



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE
POLIFENOLES EN HOJAS DE *Cestrum auriculatum*
***L'Her* (HIERBA SANTA)**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:

GODOS CHINCHAYHUARA YANPIER

ASESOR:

Mgtr. ZEVALLOS ESCOBAR LIZ ELVA

Chimbote - Perú

2018

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO
DE POLIFENOLES EN HOJAS DE *Cestrum
auriculatum* L'Her (HIERBA SANTA)**

JURADO EVALUADOR

Dr(a). DIAZ ORTEGA JORGE LUIS

PRESIDENTE

Mgr. RAMIREZ ROMERO TEODORO WALTER

MIEMBRO

Mgr. VASQUEZ CORALES EDISON

MIEMBRO

Mgr. ZEVALLOS ESCOBAR LIZ ELVA

ASESOR

DEDICATORIA

A mi madre y a mi padre, por su paciencia y su gran amor
que me brindan, por su constante apoyo para seguir
adelante esforzándome en mis logros
personales y profesionales.

A mis hermanos, por extenderme su mano y brindarme
su apoyo incondicional para así poder lograr
como profesional y cumplir mis metas.

AGRADECIMIENTO

A la Doctora Liz Zevallos Escobar, por su apoyo incondicional, por la confianza y colaboración en el logro de este trabajo. Por sus ganas y su ejemplo de superación ante obstáculos que se puedan presentar en nuestro camino durante el cumplimiento de nuestros objetivos.

Así mismo al Doctor Édison Vásquez Corales por su apoyo, su comprensión y tiempo para conmigo en el transcurso del desarrollo experimental.

A todas las personas que de una u otra manera me mostraron su apoyo y entusiasmo para el término de esta tesis.

RESUMEN

En el Perú cuando se habla de la medicina tradicional se refiere a las hierbas que han sido utilizadas anteriormente por diversas culturas, como una ayuda para el mantenimiento de la salud, siendo una de las especies de mayor uso dentro de la medicina complementaria en algunos países. Hierba Santa (*Cestrum Auriculatum L'Her*) es una planta que por los dichos populares se puede encontrar en una zona de Quillo, distrito de Yungay, departamento de Áncash. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles en hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her* (hierba santa). De acuerdo a la investigación se realizó la extracción exhaustiva de las hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her* (hierba santa) y los métodos que se utilizaron fueron el método de secuestro de radicales libres DPPH para determinar la actividad antioxidante y el método de Folin – Ciocalteu, para determinar el contenido de polifenoles. De acuerdo a los resultados para la actividad antioxidante in vitro fue 190.57 ± 49.04 mM trolox eq./g de hojas secas, para la cuantificación de polifenoles fue $23,95 \pm 1,7274$ mg de catequina/g de hojas secas. Se concluye que las hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her* (hierba santa) presentan contenido de polifenoles y actividad antioxidante.

Palabras claves: Antioxidante, polifenoles, folinciocalteu, dpph, cestrum , hierba santa

SUMMARY

In Peru, when we talk about traditional medicine, it refers to herbs that have been used by different cultures before, as an aid for the maintenance of health, being one of the most commonly used species in complementary medicine in some countries. . Herb Santa (*Cestrum Auriculatum* L'Her) is a plant that popular sayings can be found in an area of Quillo, Yungay district, department of Ancash. The objective of the study was to determine the antioxidant activity and the content of polyphenols in leaves of *Cestrum Auriculatum* L'Her (holy grass). According to the research, exhaustive extraction of the leaves of *Cestrum Auriculatum* L'Her (holy grass) was carried out and the methods used were the DPPH free radical scavenging method to determine the antioxidant activity and the Folin-Ciocalteu method, to determine the content of polyphenols. According to the results for the in vitro antioxidant activity was 190.57 ± 49.04 mM trolox eq./g of dried leaves, for the quantification of polyphenols was 23.95 ± 1.7274 mg of catechin / g of dried leaves. It is concluded that the leaves of *Cestrum Auriculatum* L'Her (holy grass) contains polyphenol content and antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant, polyphenols, folinciucalteu, dpph, cestrum, holy herb.

INDICE

1. Título de la tesis.....	ii
2. Hoja de firma del jurado y asesor.....	iii
3. Hoja de agradecimiento	iv
4. Hoja de agradecimiento.....	v
5. Resumen.....	vi
6. Abstract.....	vii
7. Contenido.....	viii
8. Índice de gráficos, tablas y cuadros.	ix
I. Introducción.....	pág.1-3
II. Revisión de literatura.....	pág.4-14
III. Hipótesis.....	pág.14
IV. Metodología.....	pág.15
4.1. Diseño de la investigación	pág.15-18
4.2.Población y muestra.....	pág.18
4.3.Definición y operacionalización de variables e indicadores...pág.	19
4.4.Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	pág.19
4.5.Plan de análisis.....	pág. 19
4.6.Matriz de consistencia.....	pág.20
4.7.Principios éticos.....	pág.20
V. Resultados.....	pág.21
5.1.Resultados.....	pág.22-23
5.2.Análisis de resultados.....	pág.24-25
VI. Conclusiones.....	pág.26
Referencias bibliográficas.....	pág.27-32
Anexos.....	pág.33-39

INDICE DE GRAFICOS, TABLAS Y CUADROS

Tabla 01 Contenido de Polifenoles.....	pág. 22
Tabla 2 actividad antioxidante.....	pág. 23
Anexo 1 Certificado de la planta.....	pág. 34
Anexo 2 Curva de calibración de Polifenoles Totales.....	pág. 35
Anexo 3 Curva de calibración de DPPH.....	pág. 35
Anexo .4 Recolección de la planta.....	pág. 36
Anexo .5 Muestra.....	pág. 36
Anexo .6 Molienda.....	pág. 37
Anexo 7Muestra triturada.....	pág. 37
Anexo 8 Contenido de Polifenoles.....	pág. 38
Anexo 9 Actividad Antioxidante.....	pág. 39

I. INTRODUCCION:

Los pueblos originarios del Perú tienen un gran conocimiento sobre plantas medicinales las cuales han venido transmitiéndose de generación en generación, es por ello que la investigación y el estudio sobre las plantas medicinales se transforma en una necesidad para la población así como también la protección de aquellos saberes, El CENSI lo que hizo fue desarrollar una serie de actividades que se relacionan con la prevención y protección de estos conocimientos, estos pueblos indígenas del Perú utilizaron las plantas medicinales desde hace mucho tiempo de los cuales se les fueron asignando nombres como los que conocemos como populares o comunes, esto hace que en el conocimiento popular de acuerdo a la región le otorgue más de un nombre, de acuerdo a su idioma⁽¹⁾.

