxicos.²²

b) Proteínas, hay oxidación de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina, metionina, entrecruzamiento de enlaces proteína-proteína, lípido-lípido, proteína-lípido, estos son susceptibles al daño del radical $\cdot\text{OH}$ y como resultado final puede producir lisis celular.^{19'22}

- c) **Ácido desoxirribonucleico (ADN)**, los radicales OH y O_2^- causan cambios conformacionales, alteración de bases, ruptura de una de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, presentando una mutación antes de la replicación. Estos radicales pueden atacar tanto purinas como pirimidinas.²⁶
- e) **Carbohidratos**, la oxidación de carbohidratos puede dar lugar a la formación de moléculas capaces de reaccionar con los grupos carbonilo de las proteínas.²⁶

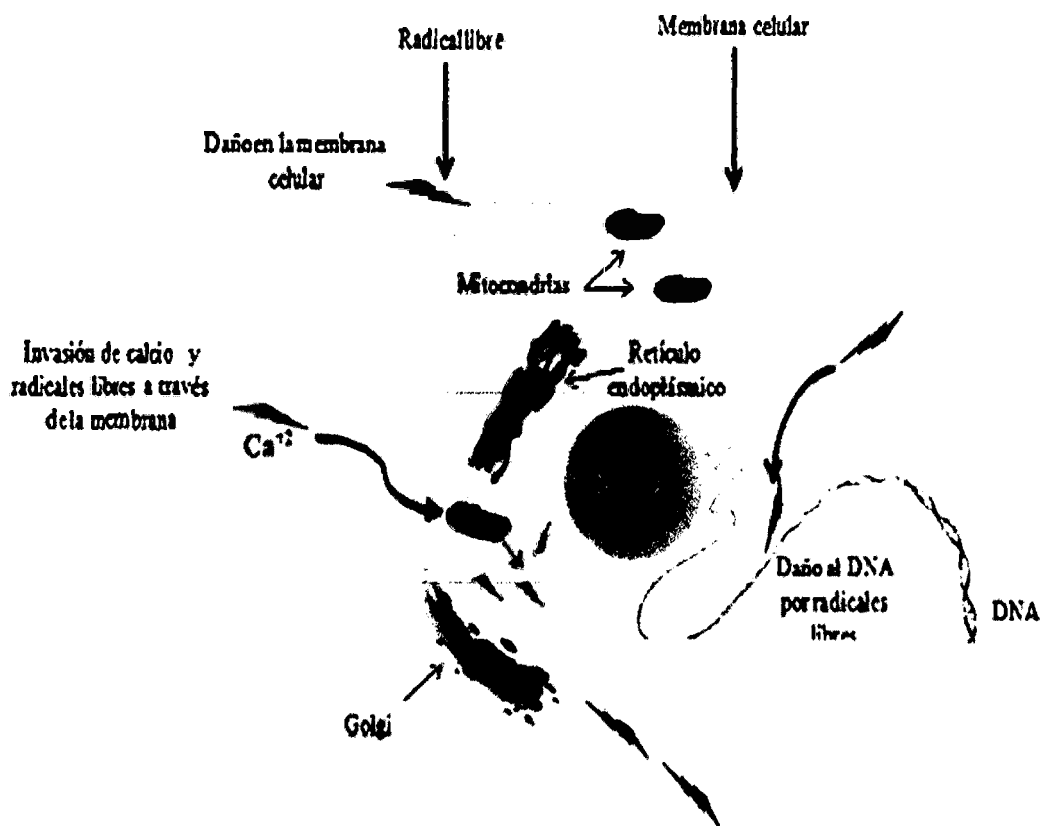


Figura 1. Daño a biomoléculas por radicales libres.¹⁷

El daño celular es provocado principalmente por la oxidación en la membrana, permitiendo el paso de radicales libres (O_2^- , OH) y calcio, el cual provoca daño mitocondrial, liberando al medio intracelular más radicales libres, los cuales provocan una reacción en cadena, oxidando a su paso proteínas, lípidos de membrana (mitocondrial, nuclear y de retículo), y el propio DNA.¹⁷

2.3.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción (balance entre prooxidantes y antioxidantes) intracelular que reúne lesiones de muchos tipos de procesos de enfermedad. Esta alteración se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), conduciendo a daño celular.^{24,27}

2.4 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales oxidables, capaces de neutralizar los radicales libres, debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores. El antioxidante al reaccionar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Bajo condiciones fisiológicas, el organismo puede prevenir el daño producido por las especies oxidantes, a través de mecanismos de protección que incluye elevar los niveles intracelulares de defensas antioxidantes.^{28,29}

2.4.1 Clasificación de antioxidantes

Los antioxidantes se clasifican en dos sistemas:

2.4.1.1 Antioxidantes endógenos

Son los sistemas antioxidantes que se producen dentro del organismo para combatir la acción de los radicales libres. Se clasifican en enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa) y no enzimáticos (glutatión, melatonina, estrógenos, ácido úrico, albúmina).^{22,26}

2.4.1.2 Antioxidantes exógenos

Útiles cuando el sistema endógeno se satura, capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena, este proceso se obtiene mediante la dieta. Dentro de éstos antioxidantes encontramos a la vitamina C, vitamina E, carotenoides y compuestos fenólicos.¹⁹

2.5 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional (ésteres, metil-éster). Son productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo. En general son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo los flavonoides).³⁰

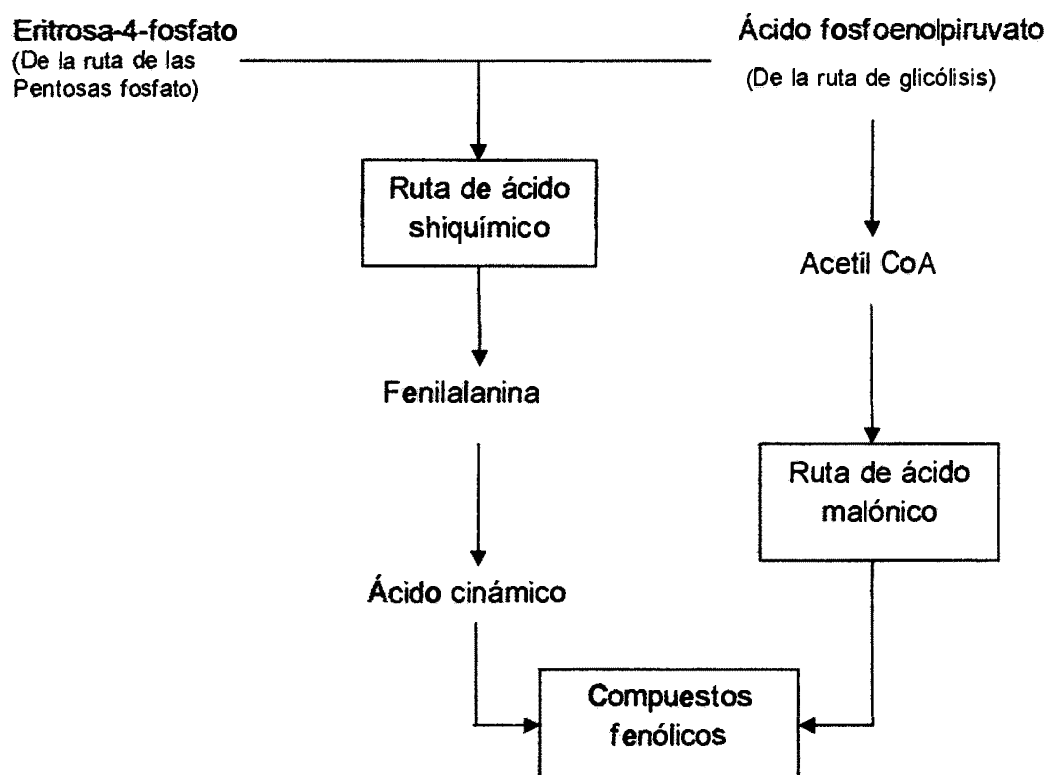


Figura 2. Rutas de síntesis de compuestos fenólicos.³¹

La ruta del ácido malónico, es una fuente importante de fenoles, poco empleada en plantas superiores; la ruta del ácido shikímico, es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de las plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikímico y, derivados de este, aminoácidos

aromáticos (fenilalanina), la enzima fenilalanina amonio liasa cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina, este ácido se metaboliza para formar ácidos fenólicos (cafeico y ferúlico), cuya principal función es ser precursor de otros derivados más complejos como los flavonoides.³¹

2.5.1 Ácidos fenólicos

Se caracterizan por poseer un anillo aromático con un grupo carboxilo, se encuentran en los metabolitos secundarios de los vegetales.³² Los ácidos fenólicos se incorporan a la pared celular de las plantas en respuesta al estrés biótico resultando en la síntesis de ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico (cafeico, sináptico, ferúlico, *p*-cumárico). Tienen acción antiespasmódica, antiinflamatoria, anticoagulante indirecto de la sangre, acción diurética, antiedematoso, hipocolesterolemizante.³³

2.5.1.1 Clasificación de los ácidos fenólicos

a) Derivados del ácido hidroxibenzoico C₆ – C₁

Se encuentran distribuidos en el reino vegetal, poseen 7 átomos de carbono, el grupo carboxílico está enlazado directamente al anillo aromático C₆ - C₁, tienen un esqueleto formado por fenilpropanoides. Se encuentran libres o combinados en forma de heterosidos o ésteres. Están presentes en forma de aldehídos, derivados metoxilados y algunos alcoholes.^{34'35}

b) Derivados del ácido hidroxicinámico C₆ – C₃

Es el grupo más distribuido en la naturaleza, poseen 9 átomos de carbono, el grupo carboxilo está enlazado a partir de un sustituyente 2-propanilo C₆ - C₃. Los principales ácidos son (cafeico, ferúlico, *p*-cumárico y sináptico), habitualmente se encuentran en la naturaleza esterificados. El ejemplo más importante es que el ácido caféico se encuentra esterificado con el ácido quínico, dando lugar al ácido clorogénico.^{34'35}

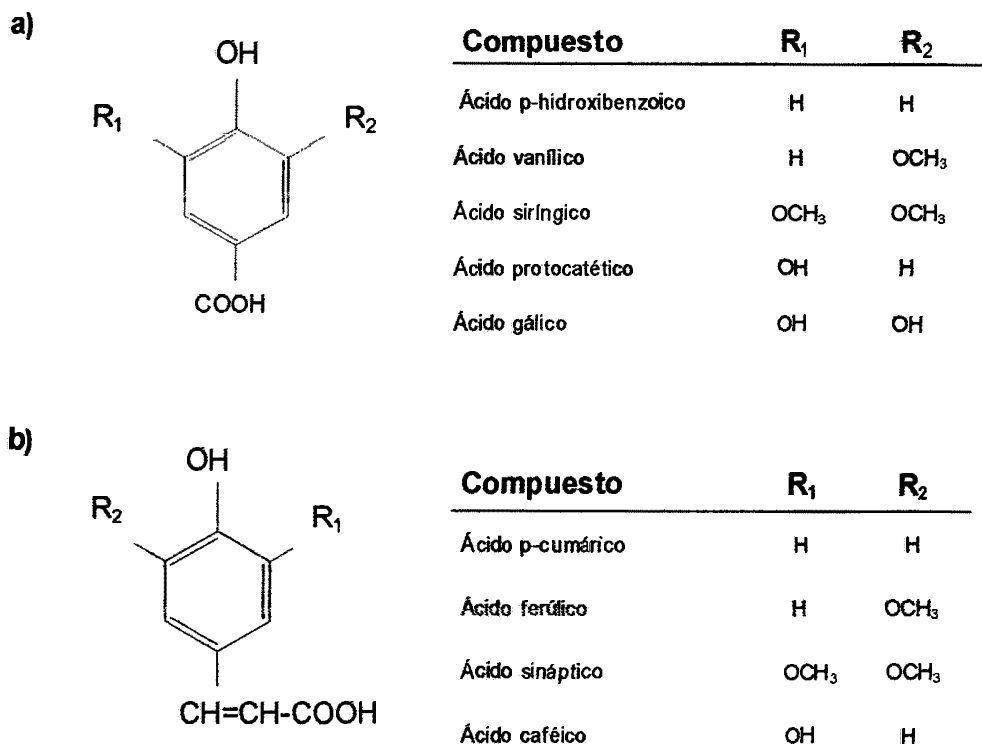


Figura 3. Estructura química del ácido hidroxibenzoico (a) y el ácido hidroxicinámico (b).³⁴

