

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de
las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts.
“chiuchi-chiuchi”. Lima - 2016.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por:
Bach. CESPEDES MAMANI, Richard

AYACUCHO – PERÚ
2017

A mis padres, Rolando y Gregoria por la confianza que siempre me han brindado para alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjador de excelentes profesionales al servicio de la sociedad y del país.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica.

A los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por sus enseñanzas y orientaciones durante mi formación profesional.

A mi asesor Mg. Q.F. Marco Rolando Aronés Jara por su constante asesoramiento y apoyo en la realización del presente trabajo.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en especial al Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales.

Al Dr. Q.F. Fritz Choquesillo Peña, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, fundamentales para la concreción de esta tesis.

A todas las personas que me apoyaron desinteresadamente en la culminación del presente trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICES DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos botánicos	4
2.3. Estrés oxidativo	6
2.4. Radicales libres y compuestos antioxidantes	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Ubicación	11
3.2. Materiales	11
3.3. Métodos de recolección de datos	11
3.3.1. Recolección y preparación de la muestra	11
3.3.2. Tamizaje fitoquímico de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts.	12
3.3.3. Obtención del extracto hidroalcohólico e identificación de compuestos químicos	14
3.3.4. Evaluación de parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts.	14
3.3.5. Evaluación de actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. (DPPH)	16
3.4. Diseño Experimental	17
3.5. Análisis estadístico	18
IV. RESULTADOS	19
V. DISCUSIÓN	27
VI. CONCLUSIONES	33
VII. RECOMENDACIONES	35
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales metabolitos secundarios presentes en el extracto Etéreo de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.	21
Tabla 2. Principales metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.	22
Tabla 3. Principales metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima – 2016	23
Tabla 4. Principales metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.	24
Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi – chiuchi”. Lima - 2016.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Actividad antioxidante por captación de radicales libres del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi – chiuchi” y de la Vitamina C. Lima – 2016.	26

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Recolección de la planta <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Tarma -2016.	43
Anexo 2. Clasificación Taxonomica de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. según el sistema de clasificación de Cronquist (1988). Lima - 2015.	44
Anexo 3. Diseño Experimental para determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi” Lima – 2016.	45
Anexo 4. Extracción sucesiva de material vegetal para la aplicación de técnicas de tamizaje fitoquímico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima -2016.	46
Anexo 5. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etéreo de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima -2016.	47
Anexo 6. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima -2016.	48
Anexo 7. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima -2016.	49
Anexo 8. Identificación de metabolitos secundarios de los extractos Etéreo, alcohólico y acuoso de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. Benth “chiuchi-chiuchi”. Lima - 2016.	50
Anexo 9. Evaporación del alcohol del extracto hidroalcohólico de las hojas <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima - 2016.	51
Anexo 10. Extracto hidroalcohólico concentrado de las hojas <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima - 2016.	52
Anexo 11. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima -2016.	53

Anexo 12. Determinación del porcentaje de cenizas totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima -2016.	54
Anexo 13. Criterios de solubilidad según USP 39 para la determinación del solvente para el extracto hidroalcohólico de las hojas <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima - 2016.	55
Anexo 14. Distribución de los grupos de ensayo del extracto hidroalcohólico de las hojas <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi” al 1ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL y 200 ug/mL. Lima - 2016.	56
Anexo 15. Preparación de muestras de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi” y Vitamina C a diferentes concentraciones para su lectura en el espectrofotómetro. Lima - 2016.	57
Anexo 16. Determinación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi” por el método espectrofotométrico. Lima - 2016.	58
Anexo 17. Datos descriptivos de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi” y Vitamina C a concentraciones de 1 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/ mL y 200 ug/mL. Lima - 2016.	59
Anexo 18. Análisis de varianza de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Lima - 2016.	60
Anexo 19. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la actividad antioxidante por captación de radicales libres del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.	61
Anexo 20 Análisis comparativo t student de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi” y vitamina C. Lima - 2016.	62

Anexo 21 Matriz de consistencia de la tesis: Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi-chiuchi". Lima - 2016.

63

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi-chiuchi" que fueron recolectadas en el Centro Poblado de Umancocha, distrito y provincia de Tarma - Junin, en el mes de mayo del 2016. La identificación de la especie se realizó en el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se identificaron fenoles, flavonoides, taninos en mayor cantidad en los extractos etéreo, alcohólico, acuoso e hidroalcohólico. Se obtuvo el extracto hidroalcohólico con un 14,5 % de rendimiento, 8,72 % de humedad, color verde oscuro, olor *sui generis*, sabor amargo, pasta resinosa, fácilmente soluble en agua, pH ligeramente ácido, 28,84 % de sustancias solubles y 5,61 % de cenizas totales. Se elaboró diluciones a concentraciones de 1 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml y 200 ug/ml. La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico se determinó por el método espectrofotométrico usando DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) como fuente de radicales libres. La concentración a 100 ug/ml presenta mayor actividad antioxidante por captación de radicales libres (96,6%) en comparación a las concentraciones a 1 ug/ml, 50 ug/ml, y 200 ug/ml ($p < 0,05$). El extracto hidroalcohólico se comparó con un patrón de Vitamina C a las mismas concentraciones y los resultados sugieren mejor actividad del extracto de *Clinopodium breviflorum* antioxidante a concentraciones de 1 ug/ml y 100 ug/ml ($p < 0,05$).

Palabras clave: *Clinopodium breviflorum*, radicales libres, antioxidantes.

I. INTRODUCCIÓN

La medicina herbaria se utiliza desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, dando lugar a los fitofármacos, y es apreciada por su bajo costo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis.

Según la OMS el 80 % de la población mundial utiliza las plantas como principal remedio, no obstante, faltan estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen de forma fehaciente sus efectos terapéuticos.¹

En la actualidad hay poco uso de medicamentos de origen vegetal por parte de los profesionales de la salud; sus tratamientos están basados únicamente en fármacos sintéticos, incluso, en el tratamiento de problemas de salud diagnosticados como enfermedad leve.²

Los efectos colaterales de las drogas sintéticas y la falta de drogas efectivas hacen que muchas enfermedades no sean resueltas eficazmente, siendo aún una característica insalvable de la farmacología moderna.³ Entre estas se encuentran las enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cáncer, artritis, envejecimiento precoz y otras que son producidas por el daño oxidativo causado por radicales libres.⁴

En el mercado existen diversas sustancias sintéticas con capacidad antioxidantes que están siendo restringidas por presentar efectos cancerígenos.⁵ Por lo tanto, existe un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes de origen natural, especialmente provenientes de plantas medicinales y/o alimenticias. En la mayoría de los casos, la actividad antioxidante de estas plantas se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, los cuales son potentes secuestradores de especies reactivas del oxígeno (ERO) e inhiben enzimas productoras de radicales libres.^{6,7}

En este sentido, los extractos de plantas y diferentes clases de fitoquímicos han demostrado ser una fuente importante de compuestos con marcada actividad

antioxidante, permitiendo el crecimiento acelerado de investigaciones en esta área.⁸

El Perú cuenta con plantas medicinales muy reconocidas, pero existen muchas especies por estudiar como el *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. cuyo uso se limita a zonas rurales, por lo que se requiere estudios científicos de ésta y otras plantas.

Por estas consideraciones y con el propósito de contribuir al conocimiento de las bondades que nos ofrece la especie *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. el presente trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos:

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los principales metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”.
- Evaluar los parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”.
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

En los últimos años las personas prefieren usar productos y medicamentos elaborados con ingredientes naturales, debido a los efectos colaterales que pueden causar los productos sintéticos. Por este motivo, es importante el estudio de las plantas medicinales para poder ampliar los conocimientos respecto a los componentes farmacológicamente activos.