En el Perú cuando se habla de la medicina tradicional se refiere a las hierbas que han sido utilizadas anteriormente por diversas culturas, como una ayuda para el mantenimiento de la salud, siendo esta una de las medicinas complementarias en algunos países⁽²⁾.

La planta medicinal Hierba Santa cuyo nombre científico es *Cestrum Auriculatum* L'Her, es una planta que en cuanto a su época de siembra se encuentra de preferencia en épocas de lluvia y días nublados, las partes que se aprovechan de este árbol que mide 3 metros de alto son las flores y las hojas, de acuerdo a la distribución geográfica en el Perú, esta planta se puede hallar en los departamentos de, Loreto (Yurimaguas e Iquitos), Cusco (valle del Urubamba); Junín, Pasco y Huánuco (Tomaiquichua)⁽³⁾. Así como también según el dicho popular menciona

que en una zona de Quillo, distrito de Yungay, departamento de Áncash se distribuye esta planta medicinal

El oxígeno es esencial en la vida celular del organismo pero a resultado de la misma se crean unas moléculas llamadas radicales libres que causan a lo largo de la vida efectos negativos en nuestra salud ya que estos tienen la actividad de alterar a las grasas, proteínas y al transcurrir el tiempo los radicales libres pueden ocasionar una alteración genética sobre el ADN, incrementando el riesgo de sufrir una enfermedad como el cáncer y también disminuyendo la funcionalidad de las células que no les es posible renovarse, por otro lado los radicales libres ejercen una labor sobre el ADN mitocondrial la cual es muy susceptible al estrés oxidativo, este mecanismo se encuentra comprometido en los procesos carcinogénicos al igual producen oxidación de las proteínas y del mismo modo producen una desfiguración estructural de las mismas, está a nivel de las grasas incitan a una peroxidación lipídica que como consecuencia altera la permeabilidad de la membrana celular y el correspondiente daño y muerte celular⁽⁴⁾.

Los polifenoles protegen a las células ante el daño oxidativo tratando de disminuir los riesgos que están asociados a el estrés oxidativo como las enfermedades degenerativas que son causadas por el oxígeno en su forma radical, los flavonoides son importantes compuestos fenólicos que se sintetizan en cantidades esenciales por las plantas⁽⁵⁾. Los polifenoles están formados por varios grupos bencénicos que son reemplazados por funciones hidroxilicas y que se pueden obtener en una gran variedad de plantas⁽⁶⁾, por otro lado cuando hablamos de antioxidante se refiere a una sustancia la cual al encontrarse a niveles bajos y en conjunto con un

sustrato oxidable por inhibición de la tasa de oxidación, esta previene y prolonga la oxidación de la misma, los antioxidantes son sistemas de defensa que tiene el organismo para combatir con el daño que producen los radicales libres es porque ello que las enzimas antioxidante son de acción complementaria las cuales cumplen su función en una zona determinada(7).

Esta investigación pretende:

Objetivo general

- Determinar la actividad antioxidante y contenido de polifenoles en hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her* (hierba santa)

Objetivos específicos:

- Determinar la actividad antioxidante in vitro de las hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her* mediante el método de secuestro de radicales libres DPPH.
- Determinar el contenido de polifenoles en hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her* mediante el método de Folin –Ciocalteu.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Soto H. ⁽⁸⁾ describe que en relación a estudios científicos se muestran escasos las investigaciones sobre los efectos tóxicos y benéficos de esta planta medicinal, por lo que se realiza dicho trabajo de investigación sobre la caracterización de dos extractos, uno hidroalcohólico y el otro acuoso de las hojas y tallos de la parte aérea de *Cestrum parqui* L'Herit respecto a la actividad antioxidante y surfactante, esta investigación muestra también que ambas muestras de extractos evitaron la oxidación de los tioles proteicos y de los lípidos dando como resultado como mejor oxidante al extracto hidroalcohólico, aun siendo así la concentración de polifenoles 4.2 veces menor que al extracto acuoso, de tal manera que la liberación de hemoglobina eritrocítica fue 8,5 veces mejor en el extracto hidroalcohólico.

Juárez R. et al. ⁽⁶⁾ menciona sobre el colorante de la “hierba santa” *Cestrum hediondinum* D., lo que se realizó fue la separación de seis fracciones, confirmado mediante el estudio espectroscópico IR de los sólidos obtenidos, los que muestran la aparición de bandas 1452 cm⁻¹ y 778 cm⁻¹, correspondientes al grupo metileno, finalmente el estudio espectroscópico IR del sólido polimérico de la fracción C con tricloruro de aluminio revela bandas fuera del intervalo normal 2993 cm⁻¹ y 2465,72 cm⁻¹ y la variación en las señales 1312 cm⁻¹ y 1073 cm⁻¹, siendo así relacionadas todas a los enlaces C-O y O-H fenólicos.

Paredes M. ⁽⁹⁾ se demostró la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de: *Opuntia soederstromiana*, *Dononea viscosa*, *Bactris gasipaes* y *Mauritia flexuosa* utilizando como metodología el método de Capacidad Atrapadora del Radical o del 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) a distintas concentraciones de extracto de cada planta: 200ug/mL, 150ug/mL, 100ug/mL, 50ug/mL finalmente procedieron a la investigación y experimentación farmacológica donde se efectuó la evaluación de la actividad antioxidante.

Guimet R. ⁽¹⁰⁾ menciona que el organismo humano fábrica de manera equilibrada antioxidantes y radicales libres, pero cuando ocurre un desorden en la degradación y síntesis de los mismos suele producirse inevitablemente un estrés oxidativo que aumenta la generación de estos radicales, que se encuentran relacionados a enfermedades degenerativas, por ende el objetivo de esta tesis fue evaluar la actividad antioxidante in vitro y determinar la concentración de polifenoles totales, de extractos de *Bixa Orellana L* en sus ocho morfotipos existentes en la ciudad, finalmente la actividad antioxidante se midió por el método de DPPH y se cuantifico los polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Cruzado M. et al. ⁽¹¹⁾ evaluó la actividad antioxidante de diversos extractos y el contenido de compuestos fenólicos de alcachofa (*Cynara scolymus L.*), presentando el contenido de compuestos fenólicos que varían entre 93 y 117mg por gramo de la muestra y que fueron expresados como mg de ácido gálico, dependiendo de la forma del proceso y del tipo de extracto analizado, en cuanto a la actividad antioxidante 47mg de ácido gálico es comparable con la muestra de mayor contenido en compuestos fenólicos.