2.5.2 Flavonoides

Son compuestos fenólicos, responsables de la coloración de flores y frutos, están ampliamente extendidos en todo el reino vegetal constituyen la mayoría de los pigmentos amarillos (flavonas, flavonoles, chalconas, auronas), rojos y azules (antocianos). Los flavonoides comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C₆ - C₃ - C₆), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano. Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6', contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que tienen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante, poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianos, antialérgicas, antitumorales.^{33,36}

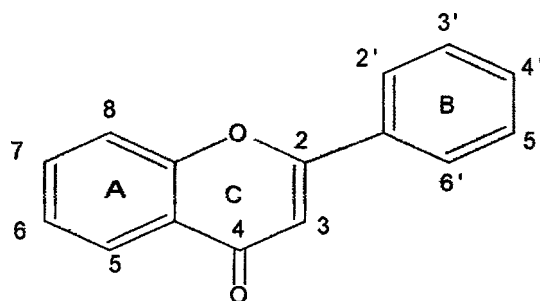


Figura 4. Núcleo básico de un flavonoide.³⁶

2.5.2.1 Clasificación de flavonoides

Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a los flavonoides en seis subclases: flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas, flavanoles.³⁵

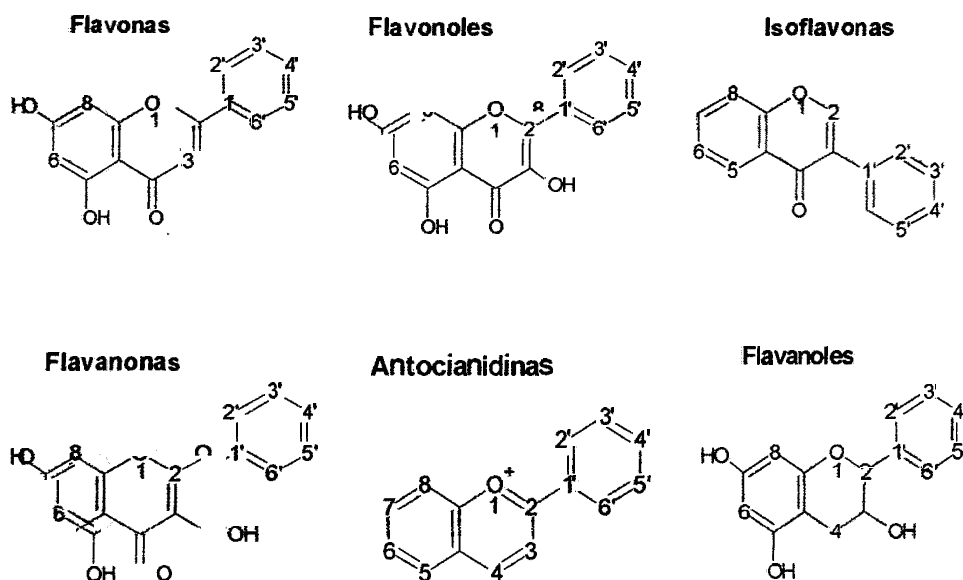


Figura 5. Estructura química de los flavonoides.³⁶

2.5.3 Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, está relacionado con su estructura química, debido a la presencia de grupos hidroxilo y a su estructura aromática. Los compuestos fenólicos actúan, como donadores de hidrógeno o electrones, al ceder un electrón al radical libre, la molécula se queda con un electrón desapareado, que se estabiliza gracias a la deslocalización de los

dobles enlaces, actúan como agentes reductores que evitan la reacción oxidante atrapando a las ROS antes de que causen daño, actúan también como prooxidantes quelando metales, de manera que mantienen o incrementan su actividad catalítica o bien reduciendo metales.^{37'38}

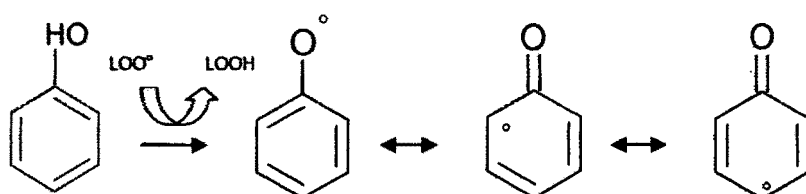


Figura 6. Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos.³⁷

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación, se desarrolló en el Laboratorio de Farmacognosia del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de diciembre 2012 a abril del 2013.

3.2 Población y muestra

Población: Las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”, que crecen en el centro poblado de Huaschahura, del distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

Muestra: un kg de hojas secas de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma” y un kg de flores secas de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”, que crecen en el centro poblado de Huaschahura.

3.3 Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1 Recolección de muestra

Se colectaron las hojas y flores no dañadas en los alrededores del Centro Poblado de Huaschahura, distrito de Ayacucho, en horas de la mañana (8:00 am), se distribuyó en una habitación ventilada sobre papel periódico para su secado (Anexo 4), se trasladó a los laboratorios del Área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

En la identificación botánica se emplearon las hojas, flores y raíz de la muestra. La cual estuvo a cargo de los especialistas del *Herbarium Huamanguensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH (Anexo 1).

3.3.2 Preparación del extracto etanólico

Se utilizó dos kg de hojas y flores secas, en seguida se realizó la molienda en un mortero de porcelana, el material molido se llevó a maceración en un frasco limpio y seco durante una semana con 5 litros de etanol al 96%. Posteriormente se realizó la filtración del macerado a través del filtro al vacío utilizando papel Whatman N° 40, finalmente se procedió a la evaporación a sequedad en un rotavapor rotatorio BUCHI 3000, y en una estufa 40°C (Anexo 5).

3.3.3 Técnica de la obtención de fracciones

El extracto seco fue resuspendido en agua destilada (fracción etanólica); se procedió a desengrasar con éter de petróleo utilizando un embudo de separación con la finalidad de eliminar grasas y otros metabolitos (fracción etérea), el cual se llevó a sequedad; sucesivamente se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo recogiendo la fase clorofórmica y llevándola a sequedad (fracción clorofórmica); seguidamente se realizó una extracción con acetato de etilo, la cual se evaporó a sequedad (fracción de acetato de etilo) y finalmente se recuperó la solución acuosa (fracción acuosa)³⁹ (Anexo 2).

3.4 Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico y pruebas químicas

Se desarrolló mediante los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas^{36,40} (Anexo 3).

Así mismo, las fracciones aisladas se sometieron a la identificación de complejos fenólicos con cloruro férrico; identificación de sustancias reductoras con permanganato de potasio y la prueba de decoloración del DPPH.⁴⁰

3.5 Cromatografía en capa fina (CCF)

Sistema cromatográfico:

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

Cada una de las fracciones aisladas se disolvieron en metanol y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica, se colocó la placa de CCF en la cámara teniendo cuidado que el solvente butanol: ácido acético: agua (4:1:5) no sobrepase a la muestra aplicada, se dejó por 12 horas que el solvente ascienda por capilaridad. Posteriormente se procedió a sacar la placa cromatográfica teniendo en cuenta que el solvente haya llegado hasta los 2 cm de la parte superior de la placa (frente del solvente), se dejó secar la placa de CCF al aire libre y se procedió a observar en la cámara UV CAMAG, finalmente se reveló con DPPH y cloruro férrico.³⁹

3.6 Contenido de fenoles totales

Fundamento:

Se fundamenta en una reacción de oxidación/reducción que es el mecanismo básico; gracias al carácter reductor del reactivo Folin-Ciocalteu.

Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfotungstácico y fosfomolibdico (amarillo) en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio y molibdeno. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 725 nm. La concentración de fenoles totales se establecerá por comparación con un compuesto estándar (ácido clorogénico) y los resultados se expresan como equivalentes del estándar utilizado.⁴¹

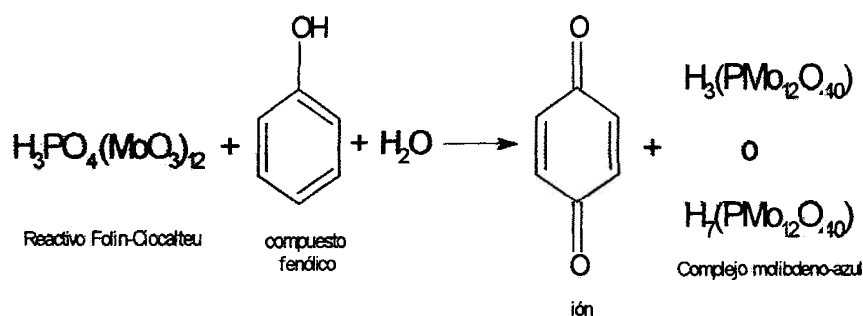


Figura 7. Reacción de compuestos fenólicos con el reactivo Folin-Ciocalteu.⁴¹

Reactivos y soluciones:

Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (Merck), diluido en agua destilada 1: 10; Na_2CO_3 al 20% en agua destilada, ácido clorogénico 1 mg/ml.

Curva de calibración:

La curva de calibración se construyó graficando diferentes concentraciones del estándar (ácido clorogénico) en función de su absorbancia correspondiente. Se tomaron volúmenes de 7,59 mg/ml; 15,18 mg/ml; 22,27 mg/ml; 30,36 mg/ml y 37,95 mg/ml y se leyó en el espectrofotómetro a 725 nm⁴² (Anexo 14).

Procedimiento:

Se colocó 0,1 g de extracto en una fiola y se enrazó a 50 ml con metanol; se mezcló por 2 minutos, después del reposo, con una pipeta se tomó 0,5 ml de la muestra (sobrenadante claro), y 8 ml de agua destilada y se mezcló; al mismo tiempo, se preparó un blanco con 0,5 ml de metanol; se añadió 0,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu; se mezcló y dejó reaccionar por 3 minutos; al pasar este tiempo, se añadió 1 ml de carbonato de sodio (Na_2CO_3) con una pipeta; se mezcló y dejó reaccionar por 10 minutos; se llevó al espectrofotómetro a "cero" con una solución blanco de metanol; se colocó la alícuota del sobrenadante en una cubeta y se llevó al espectrofotómetro a una lectura de 725 nm; finalmente se estimó la cantidad de fenoles totales a partir de la ecuación desarrollada para el ácido clorogénico en mg%.⁴²

3.7 Determinación de la actividad antioxidante

Actividad secuestradora del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

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 será el mejor antioxidante. Reacción química en el que el radical libre DPPH sustrae un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (antioxidante), producto de este cambio se desarrolla un cambio de color, de azul-violeta a amarillo, al disminuir la concentración de radical DPPH.⁴³

En representación del radical DPPH, la reacción es:

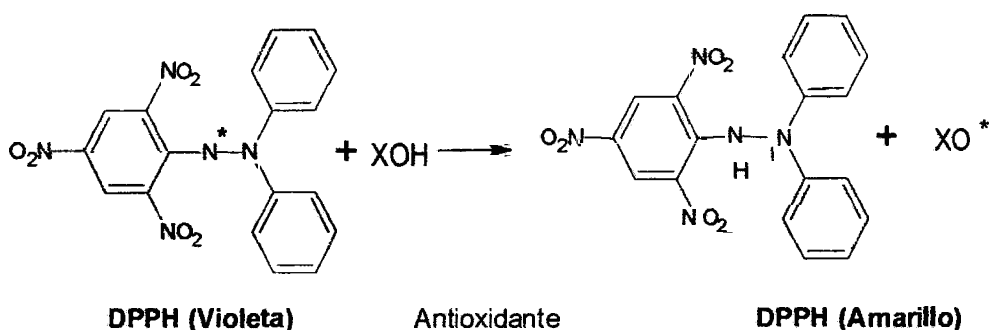


Figura 8. Reacción del DPPH con el antioxidante.⁴³

Procedimiento:

- Se preparó una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l.
- Se preparó una solución metanólica de cada fracción (total, etérea, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) a una concentración de 300 µg/ml (solución A).
- Se calibró el espectrofotómetro a cero con una solución blanco de metanol: agua (2:1).
- Se preparó un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (solución A) más 1,5 de metanol.