Una de las plantas con actividad farmacológica es el *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. conocido en las zonas rurales como chiuchi-chiuchi, especie nativa del Perú que crece en las zonas altas de la sierra donde los pobladores la utilizan para tratar afecciones respiratorias y gastrointestinales.

Los estudios científicos de esta planta son escasos, pero se tiene el interés de estudiar los componentes de esta planta, por ello, en el 2006, Ricardi⁹ realizó la caracterización fisicoquímica y determinó el porcentaje de rendimiento del aceite esencial presentes en el *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts.¹⁰ obtenida por arrastre de vapor, pero como los resultados fueron prometedores, en el 2014, Ricardi¹¹ analizó la composición de fitobioactivos del aceite esencial a través de cromatografía de gases acoplada a espectrofotómetro de masas, reportando la presencia de compuestos sesquiterpénicos y terpénicos en mayor concentración. Cabe indicar que existen estudios de especies cercanas al *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. como la especie *Satureja brevicalyx* estudiada por Arias¹² en el 2008, quien determinó el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja brevicalyx* “wayra muña” en cerebro de ratas sometidas a hiperoxia e hipoxia experimental, mediante la mitigación de la lipoperoxidación como parámetro de daño oxidativo, con participación del glutatión y la actividad de superóxido dismutasa como mecanismos de defensa antioxidante.

Luego en el 2010, Aguilar¹³ determinó la actividad antioxidante de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja Brevicalyx* utilizando la capacidad secuestradora del DPPH, obteniendo más de 90 % de actividad antioxidante, superior a la rutina y ligeramente inferior a la vitamina C; así mismo, la actividad antiinflamatoria se demostró por el modelo de edema plantar inducido por carragenina dando resultados similares al diclofenaco a la dosis de 200 mg/kg.

2.2. ASPECTOS BOTÁNICOS

2.2.1. Clasificación Sistemática

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA.

CLASE : MAGNOLIOPSIDA.

SUB CLASE : ASTERIDAE.

ORDEN : LAMIALES.

FAMILIA : LAMIACEAE.

GENERO : *Clinopodium*.

ESPECIE : *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts.

N. V. : “chiuchi - chiuchi”.

La clasificación se realizó en el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos según el sistema de clasificación de Cronquist (1988). (Anexo 2)

2.2.2. Descripción de la Familia Lamiaceae:

Familia compuesta por 224 Géneros y 5 600 Especies, se caracterizan por ser plantas herbáceas (anuales o perennes), con tallos y ramas cuadrangulares o tetragonales generalmente con aceite esencial, aromático, hojas opuestas enteras, simples, pinnatipartidas o raramente compuesta, peciolado o sésil, sin estípulas y mayormente pinnatinervias. Inflorescencia cimosa con pocas o muchas flores que se reúnen en pseudo espiga o capítulos. Flores hermafroditas solitarias a menudo sésiles, zigomorfas o raramente actinomorfas, con o sin bracteolas, cáliz con cinco sépalos soldados, corola con cinco pétalos generalmente bilabiados, de 2 a 4 estambres libres, gineceo con ovario súpero bicarpelar, un estilo y dos estigmas, fruto tetraquenio, descompuesto en cuatro núculas (muy raramente carnosas) y semillas con endospermo escaso.¹⁴⁻¹⁶

2.2.3. Descripción del género *Clinopodium*:

Es un género de plantas perteneciente a la familia Lamiaceae que comprende 271 especies.

Plantas herbáceas, algo leñosas en la base, perennes, rizomatosas, ligeramente aromáticas. Tallos pelosos, con pelos frecuentemente retrorsos. Hojas simples,

enteras, generalmente pelosas. Inflorescencia en verticilastros axilares densos. Brácteas similares a las hojas, algo más estrechas; bractéolas lineares, sobresalientes en los verticilastros, ciliadas. Flores pediceladas. Cáliz bilabiado, generalmente curvado hacia abajo, con 13 nervios, con carpostegio; labio superior con tres dientes, labio inferior con dos dientes triangulares, estrechos, largos, todos levemente curvados hacia arriba y ciliados. Corola blanca a azul, color lavanda, roja o anaranjada (rara vez amarilla), bilabiada, más o menos tubular; labio superior con un lóbulo redondeado y emarginado, erecto; labio inferior con tres lóbulos, mayores que el labio superior, perpendiculares al tubo. Cuatro estambres, didínamos y exertos. Estilo bifido. Ovario tetralobado, disco simétrico, ápice del estilo igual a desigualmente bipartido. Frutos en nuececillas elipsoidales a ovoides, con frecuencia ligeramente trígonas, lisas o diminutamente esculpidas¹⁷

2.2.4. Descripción botánica de la *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts.

Es una planta herbácea perenne, muy aromática, presenta tallos semileñosos, altura variable; tiene hojas opuestas, ovaladas, agudas, con haz liso y envés blanquecino, de 1 a 2 cm de largo; flores rojo anaranjados, jaspeado de color amarillo en el interior, verticilos pedunculados, cáliz tubular.¹¹

2.2.5. Distribución geográfica

En el Perú *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. crece en territorios alto andino mayormente entre los 3400 y 3600 m.s.n.m. de clima frío, creciendo de manera silvestre en las montañas y faldas de los cerros junto con el ichu.

Generalmente esta la especie *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. crece por laderas de suelos areno-arcillosos y pedregosos. Los lugares peruanos donde esta planta se desarrolla se encuentran en Huánuco, Arequipa y Junín¹⁸ donde crece de manera silvestre.

2.2.6. Etnobotánica y etnofarmacología

Según informaciones etnobotánicas y etnofarmacológicas es utilizada para resolver afecciones respiratorias (tos, bronquitis, gripe) y problemas gastrointestinales (cólicos, flatulencia e indigestión).¹¹ Los pobladores suelen utilizar las flores y hojas en forma de infusión después de las comidas.¹⁹

En el Perú esta especie se consume poco, solamente en ciertos lugares donde la gente tiene costumbre de consumirla, el uso es de carácter etnobotánico.

2.2.7. Investigaciones fitoquímicas

Ricardi, determinó el rendimiento de extracción y la caracterización fisicoquímica del aceite esencial de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. que fue obtenida

por arrastre de vapor.⁹ En el 2014, realizó un estudio de los compuestos fitobioactivos en el aceite esencial encontrando los siguientes compuestos: germacreno (25,91 %), β – cariofeno (22,10 %), α – ocimeno (12,62 %), 4(8) –p – mentona (6,73 %) y otros compuestos en menor proporción.¹¹

Arias, realizó un estudio de los componentes del aceite esencial y extracto de *Clinopodium bolivianum* evidenciando la presencia de pulegona, mentona y sus isómeros en el aceite esencial; mientras que en el extracto se evidenció flavonoides que aportan su capacidad antioxidante.²⁰

Aguilar, aisló e identificó dos flavonoides del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx*: la apigenina y la naringenina por espectrofotometría UV e IR.¹³

2.2.8. Investigaciones farmacológicas

Palomino, concluyó que el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Satureja brevicalyx* posee capacidad de captación de radicales libres, en relación a la vitamina C. Además, no existe diferencia estadísticamente significativa en los niveles de lipoperoxidación, glutatión y proteínas hepáticas utilizados como medida de estrés oxidativo.²¹

Carhuapoma, estudió la actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de la *Satureja brevicalyx*.²²

Mendoza, demostró el efecto hepatoprotector, cuya actividad lo atribuye a la presencia de flavonoides por su capacidad antioxidante, es decir, como agente neutralizador de los radicales libres, generadores del daño hepático.²³

2.3. ESTRÉS OXIDATIVO:

En determinadas circunstancias la producción de radicales libres puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida con el nombre de estrés oxidativo. El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales libres. Las células disponen de mecanismos de protección del efecto nocivo de los radicales libres basado en un complejo mecanismo de defensa constituido por los agentes antioxidantes.²⁴

El estrés oxidativo está asociado a un exceso de especies reactivas de oxígeno, que pueden reaccionar con diferentes tipos de componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, produciendo efectos locales y una eventual disfunción de los órganos. De manera que pueden actuar:

- Sobre lípidos poliinsaturados de las membranas, produciendo pérdidas de la fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL). Los

lípidos son probablemente las biomoléculas más susceptibles al ataque de los radicales libres. Las especies reactivas de oxígeno, en particular el radical hidroxilo, tienen como objetivo preferente los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de la fase lipídica de las membranas celulares. La PL se desarrolla mediante una serie de reacciones en cadena. Una vez puesta en marcha, se propaga rápidamente, dando lugar a lesiones que disminuyen la fluidez de la membrana.