Kuskoskil M. et al.⁽¹²⁾ mosto por objetivo la determinación de antocianos totales, el índice de fenoles totales, y la actividad antioxidante de las pulpas de frutos comerciales congelados, aplicando los métodos espectrofotométrico químicos más en boga para la determinación de la actividad antioxidante (ABTS, DPPH y DMPD), determinando así la actividad antioxidante de las pulpas de los frutos tropicales de mayor consumo en el mercado del sur de Brasil, aplicando el método ABTS con medidas a dos tiempos (1 y 7 minutos), DPPH (30 y 60 minutos) y DMPD (10 minutos), demostrando que la actividad antioxidante encontradas mediante los métodos ABTS y DPPH se encuentran relacionadas con el contenido de compuestos antocianicos y fenólicos.

Beltrán Y. et al.⁽¹³⁾ logró determinar el contenido de fenoles totales de 5 extractos de cuerpos fructíferos de setas comestibles tipo *Pleurotus* sp. obtenidos con solventes de diferente polaridad: n-hexano, acetato de etilo, acetona, etanol y agua, para la determinación del contenido de polifenoles se hizo con el reactivo de Folin-Ciocalteu, esta tesis tubo como resultados un concentración de sólidos totales superior en los extractos acuoso y etanólico, con valores tres y cinco veces mayores con respecto a los alcanzados con solventes menos polares ($p < 0,05$), de tal manera que en los cinco extractos se detectaron compuestos fenólicos; sin embargo, los niveles más altos se visualizaron en aquellos obtenidos con los solventes más polares (agua y etanol) con valores de 138,4 y 86,37 mg/100 g, base seca, respectivamente ($p < 0,05$), finalmente se constató la existencia de una correlación positiva entre el contenido de fenoles y la constante dieléctrica de los solventes ($r = 0,92$).

Alvarado B. al determinar la actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la Cordillera Negra, demostró respecto a la planta medicinal *Cestrum auriculatum* que presenta actividad antioxidante dando como valor el 46.40% de captación de radicales libres a concentración de 100 µg/mL, de extracto metanolico. ⁽¹⁴⁾

Cruz L., Zapata E. demostró sobre la planta *Cestrum auriculatum* L'Her (Hierba santa) en su investigación que pose actividad antioxidante obteniendo valores como el porcentaje de inhibición que fue de 47,09%, dando como resultado 93.29 milimol equivalente a trolox por gramos de hojas de *Cestrum auriculatum* L'Her (Hierba santa). ⁽¹⁵⁾

2.2.BASES TEÓRICAS DE LA INVESTIGACIÓN:

GENERO CESTRUM

El género *Cestrum* es uno de los géneros que se le han hallado una aplicación dentro de la medicina folklórica, como son estos tipos de especies que muestran distintas actividades farmacológicas las cuales la presentamos en este cuadro según la especie, el modo de uso y el lugar donde la utilizan:

ESPECIE	UTILIZACION	LUGAR
<i>C. parqui</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Antifebrífugo ➤ Antiinflamatorio 	Medicina tradicional Chilena
<i>C. auriculatum</i>	Aplicándolas externamente <ul style="list-style-type: none"> ✓ reducir la inflamación en heridas ✓ Como tratamiento antipulgas ✓ Antimicrobiales ✓ Antiinflamatorias 	Provincia de Canta en Perú
	Extracto acuoso de las hojas aplicándose directamente en la zona afectada <ul style="list-style-type: none"> ✓ tratar infecciones de la piel ✓ alergias Ingerida como infusión (tomada en pequeñas dosis) <ul style="list-style-type: none"> ✓ para aliviar la fiebre ✓ la diarrea. Se ha usado también como <ul style="list-style-type: none"> ✓ Antirreumática ✓ Astringente 	Distrito de Pamparomas en Perú
<i>C. nocturnum</i>	Las hojas se emplean <ul style="list-style-type: none"> ✓ Heridas ✓ Zonas inflamadas 	China

	En algunos casos se utiliza como tratamiento epiléptico. El aceite esencial ✓ Repelente de mosquitos	
<i>C. nocturnum</i> + <i>C. diurnum</i>	Juntas estas dos especies son utilizadas para la prevención de la malaria	África
<i>C. laevigatum</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sedante ➤ Úlceras ➤ Antiespasmódico ➤ Diurético 	
<i>C. parvifolium</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fiebre ➤ Úlceras ➤ Desordenes en la piel 	

Desde los primeros reportes investigados por Peckolt en 1909 ha surgido una gran variedad de investigaciones del genero *Cestrum* mostrando a través de estos estudios la riqueza del genero principalmente en lignanos, aceites esenciales, saponinas esteroidales. ⁽¹⁶⁾

TAXONOMIA HIERBA SANTA (anexo N°01)

División: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Archychlamydeae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Cestrum*

Especie: *C. auriculatum* L'Her.

La Temperatura anual de 23 a 26.5 °C en las zonas tropicales, temperatura mínima anual entre 20 a 26 °C, soportan una temperatura de 10 °C y la humedad es de 80 a 90%, altitudes de hasta 3400 metros sobre el nivel del mar, se hallan en suelos arenosos y en suelos arcillosos, habita en chacras, en un campo con semisombra u/o abierto y en bosques húmedos tropicales, de preferencia en épocas de lluvia y días nublados, durante los 6 meses de plantación se debe de podar para la formación, abonar con materia orgánica y deshierbarse esporádicamente, lo recomendable es trasplantar de un terreno definitivo después de 208 días de germinado, cuando llegue a una altura máxima de 51cm y un mínimo de 15cm. En cuanto a la cosecha y conservación del producto las partes aprovechadas son la Flor y hoja, los componentes químicos que tiene esta planta son los taninos, gomas, mucilagos, almidones, azufre orgánico, saponinas y heterósidos. Este árbol es de 3m de altura, tallo ramificado desde la base, hojas pecioladas alternas, ápice agudo y bordes enteros, de fruto baya azul oscuro, de aproximadamente 6 mm de largo la cual muestra 3 semillas y se distribuye en el Perú, se hallan en los departamentos de, Loreto (Yurimaguas e Iquitos), Cusco (valle del Urubamba); Junín, Pasco y Huánuco (Tomaiquichua) ⁽¹⁷⁾, como también según el dicho popular menciona que en un zona de Quillo, distrito de Yungay, departamento de Áncash se distribuye esta planta medicinal.

Soto H. ⁽⁸⁾ menciona y da como resultado que ambos extractos, tanto hidroalcohólico como acuoso de hojas y tallos de la parte aérea de *Cestrum parqui*, mostraron actividad antioxidante y surfactante de forma concentración-respuesta pero a diferentes magnitudes, de tal manera que el extracto hidroalcohólico fue 13,2 veces más intensa antilipoperoxidante que el extracto acuoso, esta también

fue 9,3 veces más intensa en impedir la oxidación de tioles microsómicos, y 11,0 veces más potente en revertir este fenómeno.

