

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru", Ayacucho 2018.

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

PRESENTADO POR LA:

**Bach. AMAO SOCA, Liss Geovanna**

AYACUCHO – PERÚ

2019

Agradezco a Dios por permitirme realizar esta tesis, brindándome la fortaleza y perseverancia para poder concretar uno de mis sueños.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de excelentes profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, en especial al “Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos”, a todos los docentes por sus enseñanzas y orientaciones durante mi formación profesional.

Un reconocimiento especial al Mg. Q.F. Marco Rolando Arones Jara por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en la dirección de esta tesis.

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

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”	6
2.3. Radicales Libres	7
2.4. Fuentes de radicales libres	8
2.5. Estrés oxidativo	8
2.6. Antioxidantes	9
a. Antioxidantes endógenos	9
b. Antioxidantes exógenos	10
2.7. Compuestos fenólicos	10
2.7.1. Estructura química de los fenoles	11
2.7.2. Ácidos fenólicos	11
2.7.3. Flavonoides	12
2.8. Actividad antioxidante	13
2.9. Medición de la actividad antioxidante	13
2.9.1. Método DPPH	14
2.9.2. Método ABTS	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	17
3.2. Definición de población y muestra	17
3.2.1. Población	17
3.2.2. Muestra	17
3.2.3. Unidad de análisis	17
3.3. Metodología y recolección de datos	18
3.3.1. Recolección e identificación de la muestra vegetal	18
3.3.2. Obtención del extracto hidroalcohólico	18
3.3.3. Identificación de compuestos químicos del extracto hidroalcohólico	18

3.3.4	Determinación del contenido de fenoles totales	18
3.3.5	Cuantificación de flavonoides totales	19
3.3.6	Determinación de la actividad antioxidante	20
3.3.6.1	Método de radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	20
3.3.6.2	Método del Radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)	21
IV.	RESULTADOS	23
V.	DISCUSIÓN	31
VI.	CONCLUSIONES	37
VII.	RECOMENDACIONES	39
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
IX.	ANEXOS	45

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
<b>Tabla 1.</b>	Clasificación taxonómica de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”.	6
<b>Tabla 2.</b>	Metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Clasificación de los compuestos fenólicos.	10
<b>Figura 2.</b>	Estructura básica del fenol.	11
<b>Figura 3.</b>	Estructura de los ácidos benzoicos.	12
<b>Figura 4.</b>	Estructura química de los flavonoides.	13
<b>Figura 5.</b>	Mecanismo de reacción del DPPH con sustancias antioxidantes (AH).	14
<b>Figura 6.</b>	Mecanismo de reacción para el ensayo ABTS.	15
<b>Figura 7.</b>	Contenido de fenoles totales y flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	26
<b>Figura 8.</b>	Porcentaje de actividad antioxidante mediante el Método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	27
<b>Figura 9.</b>	Porcentaje de actividad antioxidante mediante el Método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	28
<b>Figura 10.</b>	Concentración media inhibitoria (CI <sub>50</sub> ), mediante el Método DPPH y ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	29

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>Anexo 1.</b> Certificado de identificación de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2017.	47
<b>Anexo 2.</b> Certificado de Descripción Botánica de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”.	48
<b>Anexo 3.</b> Fotografía de las hojas y flores de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	49
<b>Anexo 4.</b> Flujograma de procedimientos a seguir para la determinación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	50
<b>Anexo 5.</b> Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	51
<b>Anexo 6.</b> Metodología para cuantificación de fenoles totales por el método de Folin - Ciocalteu del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	52
<b>Anexo 7.</b> Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	53
<b>Anexo 8.</b> Protocolo para la determinación del contenido de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	54
<b>Anexo 9.</b> Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	55
<b>Anexo 10.</b> Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	56

<b>Anexo 11.</b>	Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante, según el método DPPH del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	57
<b>Anexo 12.</b>	Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH.	58
<b>Anexo 13.</b>	Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	59
<b>Anexo 14.</b>	Prueba de comparación múltiple de DUNCAN de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	60
<b>Anexo 15</b>	Prueba t Student de la Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ), mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	61
<b>Anexo 16.</b>	Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS, del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	62
<b>Anexo 17.</b>	Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS.	63
<b>Anexo 18.</b>	Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	64
<b>Anexo 19.</b>	Prueba de comparación múltiple de DUNCAN de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.	65
<b>Anexo 20.</b>	Prueba t Student de la Concentración media inhibitoria (CI <sub>50</sub> ), mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav.	66

“puru puru”, Ayacucho 2018.

**Anexo 21.** Matriz de consistencia.

67

## RESUMEN

Un antioxidante es una molécula suficientemente estable como para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo así su capacidad para dañar. Estos antioxidantes retrasan o inhiben el daño celular, principalmente a través de su propiedad de eliminación de radicales libres. El objetivo fue Determinar el Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018. Su ejecución se realizó en los laboratorios del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La investigación es básica descriptiva. Las muestras de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, fueron recolectadas en horas de la mañana en el mes de junio, en la comunidad de Huaraca, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó los métodos espectrofotométricos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (2,2-Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico), así mismo para la cuantificación de fenoles y flavonoides se utilizó el método espectrofotométrico de folin - ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente. La identificación fitoquímica fue realizada según el método de análisis cualitativo de ensayo a la gota, donde se pudo evidenciar la presencia de fenoles y/o taninos, flavonoides y saponinas. El contenido de fenoles totales y flavonoides fue de 62,9 +/- 0.74 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g ES) y 55,7 +/- 0.13 mg equivalentes de rutina por gramo de extracto seco (ERu/g ES) respectivamente. La concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru” sobre el radical DPPH y ABTS fueron de 767,7 y 1082,7 µg/mL respectivamente, éstas difieren estadísticamente del estándar Trolox, ( $p=2, 233 \times 10^{-5}$ ) según el método DPPH y ( $p= 3,981 \times 10^{-5}$ ) según el método ABTS. Conclusión: la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru” es proporcional a la concentración, a mayor concentración mayor actividad antioxidante.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante, *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, fenoles totales, flavonoides.

## I. INTRODUCCIÓN

Las pasifloras son un grupo de plantas que tienen uso desde periodos precolombinos por el sabor de sus frutos, sin embargo, en los últimos siglos se han encontrado compuestos de importancia farmacéutica para la salud humana.<sup>1</sup> Por otro lado como resultado del metabolismo, algunos organelos celulares como mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, membrana nuclear, citoplásmica y retículo endoplásmico originan radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno (ROS): superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido ( $R-OO^{\cdot}$ ), alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ) e hidroperoxilo ( $HOO^{\cdot}$ ) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS): óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) y peróxido de nitrato. Sin embargo, éstos también pueden generarse por factores externos como contaminación ambiental, exposición a radiación y productos químicos como medicamentos, aditivos alimenticios, pesticidas, herbicidas y tabaco, entre otros.<sup>2</sup>

Estos radicales atacan moléculas como aminoácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Para contrarrestar su efecto, las células han desarrollado mecanismos de protección y reparación del daño, como la producción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADPH-quinona oxidoreductasa y epóxido hidrolasa, también metabolitos antioxidantes que atrapan y neutralizan los radicales libres; sin embargo, resultan insuficientes para protegerlas completamente.<sup>2</sup>

Cuando los oxidantes superan la cantidad de antioxidantes ocurre el estrés oxidativo, que provoca daños importantes en biomoléculas y componentes celulares, lo cual está asociado a enfermedades crónicas degenerativas como Alzheimer, Parkinson, arterioesclerosis, cáncer, artritis, desordenes neurodegenerativos, enfermedades coronarias y envejecimiento.<sup>2</sup>

Se ha demostrado que los componentes fenólicos son los principales antioxidantes derivados de plantas. Entre los compuestos fenólicos más

importantes se encuentran los flavonoides, los cuales, además de su comprobada actividad antioxidante, se les han atribuido efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónicas, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplásica, antimicrobial, entre otros.<sup>2</sup>

Además, los antioxidantes naturales son apreciados porque pueden ser usados en el diseño de alimentos benéficos para la salud (funcionales o nutraceuticos), la importancia de los antioxidantes es crucial para la salud, debido a su capacidad de neutralizar radicales libres, que contienen uno o más electrones desapareados, siendo responsables de muchas enfermedades degenerativas, cataratas, arterioesclerosis, muerte celular y cáncer, asimismo por su capacidad de eliminar y atrapar potencialmente a los electrones dañados del ADN, metales tóxicos, hasta la inhibición de enzimas activadoras de precarcinógenos, hasta carcinógenos. El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico.<sup>3</sup>

Debido a que el rechazo es cada vez mayor por parte de los consumidores hacia el uso de antioxidantes sintéticos; como por ejemplo el BHA y el BHT y, además, dadas las restricciones legales levantadas hacia estos productos, se ha potenciado el empleo de antioxidantes naturales, libres de compuestos químicos sintéticos, como los ácidos fenólicos, los flavonoides y tocoferoles.<sup>3</sup>

Debido a lo anterior, es importante la búsqueda de productos naturales con propiedades antioxidantes que al incluirse en la dieta diaria contribuyan a mantener la salud, al prevenir y curar enfermedades, siendo interesante el estudio de especies vegetales que poseen potencial medicinal. Existen muchas especies medicinales entre ellos el género *Passiflora* que tiene agentes antioxidantes como fenoles y flavonoides.

El presente trabajo de investigación se realizó en el marco del Proyecto FOCAM: Contribución a la mejora de la calidad de recursos naturales terapéuticos, productos y medicamentos herbarios con potencialidad económica del distrito de Vinchos, Ayacucho 2015.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general**

- Determinar el Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar la composición fitoquímica identificando los principales metabolitos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”.
- Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”.
- Cuantificar el contenido de flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, por el método DPPH y ABTS.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Carvajal et al<sup>4</sup>, en el estudio titulado algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. Los frutos y las hojas pertenecientes a badea (*P. quadrangularis*), cholupa (*P. maliformis*), granadilla (*P. ligularis* Juss), gulupa (*P. edulis* var. *edulis*) y maracuyá (*P. edulis* var. *flavicarpa*) se prepararon secando las hojas durante 24 h a 30 °C, luego se maceraron y se hizo la extracción con metanol acidificado. Posteriormente se concentraron en un rota evaporador. La capacidad antioxidante fue medida como la habilidad para atrapar el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) y 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonato de amonio (ABTS'+), el potencial para reducir el hierro (FRAP) y, finalmente, el contenido de fenoles totales se determinó mediante el ensayo del reactivo de Folin-Ciocalteu. se evidenció la presencia de sustancias antioxidantes en los frutos y en los sustratos provenientes de las hojas de algunas especies del género *Passiflora*. Específicamente se encontraron valores significativos para los frutos de granadilla silvestre y para las hojas de gulupa.

En un estudio realizado por Paredes<sup>5</sup> sobre la composición fitoquímica y evaluación de la actividad antioxidante in vitro de hojas y flores de curuba de monte (*Passiflora mixta*). Se cuantificó fenoles y flavonoides mediante espectroscopía UV en tres diferentes extractos: acetato de etilo, metanol y etanol al 70%. Para la cuantificación de fenoles se usó el método de Folin Ciocalteu, con ácido gálico como estándar de referencia, mientras que para el análisis de flavonoides se usó quercetina. La cuantificación de flavonoides no glicosilados se realizó mediante Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en extractos hidrolizados, y se usó apigenina, quercetina y luteolina como estándares de referencia. El análisis de la actividad captadora de radicales libres se realizó en extractos metanólicos mediante pruebas in vitro con 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). En el estudio se identificó compuestos propios del género *Passiflora*

como isovitexina, vitexina 1- ramnósido, isovitexina 2-O-ramnósido y orientina. El extracto metanólico de hojas presentó mejor actividad antioxidante con un IC50 de 361,167 µg/mL en comparación con flores que presenta un IC50 de 479,445µg/mL. Se concluye que *Passiflora mixta* tiene mejor actividad captadora de radicales libres en hojas en comparación con flores.

En el trabajo de investigación realizado por Sousa et al.<sup>6</sup>, titulado fenoles totales y actividad antioxidante de cinco plantas medicinales. En este estudio se cuantificaron los fenoles totales y actividad antioxidante mediante el método espectrofotométrico 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) contenido en el extracto etanólico de hojas, raíces y corteza de cinco plantas medicinales: *Terminalia brasiliensis* Camb, *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc., *Copernicia cerifera* (Miller) HE Moore, *cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire y *Qualea grandiflora* Mart. El total fenólico contenido en los extractos fue determinado por el método de Folin – Ciocalteu, varía desde 250.0 ± 8,2 hasta 763,63 ± 13.03 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco. Se utilizó el agente antioxidante 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). El extracto de corteza de *T. brasiliensis* fue el más activo, con un valor de EC<sub>50</sub> de 27,59 ± 0,82 µg / ml, fue comparable a la rutina (EC<sub>50</sub> = 27,80 ± 1,38) y ácido gálico (EC<sub>50</sub> = 24,27 ± 0,31), utilizado como los controles positivos. La relación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante fue significativa y positiva para *T. brasiliensis*, *C. macrophyllum* y *C. cerifera*.

## 2.2. *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”.

DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	DILLENIIDAE
ORDEN	VIOLALES
FAMILIA	PASSIFLORACEAE
GÉNERO	<i>Passiflora</i>
ESPECIE	<i>Passiflora trifoliata</i> Cav.
N. V.	"puru puru"

Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis*, UNSCH 2017. (Anexo 01)

### **a. Descripción botánica**

Es una planta voluble, de hábito trepador mediante zarcillos, de tallos delgados y largos; las hojas son trifoliadas, alternas, cortamente pecioladas, estipuladas, los folíolos pequeños subcoriáceos, con el ápice aguado y pubescente.