- Se preparó un patrón de referencia (estándar) con 1,5 ml de DPPH más 0,75 ml de agua destilada.
- La muestra; con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una solución final de 100 µg/ml.
- Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro.
- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 (solución B) para obtener una solución final de 50 µg/ml y luego en una proporción de 1:9 (solución C), para obtener una concentración final de 10 µg/ml.
- Con la solución B y C se procedió igual que en el paso 7.

Los cálculos del porcentaje de actividad antioxidante se realizarán de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Donde:

AA%: Porcentaje de actividad antioxidante.

Am: Absorbancia de la muestra.

Ab: Absorbancia del blanco.

Ac: Absorbancia del reactivo DPPH.

3.8 Análisis de datos

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

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"

Ensayo	Metabolito	Resultado	Observación
Dragendorff	Alcaloides	+	Precipitado
Baljet	Lactonas y/o cumarinas	++	Rojo
Shinoda	Flavonoides	+++	Rojo
Borntrager	Quinonas	++	Rojizo
Espuma	Saponinas	+	Espuma
Benedict	Azúcares reductores	++	Rojo ladrillo
Cloruro férrico	Taninos y/o fenoles	+++	Verde-azulado
Catequinas	Catequinas	+++	Verde Fluorescente
Ninhidrina	Aminoácidos libres	++	Violeta
Liebermann- Burchard	Triterpenos y/o esteroides	++	Verde oscuro

LEYENDA:

(+++) Abundante

(++) Moderado

(+) Leve

Tabla 2. Características químicas de las diferentes fracciones de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"

Fracciones	Prueba de FeCl ₃ 5%	Prueba de KMnO ₄	DPPH	Características		
				FeCl ₃	KMnO ₄	DPPH
Etanólica	+++	+++	+++	Verde azulado	Precipitado	Decolora
Etérea	++	+	+++	Verde oscuro	Precipitado	Decolora
Clorofórmica	+++	++	+++	Verde azulado	Precipitado	Decolora
Acetato de etilo	+++	+++	+++	Verde azulado	Precipitado	Decolora
Acuosa	++	+	+++	Verde oscuro	Precipitado	Decolora

LEYENDA:

(+++) Abundante

(++) Moderado

(+) Leve

Tabla 3. Características cromatográficas de las diferentes fracciones de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”

Fracciones	Sub fracciones	Revelador		
		Luz ultravioleta	FeCl ₃	DPPH
Etanólica	cuatro	Rojo	Verde azulado	Amarillo
		Azul	Verde azulado	Amarillo
		Púrpura	Verde azulado	Amarillo
		Celeste	Verde azulado	Amarillo
Etérea	dos	Rojo	Verde	Verde
		Púrpura	Verde	Verde
Clorofórmica	tres	Azul	-	-
		Verde azulado	-	-
		Púrpura	-	-
Acetato de etilo	seis	Marrón verde	Verde azulado	Amarillo
		Amarillo azulado	Verde azulado	Amarillo
		Marrón	Verde azulado	Amarillo
		Púrpura	Verde azulado	Amarillo
		Celeste	Verde azulado	Amarillo
		Azul	Verde azulado	Amarillo
Acuosa	tres	Púrpura	Verde azulado	Amarillo
		Celeste	Verde azulado	Amarillo
		Azul	Verde azulado	Amarillo
Quercetina	uno	Marrón	Verde azulado	Amarillo
Ácido cafeico	uno	Celeste	Verde azulado	Amarillo

Tabla 4. Contenido de fenoles totales de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"

Repeticiones	Fracciones aisladas				
	Absorbancia (725 nm)				
	$y = 0,0562x - 0,0512$ (Ácido clorogénico)				
	F. Etanólica	F. Etérea	F. Clorofórmica	F. Acetato de Etilo	F. Acuosa
1	13,22	4,22	4,51	16,27	5,91
2	13,40	3,69	4,83	17,03	5,73
3	12,60	4,15	3,70	20,25	9,47
Eq. Acido					
clorogénico	13,08	4,02	4,35	17,85	7,04
(mg%)					

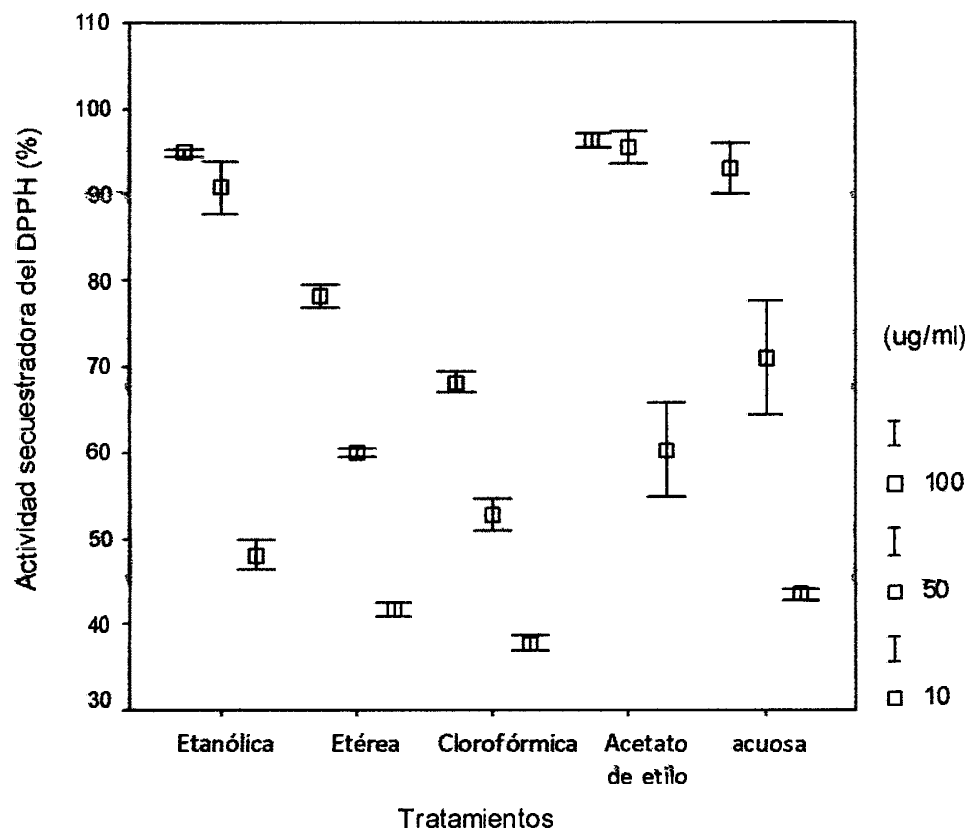


Figura 9. Porcentaje de la actividad secuestradora del radical libre DPPH según tratamientos.

V. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que dietas ricas en alimentos vegetales reducen de forma significativa la incidencia y tasas de mortalidad de enfermedades degenerativas causadas por estrés oxidativo. Este efecto protector ha sido atribuido principalmente a compuestos fenólicos y otros metabolitos, a la actividad antioxidante presentes en especies vegetales.¹ La planta que ha sido objeto del presente estudio está relacionado con efectos antioxidantes, ya que se ha comprobado en los últimos años la implicación que han tenido las especies reactivas de oxígeno en ciertas patologías lo que puede conllevar a la disminución de las defensas antioxidantes, de tal manera que lo que se quiere es ayudar a prevenir a los pacientes que están expuestos a enfermedades a disminuir complicaciones.

Para determinar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas, han indicado que los compuestos fenólicos pueden ser extraídos utilizando una secuencia de disolventes con polaridad divergente.⁴⁴ Así se procedió a realizar las extracciones líquido – líquido con distintos solventes que se basan en diferentes solubilidades de los diversos compuestos que se encuentran en el material vegetal; la primera consistió en una extracción etanólica (fracción etanólica), el alcohol es generalmente más eficaz para lograr la recuperación de la mayoría de los metabolitos secundarios; la segunda consistió en una extracción con éter de

petróleo (fracción etérea) con la finalidad de extraer sustancias de baja polaridad (lípidos) y eliminar la clorofila (Anexo 6); la tercera extracción se realizó con cloroformo (fracción clorofórmica) con la finalidad de extraer sustancias de baja polaridad (terpenos); la cuarta con acetato de etilo (fracción de acetato de etilo), para extraer sustancias de alta polaridad (compuestos fenólicos); quedando como residuo la fase acuosa (fracción acuosa).³⁹

El tamizaje fitoquímico del extracto etanólico, muestra en la Tabla 1 y Anexo 7 la presencia de flavonoides, taninos y/o fenoles y catequinas en abundante concentración. En la prueba de Shinoda las coloraciones que van de rojo a amarillo son consideradas positivas, en la identificación de fenoles y/o taninos debe observarse una coloración azul verdosa al agregar unas gotas de cloruro férrico, así mismo; la identificación de catequinas se evidencian por fluorescencia verde al UV.³⁶ En concentración moderada se identificó lactonas y/o cumarinas, quinonas, azúcares reductores, aminoácidos libres y triterpenos y/o esteroides. Las cumarinas dan una coloración y precipitado rojo que indica un resultado positivo y en la prueba de Lieberman debe observarse una coloración azul verdosa.³⁶ En la identificación de quinonas indican que una coloración rojiza al realizar la prueba de Borntrager es considerado positivo, en el caso de la prueba de Benedict explican que los azúcares reductores dan precipitados de color rojo ladrillo y en la prueba de ninhidrina se debe evidenciar una coloración violeta.⁴⁰ En poca concentración se identificó la presencia de alcaloides y saponinas. Un resultado positivo para identificar alcaloides debe ser la presencia de precipitado y en la identificación de saponinas debe observarse formación de espuma.^{36,40} Estudios realizados por otros autores corroboran la presencia de algunos metabolitos encontrados al realizar el tamizaje fitoquímico de *Mutisia acuminata* R&P.^{10,12}

La reiterada similitud de metabolitos secundarios identificados, representa un

soporte para la realización del presente estudio, puesto que los compuestos fenólicos son ampliamente conocidos por su actividad antioxidante.

En las pruebas químicas realizadas en las fracciones aisladas, la Tabla 2 y Anexo 8, reporta que las fracciones (etanólica, etérea, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) obtenidas fueron diferenciadas por las pruebas de cloruro férrico al 5%, permanganato de potasio y DPPH; la prueba química con cloruro férrico al 5% para las fracciones etanólica, clorofórmica, y acetato de etilo produjeron un color verde azulado intenso identificándose presencia de grupos fenólicos en abundante concentración. Los compuestos fenólicos son solubles en alcohol y en acetato de etilo debido a su alta polaridad de los solventes y son poco solubles en compuestos de baja polaridad.⁴⁵ Las fracciones etérea y acuosa produjeron una coloración verde oscuro deduciendo que la presencia de grupos funcionales se encuentra en baja concentración. La prueba química con permanganato de potasio para las fracciones etanólica y acetato de etilo producen precipitación intensa debido a una reacción de oxidación. La reacción de oxidación se da por interferencia de enlaces dobles de fenoles aromáticos donde hay cambio de coloración.³⁶ La fracción clorofórmica al reaccionar produce poca cantidad de precipitado, así mismo; en la fracción etérea y acuosa se observó mínima cantidad de precipitado. En la prueba química con el DPPH para las fracciones etanólica, etérea, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa es positivo ya que se observó decoloración del radical libre. Los resultados de las pruebas químicas realizados en el presente estudio nos indican que la especie *Mutisia acuminata* R&P presenta compuestos fenólicos con carácter antioxidante.