ANTIOXIDANTE

Cuando hablamos de antioxidante se refiere a una sustancia la cual al encontrarse a niveles bajos y en conjunto con un sustrato oxidable por inhibición de la tasa de oxidación, esta previene y prolonga la oxidación de la misma, los antioxidantes son sistemas de defensa que tiene el organismo para combatir con el daño que producen los radicales libres es porque ello que las enzimas antioxidante son de acción complementaria las cuales cumplen su función en una zona determinada. ⁽⁷⁾

ESTRÉS OXIDATIVO

Nuestras células se encuentran continuamente generando energía necesaria para nuestro día a día, y para obtener dicha energía necesitamos del oxígeno y los nutrientes que se encuentran en los alimentos, sabemos que necesitamos el oxígeno para vivir, sin embargo la naturaleza también presenta una figura contradictoria, si bien necesitamos el oxígeno, en la respiración celular se van creando los radicales libres, y como consecuencia estos radicales libres dañan nuestra salud ya que estos van oxidando a todo lo que encuentren en su paso los cuales son básicamente el ADN, los lípidos y proteínas, utilizando al electrón suelto y a través de una transformación química en ese ataque cambian también a otras moléculas a radicales libres, por lo tanto estas moléculas no solo se generan de manera inapelable sino que por otros factores también se pueden generar. ⁽¹⁸⁾

POLIFENOLES

Los polifenoles son un grupo de moléculas heterogéneas que tienen como característica en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, hallándose así en una gran variedad de plantas, dándole a estas determinados usos comunes y merecen una considerable atención por sus propiedades antioxidantes. ⁽¹⁹⁾

RADICALES LIBRES Y LA OXIDACION

El oxígeno es esencial en la vida celular del organismo pero a resultado de la misma se crean unas moléculas llamadas radicales libres que causan a lo largo de la vida efectos negativos en nuestra salud ya que estos tienen la capacidad de alterar a las grasas, proteínas y a el ADN. Todos los hechos de vida en el mundo dependen del oxígeno, el cual si se presenta en condiciones desfavorables y elevadas se convierte en un potente oxidante liberando especies reactivas de oxígeno, por otro lado los radicales libres ejercen una labor sobre el ADN mitocondrial la cual al estrés oxidativo es muy susceptible, este mecanismo se encuentra comprometido en los procesos carcinogénicos como también producen oxidación de las proteínas y del mismo modo producen una desfiguración estructural de las mismas, está a nivel de los lípidos incitan a una peroxidación lipídica que como consecuencia altera la permeabilidad de la membrana celular y el correspondiente daño y muerte celular. ⁽¹⁰⁾

DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Tovar J. ⁽¹⁸⁾, define al DPPH como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo que la molécula no se dimeriza como es el caso de la mayoría de los radicales libres, esta deslocalización del electrón intensifica el color violeta típico del radical, cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrogeno el color violeta se desvanece, así mismo este cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es empleado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.

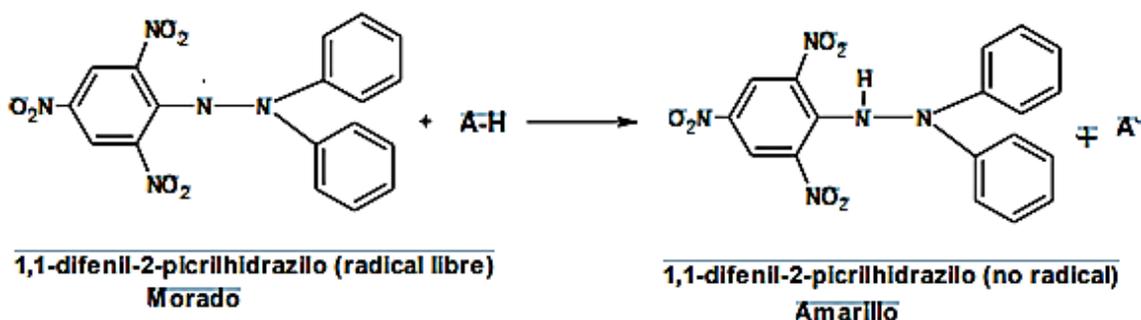


Figura 01. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante. ⁽²⁰⁾

TECNICA PARA DETERMINAR POLIFENOLES TOTALES

- **Determinación de fenoles totales (FT)**

Para determinar los fenoles totales se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. ⁽¹²⁾

TECNICA PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

- **Método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)**

Este método se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH•, por antioxidantes. Con modificaciones el método se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH• 100 µM (3,9 mL) disuelto en metanol al 80%, a la longitud de onda de 517 nm. Se añade 0,1 mL de la muestra o patrón, la mezcla se homogeniza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517 nm se realizan antes de añadir la muestra (A0) y pasados los 30 y 60 minutos (Af). La concentración de DPPH• en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (µM/g de muestra peso fresco). El antioxidante sintético de referencia Trolox, a una concentración de 0,08-1,28 mM en disolución de metanol al 80%, se ensaya en las mismas condiciones, expresándose los resultados en TEAC y VCEAC.⁽¹²⁾

III. HIPÓTESIS

Hipótesis Implícita

IV. METODOLOGIA

4.1. Diseño de investigación

El presente trabajo de investigación corresponde a un estudio de tipo descriptivo.

El nivel de investigación es de enfoque cuantitativo, por tanto, permite la enumeración y medición a través de las matemáticas, la misma que debe ser sometida a los criterios de la confiabilidad y validez; busca reproducir numéricamente las relaciones entre los objetivos y fenómenos y, por lo general se la relaciona con los diseños denominados tradicionales o convencionales, por ello, el análisis cuantitativo de contenido es condición indispensable para la valoración cuantitativa.