Las flores son grandes, vistosas, solitarias, axilares, y sostenidas por pedúnculos que llevan 3 brácteas bastante pubescentes, son heteroclamídeas, bisexuales, pentámeras y actinomorfas, presentan un tálamo floral profundamente cóncavo o tubular de cuya superficie nacen un cáliz con 5 sépalos bastante pubescentes, corola con 5 pétalos libres de color rojo intenso internamente, corona formada por varios verticilos de filamentos muy vistosos; del centro del tálamo floral cóncavo se levanta un eje denominado androginóforo en cuyo ápice se insertan los estambres y pistilo, androceo formado por 5 estambres libres y gineceo de ovario súpero, tricarpelar con 3 ramas estigmáticas, unilocular y con numerosos óvulos de placentación parietal; fruto baya, ovoide de ápice achatado con 3 surcos longitudinales de color verde amarillento a la madurez, cuyas semillas están recubiertas de una capa delgada y jugosa agrídulce llamada arilo que constituye la parte comestible.

Se propaga mediante semillas y florece casi todo el año.

### **b. Hábitad y distribución**

Crece en forma silvestre y cultivada en la zona andina, en valles interandinos desde los 2800 hasta los 3500 msnm., en bordes de las chacras, en huertos.

### **c. Usos tradicionales de la planta**

Los pobladores de la zona usan como medicina tradicional las hojas y frutos como sedante para el tratamiento del corazón y como cicatrizante de heridas y los frutos lo consumen como fruta fresca, en refrescos, mermeladas, etc.

**Fuente:** Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis*, UNSCH. **(Anexo 02)**

### **2.3. Radicales Libres**

Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen uno o más electrones desapareados lo cual los hace altamente inestables y reactivos.

Estos radicales recorren nuestro organismo deseando robar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica por medio de reacciones de óxido-reducción.<sup>7</sup>

Una vez que el RL ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un nuevo RL, por quedar con un electrón desapareado; iniciándose así una

verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células; estas reacciones en cadena se combate con la acción de los antioxidantes, los cuales neutralizan los átomos de oxígeno. La vida biológica media del radical libre es de microsegundos; pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un estrés oxidativo que puede conducir a diversas enfermedades, tales como envejecimiento, problemas del sistema cardiovascular (arterosclerosis), problemas en el sistema nervioso, daño genético (mutaciones y cánceres).<sup>7</sup>

## **2.4. Fuentes de radicales libres**

### **2.4.1. Fuentes endógenas**

Las principales fuentes endógenas de especies oxidantes y radicales libres en el organismo son:

- La respiración aeróbica mitocondrial: las mitocondrias consumen  $O_2$  reduciéndolo en varias etapas a  $H_2O$  y produciendo como subproducto de esta respiración  $O_2$ ,  $H_2O_2$  y  $OH$ .
- Las células fagocíticas: los leucocitos neutrófilos, macrófagos y eosinófilos actúan mediante respuesta oxidativa al activarse por medio de proinflamatorios no de agentes bacterianos, víricos o parasitarios. Así, son productores directos de grandes cantidades de  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$ ,  $NO$  y  $OCl$ .

### **2.4.2. Fuentes exógenas**

Las principales fuentes exógenas de especies oxidantes son:

- Las radiaciones ultravioletas, rayos X y gamma.
- El ozono, habitual y naturalmente presente en las capas más externas de la atmósfera terrestre. En ocasiones puede encontrarse en capas más bajas de forma natural o puede ser producido por fuentes antrópicas.
- Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos (reacción de Fenton).
- Los alimentos que ingerimos que potencialmente pueden contener peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición.

## **2.5. Estrés oxidativo**

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen un desbalance entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae

como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos.<sup>8</sup>

## **2.6. Antioxidantes**

Un antioxidante es una molécula suficientemente estable como para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo así su capacidad para dañar. Estos antioxidantes retrasan o inhiben el daño celular, principalmente a través de su propiedad de eliminación de radicales libres.

Dentro de este tipo de compuestos antioxidantes se encuentran los compuestos fenólicos que son compuestos asociados al color, a las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), características nutritivas de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol.<sup>9</sup>

En particular, los antioxidantes naturales (hidrosolubles y liposolubles) pueden funcionar como compuestos reductores, interrumpen la formación de radicales libres, inhiben la formación de oxígenos libres e inactivan los metales pro-oxidativos. Los radicales libres se forman en el organismo mediante la respiración aeróbica y existen en diferentes formas como: anión superóxido, hidroxilos, peróxidos, y alcóxilos.<sup>10</sup>

### **a. Antioxidantes endógenos**

Normalmente son bio-sintetizados por el organismo, son las enzimas (proteínas) con capacidad antioxidante que no se consumen al reaccionar con los radicales libres y son dependientes de sus cofactores tales como el cobre, el hierro, el zinc, el magnesio y selenio.<sup>7</sup>

Constituye la primera y mejor línea de defensa contra los radicales libres. Está integrado por tres enzimas principales que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres: superóxido dismutasa, (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); otras tres enzimas, glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST) y  $\Gamma$ -glutamil cisteinil sintetasa (GCS), sin ser estrictamente enzimas antioxidantes, estas colaboran indirectamente con la GPx ya que contribuyen a regular el pool intracelular de glutatión reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos.<sup>11</sup>

## b. Antioxidantes exógenos

Son introducidos por la dieta y a diferencia de las enzimas se consumen al reaccionar con los radicales libres, y deben ser reemplazados y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación (vitaminas E y C y del caroteno).

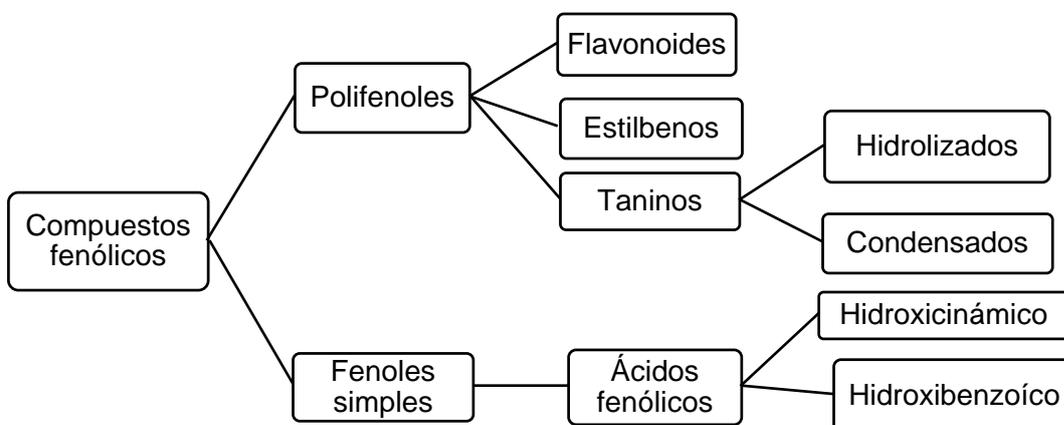
Los antioxidantes exógenos están determinados por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, los mismos que intervienen logrando retrasar la generación y acción de los radicales libres. <sup>7</sup>

### 2.7. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo amplio de sustancias químicas, con estructuras, propiedades químicas y actividad biológica diferente, englobando más de 8000 compuestos distintos.<sup>2</sup>

Los compuestos fenólicos es el grupo más numeroso y ampliamente distribuido en la naturaleza. Además de su comprobada actividad antioxidante, se les han atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónicas, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial, entre otros. Químicamente, estos compuestos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo.<sup>2, 12</sup>

Los compuestos fenólicos o polifenoles son sustancias orgánicas que constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Poseen un anillo benceno hidroxilado, los cuales agrupan un amplio intervalo de sustancias que difieren en el número de átomos de carbono, que las constituyen en conjunto con el esqueleto fenólico básico, además del número y posición de los sustituyentes hidroxilo. Su clasificación se observa en la Figura 1.



**Figura 1.** Clasificación de los compuestos fenólicos.

La actividad antioxidante se debe a la presencia del ortodiol o catecol en la estructura de los diversos compuestos, esto les da la capacidad de quelar metales, interceptar radicales libres y modular la actividad enzimática.<sup>13</sup>

Algunos de los principales efectos biológicos que les confieren actividad antioxidante son:

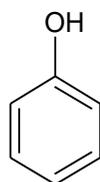
- Suprimen la oxidación de lipoproteínas de baja densidad.
- Presentan antagonismo hacia receptores carcinogénicos.
- Modulan la secreción de las citocinas, así como la expresión de las cinasas proteicas en la proliferación de tumores.
- Inducen la expresión de enzimas anticarcinogénicas o inhiben la inducción de enzimas promotoras de cáncer.
- Tienen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas.

La mayoría de los polifenoles presentes en alimentos están en sus formas conjugadas, los fenoles libres se encuentran únicamente en tejidos muertos.

Los flavonoides que incluyen a las flavanonas, flavonoles y taninos condensados, funcionan como quelantes de metales, atrapan radicales libres, inhiben la xantina- oxidasa asociada a la formación de especies reactivas del oxígeno y la proliferación de células cancerígenas en pulmones, estómago y colon, además, previenen enfermedades coronarias. Los flavonoles se distribuyen en sus formas sin conjugar lo que les da una significancia metabólica.<sup>13</sup>

### 2.7.1. Estructura química de los fenoles

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.<sup>14</sup>



**Figura 2.** Estructura básica del fenol.

### 2.7.2. Ácidos fenólicos

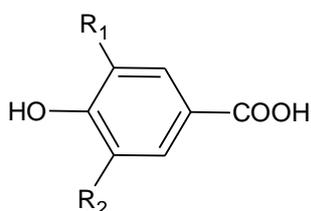
Se caracterizan por poseer un anillo aromático con un grupo carboxilo, pertenecen a dos clases diferentes, ácidos hidroxibenzoico (HBA) y ácidos hidroxicinámicos (HCA), que se derivan a partir de dos moléculas no fenólicas, ácido benzoico y cinámico, respectivamente. En contraste con otros compuestos

fenólicos, HBA y HCA presentan un carácter ácido debido a la presencia de un grupo carboxílico en la molécula. Ellos están ampliamente representados en las plantas, aunque su distribución puede variar fuertemente con especies, variedad, y etapa fisiológica. Además, sus propiedades antioxidantes son esenciales en los mecanismos de defensa antioxidantes de los sistemas biológicos.<sup>15</sup>

### 2.7.2.1. Clasificación de los ácidos fenólicos

- **Derivados del ácido hidroxibenzoico C<sub>6</sub> – C<sub>1</sub>**

Se encuentran distribuidos en el reino vegetal, poseen 7 átomos de carbono, el grupo carboxílico está enlazado directamente al anillo aromático C<sub>6</sub> - C<sub>1</sub>, tienen un esqueleto formado por fenilpropanoides. Se encuentran libres o combinados en forma de hetérosidos o ésteres. Están presentes en forma de aldehídos, derivados metoxilados y algunos alcoholes.<sup>16,17</sup>



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
H	H	ácido p-hidroxibenzoico
OCH <sub>3</sub>	H	ácido vanílico
OH	OH	ácido gálico
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	ácido siringico

Ácido p-hidroxibenzoico

**Figura 3.** Estructura de los ácidos benzoicos.

- **Ácido gálico**

El ácido gálico (AG), también conocido como ácido 3, 4 ,5-trihidroxibenzoico, es un ácido fenólico. Se le atribuyen varios efectos biológicos, que van desde la actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibiótica, hasta la protección cardiovascular y anticancerígena.

Forma de hetérosidos o ésteres. Están presentes en forma de aldehídos, derivados metoxilados y algunos alcoholes.<sup>16,17</sup>

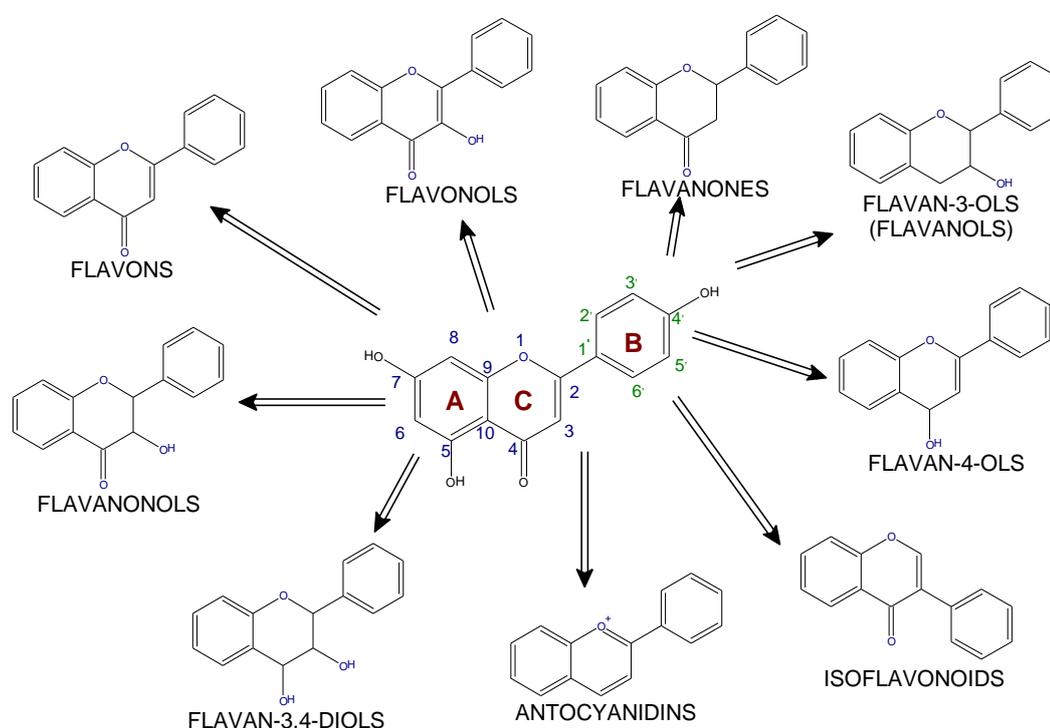
### 2.7.3. Flavonoides

Son pigmentos naturales presentes en los vegetales, 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 (C<sub>6</sub> - C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub>), 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.<sup>18</sup>