En la cromatografía en capa fina; el procedimiento para la separación e identificación de compuestos fenólicos, se desarrolló utilizando como sistema de solventes el BAW (n-buOH: HOAc: H₂O; 4: 1: 5). Las proporciones que se

utilizaron permiten separar los compuestos fenólicos de otros compuestos.³⁶ Con las cinco fracciones obtenidas se determinó las diferencias y semejanzas entre ellas, utilizándose como estándares al ácido cafeico (ácido fenólico) y la quercetina (flavonoide); y como revelador luz ultravioleta, cloruro férrico y DPPH.

En la Tabla 3 y Anexos 9, 10, 11; observamos el comportamiento de cada una de las fracciones aisladas, en la fracción etanólica, se observa cuatro manchas fluorescentes (rojo, azul, púrpura y celeste), seguido de la fracción etérea donde se observa dos manchas fluorescentes (rojo y púrpura), mientras que en la fracción clorofórmica se observa tres manchas fluorescentes (azul, verde - azulado y púrpura), así mismo, en la fracción de acetato de etilo se observa seis manchas fluorescentes (marrón-verde, amarillo-azulado, marrón, púrpura, celeste, azul), finalmente en la fracción acuosa se observa tres manchas fluorescentes (púrpura, celeste y azul). En las fracciones etanólica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa se observa manchas de color azul, deducimos que hay presencia de derivados del ácido cinámico, así mismo, la fracción de acetato de etilo es la que presenta mayor cantidad de manchas, la mancha marrón que presenta, es semejante al estándar quercetina identificándose un derivado de la quercetina. Al ser revelados con cloruro férrico se observa que las fracciones etanólica, en especial la fracción de acetato de etilo y la fracción acuosa presentan manchas de color verde azulado afirmando que existen compuestos fenólicos, que no muestra en las fracciones etérea y clorofórmica. Al ser revelados con el DPPH se observa que en la fracción de acetato de etilo se encuentran la mayor concentración de compuestos fenólicos antioxidantes secuestradores del radical libre, seguido de la fracción etanólica y la fracción acuosa donde se observan manchas de color amarillo. Los fenoles son compuestos aromáticos y por consecuencia generalmente fluorescen o atrapan

luz, las manchas características de los derivados del ácido cinámico debido a su movilidad en los disolventes utilizados dan una coloración azul fluorescente, celeste fluorescente.⁴⁶ Las posibles coloraciones de los flavonoides en la cromatografía en capa fina van desde púrpura, celeste fluorescente, amarillo-naranja fluorescente, amarillo-verdosa, azul-verdosa, marrón.³⁶ Estudios realizados corroboran principalmente con la presencia de compuestos fenólicos caracterizados en distintos solventes.⁷⁸⁹

El contenido de fenoles totales es un parámetro importante para determinar la actividad antioxidante. En la Tabla 4 y Anexos 12, 13; se presentan los resultados de la cuantificación de fenoles totales obtenidos para las cinco fracciones aisladas, se calculó a partir de la curva de calibración del ácido clorogénico con su ecuación correspondiente: $y = 0,0562 x - 0,0512$ ($R^2 = 0,9977$) (Anexo 14). La selección del disolvente apropiado para la cuantificación de fenoles totales es un aspecto importante ya que se debe alcanzar la concentración deseada de fitoconstituyentes en los extractos.⁴⁴ Así la fracción de acetato de etilo presentó 17,85 mg% de fenoles en equivalentes de ácido clorogénico, seguido de la fracción etanólica donde el contenido de fenoles fue de 13,08 mg% en equivalentes de ácido clorogénico; de modo contrario las fracciones etérea, clorofórmica y acuosa reportaron valores respectivamente 4,02 mg%, 4,35 mg% y 7,04 mg% en equivalentes de ácido clorogénico. El resultado de la reacción presenta una coloración azul; mientras más intenso sea, mayor contenido de fenoles habrá en una muestra.⁴⁷ Se puede apreciar que el contenido de fenoles totales fue considerablemente superior en la fracción de acetato de etilo y en la fracción etanólica lo que significa que hay mayor concentración de compuestos fenólicos, destacándose que tiene mayor actividad antioxidante, en comparación con las demás fracciones que resultaron poco significativas.

Las fracciones aisladas demostraron tener actividad antioxidante al captar el radical libre DPPH, tal como se muestra en el Figura 9 y Anexo 15, se compara la actividad antioxidante de las cinco fracciones aisladas, donde la fracción etanólica, la fracción de acetato de etilo y la fracción acuosa a 100 µg/ml reportaron una actividad antioxidante superior al 90%, mientras que la fracción etérea y clorofórmica obtuvieron una actividad superior al 50%. A concentración de 50 µg/ml, la fracción etanólica y la fracción de acetato de etilo presentaron una actividad antioxidante superior al 90%, la fracción acuosa presentó una actividad superior al 70%, mientras que la fracción etérea y clorofórmica obtuvieron una actividad superior al 50%. Así mismo, a concentración de 10µg/ml, la fracción de acetato de etilo presentó una actividad secuestradora superior al 60%, mientras que las fracciones etanólica total, etérea, clorofórmica y acuosa presentaron actividad inferior al 50%. A las concentraciones de 100 µg/ml, 50µg/ml y 10µg/ml el análisis de varianza factorial aplicado dejó ver que existen diferencias significativas entre las fracciones aisladas, así también entre las concentraciones probadas (Anexo 16). Por lo tanto, podemos afirmar que cada una de las fracciones aisladas a las concentraciones de 100 µg/ml y 50µg/ml tienen actividad secuestradora del radical libre DPPH superior al 50%, y la fracción de acetato de etilo fue la que mostró la mejor actividad antioxidante en las diferentes concentraciones 100 µg/ml, 50µg/ml y 10 µg/ml, por ende el mejor solvente extractor de los compuestos fenólicos es el acetato de etilo. Los compuestos fenólicos se encuentran en los solventes de alta polaridad etanol, acetato de etilo y agua y los terpenos son extraídos en solventes de baja polaridad como éter de petróleo y cloroformo.^{34,36}

Con estos resultados obtenidos en el presente trabajo podemos afirmar que existe un alto potencial antioxidante de la especie *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma".

VI. CONCLUSIONES

1. Las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma" presentan actividad antioxidante.
2. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma" son: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, flavonoides, quinonas, catequinas, saponinas, azúcares reductores, taninos y fenoles, aminoácidos libres, triterpenos.
3. Los compuestos fenólicos presentes en las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma" se evidenciaron mediante cromatografía en capa fina, identificándose mayor cantidad en la fracción de acetato de etilo.
4. Se determinó el contenido de fenoles totales en cada una de las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia Acuminata* R&P "chinchilcoma", siendo la fracción de acetato de etilo la de mayor concentración de compuestos fenólicos de 17,85 mg% equivalente de ácido clorogénico.
5. Las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma", a concentraciones de 100 µg/ml y 50 µg/ml demostraron tener actividad antioxidante superior al 50%, y la fracción de acetato de etilo demostró tener actividad antioxidante superior al 50% a las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad antioxidante de *Mutisia Acuminata* R&P “chinchilcoma”, aislando compuestos fenólicos específicos y elucidar su estructura química.
2. Proseguir con los estudios de la actividad antioxidante *in vivo* de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”, puesto que demostró tener actividad antioxidante en el ensayo *in vitro*.
3. Realizar formulaciones en presentaciones farmacéuticas (capsulas, sobres) para su empleo como sustancia antioxidante.
4. Realizar estudios de toxicidad en animales de experimentación, empleando las hojas y flores de *Mutisia Acuminata* R&P “chinchilcoma”.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Editorial Atenea. 2006.
2. Lampe J. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* [revista en internet] 1999. [acceso enero 2013]; 70(3): 475S- 490S. disponible en: <http://ajcn.nutrition.org/content/70/3/475s.full>
3. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* [revista en internet] 1997. [acceso enero 2013]; 82(2): 291-295. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129943>
4. Burneo Z. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del sur del Ecuador. [Tesis pre grado]. Ecuador. UTPL; 2009.
5. Pietrellini F. Las plantas Medicinales en un piso alto y Mesoandino. Estudio etnobotánico de la zona de Puquio-Ayacucho. Editorial Graticenter-Perú; 2007.
6. Viturro C, Molina A, Schmeda G. Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (asteraceae) and *Sanicula graveolens* (apiaceae). *Phytotherapy Research* [revista en internet] agosto 2004. [acceso diciembre 2012]; 13(5): 422-424. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441784>
7. Yarlequé M, Bonilla P, Rueda L. Aislamiento de dos flavonoides de *Mutisia acuminata* "chinchilcoma" y su efecto sobre el plasma humano. *Anales de la Facultad de Medicina de la UNMSM* [revista en internet] 2002. [acceso diciembre 2012]; 63. Disponible en: http://sisb.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v63_sup/pdf/investigacion_basica.pdf
8. Juárez B, Mendiando M. Flavonoids from *Mutisia acuminata*. *Pharmaceutical Biology* [revista en internet] 2003. [Acceso diciembre 2012]; 41(4): 291-292. Disponible en: <http://www.encognitive.com/files/Flavonoids20from%20Mutisia%20acuminata.pdf>
9. Daily A, Seligmann O, Nonnenmacher G, Fessler B, Wong S, Wagner H. New Chromemone, Coumarin, and Coumestan Derivates from *Mutisia acuminata* var. *Hirsuta*. *Planta Médica* [revista en internet] 2006. [Acceso diciembre 2012]; 54(1): 50-52. Disponible en: http://www.interciencia.org/v20_05/art03/
10. Arce P, Cárdenas A, De la Rosa S, Uriundo K. Actividad antiinflamatoria de hidrogeles elaborados a partir de extractos de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma". *Rev. de encuentro Científico Internacional de verano Ica-Perú. UNICA* [revista en internet] enero 2010. [acceso diciembre 2012]. Disponible en: <http://www.encuentrocientificointernacional.org/ECi2010/ECi2010resumenes.htm>
11. Catalano S, Cioni P, Panizzi L, Morelli M. Antimicrobial activity of extracts of *Mutisia acuminata* Ruiz y Pavón. Department of bioorganic Chemistry. Faculty of Pharmacy, University of Pisa - Italy. *J Ethnopharmacol* [artículo en internet] enero 2008. [acceso diciembre 2012]; 59 (3): 207-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9507906>
12. Lozano J. Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma" en ratas. [Tesis pre grado]. Ayacucho-Perú. UNSCH; 2007.
13. Castañeda E, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Médico* [revista en internet]. 2008 [acceso diciembre 2012]; Vol. 8(1). Disponible en: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_/Art4_Vol8_N1.pdf
14. Loja B. Contribución al estudio florístico de la provincia de Concepción (Junín): Dicotiledóneas. [Tesis para optar el Grado Académico de: Magister en Botánica]