4.1.1 Recolección secado y pulverización

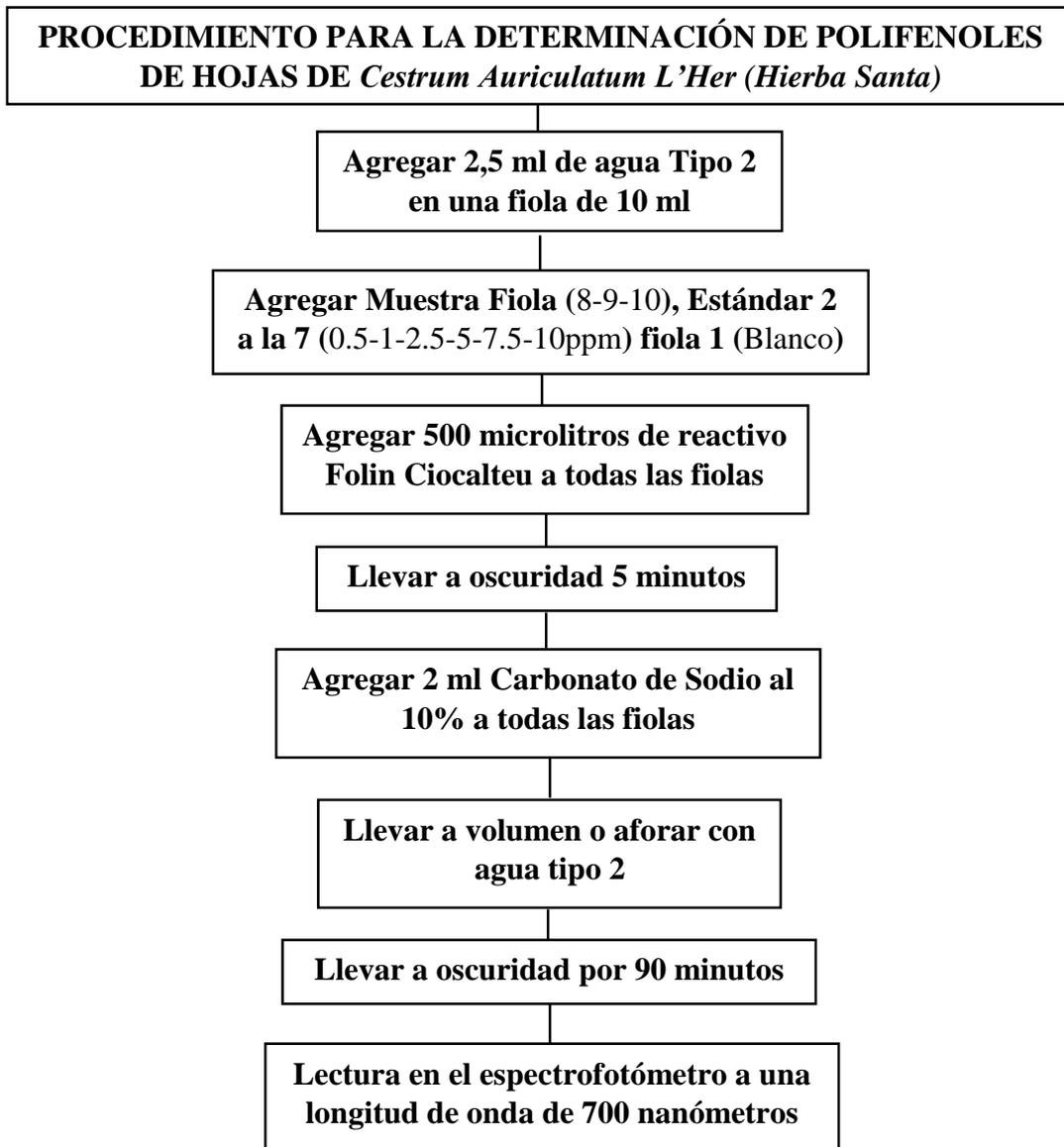
La especie fue recolectada en Quillo, distrito de Yungay, departamento de Áncash. (Anexo 2), Se seleccionaron la hojas de acuerdo a sus características fitosanitarias. Se desinfectaron con alcohol de 80°. Se llevó a la estufa (Anexo 4), se pulverizó la muestra en un molino y tamizó (Anexo 4)

4.1.2 Extracción exhaustiva de *Cestrum Auriculatum L' Her.* ⁽²¹⁾

- ✓ Se pesa 0.5018 g la muestra de hoja seca pulverizada
- ✓ Luego de haber pesado la muestra procedemos a agregar 10 ml de Metanol 80% + 0,1% de Ac. Fórmico, el cual es el solvente necesario para lograr un buen resultado, se procede a llenar a un tubo de ensayo con tapa rosca o también llamado tubo Falcón.
- ✓ Después de ello cubrimos los tubos con papel aluminio, esto se debe a que hay polifenoles sensibles a la luz, y la exposición a ello podría producir una alteración en los resultados.
- ✓ Los tubos previamente cubiertos lo llevamos a un agitador magnético por 30 minutos a 800 rpm, en el cual esta introducido un magneto lo cual va a facilitar la mezcla.
- ✓ Al terminar la agitación, retiramos la magneto y pesamos los tubos para así lograr un equilibrio de las muestras.

Después de ello llevamos el tubo a una centrifuga durante 5 minutos a 6000 rpm, culminado el tiempo retiramos y se extrae el sobrenadante y lo colocamos a una fiola de 50 ml, y así volvemos a repetir este procedimiento con los demás tubos exactamente 4 extracciones, para culminar este procedimiento aforamos la fiola con Metanol 80% + 0,1% de Ac. Fórmico.

4.1.3. Determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. ⁽²¹⁾ (Anexo 6)



4.1.4. Determinación de actividad antioxidante según el método de DPPH.

Preparado de DPPH con concentración de 0.06 mM (Anexo 7) ⁽²¹⁾

Se pesó 0.023 gr y se aforó con metanol en una fiola hasta 100ml, para obtener una concentración de 0.06 mM, se preparó estándares de Trolox 1, 2, 3 y 4, con diluciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mM, de las fiolas de 50 mL con las muestras se extrae en una cubeta de poliestireno, se agrega 1450 ul de DPPH a 0.06 mM y se lleva al espectrofotómetro a una medida de 515 nm para obtener la absorbancia del tiempo cero “0”, luego de ello se le agrega 50 uL del extracto de hojas y se espera un tiempo de 15 minutos para que reaccione en la cámara oscura, finalmente se lleva nuevamente al espectrofotómetro y se mide la absorbancia, una vez medida se realiza por triplicado y se realiza la curva de calibración.

4.2 Población y muestra.

Población vegetal: Conjunto de hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her.*, que se obtuvieron de una zona de Quillo, distrito de Yungay, departamento de Áncash.

Muestra: 100 g de hoja seca de *Cestrum Auriculatum L'Her*

4.3 Definición y operación de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador
- Actividad antioxidante de los Extractos de hojas de <i>Cestrum Auriculatum</i> L'Her.	Sustancia que al encontrarse a bajos niveles de concentraciones en existencia de un sustrato oxidable, esta retarda la oxidación de la misma.	Se realizó a través del método de DPPH según capacidad de secuestro y/o inhibición de radicales libres de acuerdo a valores de absorbancia medida en el espectrofotómetro UV/VIS.	- mM trolox equivalente/g de hoja seca
- Concentración de Polifenoles de hojas de <i>Cestrum Auriculatum</i> L'Her.	Grupo heterogéneo de moléculas que comparten la característica de tener en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas	Se trabajó con el reactivo Folín Ciocalteu según valores de absorbancia medida en el espectrofotómetro UV/VIS.	- mg catequina equivalente/g de hoja seca

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se utilizó la observación directa, medición y registro de las reacciones de coloración y otras características que se observen en la medición de las concentraciones totales de polifenoles. Los datos obtenidos fueron registrados en fichas de recolección de datos

4.5 Plan de análisis

Los datos se procesaron mediante en una matriz elaborada en el programa Excel se obtuvieron los datos de la media y desviación estándar.