### 2.7.3.1. Clasificación de flavonoides

Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a los flavonoides en seis subclases: flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas, flavanoles.<sup>16,17</sup>



**Figura 4:** Estructura química de los flavonoides.

### 2.8. Actividad antioxidante

El número y la posición de grupos hidroxilo, la glicosilación y otras sustituciones determinan la actividad de secuestro de radicales libres por los compuestos fenólicos. La diferencia que existen entre la actividad de secuestro de radicales libres están atribuidas a las diferencias estructurales de hidroxilación, glicosilación y metoxilación.<sup>19</sup>

### 2.9. Medición de la actividad antioxidante

Existen numerosos métodos para medir la capacidad antioxidante de los compuestos, los que se clasifican en dos categorías:

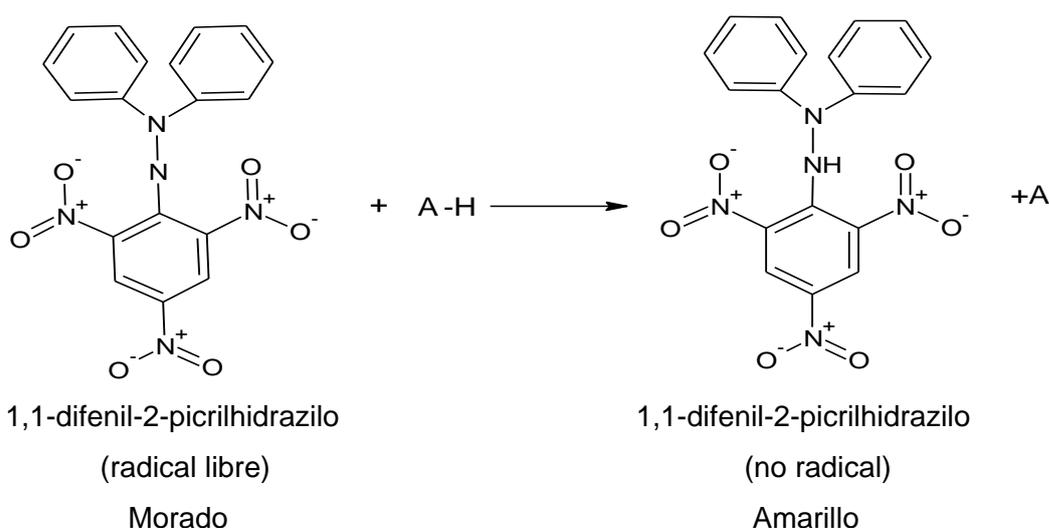
La primera, mide la inhibición de la oxidación en un sistema modelo por monitoreo a los cambios asociados usando medios físicos, químicos o instrumentales.<sup>20</sup>

La segunda, involucra a los ensayos captadores de radicales, los cuales incluyen métodos basados en mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o transferencia de electrones (ET). Los ensayos ORAC (capacidad de absorber radical oxígeno) y TRAP (parámetro antioxidante que atrapan los radicales totales), son los mejores métodos utilizados para medir el HAT. Los ensayos TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox), FRAP (poder antioxidante reductor férrico) y el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) representan a los métodos basados en ET.<sup>20</sup>

### 2.9.1. Método DPPH

El método DPPH es el método de neutralización del radical libre 2,2-difenildipicrilhidracil. El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. Este método es empleado para sustancias liposolubles o hidrosolubles.<sup>9,21</sup>

La solución del reactivo de DPPH es de color violeta y con una absorción de 515 nm. La reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (antioxidante) por el radical libre DPPH, desarrollando un cambio del color violeta a amarillo, al disminuir la concentración del radical libre. El grado de este decoloramiento indica la habilidad del antioxidante de secuestrar al radical libre; el que se lee en el espectrofotómetro después de veinte a treinta minutos de reacción.<sup>9, 20</sup>



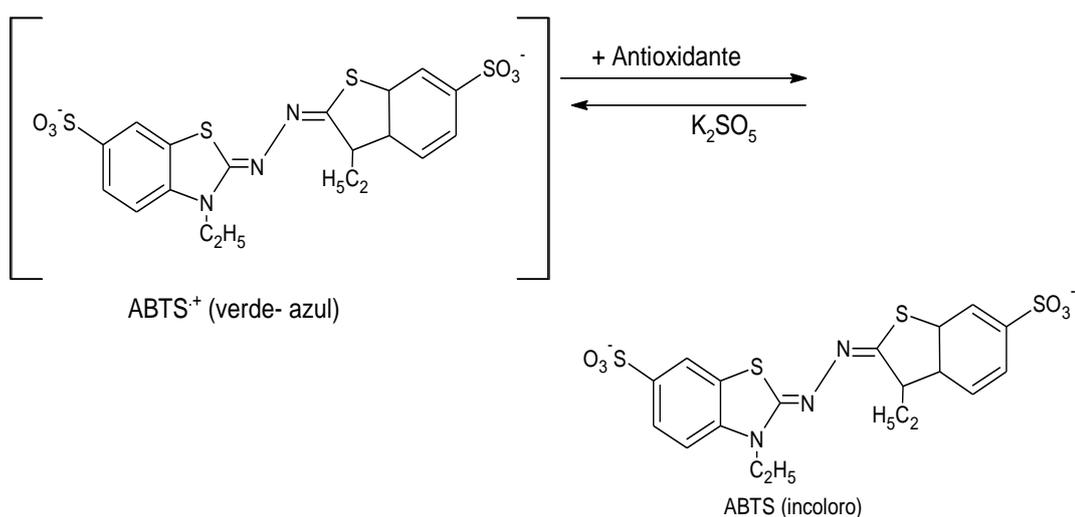
**Figura 5.** Mecanismo de reacción del DPPH con sustancias antioxidantes (AH).

El dato se expresa normalmente como valor EC50, es decir, la concentración del antioxidante necesaria para inhibir el 50% de los radicales DPPH en un periodo de tiempo determinado.<sup>21</sup>

### 2.9.2. Método ABTS

El método ABTS se basa en la capacidad de captura que tiene el anión radical ABTS•<sup>-</sup> [del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)] de vida larga. El ABTS•<sup>-</sup> es oxidado por los radicales peroxilo u otros oxidantes a su forma de radical catión ABTS•<sup>+</sup> de color intenso. La capacidad antioxidante de los compuestos de prueba se mide como inhibición óptica complementaria a la absorbancia (disminución del color), al reaccionar directamente con el radical ABTS•<sup>+</sup>. Los resultados de los compuestos analizados se expresan como equivalentes de trolox.<sup>22</sup>

El método permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para donar un hidrogeno y estabilizar al radical ABTS. La decoloración que la solución de ABTS experimenta en la reacción, se compara con la decoloración hecha por un antioxidante patrón derivado de la vitamina e conocido como trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-acido carboxílico), mediante una curva de calibración. Por esta razón el resultado se expresa como capacidad antioxidante en equivalentes trolox o TEAC (del inglés: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).<sup>21</sup>



**Figura 6.** Mecanismo de reacción para el ensayo ABTS.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación y procesamiento de las muestras se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. En el marco del Proyecto FOCAM: Contribución a la mejora de la calidad de recursos naturales terapéuticos, productos y medicamentos herbarios con potencialidad económica del Distrito de Vinchos, Ayacucho 2015.

#### 3.2. Definición de población y muestra

##### 3.2.1. Población

Está constituida por las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, que crecen en la comunidad de Huaraca, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

##### 3.2.2. Muestra

Está constituida por un kilogramo de hojas frescas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, que fueron recolectadas en la comunidad de Huaraca a 3800 m.s.n.m. en horas de la mañana en el mes de junio, realizando muestreo por conveniencia.

##### 3.2.3. Unidad de análisis

5 g de extracto seco de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”.

##### 3.2.4. Sistema de muestreo

Libre por conveniencia.

### **3.3 Metodología y recolección de datos**

#### **3.3.1 Recolección e identificación de la muestra vegetal**

Las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, fueron recolectadas en horas de la mañana, seleccionadas, lavadas y secadas a temperatura ambiente, en un lugar con buena ventilación, cambiando el papel de soporte y removiendo el vegetal para evitar su descomposición, por un periodo de tres semanas según las directrices de la OMS.<sup>23</sup>

La clasificación y descripción botánica de la planta fue realizada por la Bióloga Laura Aucasime Medina, de acuerdo al sistema de clasificación de Arthur Cronquist et al., 1981 (Anexo 1).

#### **3.3.2 Obtención del extracto hidroalcohólico**

Luego del secado de las hojas se procedió a reducir el tamaño de la muestra utilizando molino de cuchilla, hasta obtener un pulverizado uniforme, luego se pesó 20 g de muestra seca pulverizada, el cuál fue llevado a un frasco ámbar para su maceración, cubriéndolo con alcohol de 50° hasta una altura de 1-2 cm por encima de la muestra, por un periodo de 24 h. Después se colocó en un percolador durante 24 horas adicionales, posteriormente se dejó salir el percolado a razón de 20 gotas por minuto (agregando continuamente el solvente) y posteriormente fue filtrada para evitar polvillo.

Luego se procedió a secar el extracto empleando una estufa a una temperatura de 40 °C. El producto obtenido se envasó en un recipiente ámbar.

#### **3.3.3 Identificación de compuestos químicos del extracto hidroalcohólico**

La identificación de los diferentes compuestos químicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, fueron realizadas siguiendo el método cualitativo de la gota.<sup>24</sup>

#### **3.3.4 Determinación del contenido de fenoles totales**

La determinación de contenido de fenoles totales se realizó mediante el método de espectrofotometría de Folin-Ciocalteu, para lo cual se usó ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia.<sup>25</sup>

Este método se fundamenta en su carácter reductor y seguida neutralización. Consiste en la mezcla de la muestra a analizar y el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual tiene la capacidad de reaccionar con los compuestos polifenólicos, dando como resultado un cambio de coloración de amarillo a azul, y su intensidad depende del contenido de fenoles presentes en la muestra. Seguidamente se mide esta coloración en el espectrofotómetro.<sup>26</sup>

#### **a. Procedimiento**

Se tomó 100 µL de las muestras convenientemente diluidas, 500 µL del reactivo Folin – Ciocalteu 1:10, 400 µL de una solución de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 7,5 %. Se mezcló en un tubo de ensayo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 765 nm utilizando un espectrofotómetro. El contenido de fenoles totales fue expresado en miligramos de equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto seco, a partir de una curva de calibración del estándar ácido gálico de 10 a 60 µg/mL.

#### **b. Cálculos**

Para determinar el valor del contenido de fenoles totales se procedió a realizar la curva de calibración con el estándar de ácido gálico, de tal manera que se obtiene la siguiente ecuación:  $y=bx+a$ , donde “a” es la intersección y “b” pendiente, para calcular el contenido de fenoles totales se debe reemplazar en el valor correspondiente en el eje “Y” (absorbancia) y despejar “X” (concentración ug/mL), posteriormente los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco(mg EAG/g ES).

#### **3.3.5 Cuantificación de flavonoides totales**

El contenido de flavonoides totales en los extractos secos de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, fue determinado por el método de Gonzales<sup>27</sup>, Empleando el reactivo de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>). Utilizando la rutina como el compuesto flavonoide de referencia.

#### **a. Procedimiento**

Se preparó una solución madre de rutina, para ello se pesó 1 mg de rutina, y llevó a un matraz de 25 mL, se disolvió con 2,5 ml de metanol y se aforó a volumen con etanol de 50°.

A partir de la solución del extracto seco de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, se tomaron alícuota de 2 mL las cuales fueron transferidas a un volumétrico de 5 mL, se adicionó a continuación 0,5 mL del reactivo de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) 2 %. Se completó con alcohol de 50° hasta volumen. Después de treinta minutos de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 415 nm. El contenido de flavonoides totales fue expresado como mg equivalentes de rutina por gramo de extracto seco (mg ERu/g ES) a partir de la curva de calibración de este compuesto.<sup>28</sup>

La curva de calibración se trabajará en un intervalo de concentración de 8-32 µg/mL. Las evaluaciones de los extractos del atomizado de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, se realizarán por triplicado.

## **b. Cálculos**

Para determinar el valor del contenido de flavonoides totales se procedió a realizar la curva de calibración con el estándar rutina, de tal manera que se obtiene la siguiente ecuación:  $y=bx+a$ , donde “a” es la intersección y “b” pendiente, para calcular el contenido de fenoles totales se debe reemplazar en el valor correspondiente en el eje “Y” (absorbancia) y despejar “X” (concentración µg/mL), posteriormente los resultados fueron expresados como mg equivalentes de rutina por gramo de extracto seco (mg ERu/g ES).

### **3.3.6 Determinación de la actividad antioxidante**

#### **3.3.6.1 Método de radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)**

Se realizó la evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante siguiendo la metodología descrito por Sousa et al.<sup>6</sup>, el seguimiento del consumo de radical DPPH por las muestras, mediante la disminución de la absorbancia de las soluciones a diferentes concentraciones. Estas mediciones se harán en UV-Vis a una longitud de onda de 515 nm, se usará el trolox como control positivo.

Los resultados se expresarán como  $CI_{50}$ , % de actividad antirradicalaria, o equivalentes a trolox.