- Sobre las proteínas, produciendo inactivación y desnaturalización. De hecho, las proteínas pueden ser atacadas por las ERO, produciendo cambios estructurales y funcionales; aunque, no son tan susceptibles como los ácidos grasos poliinsaturados, al presentar menores posibilidades para la progresión de las reacciones en cadena. El ataque de los radicales libres a las proteínas únicamente se produce cuando existe una acumulación de radicales o cuando el ataque facilitado por la unión de la proteína a un ion de metal de transición converge en un lugar concreto de la proteína.
- Sobre los ácidos nucleicos, mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis. Las lesiones oxidativas del ADN en condiciones metabólicas normales son elevadas; pero existe un grupo de enzimas reparadoras que solucionan estas lesiones. Por lo tanto, las lesiones oxidativas y las mutaciones van acumulándose con la edad y pueden contribuir al desarrollo de enfermedades como el cáncer y procesos inflamatorios crónicos.

2.4. RADICALES LIBRES Y COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

2.4.1. Radicales libres

El radical libre (RL) es cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura. Como consecuencia, son altamente reactivos lo que hace que tengan una vida media del orden de milisegundos, aunque varía según el tipo de radical libre.²⁴

Los radicales libres también son conocidos como especies reactivas oxigénicas o del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN).

A bajas concentraciones los radicales libres son necesarios para el buen funcionamiento celular pudiendo actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células. Sin embargo, un exceso de los mismos puede acumularse hasta niveles tóxicos dando como resultado que se produzcan diversas acciones sobre el

metabolismo de los principios inmediatos (proteínas, grasas e hidratos de carbono), que pueden ser origen del daño celular.²⁵

La mayoría de los compuestos biológicos no son radicales, siendo denominados por tal motivo no-radicales. Los electrones son más estables cuando están apareados en un orbital. Los radicales libres, por contener electrones no apareados son inestables y más reactivos que los no-radicales. Si se encuentran dos radicales libres pueden combinar sus electrones no apareados y formar un enlace covalente. Un radical libre también puede donar su electrón no apareado a un compuesto no-radical o apropiarse de un electrón de otra molécula para formar su par electrónico. En estos casos el radical deja de serlo y la otra molécula se transforma en un radical. Así se puede iniciar y perpetuar una cadena de reacciones como ocurre por ejemplo en la peroxidación de ácidos grasos insaturados.²⁶

2.4.2. Antioxidantes

Son un grupo de moléculas reconocidas por su capacidad para neutralizar los radicales libres, estas sustancias han surgido como una alternativa para combatir las deficiencias asociadas al estrés oxidativo.⁴

Cuando está presente a concentraciones bajas, en comparación con los radicales libres retrasa o previene significativamente la oxidación de moléculas.²⁷

Las sustancias antioxidantes se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y el sistema no enzimático; también conocido como endógeno y exógeno respectivamente, las cuales pueden actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular. El primer sistema de defensa corresponde a las enzimas antioxidantes o endógenas, está basado en un complejo enzimático de defensa que puede incluir a la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, la tioredoxina reductasa.²⁸

En el sistema no enzimático, las células utilizan una serie de compuestos antioxidantes como son: vitamina E, vitamina C, beta-caroteno, ferritina, ceruloplasmina, selenio, glutatión reducido, manganeso, ubiquinona, zinc, ácido úrico, flavonoides, como más representativos e importantes. Siendo en la actualidad de especial importancia los flavonoides extraídos de determinados alimentos. Su acción dependerá en ocasiones de la interacción directa de la especie reactiva para formar complejos estables o de menor reactividad, mientras que en otras ejerce de co-sustrato en la acción catalítica de algunas enzimas.²⁹

2.4.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metilésteres, glucósidos, etc. y la mayor parte de ellos tienen como origen metabólico la ruta del ácido shikímico y el metabolismo de los fenilpropanoides.³⁰

En la actualidad este grupo de compuestos de origen vegetal presenta gran interés por su contribución al mantenimiento de la salud humana. De hecho, la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático. Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones tipo Fenton.³¹

a) Flavonoides: los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos, que se forman biogenéticamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, a partir del cual se derivan las otras clases por modificaciones posteriores que ocurren en varias etapas, entre ellas tenemos a las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas e isoflavonoides.³²

Los flavonoides tienen acción benéfica sobre numerosos procesos fisiológicos del cuerpo humano, otorgan beneficios sobre el corazón, vasos sanguíneos, hígado, sistema inmune, tejido conectivo, glándulas adrenales, riñones, musculatura y sistema nervioso. Pueden actuar como antialérgico, antiinflamatorio, inmunoestimulante, antihepatotóxico, espasmódica, antineoplásico, hipoglucemiante y antioxidante³³

Su capacidad antioxidante le permite neutralizar radicales libres, responsables cuando están dotados de un alto grado de reactividad, esta acción antirradicalaria es, en algunos casos, heterogénea en relación a los distintos tipos de radicales libres (anión superóxido, radical hidroxilo, etc.).^{34,35}

b) Catequinas: son bioflavonoides que tienen como estructura básica un núcleo de flavón unido mediante un enlace β -glucosídico a un azúcar. Son moléculas que poseen un alto poder antioxidante, logrando proteger a nuestras células de los radicales libres y el estrés oxidativo. Recientes investigaciones han demostrado

que las catequinas son 100 veces más efectivas que la vitamina C y 25 veces más potentes que la vitamina E (en cuanto a su poder antioxidante).³⁶

c) Taninos: los taninos están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas alcaloides, celulosa, gelatina). Sus propiedades más conocidas y avaladas por la experimentación son debidas a su capacidad para formar complejos con varias sustancias; sin embargo, su actividad antioxidante, basada en la captura de radicales libres e inhibición de la peroxidación lipídica, contribuye a sus acciones farmacológicas.³⁴

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de la Sección de Terpenos y Esteriodes del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos durante los meses de mayo del 2016 a enero del 2017.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Población

Plantas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. en estado de madurez, que crecen en el centro poblado de Umancocha, distrito y provincia de Tarma, departamento de Junín.

3.2.2. Muestra

La muestra estuvo constituida por 1 kg de hojas secas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. que fueron recolectadas al azar en el mes de mayo del 2016 en horas de la mañana.

La identificación y clasificación de la planta se realizó en el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.3.1. Recolección y preparación de la muestra

Se recolectó al azar el *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. en estado de madurez en horas de la mañana, se lavó y desinfectó con solución de hipoclorito de sodio. El secado se realizó 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 siete días. Las hojas secas se seleccionaron y fueron reducidas de tamaño con un molino de cuchillas Wiley. La muestra recuperada del molino fue un polvo de color verde oscuro.