4.6 Matriz de consistencia

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLE	TIPO DE INVESTIGACIÓN	METODOLOGIA
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES EN HOJAS DE <i>Cestrum auriculatum L'Her</i> (HIERBA SANTA)	¿CUÁL ES ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES EN HOJAS DE <i>Cestrum Auriculatum L'Her</i> (HIERBA SANTA)?	<p>Objetivos generales.</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar la actividad antioxidante y contenido de polifenoles en hojas de <i>Cestrum Auriculatum L'Her</i> (hierba santa). <p>Objetivos específicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar la actividad antioxidante en hojas de <i>Cestrum Auriculatum L'Her</i> (hierba santa). Determinar el contenido de polifenoles en hojas de <i>Cestrum Auriculatum L'Her</i> (hierba santa). 	Hipótesis Implícita	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antioxidante de hojas de <i>Cestrum Auriculatum L'Her</i> Concentración de Polifenoles de hojas de <i>Cestrum Auriculatum L'Her</i> Extracto de Hojas de <i>Cestrum Auriculatum L'Her</i> 	Estudio de tipo descriptivo.	<p>Diseño de Investigación:</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinación de polifenoles totales según el método de Folin-Ciocalteu Determinación de actividad antioxidante según el método de DPPH.

4.7 Principios éticos

Se promovió la recuperación del conocimiento tradicional sobre el uso de la Hierba Santa *Cestrum Auriculatum L'Her*, no solo para preservar su legado cultural, sino también para registrar información relevante y demostrar científicamente sus efectos terapéuticos que servirán como nuevas fuentes de medicamentos y otros beneficios para la humanidad. La finalidad es contribuir con la protección de la biodiversidad, puesto que es un bien común.

V. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales expresados en miligramos de catequina por gramo de hojas secas de *Cestrum Auriculatum L'Her.*

<i>Cestrum Auriculatum L'Her</i>	<i>Mg de catequina eq. / g de hojas secas</i>
M1	22.098
M2	25.517
M3	24.235
Promedio	23,95
Desviación estándar	±1,7274

M: muestra

Fuente: Datos de la Investigación

Tabla 2. Actividad Antioxidante expresada en milimol de trolox equivalente por gramo de hojas secas de *Cestrum Auriculatum L'Her*.

<i>Cestrum Auriculatum L'Her</i>	<i>mM trolox eq. / g de hojas secas</i>
M1	230.47
M2	135.83
M3	205.40
Promedio mM trolox eq./g	190.57
Desviación estándar	±49.04

M: muestra

Fuente: Datos de la Investigación

5.2 Análisis de resultados

Para determinar el contenido de polifenoles totales en hojas de *Cestrum Auticulaum L'Her* se realizó de acuerdo al método de Folin Ciocalteu, este método fue realizado de acuerdo a una extracción exhaustiva de hojas de la planta medicinal investigada, como se presenta en el Grafico 1, donde se puede ver la relación entre la absorbancia y concentración de catequina mostrando así un coeficiente de determinación de 0.9996mg de catequina/g de hoja seca de *Cestrum Auticulaum L'Her* mostrando una linealidad en la curva de calibración, de acuerdo a esto los resultados que se muestran en la tabla 1 presentan que las hojas de *Cestrum Auticulaum L'Her* contienen $23,95 \pm 1,7274$ mg de catequina/g de hoja seca.

Los fenoles son compuestos muy importantes que forman parte de las plantas debido a su capacidad de secuestrar radicales libres siendo está relacionada con la presencia en la molécula del grupo hidroxilo, los compuestos fenólicos son muy importantes para el equilibrio de la oxidación de lípidos siendo así coparticipe con la capacidad atrapadora de radicales libres ya antes mencionada, esta se insinuado sobre el efecto inhibitorio que tiene sobre la carcinogénesis y la mutagenesis. ⁽²²⁾

Por otro lado para determinar la actividad antioxidante de hojas de *Cestrum Auticulaum L'Her* se realizó de acuerdo al método de DPPH, en este al igual que el otro método de polifenoles se utilizó el extracto que se obtuvo de la extracción exhaustiva de hojas de la planta medicinal investigada, como se presenta en el Grafico 2, donde se puede ver la relación entre Trólox Equivalente y el porcentaje de inhibición, mostrando así un

coeficiente de determinación de 0.9996 mM Trólox Equivalente/g de hoja seca de *Cestrum Auticulaum L'Her* mostrando una linealidad en la curva de calibración, de acuerdo a esto los resultados que se muestran en la tabla 2 presentan que las hojas de *Cestrum Auticulaum L'Her* contienen 190.57 ± 49.04 mM Trólox Equivalente/g de hoja seca.

Cruz L. Zapata E. sobre la planta *Cestrum auriculatum L'Her* (Hierba santa) en su investigación demostró que posee actividad antioxidante presentando que el porcentaje de inhibición es de 47,09%, dando como resultado 93.29 μ mol equivalente a trolox por gramos de hojas de *Cestrum auriculatum L'Her* (Hierba santa).⁽¹⁵⁾

En el estudio realizado sobre la evaluación de las actividades antioxidante y antitopoisomerasa de extractos de plantas de la ecorregión cafetera colombiana evidencio que en la familia Solanaceae en los extractos metanolicos y de diclorometano estas mostraron esteroles en gran proporción así como también mostraron alcaloides, la proporción de actividad antioxidante se realizó por el método del DPPH ya sea en los extractos de diclorometano y metanol, dando como resultado que el 51,7% de los extractos de metanol que se evaluaron presentaron este porcentaje de actividad antioxidante.⁽²³⁾

VI. Conclusiones

1. Las hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her* (hierba santa) tiene actividad antioxidante y contenido de polifenoles *in vitro*.
2. La actividad antioxidante *in vitro* de las hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her* mediante el método de secuestro de radicales libres DPPH dió como resultado 190.57 ± 49.04 mM trolox eq./g de hojas secas
3. La cuantificación de polifenoles en hojas de *Cestrum Auriculatum L'Her* mediante el método de Folin –Ciocalteu dió como resultado $23,95 \pm 1,7274$ mg de catequina/g de hojas secas