#### **a. Procedimiento**

Se procedió a preparar 50 mL de la solución madre DPPH en etanol 96° a una concentración de 40 µg/mL, se deberá mantener en el refrigerador y protegido de la luz, se realizó diluciones de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1 µg/mL. La curva de calibración se construyó a partir de los valores de absorbancia obtenidos a 515 nm de todas las soluciones (1 a 40 µg/mL), medidas en una cubeta de vidrio con el camino óptico de 1cm y teniendo como “blanco” el etanol.<sup>6</sup>

El extracto seco de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, y el control positivo (trolox) en etanol 96°, serán diluidos a concentraciones de 250, 200, 150, 100, 50 y 25 µg/mL. Las medidas de absorbancia de las mezclas de reacción (0,3 mL de solución de muestra y 2,7 mL de la solución madre de DPPH a la concentración de 40 µg/mL) se realizarán a 515 nm a 30 minutos. Se utilizará una mezcla de etanol (2,7 mL) y 0,3 del extracto como blanco.<sup>6</sup>

## b. Cálculos

- Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (%AA), según la siguiente ecuación:

$$\%AA = \frac{\{[A_c - (A_m - A_b)] \times 100\}}{A_c} \quad \dots \text{Ecuación (1)}$$

### Donde:

A<sub>c</sub>: Absorbancia inicial de la solución etanólica de DPPH.

A<sub>m</sub>: Absorbancia de la reacción del DPPH con la muestra.

A<sub>b</sub>: Absorbancia del blanco.

- Se calculó la concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) de la actividad antioxidante, según la ecuación exponencial del porcentaje de DPPH remanente en función de la concentración de Trolox y/o extractos secos, utilizando el software OriginPro.

### 3.3.6.2 Método del Radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

Preparación de la solución madre de ABTS: Se preparó una solución madre de ABTS (7 mM), para ello se pesó exactamente 0,09601 g de ABTS (2,2'-azino-bis [(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 98%]) y se disolvió en 25 mL de agua destilada.<sup>31, 32, 33</sup>

Preparación de la solución de persulfato de potasio: Se preparó una solución de persulfato de potasio (2,45 mM), para ello se pesó 0,0165 g de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) y se disolvió en 25 mL de agua destilada.<sup>29,30,31</sup>

#### a. Preparación del radical ABTS•+

En un frasco ámbar, se colocó 5 mL de la solución madre ABTS (7 mM) y 5 mL de la solución de Persulfato de Potasio K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2,45 mM), se homogenizó y se cubrió con papel aluminio. La solución se incubó de 12 a 16 horas a temperatura ambiente (±25 °C) antes de su utilización.

Una vez formado el radical ABTS•+ se diluyó con etanol 96° hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (±0,02) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción).<sup>29,30,31</sup>

#### b. Procedimiento

Se colocó 20 µL de las soluciones de los extractos y estándares a concentraciones de 50 a 250 µg/mL en tubos de vidrio y se hizo reaccionar con 980 µL del radical ABTS•+.

Se midió la densidad óptica de la mezcla de reacción al minuto 6 a 734 nm, los ensayos se realizarán por triplicado.

### c. Cálculos

- Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (%AA), según la siguiente ecuación:

$$\%AA = \frac{\{[A_c - (A_m - A_b)] \times 100\}}{A_c} \quad \dots \text{Ecuación (2)}$$

#### Donde:

A<sub>c</sub>: Absorbancia inicial de la solución etanólica de DPPH.

A<sub>m</sub>: Absorbancia de la reacción del DPPH con la muestra.

A<sub>b</sub>: Absorbancia del blanco.

- Se calculó la concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) de la actividad antioxidante, según la ecuación lineal del porcentaje de actividad antioxidante en función de la concentración de Trolox y/o extractos secos.

### 3.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de los estudios fueron procesados por Microsoft Excel y en el Software OriginPro.

Los resultados se expresan como promedio, la diferencia significativa existente entre los tratamientos fue evaluada a través del análisis de varianza (ANOVA one-way), seguidos de la prueba de T-Student, con un nivel de significación estadística de 0,05.

Los promedios de la actividad antioxidante y los valores de CI<sub>50</sub> son reportados en gráficos.

Para identificar diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones evaluados se realizó el análisis de varianza, comparaciones múltiples de Duncan y t-Student de muestras independientes con un nivel de confianza de 95%.

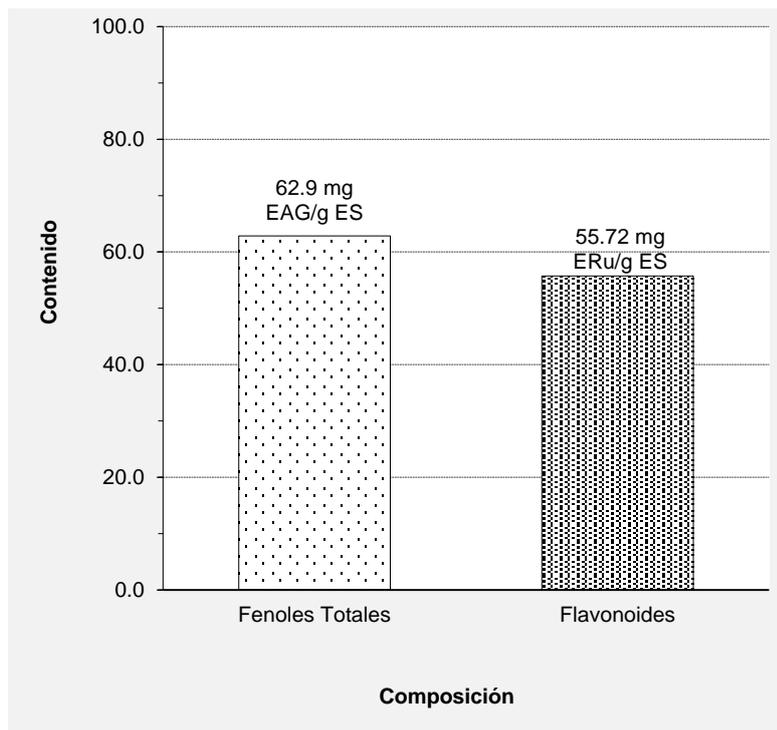
#### **IV. RESULTADOS**



**Tabla 2.** Metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Ensayos</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observaciones</b>
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración naranja intensa en la fase amílica
Fenoles y/o Taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde intensa
Saponinas	Espuma	+++	Espuma

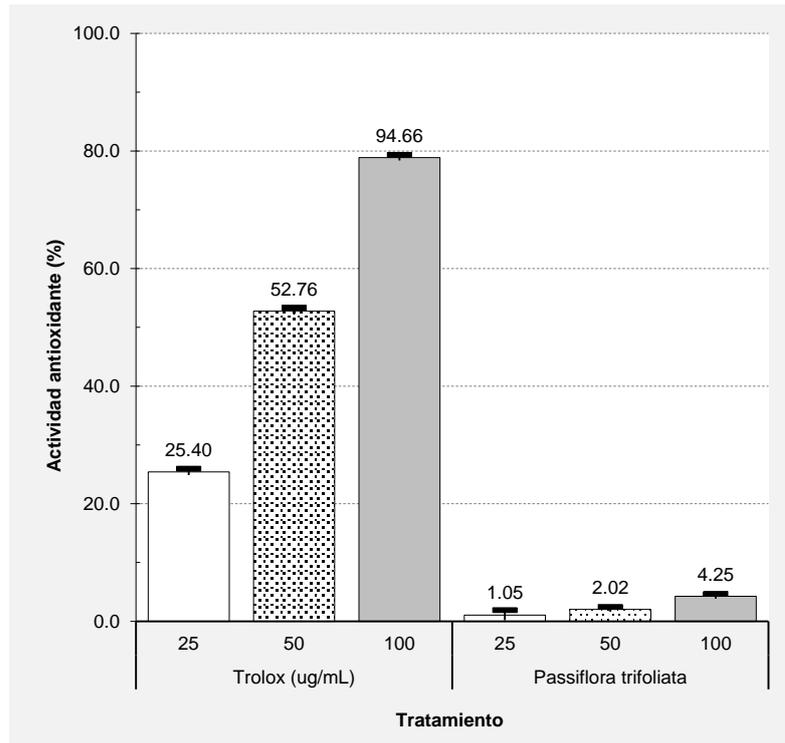
**LEYENDA:** Escasa/leve (+); Regular (++); Abundante/intenso (+++)



EAG/g ES: Equivalente ácido gálico por gramo de extracto seco

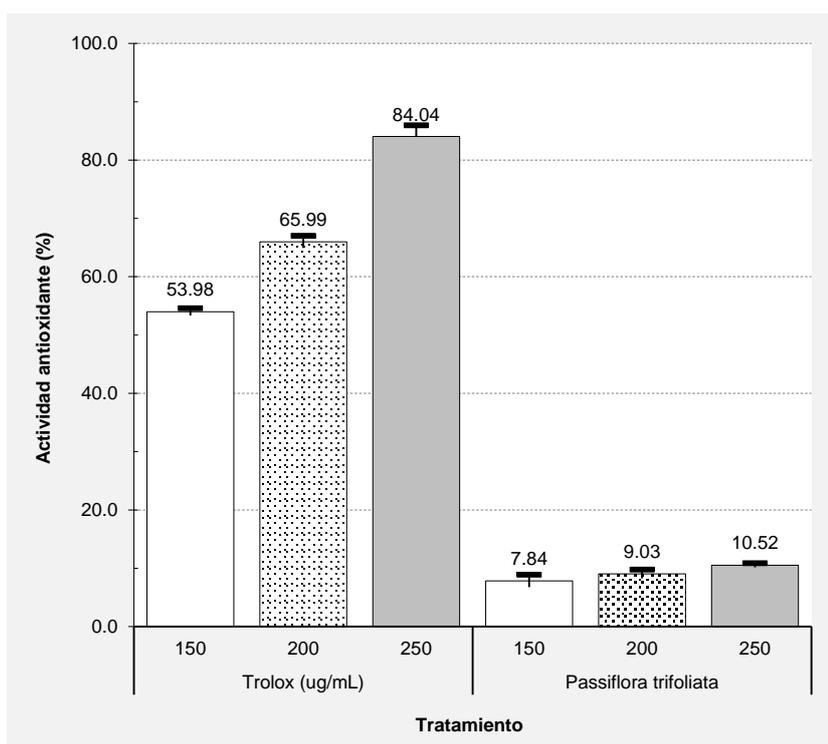
ERu/ g ES: Equivalente rutina por gramo de extracto seco

**Figura 7.** Contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



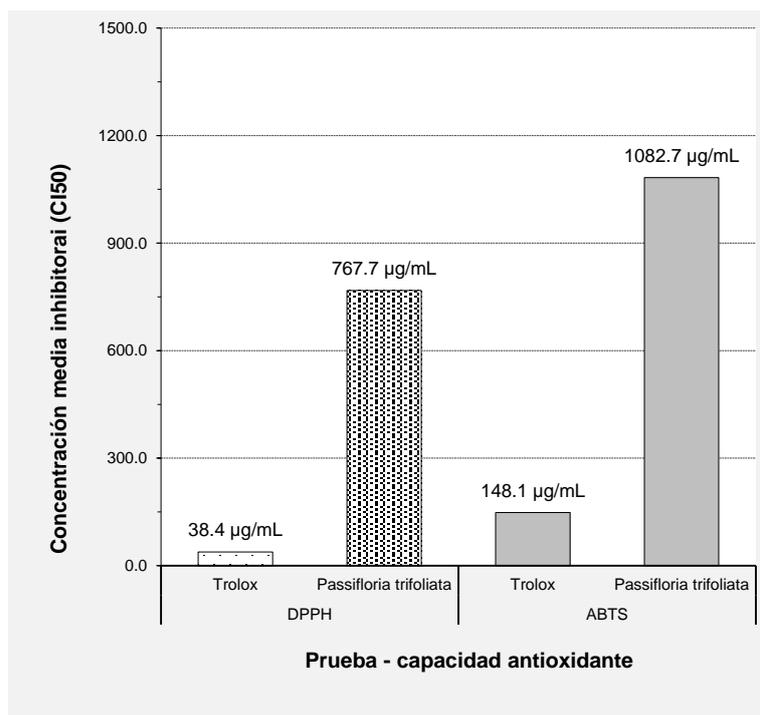
$$p = 8,2 \times 10^{-26}$$

**Figura 8.** Porcentaje de actividad antioxidante mediante el Método DPPH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



$$p = 9,5 \times 10^{-22}$$

**Figura 9.** Porcentaje de actividad antioxidante mediante el Método ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



DPPH:  $\rho = 2,233 \times 10^{-5}$

ABTS:  $\rho = 3,981 \times 10^{-5}$

**Figura 10.** Concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>), mediante el Método DPPH y ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



## V. DISCUSIÓN

Rivas et al.<sup>18</sup>, señalan que los radicales libres se definen como cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura, por lo tanto, son altamente reactivos; también son conocidos como especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno. Estos participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, afecciones broncopulmonares y procesos neurodegenerativas. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento y otros.

En la tabla 2 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru", donde se pudo evidenciar la presencia de fenoles y/o taninos, flavonoides y saponinas. Resaltando los ensayos de cloruro férrico y shinoda, mediante los cuales se observaron la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos y flavonoides respectivamente, observándose una coloración verde intensa para taninos condensados del tipo pirocatecólicos y una coloración carmelita para flavonoides, ya que diversas investigaciones mencionan que la actividad antioxidante se debe a estos metabolitos secundarios.

Pérez et al.<sup>24</sup>, mencionan que una coloración azul indica la presencia de taninos hidrolizables y una coloración verde, de taninos condensados.

Miranda et al.<sup>25</sup>, Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos, pero si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general; verde intenso, taninos del tipo pirocatecólicos; azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

En el caso del *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru", se pudo observar una coloración verde intenso para taninos condensados del tipo pirocatecólicos.