3.3.2. Tamizaje fitoquímico de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts.

a) Extracción sucesiva del material vegetal

Se realizó la extracción sucesiva del material vegetal en tres tipos de solventes, éter etílico, etanol y agua destilada.³⁷

b) Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios:

Se realizó la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios de los extractos etéreo, etanólico y acuoso según lo señalado por Miranda y Cuéllar.³⁷

- **Ensayo de Sudan:** permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente.
- **Ensayo de Dragendorff:** permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).
- **Ensayo de Mayer:** reconoce en un extracto la presencia de alcaloides, si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).
- **Ensayo de Wagner:** al igual que las anteriores este reconoce la presencia de alcaloides, se considera positivo el ensayo de la siguiente manera: opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).
- **Ensayo de Baljet:** permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Se considera un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.
- **Ensayo de Borntrager:** permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).
- **Ensayo de Lieberman-Burchard:** permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido en la coloración:
 1. Rosado – azul muy rápido
 2. Verde intenso – visible, aunque rápido
 3. Verde oscuro – negro – final de la reacción.

- **Ensayo de catequinas:** la aparición de una mancha verde carmelita sobre el papel filtro a la luz UV, indica un ensayo positivo.
- **Ensayo de resinas:** para detectar este tipo de compuesto, se adicionará a 2 mL del extracto alcohólico, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.
- **Ensayo de Fehling:** permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.
- **Ensayo de la espuma:** permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de dos minutos.
- **Ensayo del cloruro férrico:** permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. En un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:
 1. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
 2. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
 3. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.
- **Ensayo de la ninhidrina:** permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.
- **Ensayo de Shinoda:** permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.
- **Ensayo de Kedde:** permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1 a 2 horas.
- **Ensayo de antocianidinas:** permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.
- **Ensayo de mucílagos:** permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para

ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0 a 5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.

- **Ensayo de principios amargos y astringentes:** el ensayo se realiza saboreando una gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar.

3.3.3. Obtención del extracto hidroalcohólico e identificación de compuestos químicos

Se obtuvo aproximadamente 500 g de muestra seca y molida, que se llevó a maceración por siete días en alcohol de 70° con agitación constante, se cubrió la muestra por un centímetro de diferencia. Se filtró primero con gasa, luego con papel filtro para eliminar las partículas de impurezas. El extracto obtenido se llevó a baño maría a una temperatura de 50 °C para eliminar los solventes y concentrar el extracto.

La identificación de los principales compuestos químicos (metabolitos secundarios) presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. se realizó según lo descrito por Miranda y Cuellar.³⁷

3.3.4. Evaluación de parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts.

a) Determinación de las características organolépticas

Olor: Se tomó cantidad suficiente de muestra con una tira de papel secante, para luego percibir y determinar el tipo de olor.

Los términos para describir los olores de la droga son: aromático, aliáceo, alcanforado, nauseabundo, desagradable, a especia, entre otros.³⁴

Color: Se colocó cantidad suficiente de muestra en un tubo de ensayo, se observó y se determinó el tipo de color.

Sabor: Se colocó cantidad suficiente de muestra en una luna de reloj, para luego hacer contacto con la lengua y determinar el tipo de sabor (dulce, amargo, ácido, salino, astringente, punzante, nauseabundo, aromático, etc.).

b) Determinación de pH

Se pesó 1 g de extracto hidroalcohólico y se diluyó en 100 mL de agua destilada, luego se calibró el potenciómetro marca Orion con sus soluciones buffer de pH 4,0; 7,0 y 10,0. A continuación se midió el pH de la dilución al 10 % del extracto hidroalcohólico, sumergiendo el electrodo de vidrio en la solución.

c) Identificación de compuestos químicos

La identificación de compuestos químicos (metabolitos secundarios) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. fueron realizadas según los procedimientos descritos por Miranda y Cuellar.³⁷

d) Solubilidad

Se colocó un gramo de extracto hidroalcohólico en un tubo de ensayo y se añadió un mililitro de disolvente (agua, alcohol o cloroformo), se agitó y se observó. Si la muestra no se disuelve aumentar el disolvente a 10 ml y así sucesivamente para 30 ml, 100 ml, 1000 ml y más de 10 L.

e) Cenizas totales

Se pesó 2,5 g de muestra en un crisol de porcelana previamente tarado. Se calentó suavemente la muestra aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente se incineró en una mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, durante dos horas.

Se enfrió el crisol en un desecador y se pesó, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5 mg por g (masa constante). Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10 % m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco.³⁷

Cálculo:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100 (\%)$$

Donde:

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

f) Determinación del contenido de humedad

Se pesó 2 g de muestra y se transfirió a una cápsula de porcelana que fue previamente tarada y secada, seguidamente se desecó a 105 °C durante tres horas. Transcurrido el tiempo la cápsula fue retirada y colocada en el desecador hasta que se enfríe para luego ser pesada. La muestra fue colocada nuevamente

en la estufa durante una hora, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante.³⁷

Cálculo:

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100 (\%)$$

Donde:

Hg = Pérdida en peso por desecación.

M₂ = masa de la cápsula con la muestra de ensayo (g).

M₁ = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g).

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

g) Determinación de sustancias solubles

Se pesó exactamente 5 g de muestra y se transfirió a un matraz de Erlenmeyer de 250 ml; se añadió 100 ml del disolvente, se tapó y se agitó durante 6 h, dejándose en reposo hasta el día siguiente; se agitó 30 min, se dejó reposar alrededor de media hora más y se filtró por papel. Se tomó una alícuota de 20 ml que se transfirió a una cápsula previamente tarada. Se evaporó sobre baño de agua, se desecó en estufa a 105 °C durante 3 h, se enfrió y se pesó.³⁷

Cálculo:

$$S = \frac{R \times 500}{M \times (100 - H)} \times 100 (\%)$$

Donde:

S = Sustancias solubles.

H = Humedad de la muestra (%).

500 y 100 = Factores matemáticos para los cálculos.

R = Residuo de la muestra (g).

M = Masa de la muestra (g).

3.3.5. Evaluación de actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. (DPPH)

Fundamento: El 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm de forma que su concentración se pueda determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una

disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante.³⁸

Procedimiento:

- a) Se preparó 100 ml de una solución de DPPH en metanol de 20 µg/ml.
- b) Luego se preparó una solución metanólica del extracto en una concentración de 300 µg/ml (Sol. A) y 600 µg/ml (Sol. B).
- c) El blanco se preparó con metanol y agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- d) El blanco de muestra se preparó con 1,5 ml de muestra (Sol. A) y 3 ml de metanol.
- e) Se preparó el patrón de referencia con 1,5 ml de agua y 3 ml de DPPH.
- f) Luego se procedió a preparar la muestra con 1,5 ml de muestra (Sol. A) y 3 ml de DPPH, obteniéndose una concentración final de 100 µg/ml, dejándose reposar por cinco minutos y se leyó a 517 nm en un espectrofotómetro.
- g) Se midió la absorbancia del patrón de referencia y del blanco de la muestra.
- h) Luego se diluyó la solución A con metanol en una proporción 1:2 (Sol. C) para obtener una concentración final de 50 µg/ml, y en una proporción de 1:10 (Sol. D) para obtener una concentración final de 1 µg/ml.
- i) Con las soluciones B, C y D se procedió igual a los puntos f y g.

Los extractos fueron evaluados por triplicado, a diferentes concentraciones de 1, 50, 100 y 200 µg/ml.

La solución de ácido ascórbico (Vit. C) se preparó de la misma forma que la solución del extracto hidroalcohólico y se manejó las mismas concentraciones para poder realizar una comparación más exacta.¹³

Cálculo:

$$\% \text{ Capacidad antioxidante} = \left[1 - \frac{(A_2 - A_3)}{A_1} \right] \times 100$$

Donde:

A₁ = Absorbancia del patrón de referencia.