- Tropical con mención en Taxonomía y Sistemática Evolutiva]. Perú. UNMSM; 2002.
15. Tovar O. Plantas Medicinales del valle del Mantaro. Editorial Caja Negra. CONCYTEC. Perú. 2001.
 16. Brack, A. Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas". Perú. 1999.
 17. Maldonado O, Jiménez E, Guapillo M, Ceballos G, Méndez E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Revista médica de la universidad Veracruzana [revista en internet] julio-diciembre 2010. [acceso febrero 2013]; 10(2): 32-39. Disponible en: http://www.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf
 18. Finkel T. y Holbrook N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. USA [revista en internet] 2000. [acceso febrero 2013]; 408: 239-247. Disponible en: <http://www.co2science.org/articles/V4/N3/B2.php>
 19. Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomédica y estrés oxidativo. Rev. Med. Milit "DR. Luís Díaz Soto". Cuba. [revista en internet] 2001. [acceso febrero 2013]; Vol 30(1): 36-44. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/mil07100.pdf
 20. Cheeseman K, Slater T. Free Radicals in Medicine. British Medical Bulletin [revista en internet] 1993. [acceso febrero 2013]; Vol. 49(3), pp. 481-491. Disponible en: <http://bmb.oxfordjournals.org/content/49/3/481.abstract>
 21. Turrens J. Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. Biomedical Sciences. USA [revista en internet] 2006. [acceso febrero 2013]; 1:16-18. Disponible en: <http://www.antiioxidantes.com.ar/Art006.htm>
 22. Venereo J. Daño Oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. Revista Cubana Med. Milit. [revista en internet] 2002. [acceso febrero 2013]; 31(2): 126-133. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf
 23. Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. Tercera edición. Editorial Oxford: Oxford University Press. 1999.
 24. Ríos M. El estrés oxidativo y el destino celular. Revista Química Viva. Argentina. [revista en internet] abril 2003. [acceso febrero 2013]. Vol. 2(1): 17-28. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.far/Actualizaciones/estresoxidativo.htm>
 25. Halliwell B. Los radicales libres de oxígeno, la toxicidad y el envejecimiento. Pigmentos de edad. Ed. El Sevier. Norte – Holland. Amsterdam. 1981.
 26. Velásquez M, Prieto B, Contreras R. El envejecimiento y los radicales libres. Revista Ciencias de la UNAM. [revista en internet]. Julio-setiembre 2004. [acceso diciembre 2012]; Vol. 75(1): 36-43. Disponible en: http://www.alumno.unam.mx/algo_leer/Envejecimiento.pdf
 27. Amr El-Missiry M. Antioxidant Enzyme. InTech. Croacia. 2012.
 28. López A, Fernando C, Lazarova Z, Bañuelos R, Sánchez S. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. Revista Anacem. [revista en internet] junio 2012. [acceso diciembre 2012]; Vol. 6(1): 48-51. Disponible en: <http://revista.anacem.cl/web/?p=1096>
 29. Valdés J, Bruguera M. El Estrés Oxidativo y los Antioxidantes. Tendencias de Salud en Cuba. Departamento de Información. 2000.
 30. Maestro R, Borja R. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Revistas Científicas. C.S.I.C. España [revista en internet] 1993. [acceso diciembre 2012]. Vol. 42(2): 101-106. Disponible en: http://www.erevistas.csic.es/ficha_articulo.revistas.csic.php
 31. Avalos A, Pérez E. Metabolismo secundario de las plantas. Serie Fisiología Vegetal de la Universidad Complutense. Madrid. [revista en internet] 2009. [acceso febrero 2013]; 2(3) 119 -145. Disponible en:

- http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
32. Boudet A. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. [revista en internet] 2007. [acceso febrero 2013]; 68(22-64): 2722-2735. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643453>
 33. Bruneton J. Plantas medicinales Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Primera edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España. 2001.
 34. Martínez I. Manual de Fitoterapia. Elsevier Doyma S.L. MASSON. Barcelona-España. 2007.
 35. Iglesias J. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de pesca. [tesis de doctorado]. España. USC; 2009.
 36. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo editorial; 1994.
 37. Siquet C, Paiva – Martins F, Lima J, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy-and trihydroxy phenolic acids-A structure-activity relationship study. *Free Radical Research. Revista Medline. Portugal*. [revista en internet]. Abril 2006. [acceso diciembre 2012]; Vol. 40(4): 433-442. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517509>
 38. Decker E. Fenoles. Prooxidantes y antioxidantes. *Revista Nutricional de España*. [revista en internet] 1997. [acceso diciembre 2012]; Vol. 12 (3): 45-62. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2001/8-Exactas/E-019.pdf>
 39. Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smilax szechuanensis* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de maestría]. Lima. UNMSM; 2007.
 40. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba. 2000.
 41. Spanos G, Wrolstad R. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*. [revista en internet] 2009. [acceso febrero 2013]; Vol 38(7): 1565-1571. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00097a030>
 42. Swain T, Hillis W. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I - The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. [revista en internet] 2004. [acceso febrero 2013]; Vol 10(1): 63-6. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/10.1002/2740100110/abstract>
 43. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Sangkranakarin J. Sci. Technol*. [revista en internet] 2003. [acceso febrero 2013]; 26(2): 211-219. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-old/journal/26-2/07-DPPH.pdf>
 44. Banerjee S, Bonde C. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia Retusa* Spreng Bark: Impact of dielectric constant and geographical location *Journal of medicinal plants research*. [revista en internet] 2011. [acceso febrero 2013]; Vol. 5(5). 817-822. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/jmpr/pdf2011/4Mar/Banerjee0Bonde.pdf>
 45. Chasquibol S, Lengua C, Delmás I, Rivera C, Bazán D, Aguirre M, Bravo A. Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. [revista en internet] 2003. [acceso febrero 2013]; 2(5):9-20. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/ing_quimica/vol5_n2/pdf
 46. Tejacal A, Soto M, Colinas M, Martínez M. 2004. Análisis preliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de Zapote Mamey "*Pouteria*

- sapota*". Revista Chapingo Serie Horticultura de México. [revista en internet] 2004. [acceso febrero 2013]; 11(2): 225-231, 2005. Disponible en: www.chapingo.mx/revistas/cb24c55ac72be163878fa4ae7d24196b.pdf
47. García M. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Primer Verano de Introducción a la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro. México. 2007.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 5. Certificado de clasificación taxonómica de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"



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

C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Gabriela, BELLIDO MUJICA, ha
solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GENERO	:	Mutisia
ESPECIE	:	<i>Mutisia acuminata</i> R. & P.
N.V.	:	"chinchilcoma"

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

Ayacucho, 09 de Octubre del 2012

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

Bga. J. ALFARO MACHUCA
JEFE

Anexo 2

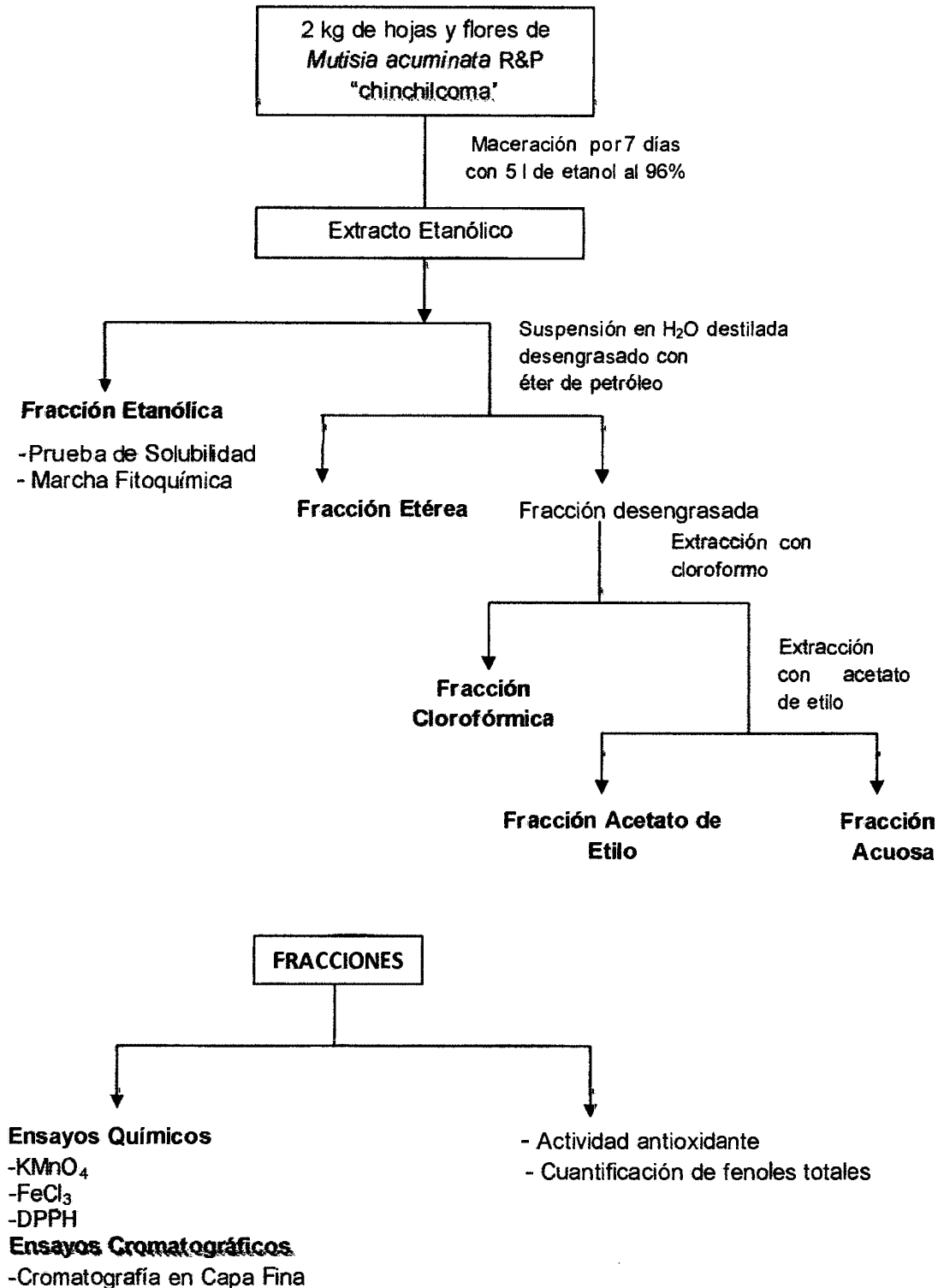


Figura 10. Esquema de la obtención de las fracciones, ensayos químicos y cromatográficos

Anexo3

Tabla 6. Características de los metabolitos secundarios

Metabolitos Secundarios	Ensayos con Reactivos	Observación
Alcaloides	Dragendorff	Hay formación de precipitado en todas las reacciones
	Mayer	
	Hager	
	Wagner	
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	Formación de una coloración roja
Flavonoides	Shinoda	Hay coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo en la fase amilica
Quinonas	Borntrager	Si es positivo la fase amoniacal es de color rojizo o rosada
Catequinas	Catequinas	Coloración verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo
Saponinas	Espuma	Si es positivo hay formación de espuma en la superficie
Azucares reductores	Benedict	Si es positivo hay formación de precipitado rojo ladrillo
Taninos y Fenoles	Cloruro Férrico	Formación de una coloración negruzca
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Hay coloración violeta
Cardenóidos	Kedde	Coloración violácea
Resinas	Resinas	Hay formación de precipitado

Anexo 4



Figura 11. Hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"

Anexo 5



Figura 12. Fracción etanólica de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"