Toapanta<sup>33</sup>, señala que los compuestos fenólicos también conocidos como polifenólicos (fenoles simples, taninos y flavonoides), forman un conjunto muy amplio de sustancias. Estos compuestos protegen a las plantas contra los daños oxidativos y llevan a cabo la misma función en el organismo humano. Los flavonoides, también conocidos como bioflavonoides, son un grupo de sustancias polifenólicas las cuales están presentes en la mayoría de las plantas. Son principalmente reconocidos como los pigmentos responsables del color de las hojas en las plantas. La mayoría de los tejidos vegetales pueden sintetizar flavonoides, los cuales se presentan en forma de glucósidos solubles en agua y se localizan en las hojas y frutas empleadas en la alimentación humana.

En la figura 7, se observan los resultados de la cuantificación de fenoles y flavonoides totales, se usaron los métodos espectrofotométricos de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente. Para la cuantificación de fenoles totales se elaboró la curva de calibración del ácido gálico, con un coeficiente de correlación de 0,9998 (anexo 7) obteniendo 62,9 mg EAG/g de extracto seco, para la cuantificación de flavonoides totales también se elaboró la curva de calibración de la estándar rutina, con un coeficiente de correlación de 0,9986 (anexo 9) obteniendo 55,72 mg ERu/g de extracto seco. Se puede observar que el contenido de flavonoides es menor en comparación con el contenido de fenoles totales, esto se debe a que los fenoles engloban los flavonoides.

Todos los fenoles poseen una estructura común: un anillo fenol, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol.<sup>34</sup>

Los flavonoides son polifenoles que poseen al menos dos subunidades fenólicas, los compuestos que tienen tres o más subunidades fenólicas se denominan taninos.<sup>35</sup>

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C.<sup>34</sup>

Existe correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad de captura de radicales libres. La polaridad de los compuestos fenólicos es determinante en

cuanto a la capacidad de capturar radicales libres. Los compuestos fenólicos que poseen mayor cantidad de sustituyentes hidroxilados (polihidroxilados) tienen una polaridad mayor que los otros fenoles. Los compuestos fenólicos capturan las especies reactivas del oxígeno, tales como radical anión superóxido y radicales lípidos peroxi.<sup>34</sup>

Cuando se realizó la cuantificación de flavonoides según el método de cloruro de aluminio en las muestras, estas presentaron un color amarillo, según Amaya y col.<sup>36</sup>, esto se debe a que el catión de aluminio forma complejos estables con el flavonoide en etanol evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas. En el caso de los fenoles se pudo observar una coloración azul según Carpio et al.<sup>26</sup>, es debido a que el reactivo de Folin-Ciocalteu, reacciona con los compuestos polifenólicos en un medio alcalino, dando como resultado un cambio de coloración de amarillo a azul, y su intensidad depende del contenido de fenoles presentes en la muestra.

En esta investigación se determinó la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru", a través de dos métodos colorimétricos *in-vitro* con las especies radicalarias sintéticas DPPH y ABTS, puesto que estos son los más utilizados en los laboratorios del mundo debido a que indican de manera general, la capacidad antioxidante de las sustancias para donar hidrógenos o captar electrones.

La solución de alcohol DPPH es de color morado oscuro, el cual desaparece en presencia de antioxidantes, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm. El DPPH es hidrófoba por lo que sus reacciones deben ejecutarse en solventes orgánicos, por ejemplo, metanol.<sup>37</sup>

El método ABTS mide la capacidad captadora de radicales libres a través de la decoloración del radical ABTS. Este método es capaz de determinar propiedades antioxidantes tanto hidrofílicos y lipofílicos. En este método, el color azul/verde del radical ABTS<sup>+</sup>, generado por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio, se reduce en presencia de antioxidantes, y el grado de decoloración se determina en un punto de tiempo fijo, por tanto, entre mayor es la capacidad antioxidante del polifenol, mayor es la decoloración generado sobre el radical ABTS.<sup>37</sup>

Kuskoski et al.<sup>38</sup>, mencionan sobre los métodos químicos utilizados para determinar la capacidad antioxidante (captación de radicales libres), el radical ABTS es uno de los más rápidos, originando resultados reproducibles y

coherentes. Además, el ABTS presenta importantes ventajas; muestra varios máximos de absorción y una buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica.

Para determinar la actividad antioxidante mediante el método DPPH, se trabajó con la curva de calibración del radical (anexo 11), se elaboró de acuerdo a la metodología descrita por Sousa et al.<sup>6</sup>, a las concentraciones de 1 µg/mL, 5µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL Y 35 µg/mL, preparado de acuerdo al anexo 10. Por otro lado, para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método ABTS, se trabajó de acuerdo al anexo 15.

Para contrastar el porcentaje de actividad antioxidante mediante el método DPPH Y ABTS, se utilizó como estándar el trolox. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru” y el estándar Trolox fueron preparadas a las concentraciones de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL y 250 µg/mL (anexo 10 y anexo15).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8 y figura 9, la actividad antioxidante es directamente proporcional a la concentración, a mayor concentración mayor actividad antioxidante. Según el método DPPH el porcentaje de actividad antioxidante a las concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL fue de 1,05; 2,02 y 4,25 respectivamente, éstas difieren estadísticamente del estándar Trolox ( $p = 8,2 \times 10^{-26}$ ), (anexo 13). Por otro lado, el porcentaje de actividad antioxidante según el método ABTS a las concentraciones de 150, 200 y 250 µg/mL fue de 7,84; 9,03 y 10,52 respectivamente, estos resultados difieren estadísticamente del estándar Trolox ( $p= 9,5 \times 10^{-22}$ ), (anexo 18).

El contenido de antioxidantes en los vegetales está determinado por numerosos factores que intervienen en la síntesis de estos compuestos, como la especie, variedad, condiciones de cultivo, zona geográfica, factores fisiológicos y la maduración. La actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes en algunas especies se reduce a medida que avanza el proceso de maduración.<sup>1</sup>

Los taninos o polifenoles poliméricos tienen mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples.<sup>34</sup>

En la figura 10, se muestran los resultados de la prueba T-student de la concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>), según el método DPPH y ABTS del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”. Donde a menor concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) mayor capacidad

antioxidante, los resultados obtenidos fueron 767,7  $\mu\text{g/mL}$  y 1082,7  $\mu\text{g/mL}$ , según el método DPPH y ABTS respectivamente. Además, estos resultados son estadísticamente diferentes, DPPH ( $p = 2,233 \times 10^{-5}$ ) y ABTS ( $p = 3,981 \times 10^{-5}$ ). Se observaron diferencias entre los dos ensayos de captura de radicales libres (DPPH $\cdot$  y ABTS $\cdot+$ ) empleados. Ambos ensayos miden la capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra para capturar el radical libre, sin embargo, sus condiciones de reacción y cinética son diferentes. Además, otra importante diferencia entre ambos ensayos es que el ABTS $\cdot+$  puede medir actividad antioxidante en medio orgánico u acuoso teniendo en cuenta la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos en la muestra. Contrario a esto, el ensayo con DPPH $\cdot$  solo se puede realizar en un medio orgánico, lo cual constituye una limitante al momento de interpretación de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos presentes en una muestra, situación que justifica las diferencias evidenciadas entre ambas determinaciones colorimétricas.



## VI. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos identificados en el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru” fueron: flavonoides, fenoles y/o taninos y saponinas.
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, contiene compuestos fenólicos totales en promedio de 62,9 mg EAG/g ES.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, contiene flavonoides totales en promedio de 55,72 mg ERu/g ES.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, presenta actividad antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH y ABTS, la concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) fue de 767,7 µg/mL y 1082,7 µg/mL respectivamente, éstas difieren estadísticamente del estándar Trolox (DPPH  $\rho=2,233 \times 10^{-5}$  y ABTS  $\rho= 3,981 \times 10^{-5}$ ).



## **VII. RECOMENDACIONES**

- Realizar la extracción de compuestos con actividad antioxidante con otros solventes y otras técnicas.
- Realizar la extracción de compuestos con actividad farmacológica de las flores y los frutos de *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru".



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franco G, Cartagena J, Correa G, Rojano B, Piedrahita A. Actividad antioxidante del jugo de *Passiflora edulis* (gulupa) durante la poscosecha. Rev. Cubana de plantas medicinales. 2014.
2. Islas M, Castañeda A, Álvarez A, Valenzuela R, Romero L, Torres M. Estudio preliminar de la actividad antioxidante de res especies del genero *Ganoderma* (polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, Mexico. Scientia Fungorum. 2017; 46:37– 45.
3. Oliveira Bardales G. capacidad antioxidante de *Averrhoa carambola* L. (carambola) frente a sistemas generadores de radicales libres [Internet] [tesis]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014 [citado 1 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3943/Oliveirabg.pdf;jsessionid=0BFDC7C84DBFFDCB1EBEBD73A0F3A48D?sequence=1>.
4. Carvajal L, Turbay S, Rojano B, Álvarez L, Restrepo S, Álvarez J, Bonilla K, Ochoa C, Sánchez N. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2011; 16(4)354-363 disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n4/pla07411.pdf>
5. Paredes D. "estudio fitoquímico y actividad antioxidante in vitro de hojas y flores de *Passiflora mixta*" Riobamba - Ecuador 2016. [Fecha de acceso 20 de mayo de 2018] disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/4903/1/56T006%20UDCTFC.pdf>.
6. Sousa C de M, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa C da, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quím Nova. 2007; 30(2):351–355. <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/20.pdf>
7. Carvajal Aguilar MG. Evaluación de la actividad antioxidante de las hojas y frutos de la Feijoa (*Acca Sellowiana*) [Internet] [tesis]. [Riobamba, Ecuador]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2015 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/4007/1/56T00530%20UDC%20TFC.pdf>.
8. García Ramírez AE. Evaluación in vitro/in vivo de propiedades antioxidantes de clones promisorios de papa criolla (*Solanum phureja*) [Internet] [tesis]. [Bogotá - Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2011 [citado 5 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8675/1/andraelisagarciamirez.2011.pdf>.
9. Coavoy Sánchez IA. evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de la tuna morada (*Opuntia ficus-indica*) del distrito de san bartolomé, huarochirí, lima. [Internet] [tesis]. [Lima - Perú]: universidad peruana union; 2015 [citado 5 de enero de 2018]. Disponible en: [http://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/UPEU/232/lbeth\\_Tesis\\_bachiller\\_2015.pdf?sequence=1](http://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/UPEU/232/lbeth_Tesis_bachiller_2015.pdf?sequence=1).
10. Villanueva Bautista E. Contenido de betalaínas y determinación de la actividad antioxidante de accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd" quinua" del distrito de Tambillo-Ayacucho 2014 [Internet] [tesis]. [Ayacucho, Perú]: universidad nacional de san Cristóbal de huamanga; 2015 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: [http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/977/Tesis%20B733\\_Vil.pdf?sequence=](http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/977/Tesis%20B733_Vil.pdf?sequence=).
11. Cruz J, Valverde M. efecto del extracto acuoso de *tropaeolum tuberosum* mashua sobre lipoperoxidación inducida con fluoxetina en hígado en *rattus rattus* var. *Albinus* ooferectomizados. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. Cajamarca-Perú 216. [Fecha de acceso de abril de 2018] disponible en: <http://repositorio.upagu.edu.pe/bitstream/handle/UPAGU/455/FYB-001-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

12. Martínez Dotor J. Efecto del procesamiento en el contenido de Compuestos Fenólicos y las propiedades antioxidantes de diferentes variedades de Frijol (*Phaseolus Vulgaris* L) mexicano [Internet] [tesis]. [Toluca, México]: universidad autónoma del estado de México; 2013 [citado 5 de enero de 2018]. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14379/407988.pdf?sequence=1>.
13. Cárdenas Camacho COR. Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* "algarrobo" [Internet] [tesis]. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017 [citado 10 de marzo de 2018]. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/5857/Cardenas\\_cc.pdf;jsessionid=89CFDFD5AC3300CA721BB4327392E805?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/5857/Cardenas_cc.pdf;jsessionid=89CFDFD5AC3300CA721BB4327392E805?sequence=1).
14. Zhañay Andrade MA. Relación entre la Actividad Antioxidante y Concentración de Compuestos Fenólicos Contenidos en el Fruto del Pungal (*Solanum crinitipes*) [Internet] [tesis]. [Riobamba - Ecuador]: escuela superior politécnica de Chimborazo; 2012. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2582/1/56T00350.pdf>.
15. Huaccho Huamán CV. capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenoides y antocianinas de 84 cultivares de mashua (*tropaeolum tuberosum ruiz y pavón*) [internet] [tesis]. [lima, Perú]: universidad nacional agraria la molina; 2016 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2844/Q04H833T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
16. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo Editorial; 1994.
17. Bruneton J. Plantas medicinales Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Primera edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España. 2001.
18. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. Investigación en plantas de importancia médica [Internet]. 1.ª ed. México: OmniaScience; Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 2016 [citado 22 de febrero de 2018]. 452 p. Disponible en: <http://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/issue/view/34>.
19. Mixcan C. Evaluación de fenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante en diez clones mejorados de papa nativa (*solanum tuberosum* sp) de la región Cusco. [internet] [tesis]. [Cusco, Perú]. Universidad Católica de Santa María; 2015 [citado 16 octubre 2018].
20. Muedas Taipe G. Estudio químico y de actividad antioxidante de la Bauhinia guinensis var. kuntiana Aubl. [Internet] [tesis]. [Lima, Peru]: PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ; 2013 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: [http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/4794/MUEDAS\\_TAIPE\\_GOLFER\\_ACTIVIDAD\\_ANTIOXIDANTE\\_BAUHINIA\\_GUINENSIS.pdf?sequence=1](http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/4794/MUEDAS_TAIPE_GOLFER_ACTIVIDAD_ANTIOXIDANTE_BAUHINIA_GUINENSIS.pdf?sequence=1).
21. Cerón Martínez LJ, López Ledesma IA. extracción y cuantificación de compuestos con actividad antioxidante a partir de cascara de tres variedades de papa (*solanum tuberosum*) en el departamento de Nariño [Internet] [tesis]. [San Juan de Pasto, Colombia]: Universidad de Nariño; 2013 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/89552.pdf>.
22. Usquiano Lecoña IV. Evaluación de la capacidad antioxidante y determinación de compuestos fenólicos a partir de extractos de frutas de los valles de la Paz [Internet] [tesis]. [La Paz, Bolivia]: Universidad Mayor de