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Midori De Habich M, Viceministro R, Del Carmen C, Instituto S, De Salud N, Dirección A, et al. Ministerio de salud del Perú Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Ambiente para la Salud Director General Estela Ospina Salinas [en línea]. Instituto Nacional de Salud Perú. 2013. [fecha de acceso: 15 de mayo del 2017]. pp. 1–59. Disponible en: http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/CINDOC/pub_ins/alertas/junio_2013/manual_procedimientos_laboratorio_2013.pdf
2. Zhang X. Medicina tradicional: definiciones [en línea]. World Health Organization. World Health Organization; 2016 [Fecha de acceso: 2017 Mayo 15]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
3. Plantas medicinales de la Amazonía peruana [en línea]. 2010 [Fecha de acceso: 2017 Mayo 14]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/118637808/Plantas-Medicinales-de-la-Amazonia-Peruana>
4. Quimet R. “Evaluación de la actividad Antioxidante y Determinación de polifenoles totales in vitro, de las hojas de ocho morfotipos de Bixa Orellana L.” [en línea]. Amazonia peruana; 2012 [Fecha de acceso: 2017 Mayo 15]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/54238660.pdf>

5. Paredes M. Determinación de la actividad antioxidante de cuatro plantas nativas del Ecuador. [en línea]. 2013 [Fecha de acceso: 2017 Mayo 15]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1901/1/T-UCE-0008-22.pdf>
6. Maureen Hernández Ángel Elio Antonio Prieto González L. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. Rev Cuba Invest Biomed [en línea]. 1999 [fecha de acceso: 2017 Mayo 15]. 18. (1). 12–4. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v18n1/ibi04199.pdf>
7. Galvána T, García T, Ochoad J, Wilhelmie J. Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. Biologia (Bratisl) [en línea]. 2010. [Fecha de acceso: 15 de mayo de 2017]; 3. (1). 33–42. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-andaluza-medicina-del-deporte-284-articulo-antioxidantes-ejercicio-fisico-funciones-melatonina-13127529>
8. Soto H. Caracterización de extractos hidroalcohólico y acuoso de *Cestrum parqui l'herit* (palqui) respecto de su actividad antioxidante y surfactante. [Tesis]. Santiago: Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, laboratorio de Farmacología y Toxicología, Universidad de Chile; 2014. [Citado 27 de abril de 2016], pág. 1-57. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/129923/Caracterizacion-de-extractos-hidroalcoholico-y-acuoso-de-Cestrum.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

9. Paredes M. Determinación de la actividad antioxidante de cuatro plantas nativas del Ecuador. [Tesis]. Quito: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador; Mayo del 2013. [Citado 27 de abril de 2016], pág. 1-120. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1901/1/T-UCE-0008-22.pdf>

10. Raúl Guimet R. “Evaluación de la actividad Antioxidante y determinación de polifenoles totales in vitro, de las hojas de ocho morfotipos de Bixa Orellana L. [Tesis]. Iquitos: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2012. [Citado 27 de abril de 2016], pág. 1-92. Disponible en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3645/CARATULA.pdf?sequence=5>

11. Cruzado M, Pastor A, Castro N, Cedrón J. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). Rev. Soc. Quím. Perú. [en línea]. 2013, [citado 27 de abril de 2016]; 79, (1), 57-63. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v79n1/a08v79n1.pdf>

12. Kuskoski I M. Agustín A, Troncoso A; Mancini-Filho J; Fett Roseane. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Rev. Soc. Quím. Perú [en línea]. 2005, [citado 27 de abril de 2016]; 25, (4), 726-732. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27642.pdf>

13. Beltrán Delgado Yaixa, Dr. C. Humberto J. Morris Quevedo, Lic. Reynaldo de la Cruz Enrique, Quevedo Morales Yanelis, Dra. C. Bermúdez Savón Rosa, et al. Contenido de fenoles Totales en Extractos de Pleurotus obtenidos con solventes de diferente Polaridad. Rev. Cub. Invest. Biomed. [en línea]. 2013, [Citado 27 de abril de 2016]; 32, (2), 121-129. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v32n2/ibi01213.pdf>
14. Alvarado B. Actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la Cordillera Negra [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. 2017. [Citado 01 de noviembre de 2018], pág. 1-235. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/5653>
15. Cruz L, Zapata E. Evaluación de la Actividad Antioxidante, Antibacteriana y Antifúngica “In Vitro” del Extracto Alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'her. “Hierba Santa” en Bacterias Patógenas Grampositivas, Gramnegativas y Hongos 2016. [Tesis]. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica 2017. [Citado el 27 de septiembre de 2018]. pág. 1-177. Disponible en: <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/6733/65.1570.FB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

16. Galarraga E. Estudio Fitoquímico de las Especies: *Phytolacca rugosa* (Phytolaccaceae), *Phytolacca icosandra* (Phytolaccaceae), *Cestrum ruizteranianum* (Solanaceae) y *Ganophyllum giganteum* (Sapindaceae). [Tesis Doctoral]. Mérida: Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Productos Naturales, Universidad de Los Andes. 2011. [Citado 27 de abril de 2016], pág. 1-129. Disponible en: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01048586/file/these_A_GALARRAGA_MONTES_Elier_2011.pdf
17. Pinedo M, Rengifo E, Cerruti T. Plantas medicinales de la amazonia peruana. [en línea]. Perú: Lauro Anna María. Diciembre, 1997. [Citado 24 de abril de 2016]; Hierba Santa. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/118637808/Plantas-Medicinales-de-la-Amazonia-Peruana>
18. Pérez J. Antioxidantes y alimentos. Ensayos de divulgación científica y humanística. [en línea]. Sin año. [Citado el 27 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.unirioja.es/ensaya/archivos/antioxidantes.pdf>
19. Hernández M, Prieto E. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev. Cub. Invest. Biomed.* [en línea]. 1999. [Citado el 09 de mayo de 2016]; 18, (1), pp.12-14 Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v18n1/ibi04199.pdf>