Anexo 6

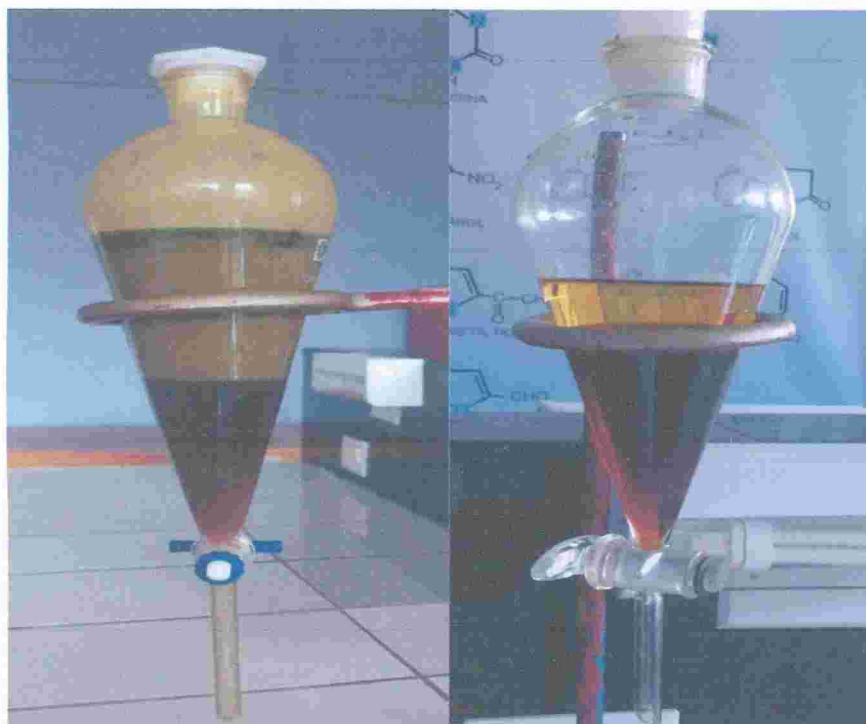


Figura 13. Desengrasado de la fracción etanólica de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”

Anexo 7

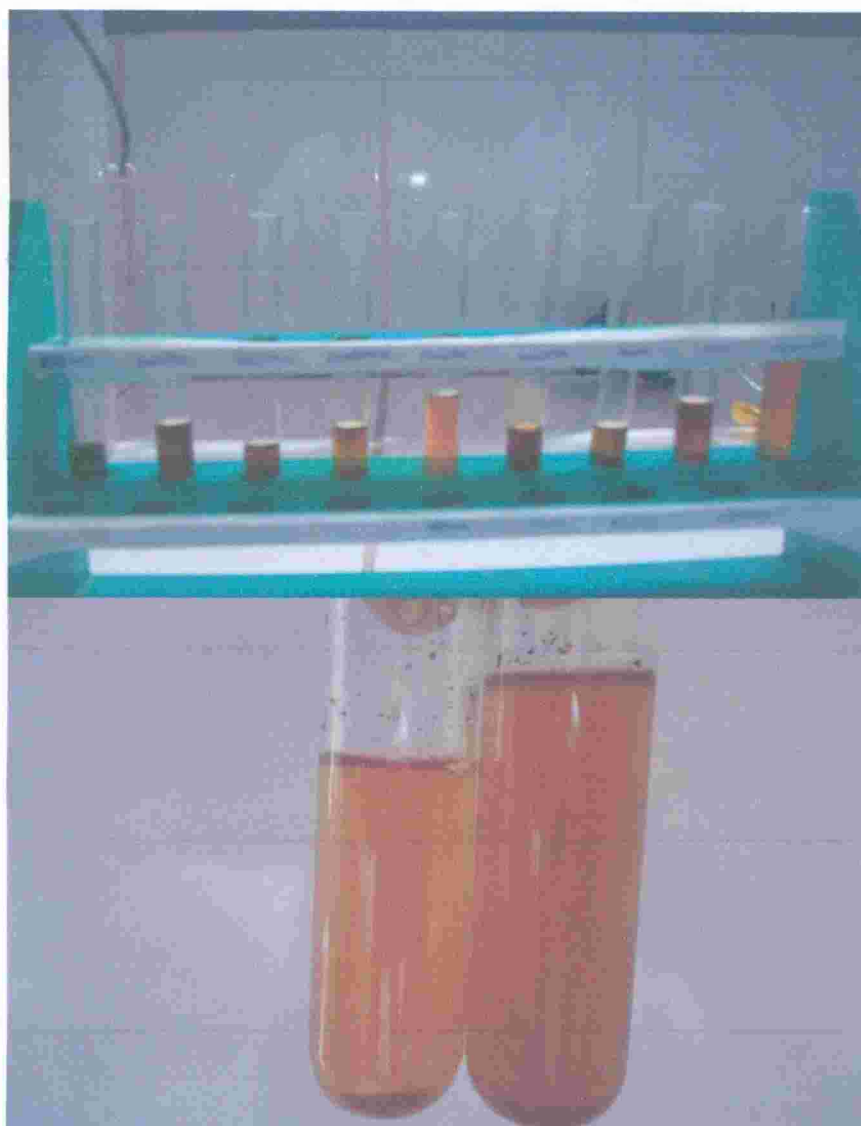


Figura 14. Tamizaje fitoquímico y reacción de Shinoda de la fracción etanólica de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"

Anexo 8

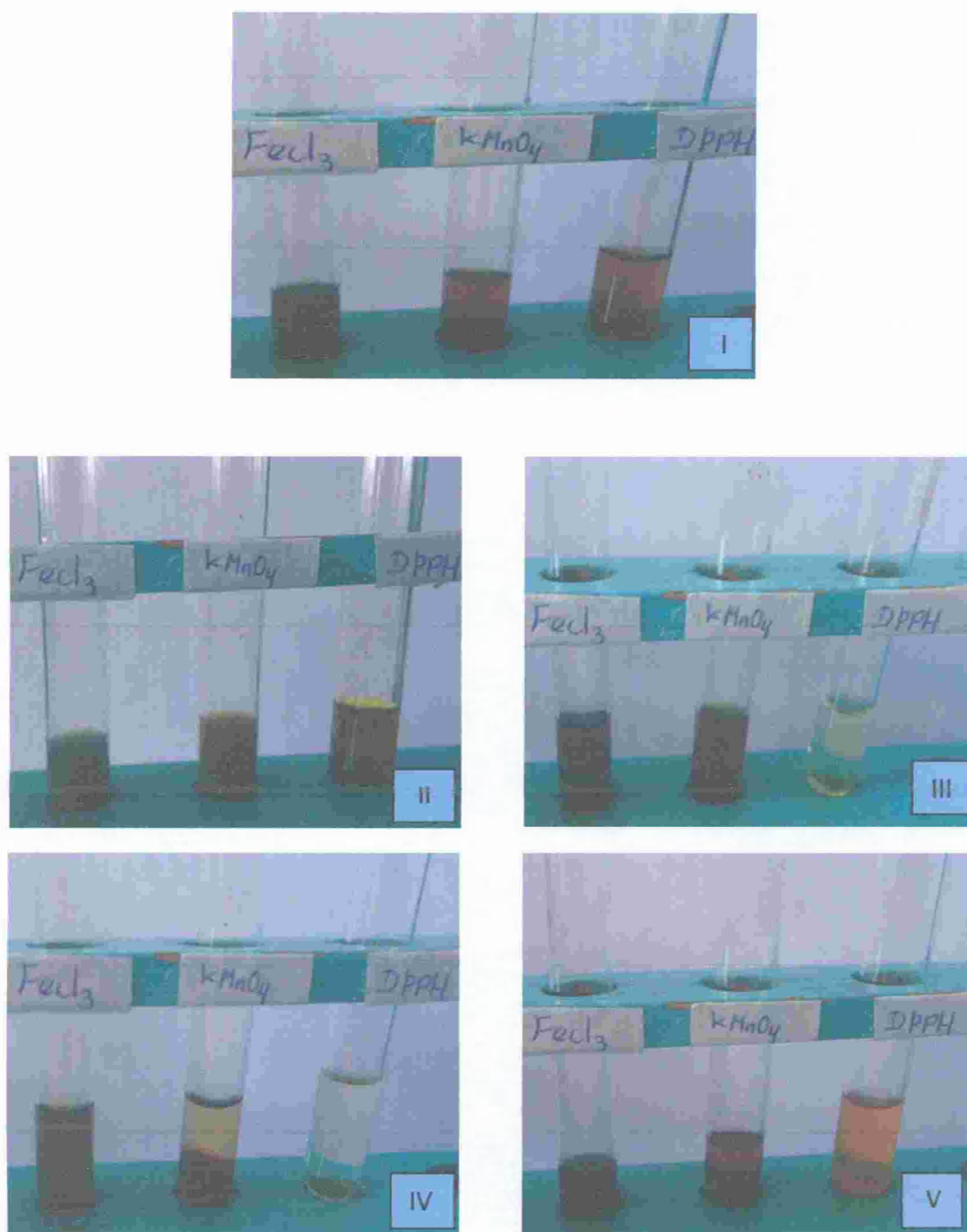


Figura 15. Pruebas químicas realizadas en la fracciones de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"

Anexo 9



Figura 16. Sembrado en la placa cromatográfica de capa fina 20 x 20 y desarrollo de la cromatografía de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"

Anexo 10



Figura 17. Cromatografía en capa fina de la fracciones (1, 2, 3, 4, 5); frente a los estándares quercetina (I) y ácido cafeico (II)

Anexo 11

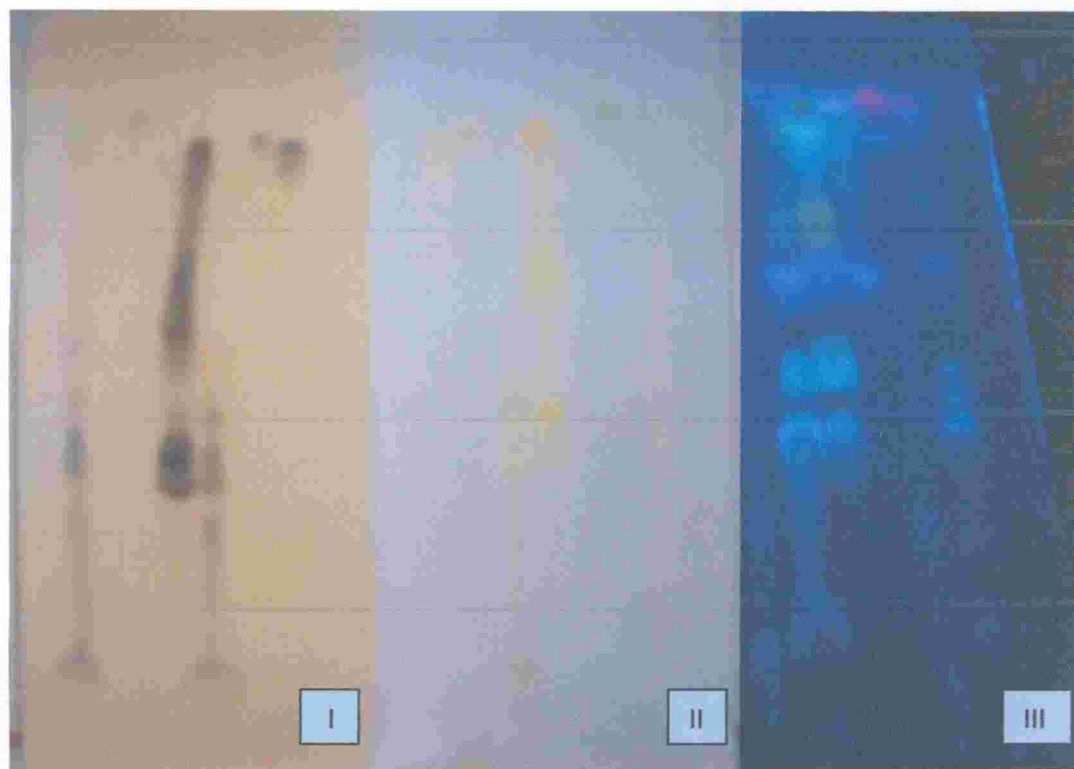


Figura 18. Cromatografía en capa fina de las fracciones, reveladas con cloruro férrico (I), DPPH (II) y luz UV (III)

Anexo 12



Figura 19. Reacción de las fracciones con el Reactivo Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma"

Actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”. Ayacucho-2012.