- San Andres; 2013 [citado 20 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/4148/T-1841.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
23. Organización Mundial de la Salud. Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección de Plantas Medicinales. Directrices de un grupo científico de la OMS. Ginebra, 2003.
  24. Pérez F, Aponte GL, Avalos FR, Nuñez LV. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú. *Pueblo cont.* 2011; 22(2): 421-426.
  25. Miranda M, Cuéllar A. Manual de Prácticas de laboratorio. Farmacognosia y Productos naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad de la Habana: Editorial Félix Varela; 2000.
  26. Carpio Apaza RE, Figueroa Huayllapuma T. Efecto de la adición de goma arábica y maltodextrina en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en extracto de sancayo (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado [Internet] [tesis]. [Arequipa - Perú]: universidad nacional de san Agustín de Arequipa; 2017 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/3014/lacaapr.pdf?sequence=1>.
  27. Gómez Salguero D. Determinación de la capacidad antioxidante del aceite de híbrido de palma en diferentes estados de maduración^ [Internet] [tesis]. [Bogota, Colombia]: pontificia universidad javeriana; 2014 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/16066/GomezSalgueroDaniela2014.pdf?sequence=1>.
  28. Gonzales Gonzales L. Composición fenólica y actividad antioxidante de las hojas de *Mosiera crenulata* [Internet] [tesis]. [Cuba]: Universidad Central «Marta Abreu» de las Villas; 2016 [citado 8 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/6372/Lorena%20Gonz%C3%A1lez%20Gonz%C3%A1lez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
  29. palomino García IR. caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia [Internet] [Tesis de maestría]. [Medellín, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2009 [citado 20 de marzo de 2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Lady\\_Palomino/publication/30757644\\_Caracterizacion\\_fisicoquimica\\_y\\_evaluacion\\_de\\_la\\_actividad\\_antioxidante\\_de\\_propoleos\\_de\\_Antioquia/links/58adf85545851503be91e803/Caracterizacion-fisicoquimica-y-evaluacion-de-la-actividad-antioxidante-de-propoleos-de-Antioquia.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Lady_Palomino/publication/30757644_Caracterizacion_fisicoquimica_y_evaluacion_de_la_actividad_antioxidante_de_propoleos_de_Antioquia/links/58adf85545851503be91e803/Caracterizacion-fisicoquimica-y-evaluacion-de-la-actividad-antioxidante-de-propoleos-de-Antioquia.pdf).
  30. Carvajal Aguilar MG. Evaluación de la actividad antioxidante de las hojas y frutos de la Feijoa (*Acca Sellowiana*) [Internet] [tesis]. [Riobamba, Ecuador]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2015 [citado 6 de enero de 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4007/1/56T00530%20UDCTFC.pdf>.
  31. Agudo Medina L. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Rev Electrónica Autodidacta.* 2010; pág. 27 - 34. Disponible en: [http://www.academia.edu/13924487/T%C3%A9cnicas\\_para\\_la\\_determinaci%C3%B3n\\_de\\_compuestos\\_antioxidante\\_en\\_alimentos\\_Laura\\_Agudo\\_Medina\\_ISSN\\_1989-9041\\_Autodidacta](http://www.academia.edu/13924487/T%C3%A9cnicas_para_la_determinaci%C3%B3n_de_compuestos_antioxidante_en_alimentos_Laura_Agudo_Medina_ISSN_1989-9041_Autodidacta).
  32. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso Márquez CJ, Otero CM, Rojano B, Osorio JA. Actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* s.) en poscosecha. *Temas Agrar.* 2014;19(2):173 - 184. Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/temasagrarios/article/viewFile/732/848>.

33. Toapanta Caguana S. Cambios en la capacidad antioxidante durante el almacenamiento refrigerado de uvilla (*Physalis peruviana L.*) orgánica sin capuchón tratada con radiación UV-C. [Internet] [tesis]. [Quito, Ecuador]: Universidad Tecnológica Equinoccial; 2012 [citado 18 de octubre de 2018].
34. Paladino SC. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinífera L.*) [Internet] [Tesis]. [La Rioja, Colombia]: Universidad Nacional de Cuyo; 2012 [citado 8 de noviembre de 2018].
35. Juli D, Arias E. Antocianinas, polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos clones de papa nativa del género *Solanum* de pulpa azul y roja. [internet] [tesis]. [ Cusco, Perú]. Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco; 2011 [citado 16 de octubre del 2018].
36. Amaya L, Portillo C. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta visible. [internet] [tesis]. [ San Salvador, El Salvador]. Universidad de El Salvador; 2013 [citado 16 de octubre del 2018].
37. Zaquinaula Iñahuzo FE. Determinación de la capacidad antioxidante en alimentos tradicionales [Internet] [Tesis]. [Loja, Ecuador]: Universidad Técnica Particular de Loja; 2016 [citado 8 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/16302/1/Zaquinaula%20I%C3%B1ahuzo%20Fabi%C3%A1n%20Efra%C3%ADn.pdf>.
38. Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cienc Tecnol. Aliment. 2005;25(4):726–732. disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cta/ v25n4/27642.pdf>.

## **IX. ANEXOS**



**Anexo 1.** Certificado de identificación de *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru", Ayacucho 2017.



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, el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fito medicamentos, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de Investigación.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	DILLENIIDAE
ORDEN	:	VIOLALES
FAMILIA	:	PASSIFLORACEAE
GENERO	:	Passiflora
ESPECIE	:	<i>Passiflora trifoliata</i> Cav.
N.V.	:	"puru puru"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 11 de Setiembre del 2017.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Dr. Carlos Francisco Serrano  
JEFE

**Anexo 2.** Certificado de Descripción Botánica de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”.

**DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE PURU PURU**

**NOMBRE CIENTÍFICO** : *Passiflora trifoliata* Cav.

**FAMILIA** : *Passifloraceae*

**Descripción botánica :**

Es una planta voluble, de hábito trepador mediante zarcillos, de tallos delgados y largos; las hojas son trifoliadas, alternas, cortamente pecioladas, estipuladas, los folíolos pequeños subcoriáceos, con el ápice agudo y pubescente.

Las flores son grandes, vistosas, solitarias, axilares, y sostenidas por pedúnculos que llevan 3 brácteas bastante pubescentes, son heteroclamídeas, bisexuales, pentámeras, y actinomorfas; presentan un tálamo floral profundamente cóncavo o tubular de cuya superficie nacen un cáliz con 5 sépalos bastante pubescentes, corola con 5 pétalos libres de color rojo intenso internamente, corona formada por varios verticilos de filamentos, muy vistosos; del centro del tálamo floral cóncavo se levanta un eje denominado androginóforo en cuyo ápice se insertan los estambres y pistilo, androceo formado por 5 estambres libres y gineceo de ovario súpero, tricarpelar, con 3 ramas estigmáticas, unilocular y con numerosos óvulos de placentación parietal; fruto baya, ovoide de ápice achatado con 3 surcos longitudinales, de color verde amarillento a la madurez, cuyas semillas están recubiertas de una capa delgada y jugosa agrídulce llamada arilo que constituye la parte comestible.

Se propaga mediante semillas y florece casi todo el año.

**HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN:**

Crece en forma silvestre y cultivada en la zona andina, en valles interandinos desde los 2800 hasta los 3 500 msnm., en bordes de las chacras en huertos.

**USOS:**

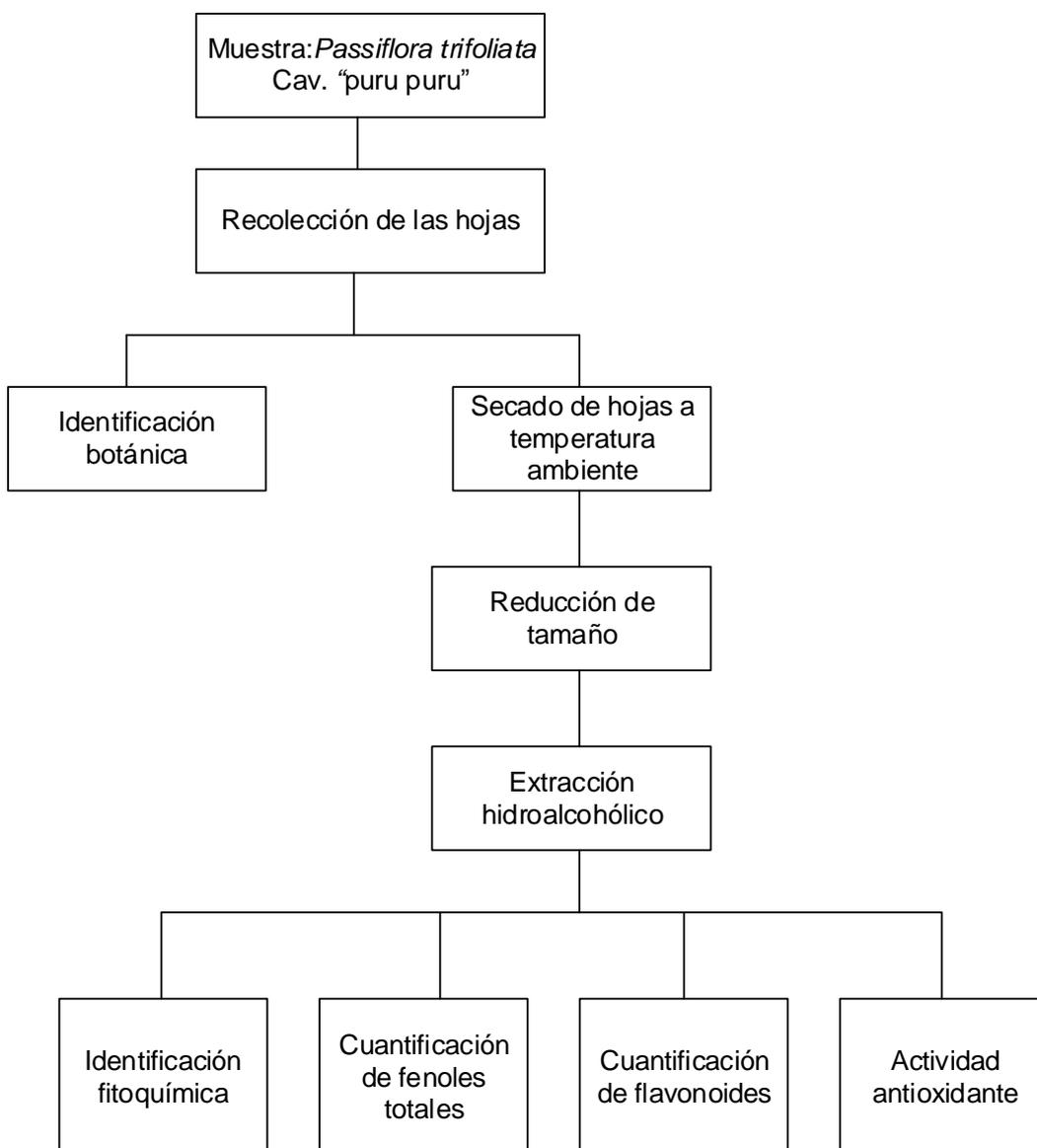
Los pobladores de la zona usan como medicina tradicional las hojas y frutos como sedante para el tratamiento del corazón y como cicatrizante de heridas y los frutos lo consumen como fruta fresca, en refrescos, mermeladas etc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE SUASUÑA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERNÁNDEZ DE LA SANGRE  
*[Firma]*  
Dña. Leticia Aucarime Medina  
JEFE