A₂ = Absorbancia de la muestra.

A₃ = Absorbancia del blanco de la muestra.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño empleado es el diseño Básico – Experimental. El extracto hidroalcohólico elaborado diluidas a diferentes concentraciones (previamente debe evaluarse los parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de “chiuchi-chiuchi”), son sometidas a evaluación para determinar su actividad antioxidante.

Los ensayos se realizaron por triplicado en cada una de las concentraciones (1ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 mg/mL y Blanco) y comparadas con la Vit. C, la cual fue diluida a las mismas concentraciones.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos están organizados en una matriz para calcular la media y la desviación estándar, asimismo, están graficados en forma de histogramas y barras.

La significancia estadística entre las diferentes concentraciones está determinada mediante el análisis de varianza y la prueba de Tukey con un nivel de significancia al 95%. También se realizó una prueba de t de student para comparar las concentraciones del extracto con las del patrón (Vitamina C).

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Principales Metabolitos secundarios presentes en el extracto etéreo de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Aceites y grasas	Sudán	++	Presencia de coloración roja en las paredes
Alcaloides	Dragendorff	+	Hay presencia de opalescencia
Triterpenos - esteroides	Lieberman – burchard	+++	Coloración verde oscuro al final

Leyenda:

(+) : Escasa
 (++) : Moderada
 (+++) : Abundante

Tabla 2. Principales Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Catequinas	Catequinas	+	Fluorescencia verde carmelita
Azucares Reductores	Fehling	+	Presencia de precipitado rojo
Lactonas	Baljet	++	Presencia de coloración roja
Triterpenos – Esteroides	Lieberman – Burchard	++	Coloración verde oscuro
Saponinas	Espuma	+	Espuma de más de 2 mm de altura y persiste por más de 2 minutos
Fenoles y Taninos	Cloruro Férrico	+++	Presencia de una coloración verde intensa
Quinonas	Borntragen	+++	Presencia de coloración roja
Flavonoides	Shinoda	++	Presencia de coloración naranja
Alcaloides	Dragendorff	++	Hay presencia de turbidez
Alcaloides	Mayer	+	Hay presencia de opalescencia
Alcaloides	Wagner	++	Hay presencia de turbidez

Leyenda:

- (+) : Escasa
- (++) : Moderada
- (+++): Abundante

Tabla 3. Principales Metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff	++	Hay presencia de turbidez
Alcaloides	Mayer	+	Hay presencia de opalescencia
Alcaloides	Wagner	+	Hay presencia de opalescencia
Taninos	Cloruro Férrico	+++	Hay presencia de una coloración verde intensa
Flavonoides	Shinoda	++	Hay presencia de coloración amarilla
Saponinas	Espuma	+++	Espuma de más de 2 mm de altura y persiste por más de 2 minutos
Mucílagos	Mucílagos	+	Hay leve presencia de consistencias gelatinosas en la solución.

Leyenda:

- (+) : Escasa
- (++) : Moderada
- (+++): Abundante

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Lactonas	Baljet	++	Presencia de coloración roja
Saponinas	Espuma	++	Hay presencia de espuma de más de 3 mm y persiste por más de 2 minutos
Alcaloides	Dragendorff	+	Hay presencia de opalescencia
Fenoles y taninos	Cloruro Férrico	+++	Presencia de coloración verde intensa
Flavonoides	Shinoda	++	Se forma una coloración naranja
Triterpenos y esteroides	Lieberman – Burchard	++	Hay presencia de una coloración verde oscuro

Leyenda:

- (+) : Escasa
- (++) : Moderada
- (+++): Abundante

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

Parámetros	Ensayos	Resultados
Organolépticos	Color	Verde oscuro
	Olor	<i>Sui generis</i>
	Sabor	Amargo
	Aspecto	Pasta resinosa
Solubilidad	Agua	Fácilmente soluble
	Cloroformo	Poco soluble
	Etanol	Insoluble
pH	Extracto hidroalcohólico	5,39
Humedad (%)	Perdida por desecación	8,72
Sustancias solubles (%)	Sustancias extraíbles	28,84
Cenizas (%)	Cenizas totales	5,61
Rendimiento (%)	-	14,502

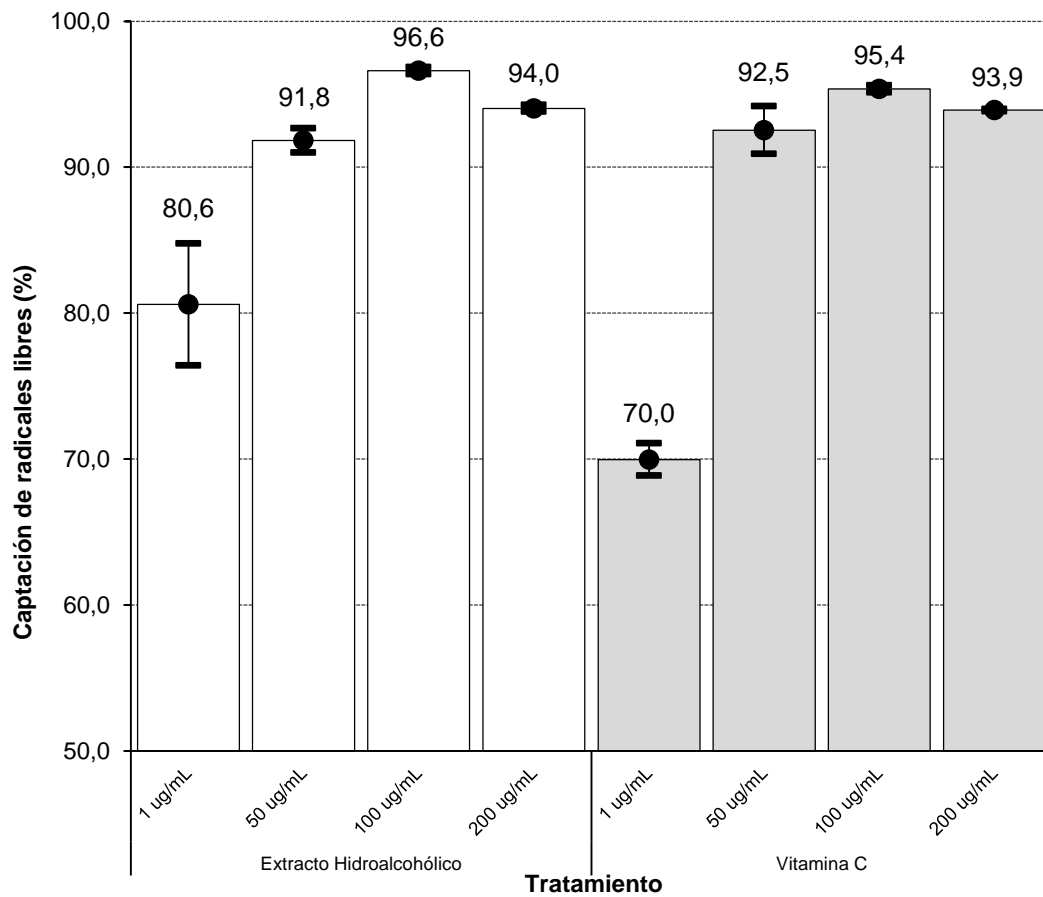


Figura 1. Actividad antioxidante por captación de radicales libres del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

V. DISCUSIÓN

Las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi – chiuchi”, fueron recolectadas y seleccionadas en el centro poblado de Umancocha, distrito de Acobamba, provincia de Tarma y departamento de Junín.