Gabriela Bellido Mujica.¹ Enrique Javier Aguilar Felices¹

¹Farmacia y Bioquímica: UNSCH

RESUMEN

El estrés oxidativo está asociado con patologías de altas incidencias en el hombre, entonces la búsqueda de antioxidantes naturales reviste una extraordinaria importancia. El presente trabajo de investigación fue desarrollado con la finalidad de determinar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”, desarrollado en los Laboratorios del Área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los meses de diciembre del 2012 a abril del 2013. La muestra fue colectada en el Centro Poblado de Huaschahura, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, las fracciones aisladas se obtuvieron por extracción con solventes de diferente polaridad: etanol, éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y agua, así mismo, se sometió a un tamizaje fitoquímico, pruebas cromatográficas, cuantificación de fenoles totales usando el reactivo de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante mediante el ensayo de captación del radical libre, 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Los metabolitos secundarios hallados fueron: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, flavonoides, quinonas, catequinas, saponinas, azúcares reductores, taninos y/o fenoles, aminoácidos libres, triterpenos y/o esteroides. La cromatografía en capa fina identificó distintos compuestos fenólicos, en la cuantificación de fenoles totales, la fracción de acetato de etilo presentó mayor contenido de compuestos fenólicos equivalentes de ácido clorogénico (17,85 mg%). Las cinco fracciones aisladas demostraron tener actividad secuestradora del radical libre DPPH superior al 50 %. Se concluye que las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma” tienen actividad antioxidante, siendo la fracción de acetato de etilo la que presentó los metabolitos secundarios con mayor actividad antioxidante.

Palabras clave: Antioxidante, fracciones aisladas, *Mutisia acuminata* R&P.

SUMMARY

Oxidative stress is associated with incidences of diseases in man, then finding natural antioxidants of extraordinary importance. The present research was developed in order to determine the antioxidant activity of the fractions isolated from the leaves and flowers of *Mutisia acuminata* R & P “chinchilcoma” developed in the laboratories of the Department of Pharmacy, National University of San Cristobal de Huamanga during the months of December 2012 to April 2013. The sample was collected in the Town of Huaschahura Center district of Ayacucho, Huamanga province, the isolated fractions were obtained by extraction with solvents of different polarity: ethanol, petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and water, also, is underwent a phytochemical screening, testing chromatographic quantitation of total phenols using the Folin-Ciocalteu reagent and antioxidant activity uptake assay using free radical, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Secondary metabolites were found: alkaloids, lactones and / or coumarins, flavonoids, quinones, catechins, saponins, reducing sugars, tannins and / or phenols, amino acids, triterpenes and / or steroids. Thin layer chromatography identified different phenolic compounds, in the quantification of total phenols, the ethyl acetate fraction showed higher phenolic content of chlorogenic acid equivalents (17.85 mg%). The five fractions isolated shown to have free radical scavenging activity of over 50% DPPH. We conclude that the leaves and flowers of *Mutisia acuminata* R & P “chinchilcoma” have antioxidant activity, being the ethyl acetate fraction which secondary metabolites showed more antioxidant activity.

Key words: Antioxidant, isolated fractions, *Mutisia acuminata* R&P.

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas y su papel principal es terminar con las reacciones de oxidación e inhibir otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos, la salud de las personas se relaciona con el adecuado balance oxidativo, es decir, que los radicales libres y antioxidantes se equilibren en modo tal que se minimice el daño.¹

Las evidencias epidemiológicas, en los últimos años, asocian el consumo de vegetales con una menor incidencia de enfermedades crónicas, indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos vegetales que, además de contener nutrientes, contengan sustancias fisiológicamente activas que cumplan, al igual que los nutrientes esenciales, una función beneficiosa en la reducción de ciertas enfermedades. A estos alimentos, se les ha denominado antioxidantes naturales.²

La característica antioxidante de los compuestos fenólicos radica en la gran facilidad que poseen para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre, estos compuestos han demostrado ser fuertes atrapadores de especies reactivas.³

Entre las alternativas de fuentes antioxidantes naturales se encuentra la especie *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”, que viene a ser una especie nativa muy que viene a ser una especie nativa muy usada en usada en nuestra localidad, representa una gran alternativa para la prevención de algunas enfermedades como problemas hepáticos, renales, úlceras gástricas, tumores internos.⁴ Sin embargo, es necesario confirmar y estudiar sus posibilidades como alternativa, por lo que al desarrollar el presente trabajo se persigue los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”.

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico total de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”.
- Realizar pruebas cromatográficas por capa fina, en las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia Acuminata* R&P “chinchilcoma”.

- Determinar el contenido de fenoles totales en las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia Acuminata* R&P “chinchilcoma”.

- Comparar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población. Las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”, que crecen en el Centro Poblado de Huaschura, del distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

Muestra. un kg de hojas secas de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma” y un kg de flores secas de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”, que crecen en el centro poblado de Huaschura.

Diseño de investigación

Tipo: básico

Nivel: descriptivo

Métodos para la recolección de datos

a. Preparación del extracto etanólico

El material seco y pulverizado de las hojas y flores (un kg) fue macerado con 5 litros de solvente etanólico al 96° en un frasco ámbar por siete días a temperatura ambiente. Se filtró al vacío y este se concentró a sequedad en un Rotavapor.

b. Técnica de la obtención de fracciones

El extracto seco fue resuspendido en agua destilada (fracción etanólica); se procedió a desengrasar con éter de petróleo utilizando un embudo de separación con la finalidad de eliminar grasas y otros metabolitos (fracción etérea), el cual se llevó a sequedad; sucesivamente se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo recogiendo la fase clorofórmica y llevándola a sequedad (fracción clorofórmica); seguidamente se realizó una extracción con acetato de etilo, la cual se evaporó a sequedad (fracción de acetato de etilo) y finalmente se recuperó la solución acuosa (fracción acuosa).⁵

c. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total y pruebas químicas

Se desarrolló mediante los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración,

formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas.^{6,7} Así mismo, las fracciones aisladas se sometieron a la identificación de complejos fenólicos con cloruro férrico; identificación de sustancias reductoras con permanganato de potasio y la prueba de decoloración del DPPH.⁷

d. Cromatografía en capa fina (CCF)

Las fracciones aisladas se disolvieron en metanol y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica, se colocó la placa de CCF en la cámara teniendo cuidado que el solvente butanol: ácido acético: agua (4:1:5) no sobrepase a la muestra aplicada, se dejó por 12 horas que el solvente ascienda por capilaridad. Posteriormente se procedió a sacar la placa cromatográfica teniendo en cuenta que el solvente haya llegado hasta los 2 cm de la parte superior de la placa (frente del solvente), se dejó secar la placa de CCF al aire libre y se procedió a observar en la cámara UV CAMAG, finalmente se reveló con DPPH y cloruro férrico.⁵

e. Contenido de fenoles totales

Se colocó 0,1 g de extracto en una fiola y se enrazó a 50 ml con metanol; se mezcló por 2 minutos, después del reposo, con una pipeta se tomó 0,5 ml de la muestra y 8 ml de agua destilada, al mismo tiempo, se preparó un blanco con 0,5 ml de metanol; se añadió 0,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu; se mezcló y dejó reaccionar por 3 minutos; al pasar este tiempo, se añadió 1 ml de carbonato de sodio (Na₂CO₃); se mezcló y dejó reaccionar por 10 minutos; se llevó al espectrofotómetro a “cero” con una solución blanco de metanol; se colocó la alícuota del sobrenadante en una cubeta y se llevó al espectrofotómetro a una lectura de 725 nm; finalmente se estimó la cantidad de fenoles totales a partir de la ecuación desarrollada para el ácido clorogénico en mg%.⁸

f. Determinación de la actividad antioxidante

Se realizó mediante el método de la actividad secuestradora del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) Se preparó una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l, por otra parte se preparó una solución metanólica de cada fracción aislada (etanólica, etérea, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) a una concentración de 300 µg/ml (solución A). Se calibró el espectrofotómetro a cero con una solución blanco de metanol: agua (2:1). Se preparó un blanco de muestra con 0,75 ml de

muestra (solución A) más 1,5 de metanol. Así mismo, se preparó un patrón de referencia (estándar) con 1,5 ml de DPPH más 0,75 ml de agua destilada. La muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una solución final de 100 µg/ml. Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro, se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 (solución B) para obtener una solución final de 50 µg/ml y luego en una proporción de 1:9 (solución C), para obtener una concentración final de 10 µg/ml, con la solución B y C se procedió igual que en los pasos anteriores.⁹ Los cálculos del porcentaje de actividad antioxidante se realizarán de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Donde:
Ac: Absorbancia del control DPPH Sigma
Am: Absorbancia de la muestra
Ab: Absorbancia del blanco de la muestra
AA: Actividad antioxidante

Análisis de datos

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

RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”

Ensayo	Metabolitos	Resultados
Dragendorff	Alcaloides	+
Baljet	Lactonas	++
Shinoda	Flavonoides	+++
Bortrager	Quinonas	++
Espuma	Saponinas	+
Benedict	Azucares reductores	++
Cloruro férrico	Taninos y fenoles	+++
Catequinas	Catequinas	+++
Ninhidrina	Aminoácidos libres	++
Liebermann-	Triterpenos y	++
Burchard	esteroides	

Leyenda: abundante(+++) moderado (++) leve(+)

Tabla 2. Características químicas de las diferentes fracciones de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”

Fracciones	FeCl ₃ 5%	KMnO ₄	DPPH
Etanólica	+++	+++	+++
Etérea	++	+	+++
Clorofórmica	+++	++	+++
Acetato de etilo	+++	+++	+++
Acuosa	++	+	+++

Leyenda: abundante(+++) moderado(++) leve(+)

Tabla 3. Características cromatográficas de las diferentes fracciones de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”

Fracciones	Sub fracciones
Etanólica	Rojo, azul, púrpura, celeste
Etérea	Rojo, púrpura
Clorofórmica	Azul, verde-azulado, púrpura
Acetato de etilo	Marrón-verde, amarillo-azul, Marrón, púrpura, celeste, azul
Acuosa	Púrpura, celeste, azul
Quercetina	Marrón
Ácido cafeico	Celeste

Tabla 4. Contenido de fenoles totales de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”

Fracciones	Eq. Ácido clorogénico
Etanólica	13,08
Etérea	4,02
Clorofórmica	4,35
Acetato de etilo	17,85
Acuosa	7,04

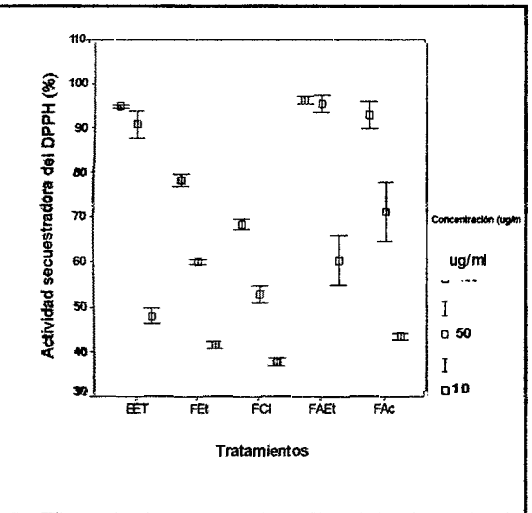


Figura 1. Porcentaje de la actividad secuestradora del radical libre DPPH según tratamientos