**Anexo 3.** Fotografía de las hojas y flores de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



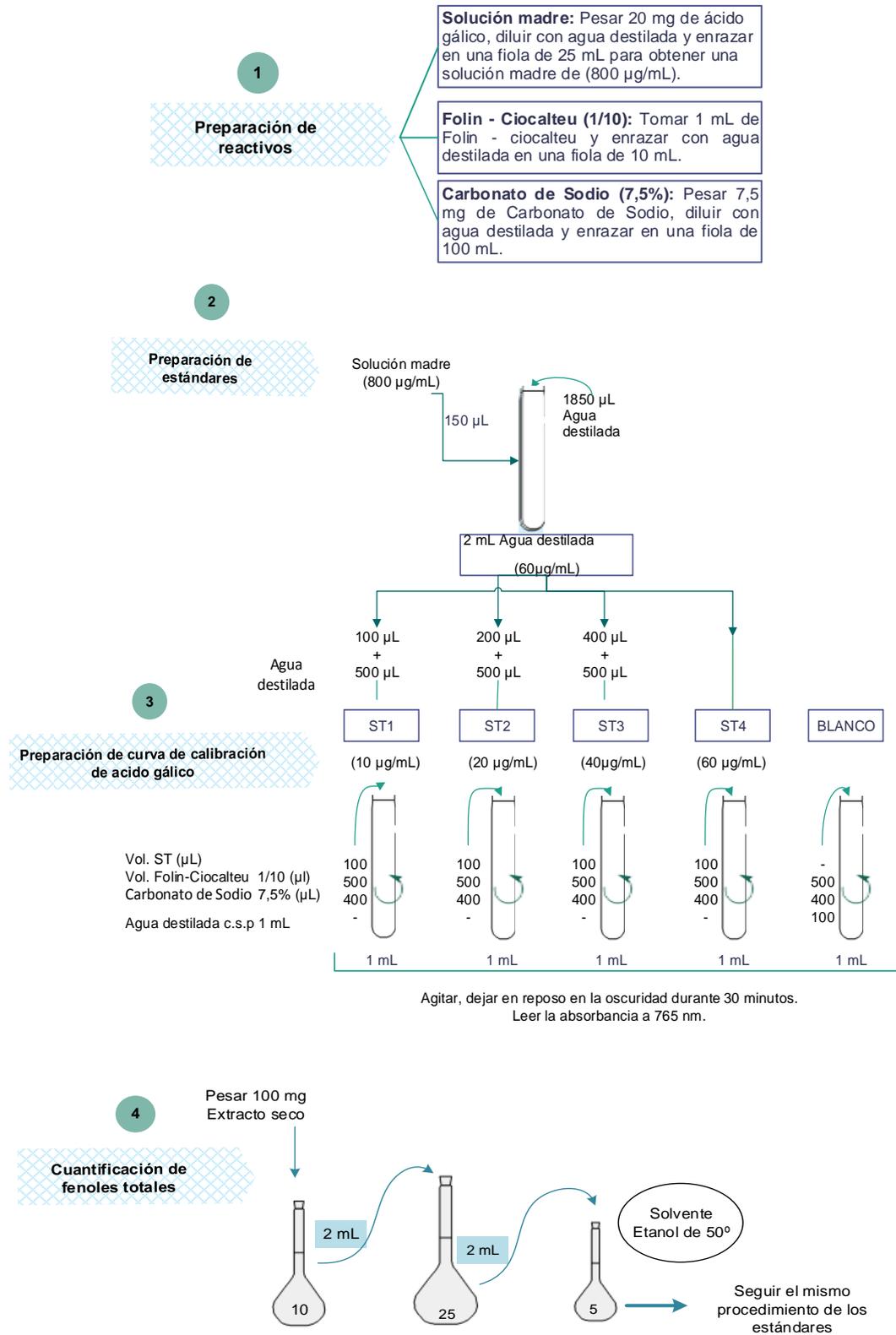
**Anexo 4.** Flujograma de procedimientos a seguir para la determinación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



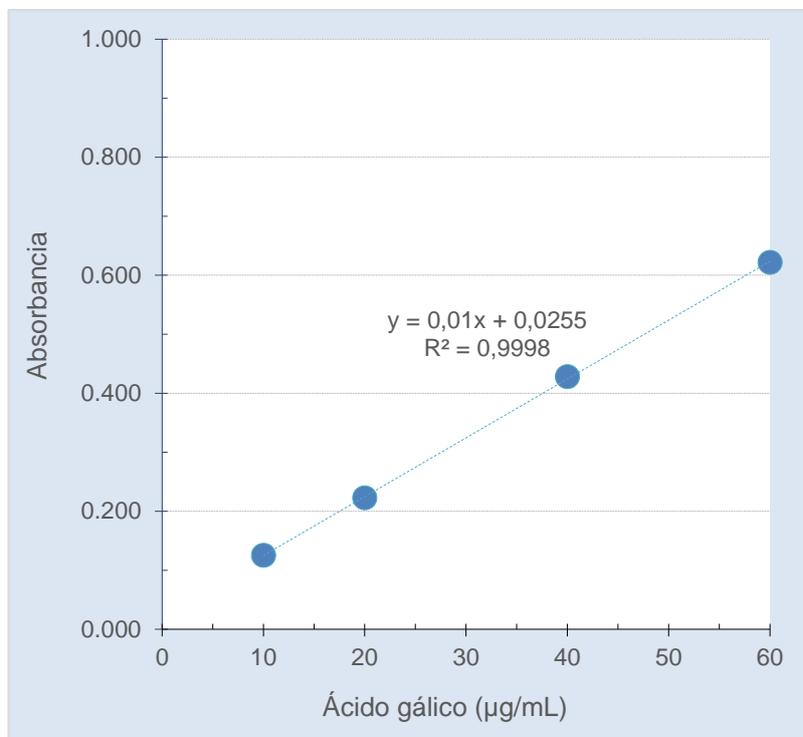
**Anexo 5.** Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru", Ayacucho 2018.



**Anexo 6.** Metodología para cuantificación de fenoles totales por el método de Folin - Ciocalteu del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



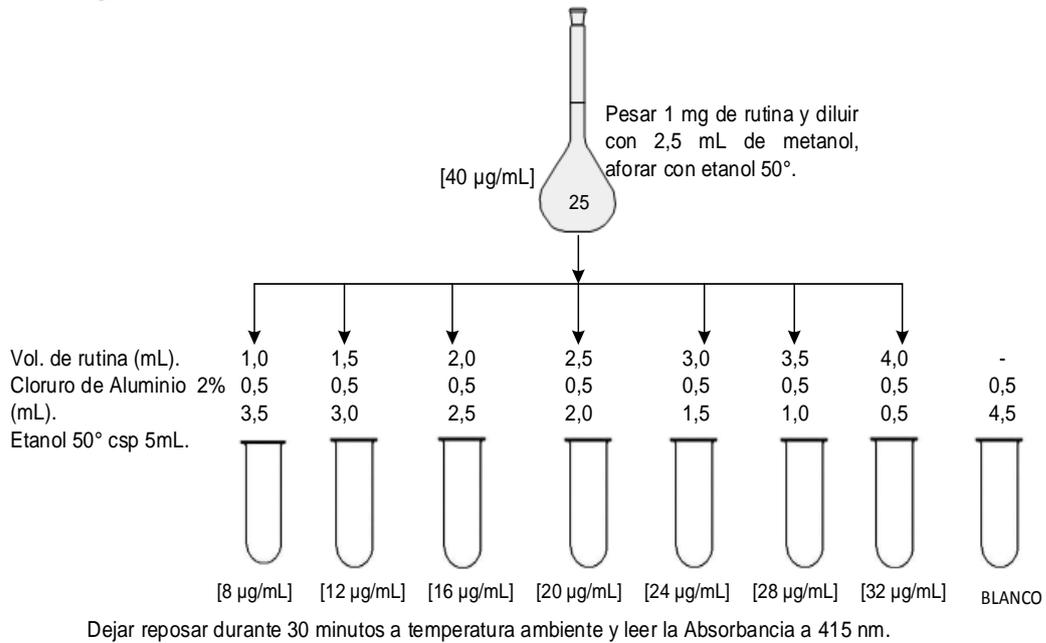
**Anexo 7.** Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



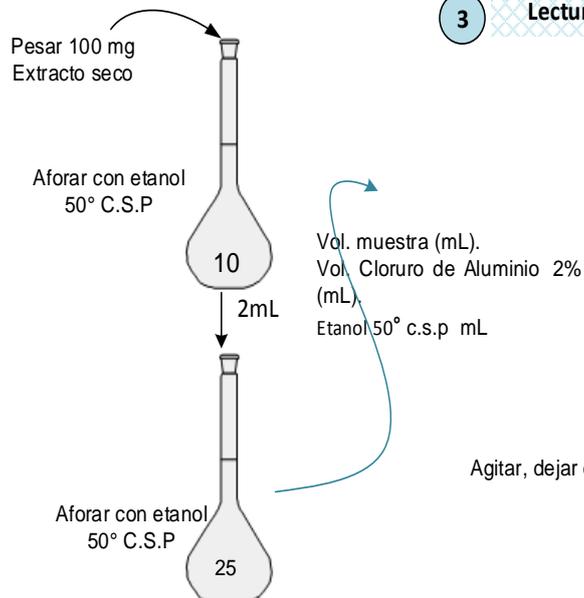
**Anexo 8.** Protocolo para la determinación del contenido de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

### CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

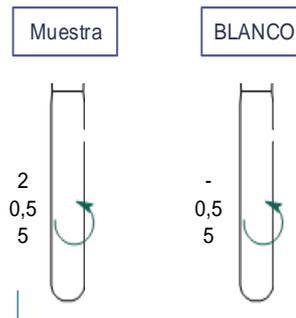
#### 1 Preparación de la curva de calibración de rutina



#### 2 Preparación de la muestra

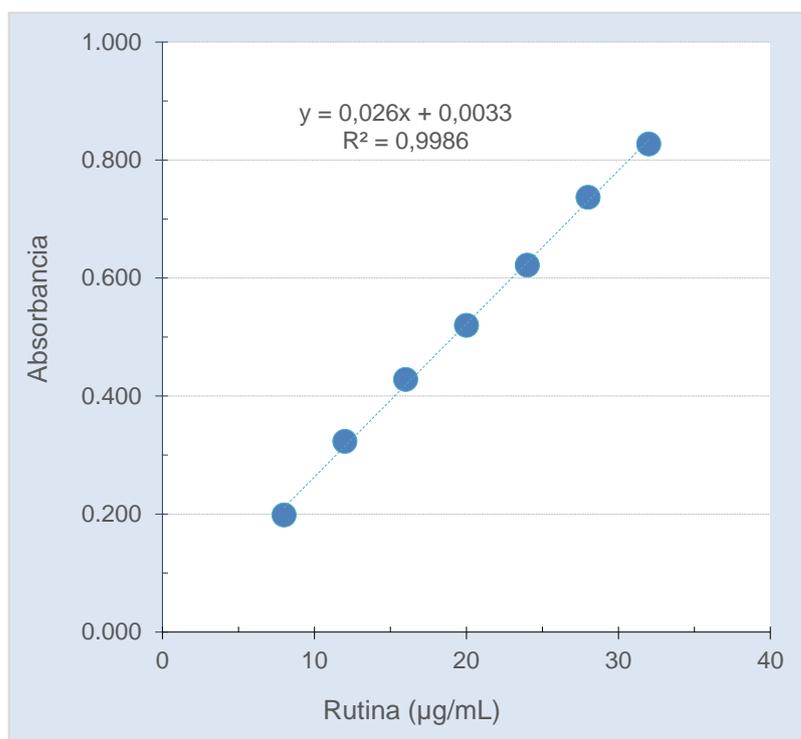


#### 3 Lectura de muestras



Agitar, dejar en reposo en la oscuridad durante 30 minutos. Leer la absorbancia a 415 nm.

**Anexo 9.** Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru", Ayacucho 2018.



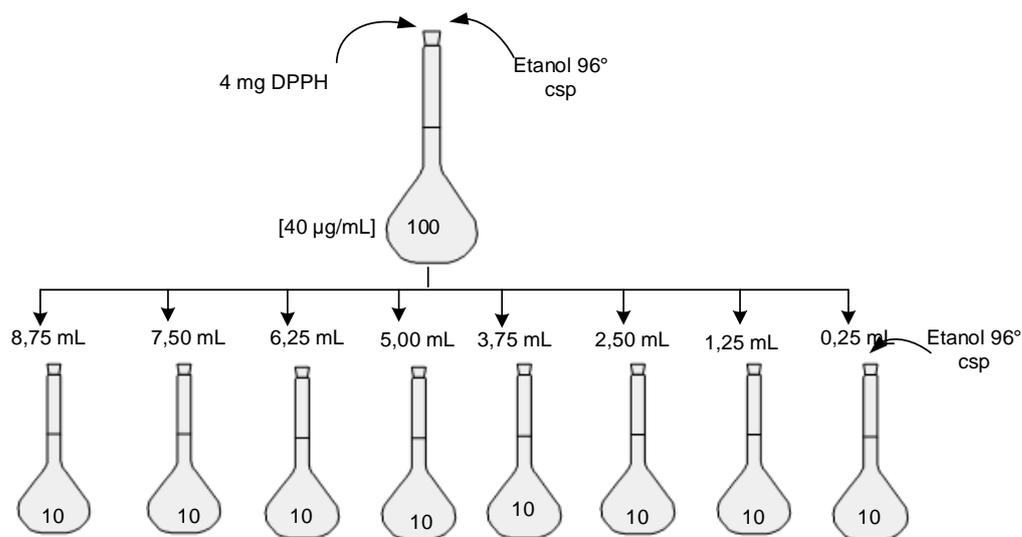
**Anexo 10.** Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

### MÉTODO DPPH

**1 Preparación de la solución de trabajo de DPPH**

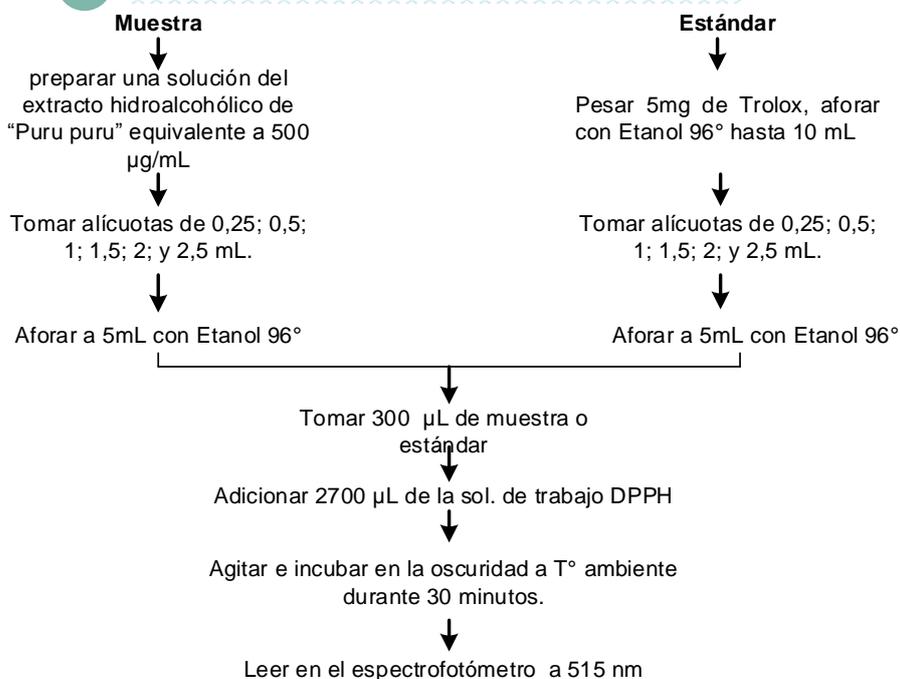
→ Pesar 4mg de DPPH, aforar a 100 mL con etanol 96°.