La extracción para el análisis fitoquímico se realizó de acuerdo a la polaridad creciente de los solventes como lo describe Miranda y Cuellar, donde el éter etílico extrae solo compuestos de baja polaridad como aceites esenciales, clorofilas, ceras y algunos esteroides; el alcohol etílico extrae mayor número de metabolitos y el agua extrae sustancias fuertemente polares como flavonoides, glicósidos, saponinas, sales orgánicas, mucilagos, ácidos orgánicos, gomas, etc, sin embargo, el problema de utilizar agua como solvente es que requiere de altas temperaturas para ser eliminado, lo que puede producir el rompimiento de estructuras de compuestos termosensibles, además el extracto acuoso es susceptible a la proliferación de hongos que altera la composición del extracto.³⁷

Los resultados del extracto etéreo que se muestra en la Tabla 1 señalan la identificación de metabolitos secundarios como los alcaloides en presencia muy escasa con la utilización del reactivo de Dragendorff, sin embargo, los resultados fueron negativos con los reactivos Mayer y Wagner.

Un panorama parecido se evidencia en especies similares como la *Satureja brevicalyx*, donde los ensayos de identificación de alcaloides arrojaron resultados negativos.³⁹

También se identificó la presencia de aceites y grasas en el extracto etéreo, los cuales se encuentran en cantidades moderadas según los resultados obtenidos con el ensayo de Sudán, así mismo se evidenció la presencia de triterpenos y esteroides realizando el ensayo de Lieberman-Burchard, el cual da un resultado positivo por la aparición de una coloración verde oscuro al finalizar la reacción, la identificación de triterpenos podría explicar el uso tradicional que se le da al

Clinopodium breviflorum (Benth) Govaerts. como analgésico, ya que existe evidencia de que los triterpenos tienen actividad analgésica según estudios realizados por Freire⁴⁰ y Toro⁴¹

Se realizó el ensayo de Baljet para la identificación de lactonas y cumarinas, sin embargo, se obtuvo un resultado negativo, ya que no hubo cambios de coloración o precipitación de color rojo como indica Miranda y Cuellar.³⁷

En la Tabla 2 se muestra los resultados de identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico, en el cual se identificó la abundante presencia de saponinas, fenoles, taninos, quinonas y en cantidades moderadas lactonas, triterpenos, esteroides, flavonoides y alcaloides. La presencia de flavonoides se evidenció con el reactivo de shinoda, con el cual se observó una coloración muy intensa de color naranja.

Las propiedades farmacológicas de los flavonoides son reconocidas por su efecto antiinflamatorio porque disminuyen la formación de mediadores proinflamatorios (prostaglandinas, leucotrienos y óxido nítrico)⁴², además existen investigaciones de especies vegetales como la *Jungia rugosa* Less⁴³ y la *Satureja brevicalyx* a quienes se les atribuye dicha propiedad²¹. Otra actividad relacionada a los flavonoides es la actividad antioxidante, la cual se evidencia en la especie *Satureja brevicalyx* estudiada por Aguilar¹³ donde compara el efecto antioxidante de los flavonoides aislados con el efecto antioxidante de la Vit. C y la rutina, demostrando una gran similitud en los resultados.

La presencia de fenoles y taninos se evidenció con el reactivo cloruro férrico dando una coloración verde intensa, que es resultado de la presencia de taninos de tipo pirocatecólicos.³⁷ La abundante presencia de taninos en el extracto podría estar relacionado con la actividad antioxidante, ya que los taninos son capaces de captar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica³³.

En la identificación de metabolitos secundarios del extracto alcohólico también se evidenció la presencia abundante de saponinas mediante el ensayo de espuma, lo cual estaría relacionado con el uso tradicional de esta especie para tratar problemas bronquiales y la tos, ya que las saponinas a nivel pulmonar producen un aumento de las secreciones y por consiguiente tiene un efecto expectorante y antitusivo³³.

La tabla 3 muestra los resultados de la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso, donde se evidencia claramente la abundante presencia de taninos mediante la reacción de cloruro férrico. Debido a la polaridad

de los taninos estos son extraídos fácilmente por sustancias altamente polares como el agua.

Los flavonoides también se encuentran presentes en el extracto acuoso, pudiendo identificarse mediante el reactivo de Shinoda, donde se logró evidenciar su presencia en cantidades moderadas.

En el extracto acuoso también se logró identificar alcaloides en cantidades moderadas mediante el reactivo Dragendorff y en cantidades escasas con los reactivos de Mayer y Wagner. Debido a la identificación de los alcaloides en el extracto acuoso y en el extracto alcohólico se puede decir que los alcaloides presentes en el *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. se encuentran en forma de sales, ya que en esta forma son solubles en agua. Además, se observó que en el extracto etéreo no se evidencio la presencia de alcaloides, debido a que los alcaloides en forma de sales son insolubles en solventes orgánicos como el éter etílico, afirmando así la presencia de alcaloides en forma de sales dentro de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts.

Dentro de los ensayos realizados al extracto acuoso se realizó también el ensayo de espuma para la detección de saponinas, donde se identificó la presencia escasa de este metabolito secundario. Este metabolito es mayormente extraído por compuestos polares como el alcohol etílico y el agua ya que las saponinas son solubles en estas sustancias.

En el extracto hidroalcohólico se realizó la identificación de metabolitos secundarios, los cuales se indican en la tabla 4, donde se observa la abundante presencia de taninos con la reacción de cloruro férrico dando una coloración verde intensa, propia de taninos de tipo pirocatecólicos.³⁷

Otros metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico en cantidades moderadas son las lactonas, saponinas, triterpenos, esteroides y flavonoides, siendo este último los principales responsables de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico, como lo demuestra diversas investigaciones. Un ejemplo de ello es lo realizado por Aguilar, donde logró aislar 2 flavonoides: la apigenina y narangenina, además demostró la actividad antioxidante de estos flavonoides, los cuales fueron extraídos a partir de hojas de *Satureja brevicalyx*¹³

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y

la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Aunado a esto, se ha visto que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa.^{44,45}

En la tabla 5 se muestra las características fisicoquímicas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. donde se encuentra las características organolépticas como el color verde oscuro, olor *Sui generis*, sabor amargo y un aspecto de pasta resinosa. Todas las características mencionadas son comunes en extractos hidroalcohólicos de vegetales.

También se realizó la determinación de la solubilidad del extracto hidroalcohólico, encontrándose que el extracto es fácilmente soluble en agua, poco soluble en cloroformo y prácticamente insoluble en etanol. El extracto hidroalcohólico presenta un pH de 5,39, por lo cual el extracto es ácido. Otro parámetro que se determinó fue la humedad del extracto mediante el ensayo de pérdida por secado dando como resultado 8,72 % de humedad, valor que se encuentra dentro de lo recomendado por Palomino,⁴⁶ quien indica que para una buena conservación del extracto esta debe tener una humedad no mayor de 10 % y así evitar el crecimiento de bacterias y hongos, además al ser un extracto hidroalcohólico, este se mantiene libre de crecimiento microbiano a diferencia de un extracto acuoso. El porcentaje de sustancias solubles en el extracto hidroalcohólico es 28,84 % y el porcentaje de cenizas totales de la muestra es 5,61%.

De un total de 500 g de muestra de hojas secas y molidas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. que se maceró, se obtuvo un total de 72,51 g de extracto concentrado, lo cual nos da un porcentaje de rendimiento de 14,50 %.