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que dietas ricas en alimentos vegetales reducen de forma significativa la incidencia y tasas de mortalidad de enfermedades degenerativas causadas por estrés oxidativo. Este efecto protector ha sido atribuido principalmente a compuestos fenólicos y otros metabolitos, a la actividad antioxidante presentes en especies vegetales.¹⁰ La planta que ha sido objeto del presente estudio está relacionado con efectos antioxidantes, ya que se ha comprobado en los últimos años la implicación que han tenido las especies reactivas de oxígeno en ciertas patologías lo que puede conllevar a la disminución de las defensas antioxidantes, de tal manera que lo que se quiere es ayudar a prevenir a los pacientes que están expuestos a enfermedades a disminuir complicaciones. Para determinar la actividad antioxidante de las fracciones aisladas, han indicado que los compuestos fenólicos pueden ser extraídos utilizando una secuencia de disolventes con polaridad divergente.¹¹ Así se procedió a realizar las extracciones líquido – líquido con distintos solventes que se basan en diferentes solubilidades de los diversos compuestos que se encuentran en el material vegetal; la primera consistió en una extracción etanólica (fracción etanólica), el alcohol es generalmente más eficaz para lograr la recuperación de la mayoría de los metabolitos secundarios; la segunda consistió en una extracción con éter de petróleo (fracción etérea) con la finalidad de extraer sustancias de baja polaridad (lípidos) y eliminar la clorofila; la tercera extracción se realizó con cloroformo (fracción clorofórmica) con la finalidad de extraer sustancias de baja polaridad (terpenos) ; la cuarta con acetato de etilo (fracción de acetato de etilo), para extraer sustancias de alta polaridad (compuestos fenólicos); quedando como residuo la fase acuosa (fracción acuosa).⁵ En la Tabla 1 se reporta la presencia de flavonoides, taninos y/o fenoles y catequinas en abundante concentración. En la prueba de Shinoda las coloraciones que van de rojo a amarillo son consideradas positivas, en la identificación de fenoles y/o taninos debe observarse una coloración azul verdosa al agregar unas gotas de cloruro férrico, así mismo, la prueba de catequinas se evidencian por fluorescencia verde al UV.⁶ En concentración moderada se identificó lactonas y/o cumarinas, quinonas, azúcares reductores, aminoácidos libres y triterpenos y/o esteroides. Las cumarinas dan una coloración y precipitado rojo que indica un resultado positivo y en la prueba de Lieberman debe observarse una coloración azul

verdosa.⁶ En la identificación de quinonas indican que una coloración rojiza al realizar la prueba de Borntrager es considerado positivo, en el caso de la prueba de Benedict explican que los azúcares reductores dan precipitados de color rojo ladrillo y en la prueba de ninhidrina se debe evidenciar una coloración violeta.⁷ En poca concentración se identificó la presencia de alcaloides y saponinas. Un resultado positivo para identificar alcaloides debe ser la presencia de precipitado y en la identificación de saponinas debe observarse formación de espuma.^{6,7} Estudios realizados por otros autores corroboran la presencia de algunos metabolitos encontrados al realizar el tamizaje fitoquímico de *Mutisia acuminata* R&P.^{1,2,13}

En la Tabla 2, se reporta que las fracciones (etanólica, etérea, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) obtenidas fueron diferenciadas por las pruebas de cloruro férrico al 5%, permanganato de potasio y DPPH; donde en la prueba con cloruro férrico al 5% para las fracciones etanólica, clorofórmica, y acetato de etilo produjeron un color verde azulado intenso identificándose presencia de grupos fenólicos en abundante concentración. Los compuestos fenólicos son solubles en alcohol y en acetato de etilo debido a su alta polaridad de los solventes y son poco solubles en compuestos de baja polaridad.¹⁴ Las fracciones etérea y acuosa produjeron una coloración verde oscuro deduciendo que la presencia de grupos funcionales se encuentra en baja concentración. La prueba química con permanganato de potasio para las fracciones total y acetato de etilo producen precipitación intensa debido a una reacción de oxidación. La reacción de oxidación se da por interferencia de enlaces dobles de fenoles aromáticos donde hay cambio de coloración.⁶ La fracción clorofórmica al reaccionar produce poca cantidad de precipitado, así mismo, en la fracción etérea y acuosa se observó mínima cantidad de precipitado. En la prueba química con el DPPH para las fracciones etanólica, etérea, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa es positivo ya que se observó decoloración del radical libre.

En la cromatografía en capa fina; el procedimiento para la separación e identificación de compuestos fenólicos, se desarrolló utilizando como sistema de solventes el BAW (n-buOH: HOAc: H₂O; 4: 1: 5). Las proporciones que se utilizaron permiten separar los compuestos fenólicos de otros compuestos.⁶ Con las cinco fracciones obtenidas se determinó las diferencias y semejanzas entre ellas, utilizándose como estándares al ácido cafeico (ácido fenólico) y la quercetina (flavonoide); y como revelador luz

ultravioleta, cloruro férrico y DPPH. En la Tabla 3; observamos el comportamiento de cada una de las fracciones aisladas, en la fracción etanólica, se observa cuatro manchas fluorescentes (rojo, azul, púrpura y celeste), seguido de la fracción etérea donde se observa dos manchas fluorescentes (rojo y púrpura), mientras que en la fracción clorofórmica se observa tres manchas fluorescentes (azul, verde - azulado y púrpura), así mismo; en la fracción de acetato de etilo se observa seis manchas fluorescentes (marrón-verde, amarillo-azulado, marrón, púrpura, celeste, azul), finalmente en la fracción acuosa se observa tres manchas fluorescentes (púrpura, celeste y azul). En las fracciones etanólica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa se observa manchas de color azul, deducimos que hay presencia de derivados del ácido cinámico, así mismo; la fracción de acetato de etilo es la que presenta mayor cantidad de manchas, la mancha marrón que presenta, es semejante al estándar quercetina identificándose un derivado de la quercetina. Al ser revelados con cloruro férrico se observa que las fracciones etanólica, en especial la fracción de acetato de etilo y la fracción acuosa presentan manchas de color verde azulado afirmando que existen compuestos fenólicos, que no muestra en las fracciones etérea y clorofórmica. Al ser revelados con el DPPH se observa que en la fracción de acetato de etilo se encuentran la mayor concentración de compuestos fenólicos antioxidantes secuestradores del radical libre, seguido de la fracción etanólica y la fracción acuosa donde se observan manchas de color amarillo. Los fenoles son compuestos aromáticos y por consecuencia generalmente fluorescen o atrapan luz, las manchas características de los derivados del ácido cinámico debido a su movilidad en los disolventes utilizados dan una coloración azul fluorescente, celeste fluorescente.¹⁵ Las posibles coloraciones de los flavonoides en la cromatografía en capa fina van desde púrpura, celeste fluorescente, amarillo-naranja fluorescente, amarillo-verdosa, azul-verdosa, marrón.⁶ Estudios realizados corroboran principalmente con la presencia de compuestos fenólicos caracterizados en distintos solventes.^{16,17}

El contenido de fenoles totales es un parámetro importante para determinar la actividad antioxidante. En la Tabla 4, se presentan los resultados de la cuantificación de fenoles totales, la selección del disolvente apropiado para la cuantificación de fenoles totales es un aspecto importante ya que se debe alcanzar la concentración deseada de fitoconstituyentes en los extractos.¹¹ Así la fracción de acetato de etilo

presentó 17,85 mg% de fenoles en equivalentes de ácido clorogénico, seguido de la fracción etanólica donde el contenido de fenoles fue de 13,08 mg% en equivalentes de ácido clorogénico; de modo contrario las fracciones etérea, clorofórmica y acuosa reportaron valores respectivamente 4,02 mg%, 4,35 mg% y 7,04 mg% en equivalentes de ácido clorogénico. El resultado de la reacción presenta una coloración azul; mientras más intenso sea, mayor contenido de fenoles habrá en una muestra.¹¹ Se puede apreciar que el contenido de fenoles totales fue considerablemente superior en la fracción de acetato de etilo y en la fracción etanólica lo que significa que hay mayor concentración de compuestos fenólicos y destacándose que tiene mayor actividad antioxidante. Las fracciones aisladas demostraron tener actividad antioxidante al captar el radical libre DPPH, tal como se muestra en la Figura 1, se compara la actividad antioxidante de las cinco fracciones aisladas, donde la fracción etanólica, la fracción de acetato de etilo y la fracción acuosa a 100 µg/ml tuvieron una actividad antioxidante superior al 90%, mientras que la fracción etérea y clorofórmica tuvieron una actividad superior al 50%. A concentración de 50 µg/ml, la fracción etanólica y la fracción de acetato de etilo presentaron una actividad antioxidante superior al 90%, la fracción acuosa presentó una actividad superior al 70%, mientras que la fracción etérea y clorofórmica presentaron una actividad superior al 50%. Así mismo, a concentración de 10 µg/ml, la fracción de acetato de etilo presentó una actividad secuestradora superior al 60%, mientras que las fracciones etanólica, etérea, clorofórmica y acuosa presentaron actividad inferior al 50%. A las concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml el análisis de varianza factorial aplicado dejó ver que existen diferencias significativas entre las fracciones aisladas, así también entre las concentraciones probadas. Por lo tanto, podemos afirmar que cada una de las fracciones aisladas a las concentraciones de 100 µg/ml y 50 µg/ml tienen actividad secuestradora del radical libre DPPH superior al 50%, y la fracción de acetato de etilo fue la que mostró la mejor actividad antioxidante en las diferentes concentraciones 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml, por ende el mejor solvente extractor de los compuestos fenólicos es el acetato de etilo. Con estos resultados obtenidos en el presente trabajo podemos afirmar que existe un alto potencial antioxidante de la especie *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lampe J. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* [revista en internet] 1999. [acceso enero 2013]; 70(3): 475S-490S. disponible en: <http://ajcn.nutrition.org/content/70/3/475s.full>
2. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* [revista en internet] 1997. [acceso enero 2013]; 82(2): 291-295.
3. Burneo Z. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del sur del Ecuador. [Tesis pre grado]. Ecuador. UTPL; 2009.
4. Pietrellini F. Las plantas Medicinales en un piso alto y Mesoandino. Estudio etnobotánico de la zona de Puquio-Ayacucho. Editorial Graticenter-Perú; 2007.
5. Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smilax sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de post grado]. Lima. UNMSM; 2007.
6. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo editorial; 1994.
7. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba. 2000.
8. Swain T, Hillis W. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I - The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [revista en internet] 2004. [acceso febrero 2013]; Vol 10(1): 63-6.
9. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Sangklanakar J. Sci. Technol* [revista en internet] 2003. [acceso febrero 2013]; 26(2): 211-219. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-ld/journal/DPPH.pdf>
10. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes Naturales y mecanismos de protección. Editorial Atenea. 2006.
11. Banerjee S, Bonde C. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia Retusa* Spreng Bark: Impact of dielectric constant and geographical location *Journal of medicinal plants research*. [revista en internet] 2011. [acceso febrero 2013]; Vol. 5(5). 817-822. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/jmpr/pdf2011/4Mar/Banerjee0Bonde.pdf>

12. Arce P, Cárdenas A, De la Rosa S, Uriundo K. Actividad antiinflamatoria de hidrogeles elaborados a partir de extractos de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”. Rev. de encuentro Científico Internacional de verano Ica-Perú. UNICA [revista en internet] enero 2010. [acceso diciembre 2012].
13. Lozano J. Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma” en ratas. [Tesis de pre grado]. Ayacucho-Perú. UNSCH; 2007.
14. Chasquíbol S, Lengua C, Delmás I, Rivera C, Bazán D, Aguirre M, Bravo A. Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química. [revista en internet] 2003. [acceso febrero 2013]; 2(5):9-20. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/ing_quimica/vol5_n2/pdf
15. Tejacal A, Soto M, Colinas M, Martínez M. 2004. Análisis preliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de Zapote Mamey “*Pouteria sapota*”. Revista Chapingo Serie Horticultura de México. [revista en internet] 2004. [acceso febrero 2013]; 11(2): 225-231, 2005. Disponible en: www.chapingo.mx/revistas/cb24c55ac72bel63878fa4ae7d24196b.pdf
16. Yarlequé M, Bonilla P, Rueda L. Aislamiento de dos flavonoides de *Mutisia acuminata* “chinchilcoma” y su efecto sobre el plasma humano. Anales de la Facultad de Medicina de la UNMSM [artículo en internet] 2002. [acceso diciembre 2012]; 63.
17. Juárez B, Mendiando M. Flavonoids from *Mutisia acuminata*. Pharmaceutical Biology [revista en internet] 2003. [Acceso diciembre 2012]; 41(4): 291-292. Disponible en: <http://www.encycognitive.com/files/Flavonoids20from%20Mutisia%20acuminata.pdf>