**2 Preparación de la curva de calibración de DPPH**

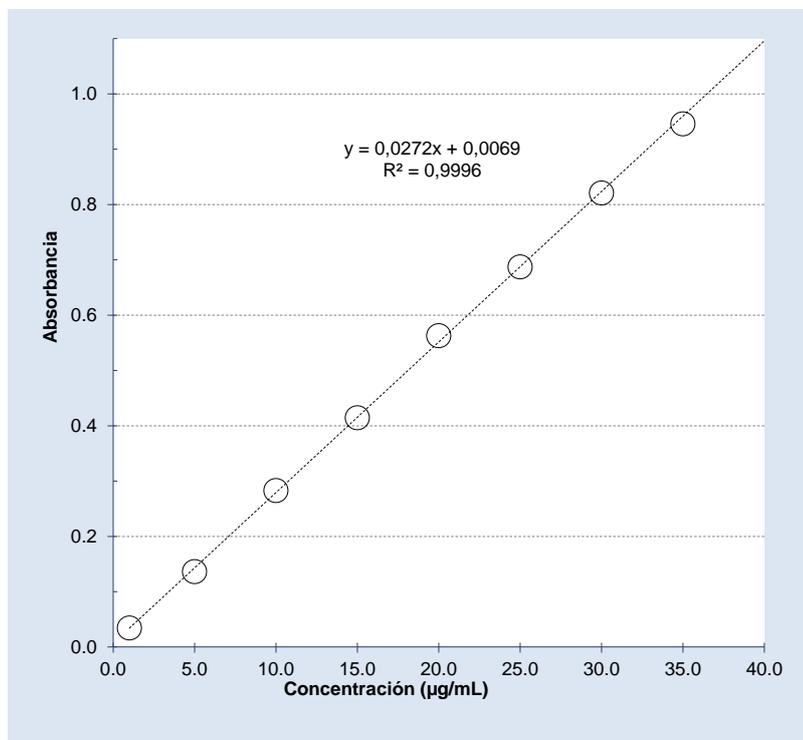


Leer la Absorbancia a 515 nm, calibrar el espectrofotómetro con etanol 96°.

**3 Determinación de la actividad antioxidante**



**Anexo 11.** Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante, según el método DPPH del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



**Anexo 12.** Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH.

**A)** Estándar Trolox.

[µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	25,40	0,218	0,857	0,54	25,94	24,86
50	52,76	0,238	0,450	0,59	53,35	52,17
75	78,86	0,190	0,241	0,47	79,34	78,39
100	94,66	0,143	0,151	0,35	95,01	94,30
150	94,89	0,048	0,050	0,12	95,01	94,77
200	95,33	0,048	0,050	0,12	95,45	95,21
250	95,73	0,048	0,050	0,12	95,85	95,61

**B)** Extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru", Ayacucho 2018.

[µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	1,05	0,344	32,897	0,85	1,90	0,19
50	2,02	0,165	8,165	0,41	2,43	1,61
100	4,25	0,165	3,888	0,41	4,66	3,84
150	7,25	0,126	1,740	0,31	7,57	6,94
200	9,48	0,424	4,473	1,05	10,53	8,43
250	11,91	0,252	2,120	0,63	12,54	11,28

**Anexo 13.** Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Entre grupos	21011,5	5,0	4202,3	56864,7	8,2 x 10 <sup>-26</sup>
Dentro de grupos	0,9	12,0	0,1		
<b>Total</b>	<b>21012,4</b>	<b>17</b>			

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes.

**Anexo 14.** Prueba de comparación múltiple de DUNCAN de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA					
		1	2	3	4	5	6
mp 25 ug/mL	3	1,0					
mp 50 ug/mL	3		2,0				
mp 100 ug/mL	3			4,3			
Trolox 25 ug/mL	3				25,4		
Trolox 50 ug/mL	3					52,8	
Trolox 100 ug/mL	3						94,7
Sig.	0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

**Anexo 15.** Prueba t Student de la Concentración inhibitoria media (CI50), mediante la captación del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

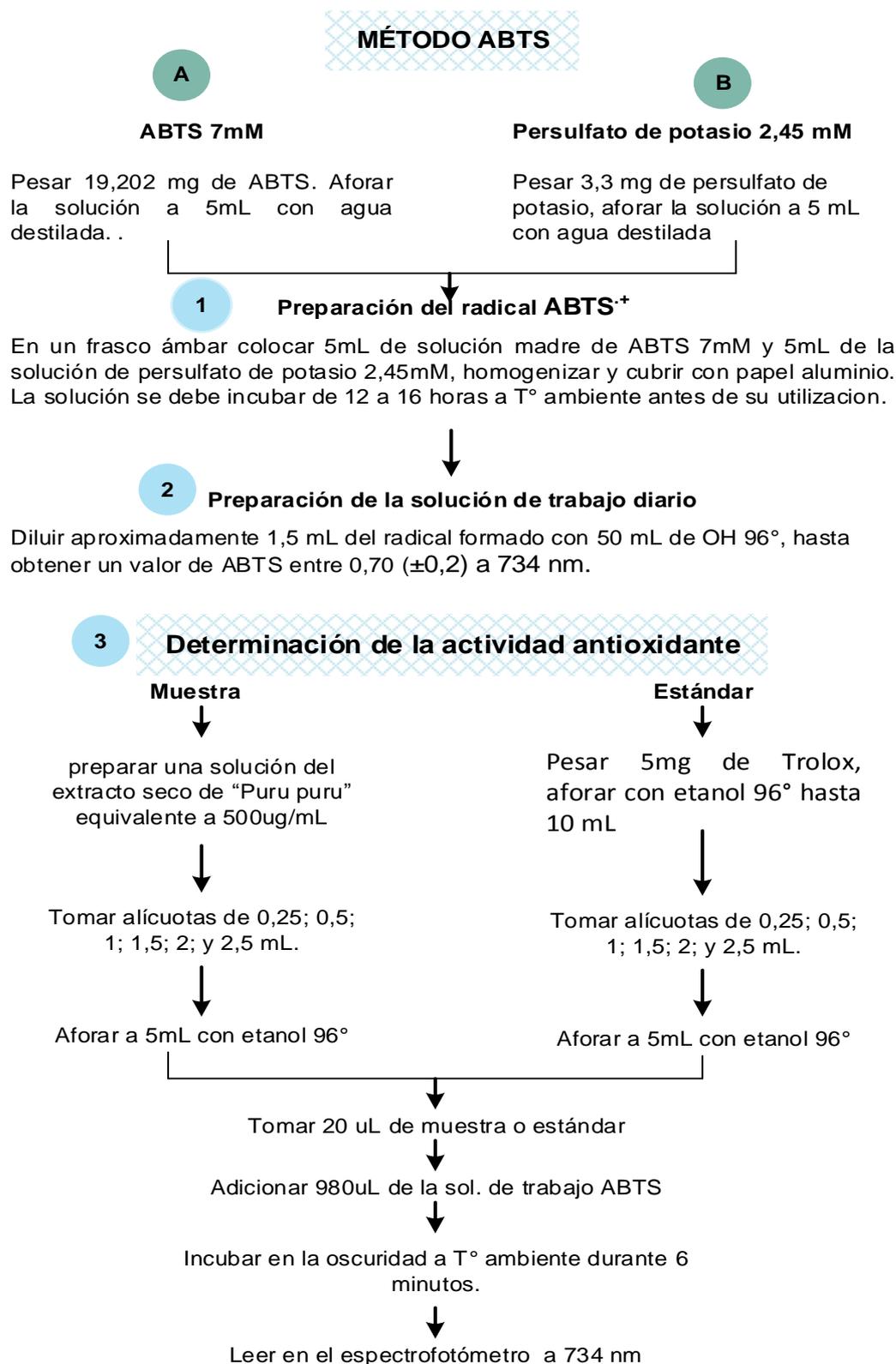
	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	Gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	8,88	0,0407	-22,70	4	2,23259E-05	-695,9233333	30,66	-781,06	-610,79
No se asumen varianzas iguales			-22,70	2,000	0,0019	-695,9233333	30,66	-827,86	-563,99

Sig. bilateral = p

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes.

**Anexo 16.** Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS, del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.



**Anexo 17.** Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS.

A) Estándar Trolox.

[µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	9,96	0,182	1,825	0,45	10,41	9,51
50	15,40	0,248	1,609	0,62	16,02	14,79
100	32,51	0,206	0,634	0,51	33,02	32,00
150	53,98	0,248	0,459	0,62	54,60	53,37
200	65,99	0,418	0,633	1,04	67,02	64,95
250	84,04	0,777	0,925	1,93	85,98	82,11

B) Extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. "puru puru", Ayacucho 2018.

[µg/mL]	%AA	S	%CV	+/-	LS	LI
25	0,69	0,491	70,711	1,22	1,91	-0,53
50	1,98	0,306	15,411	0,76	2,74	1,22
100	4,86	0,281	5,772	0,70	5,56	4,16
150	7,84	0,427	5,445	1,06	8,90	6,78
200	9,03	0,306	3,387	0,76	9,79	8,27
250	10,52	0,140	1,334	0,35	10,86	10,17

**Anexo 18.** Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Entre grupos	16983,1	5,0	3396,6	11959,4	9,5 x 10 <sup>-22</sup>
Dentro de grupos	3,4	12,0	0,3		
<b>Total</b>	<b>16986,5</b>	<b>17</b>			

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes.

**Anexo 19.** Prueba de comparación múltiple de DUNCAN de la actividad antioxidante mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

Tratamiento	N	Subconjuntos homogéneos %AA					
		1	2	3	4	5	6
mp 150 ug/MI	3	7,8					
mp 200 ug/MI	3		9,0				
mp 250 ug/mL	3			10,5			
Trolox 25 ug/mL	3				54,0		
Trolox 50 ug/mL	3					66,0	
Trolox 100 ug/mL	3						84,0
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

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

b. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,00.

**Anexo 20.** Prueba t Student de la Concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>), mediante la captación del radical ABTS del extracto hidroalcohólico de *Passiflora trifoliata* Cav. “puru puru”, Ayacucho 2018.

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	T	GI	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	7,63	0,0507	-19,62	4	3,98073E-05	-972,7633333	49,58	-1110,43	-835,10
No se asumen varianzas iguales			-19,62	2,000	0,0026	-972,7633333	49,58	-1186,09	-759,44

Sig. bilateral = p

Si: Sig. > 0,05; estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0,05; estadísticamente diferentes.

**Anexo 21**  
Matriz de consistencia.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
<p>Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru", Ayacucho 2018.</p>	<p>¿Tendrá contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru", Ayacucho 2018?</p>	<p><b>General</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar el Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru", Ayacucho 2018.</li> </ul> <p><b>Específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar la composición fitoquímica identificando los principales metabolitos del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru".</li> <li>Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru".</li> <li>Cuantificar el contenido de flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru".</li> <li>Evaluar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru", por el método DPPH y ABTS".</li> </ul>	<p><b>Hipótesis nula</b></p> <p>Las concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru", presenta actividad antioxidante.</p> <p><b>Hipótesis alternativa</b></p> <p>Las concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru", no presenta actividad antioxidante.</p>	<p><b>Variable 1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fenoles totales</li> </ul> <p><b>Indicador</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Equivalentes de ácido gálico (mg/g)</li> </ul> <p><b>Variable 2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Flavonoides totales</li> </ul> <p><b>Indicador</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Equivalentes de rutina (mg/g)</li> </ul> <p><b>Variable 3</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Actividad antioxidante</li> </ul> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Porcentaje de inhibición (%), TEAC</li> </ul>	<p><b>Descripción botánica de la especie:</b> Es una planta voluble, de hábito trepador mediante zarcillos; las hojas son trifoliadas, alternas, cortamente pecioladas, estipuladas, los foliolos pequeños subcoriáceos, con el ápice aguado y pubescente.</p> <p>Las flores son grandes, vistosas, solitarias.</p> <p><b>Radicales libres</b></p> <p>Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen uno o más electrones desapareados lo cual los hace altamente inestables y reactivos.</p> <p>Estos radicales recorren nuestro organismo deseando robar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica por medio de reacciones de óxido-reducción.</p> <p><b>Antioxidantes</b></p> <p>Un antioxidante es una molécula suficientemente estable como para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo así su capacidad para dañar.</p>	<p><b>Tipo de estudio:</b> Básico</p> <p><b>Nivel de estudio:</b> descriptivo</p> <p><b>Diseño muestral:</b></p> <p><b>Población:</b> Hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru", que crecen en la comunidad de Huaraca, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.</p> <p><b>Muestra:</b> Hojas de <i>Passiflora trifoliata</i> Cav. "puru puru", que crecen en la comunidad de Huaraca, distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.</p> <p><b>Metodología:</b> La cuantificación de fenoles totales se realizará por el método de Folin – Ciocalteu, La cuantificación de flavonoides se realizó según el método espectrofotométrico de cloruro de aluminio La capacidad antioxidante se determinó por el método de DPPH y ABTS.</p> <p><b>Instrumentos</b></p> <p>Los datos se fueron recolectados usando un espectrofotómetro UV-VIS.</p> <p><b>Análisis de datos:</b> Los datos serán organizados en una matriz para calcular la media y la desviación estándar, asimismo, serán graficados en forma de histogramas y barras, con un nivel de confianza del 95%.</p>