La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. se muestran en la Figura 1, donde se usó el método de decoloración del radical DPPH, el cual nos da resultados seguros y confiables debido a que se trata de un radical estable y estandarizado⁴⁷, además es usado frecuentemente para realizar ensayos de determinación de actividad antioxidante. Del Solar⁴⁸, usó el radical DPPH para realizar la determinación de la actividad antioxidante de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, de la misma manera Palomino²¹, determinó la actividad antioxidante de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epl. haciendo uso del radical DPPH.

Para determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. se preparó diluciones a partir del extracto hidroalcohólico concentrado obteniendo concentraciones de 1 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml y 200 ug/ml.¹³ La capacidad antioxidante del extracto se comparó con la vitamina C, el cual es reconocido por su capacidad antioxidante y ha sido utilizado en investigaciones realizadas en la especie *Satureja brevicalyx* por Aguilar¹³ y Palomino²¹.

La figura 1 muestra que el extracto hidroalcohólico a la concentración de 100 ug/ml presenta mayor capacidad antioxidante (96,6 %) en comparación con las concentraciones de 1 ug/ml, 50 ug/ml y 200 ug/ml donde se obtuvo 80,6 %, 91,8 % y 94,0% respectivamente. También se puede observar que la capacidad antioxidante incrementa conforme aumenta la concentración del extracto hasta 100 ug/ml, sin embargo, a la concentración de 200 ug/ml se observa una disminución del porcentaje de la capacidad antioxidante, este resultado podría deberse a la presencia de compuestos antioxidantes como los flavonoides, ya que pueden actuar como antioxidantes y prooxidantes en altas concentraciones para lo cual pueden influir muchos factores como las condiciones del ensayo, la concentración efectiva que se alcance en el sitio donde la ERO es formada; la estabilidad del radical del flavonoide formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante y el pH del medio.⁴⁹

Además, en la figura 1 se muestra los resultados estadísticos obtenidos mediante el análisis de varianza (ANOVA), aquí se observa que al menos una de las concentraciones del extracto hidroalcohólico es estadísticamente diferente y lo mismo sucede con las concentraciones de Vitamina C ($p < 0,05$), por lo cual se puede indicar que el efecto del extracto es diferente de acuerdo a la dosis.

Por último, se realizó la prueba de t de student para comparar las concentraciones del extracto y la vitamina C, observándose que las concentraciones de 1 ug/ml y 100 ug/ml son estadísticamente diferente, es decir, que a estas concentraciones el porcentaje de la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico es diferente al del patrón (Vitamina C).

En conclusión, todos los resultados nos conducen a afirmar que la concentración de 100 ug/ml del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi” presenta mayor capacidad antioxidante (96,6 %).

VI. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios identificados en los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi" fueron principalmente triterpenos, fenoles, taninos, flavonoides y saponinas y entre los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico se encontraron fenoles, taninos, flavonoides y triterpenos.
2. Los parámetros físicoquímicos evaluados en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi", fueron solubilidad, pH, humedad, sustancias solubles, cenizas totales y el porcentaje de rendimiento.
3. Las concentraciones de 1 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL y 200 ug/mL de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi" presentaron actividad antioxidante, que fue variando de acuerdo a la concentración del extracto obteniendo 80,6 %, 91,8 %, 96,6 % y 94,0 % de capacidad de captación de radicales libres respectivamente, de los cuales se evidenció que la concentración de extracto con mayor porcentaje de captación de radicales libres es la de 100 ug/mL con un 96,6 % de capacidad de captación de radicales libres.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos *in vivo* para determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico del *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”.
2. Aislar e identificar la estructura química de los principales metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. responsables de la actividad antioxidante.
3. Atomizar el extracto hidroalcohólico del *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi” con la finalidad de facilitar el manejo de la muestra durante los ensayos.
4. Realizar estudios de la actividad fotoprotectora del extracto hidroalcohólico del *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”.
5. Elaborar formulaciones a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beyra, Á, León, MdC, Iglesias, E, Ferrándiz, D, Herrera, R, Volpato, G, Godínez, D, Guimaraes, M, Álvarez, R. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* [Internet]. 2004; [acceso 18 de diciembre del 2016];61(2):185-203. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55661207>
2. Gallegos-Zurita M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac med* [internet].2016 [Acceso 20 de diciembre 2016]. 77:327-332. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/12647>
3. 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 de pregrado]. Iquitos. Univesidad Nacional de la Amazonia Peruana. 2012
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 5° edición. Nueva York: OUP Oxford. 2015.
5. Doroteo VH, Díaz C, Terry C, Rojas R. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante invitro de 6 plantas peruanas. *Rev Soc Quim. Perú* [internet]. 2013 [Acceso 16 de enero del 2017].79(1). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000100003&lng=es&nrm=iso
6. Fernández M. *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.: estudio fitoquímico y farmacológico [tesis doctoral]. Madrid. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutence de Madrid. 2012.
7. Echavarría B, Franco A, Martínez A. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae* [Internet]. 2009 enero. [Acceso 14 de enero del 2017]; 16(1): 126-131. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000100015&lng=en.
8. Álvarez E, Jiménez O, Posada C, Rojano B, Gil J, García C et al. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *vismia* (guttiferae). *Vitae* [Internet]. 2008 enero [acceso 14 de enero del 2017]; 15(1): 165-172. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042008000100020&lng=en.
9. Ricardi J. Determinación de rendimientos de extracción y caracterización físico química del aceite esencial de *Chiuyche Satureja incana* obtenida por arrastre de vapor. [Tesis de pregrado]. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2006.
10. León B, Pitman N, Roque J et al. El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. *Rev. peru. biol.* [internet]. 2006. 13(2):942S. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/biologia/v13n2/Contenido.htm>
11. Ricardi J, Martínez A. Cromatografía de gases – espectrometría de masas de compuestos fitoactivos del aceite esencial de *Satureja Incana*. *Apunt. cienc. soc.* 2014; 04(02). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18259/acs.2014033>.
12. Arias R. Actividad neuroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja brevicallix* Epl. “wayra muña” en ratas sometidas a hipoxia. [Tesis de pregrado]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2008.

13. Aguilar E. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña". Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2010.
14. Brako L, Zarucchi J. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Mis souri: Missouri Botanical Garden; 1993.
15. Font Quer. Plantas medicinales: El dioscorides renovado. Barcelona: Península; 2016.
16. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Trujillo: Normas Legales.2002.
17. Morales R, Quintanar A, Cabezas F, Pujadas A, Cirujano S. Flora Ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. XII. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2010.
18. Yarupaitán G, Albán J. Fanerógamas de la provincia de Huancayo, Perú. Rev perú biol. 2004. 11(2): 193-202.
19. Chirinos R, Pedreschi R, Rogez H, Larondelle Y, Campos D. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. Industrial Crops and Products. 2013. 47: 145– 152.
20. Arias A. Estudio de los componentes del aceite esencial y extracto de *Clinopodium bolivianum* (Inca Muña) obtenidos por hidrodestilación y extracción con CO₂ supercrítico. Bucaramanga-Colombia. Universidad Industrial de Santander. 2014.
21. Palomino R. Efecto antioxidante del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña". [Tesis de pregrado]. Ayacucho: UNSCH;2005.
22. Carhuapoma M. Composición química, actividad anti-Helicobacter pylori y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña". [Tesis de doctoral]. Lima: UNMSM. 2007.
23. Mendoza, J. Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" en ratas. [Tesis de pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 2007.
24. Benito P, Calvo S, Gomez C, Iglesias C. Alimentación y nutrición en la vida activa: ejercicio físico y deporte. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid. 2014: 533 - 534.
25. Korc I, Bidegain M, Martell M. Radicales libres, Bioquímica y sistemas antioxidantes. Implicancia en la patología neonatal. Rev Med Urug. 1995. 11:121-135.
26. Castañeda C, Ramos E, Ibañez V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista horizonte médico. 2008. 8(1); 56 – 72.
27. Zavaleta J, Muñoz A, Blanco T, Alvarado-Ortiz C, Loja B. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. Revista Horizonte médico. [Internet]. 2005;5(2). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637113004>
28. Valls V. El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal. Vitaminas y polifenoles. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. España.
29. Robards K, Prenzler P et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry. 1999: 66(4): 401.
30. Rice C, Ruiz M et al. Antioxidant activity of phytoestrogenic flavones. Free Radical Research. 1997; 26(1):63.
31. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de los productos naturales. 2da. ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.