20. Tovar J. Determinación de la actividad antioxidante por dpph y abts de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. [Tesis]. Pereira, Colombia: Facultad de Tecnología, Universidad Tecnológica de Pereira, 2013. [Citado el 01 de junio de 2016]; pág. 1-150. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/3636/1/54763T736.pdf>
21. Tedeschi P., Maietti A. et al. Un antico alimento funzionale: l'ortica. *Nutraceutica* [Internet]. 2018 [Citado: 01 abril 2018]. (1): 46-54. Disponible en: <https://www.natural1.it/nutraceutica/item/2082-un-antico-alimento-funzionale-lortica>
22. Valenzuela G., Cravzov A., Soro A., Tauguinás A., Giménez M., Gruszycki M. Relación entre actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en semillas de Cucurbita spp. *Rev. Valenzuela y col.* [en línea]. 2014. [citado el 27 de septiembre de 2018]. 30(1) 19-24. Disponible en: <http://www.dominguezia.org/volumen/articulos/3012.pdf>
23. Gaviria A., Correa C., Mosquera O., Niño J., Correa Y. Evaluación de las actividades antioxidante y antitopoisomerasa de extractos de plantas de la ecorregión cafetera colombiana. *Rev. Facultad de ciencias básicas.* [en línea]. 2015. [Citado el 27 de Septiembre de 2018]. 11 (1) 86-101. Disponible en: <https://docplayer.es/54854816-Evaluacion-de-las-actividades-antioxidante-y-antitopoisomerasa-de-extractos-de-plantas-de-la-ecorregion-cafetera-colombiana.html>

Anexos

Anexo 1 Certificado de la planta



Herbarium Truxillense (HUT)

Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N 64 – 2017- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

División : Angiospermae
Clase : Dicotyledoneae
Subclase : Archychlamydeae
Orden : Solanales
Familia : Solanaceae
Género : **Cestrum**
Especie : **C. auriculatum** L'Hér.

Muestra alcanzada a este despacho por **YANPIER YURI GODOS CHINCHAYHUARA**, identificada con DNI N° 74765173, con domicilio legal Villamaria Pasaje- San Lorenzo Mz. H Lte. 1- Chimbote; estudiante procedente de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, cuya determinación taxonómica servirá para la para la realización del proyecto de Tesis titulado: "Actividad antioxidante y contenido de polifenoles en hojas de **Cestrum auriculatum** L'Hér. (hierba santa)".

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

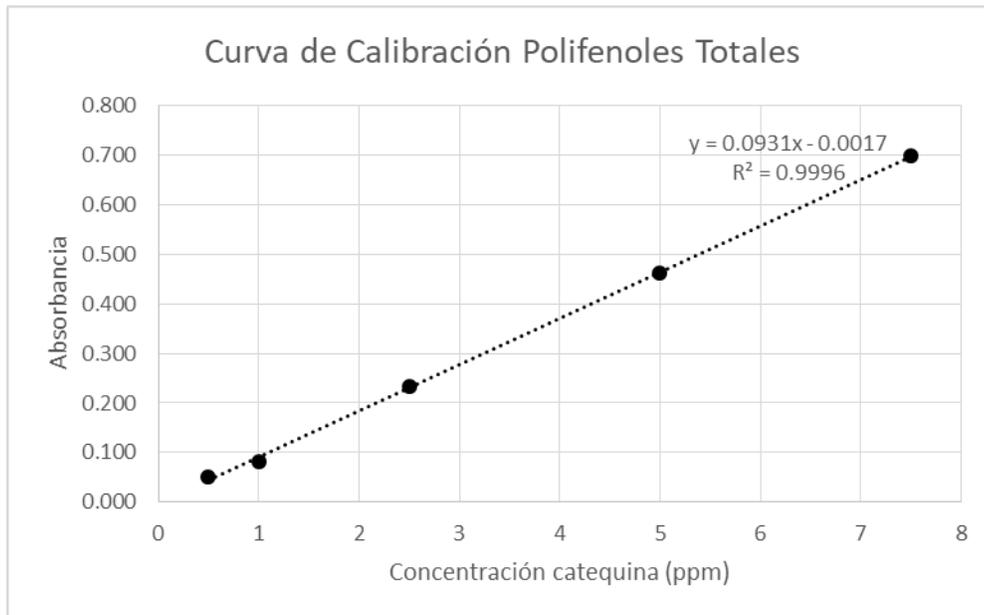
Trujillo, 19 de Julio del 2017

Dr. JOSE MUSTACERO LEON
Director del Herbario HUT

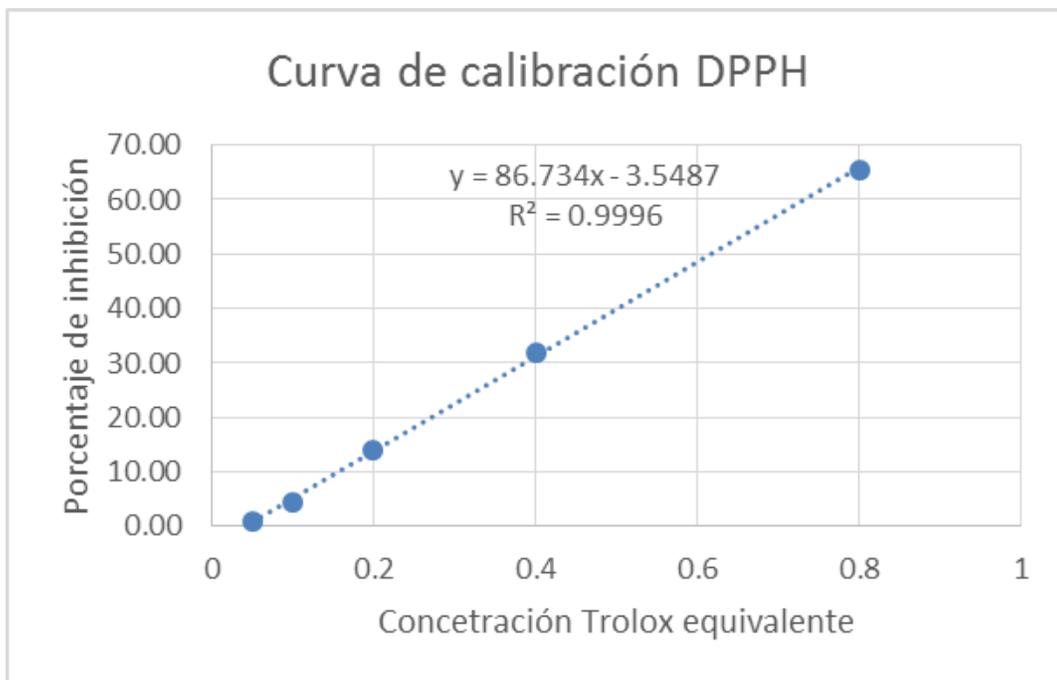


cc. Herbario HUT

Anexo 2 Contenido de polifenoles totales expresados en absorbancia por concentración de catequina (ppm)



Anexo 3 Actividad Antioxidante expresada en porcentaje de inhibición por concentración trolox equivalente.



Anexo .4 Recolección de la planta



Anexo .5 Muestra



Anexo .6 Molienda



Anexo 7 Muestra triturada



Anexo .8 Contenido de Polifenoles



Anexo 9 Actividad Antioxidante