32. Evans W. Farmacognosia. 15th ed. España: Editorial Elsevier Limited. 2006.
33. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 2003.
34. Villar del Fresno M. Farmacognosia General. Madrid: Síntesis; 1999.
35. Montana. Catequinas. Boletín Alimentos [internet]. 2012 [Acceso 19 de abril 2016]; 2(1). Disponible en:
<http://www.montana.com.pe/boletines/alimentos/02/catequinas.html>
36. Organización Mundial de la Salud. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales. Ginebra: OMS; 2003.
37. Miranda M., Cuellar A. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad de La Habana - Cuba. Universidad de la Habana; 2002.
38. Rosales A, Betancort J. Evaluación de actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. España: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; 2006.
39. Soto M. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad analgésica en diferentes extractos de la *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña". [Tesis de pregrado]. Ayacucho: UNSCH. 1999.
40. Freire S, Luce M. Actividad analgésica de un triterpeno aislado de la *Scopuria dulcis* L.(vassourinha). Noveno Simposio de Química y Farmacología de Productos Naturales de Brasil. Vol. 86. Supl. II. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1991.
41. Toro V. Evaluación de la actividad analgésica aguda y crónica de *Phytolacca dioica*. [Tesis de pregrado]. Chile: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas - Universidad de Chile. 2009.
42. Gonzales-Quevedo M, Larionova M, Martinez A, Marrero O. Evaluación de la Acción Antiinflamatoria del Producto FL-1. Rev cubana Med Milit 2003;32 (2):120.
43. Enciso E, Arroyo J. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (Matico de puna) en un modelo experimental en ratas. Anales de la Facultad de Medicina [internet]. 2011 [Acceso 06 de marzo del 2016]. 72(4). Disponible en:
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1074>
44. Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. Fundam Clin Pharmacol 1998; 3: 249-55.
45. Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *solanum melongena*. Phytother Res 1999; 13: 393-396.
46. Palomino, O. Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). España. 2001.
47. Szabo M., Iditciu C., Chambre D., Lupea A. Improved DPPH Determination for Antioxidant Activity Spectrophotometric Assay. Chem Pap. 2007; 61(3): 214 – 216.
48. Del Solar D. Actividad antioxidante de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Claceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay" [Tesis de pregrado]. Ayacucho: UNSCH. 2012.
49. Pérez Trueba Gilberto. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev cubana Invest Bioméd [Internet]. 2003 [Acceso 04 de julio 2017]; 22(1). Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S08643002003000100007&lng=es.

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de la planta *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi-chiuchi”. Tarma -2016.



Anexo 2. Clasificación Taxonómica de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi", según el sistema de clasificación de Cronquist (1988). Lima - 2015.

 UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
 MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"

CONSTANCIA N° 128-USM-2015

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo, hojas y flor) recibida de **Richard CESPEDES MAMANI**, alumno de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; ha sido estudiada y clasificada como: ***Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

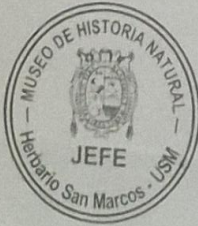
GENERO: *Clinopodium*

ESPECIE: *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts.

Nombre vulgar: "chiuchi-chiuchi"
Determinado por Mag. María Isabel La Torre.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 16 de junio de 2015

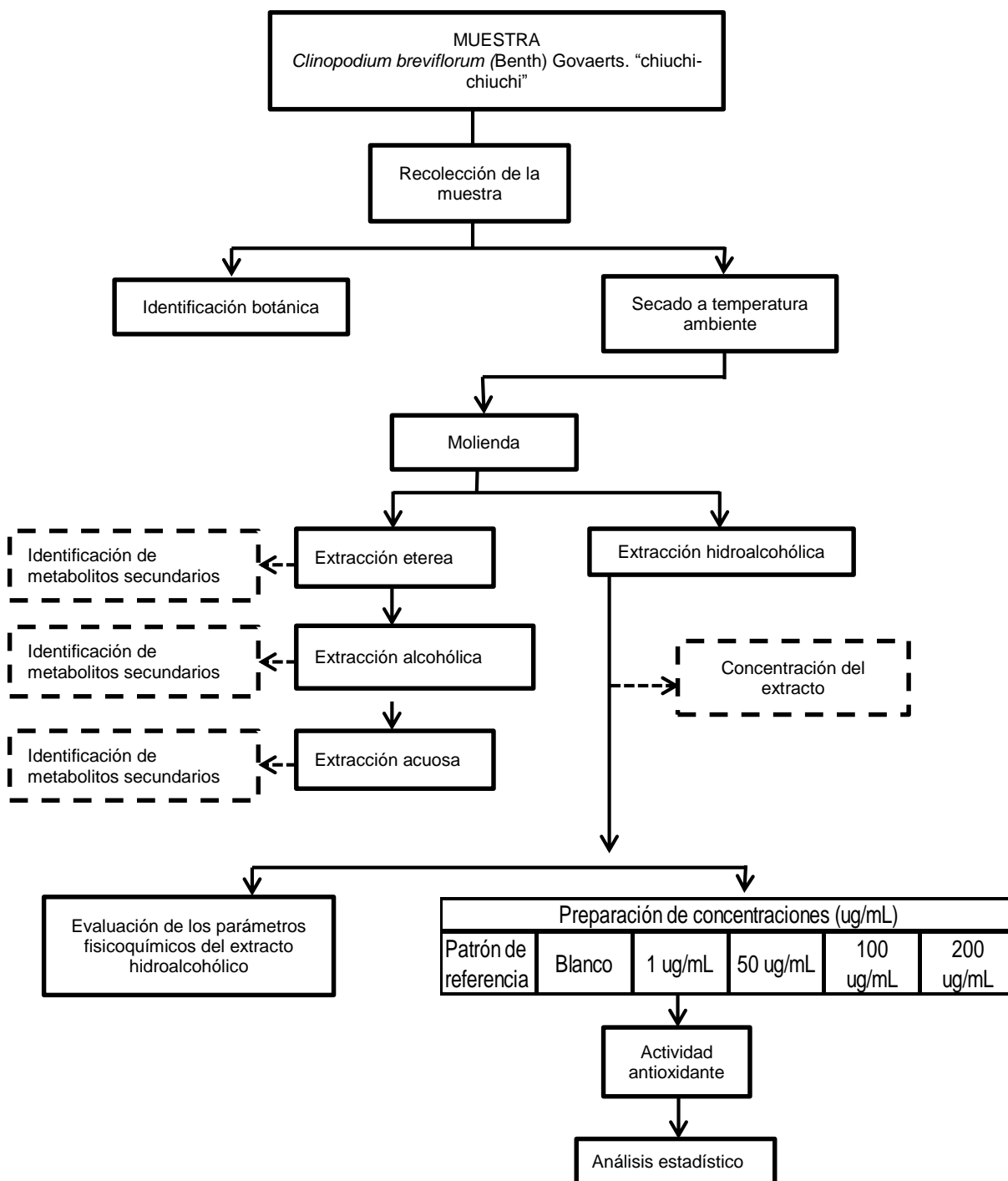
 **Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS**
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

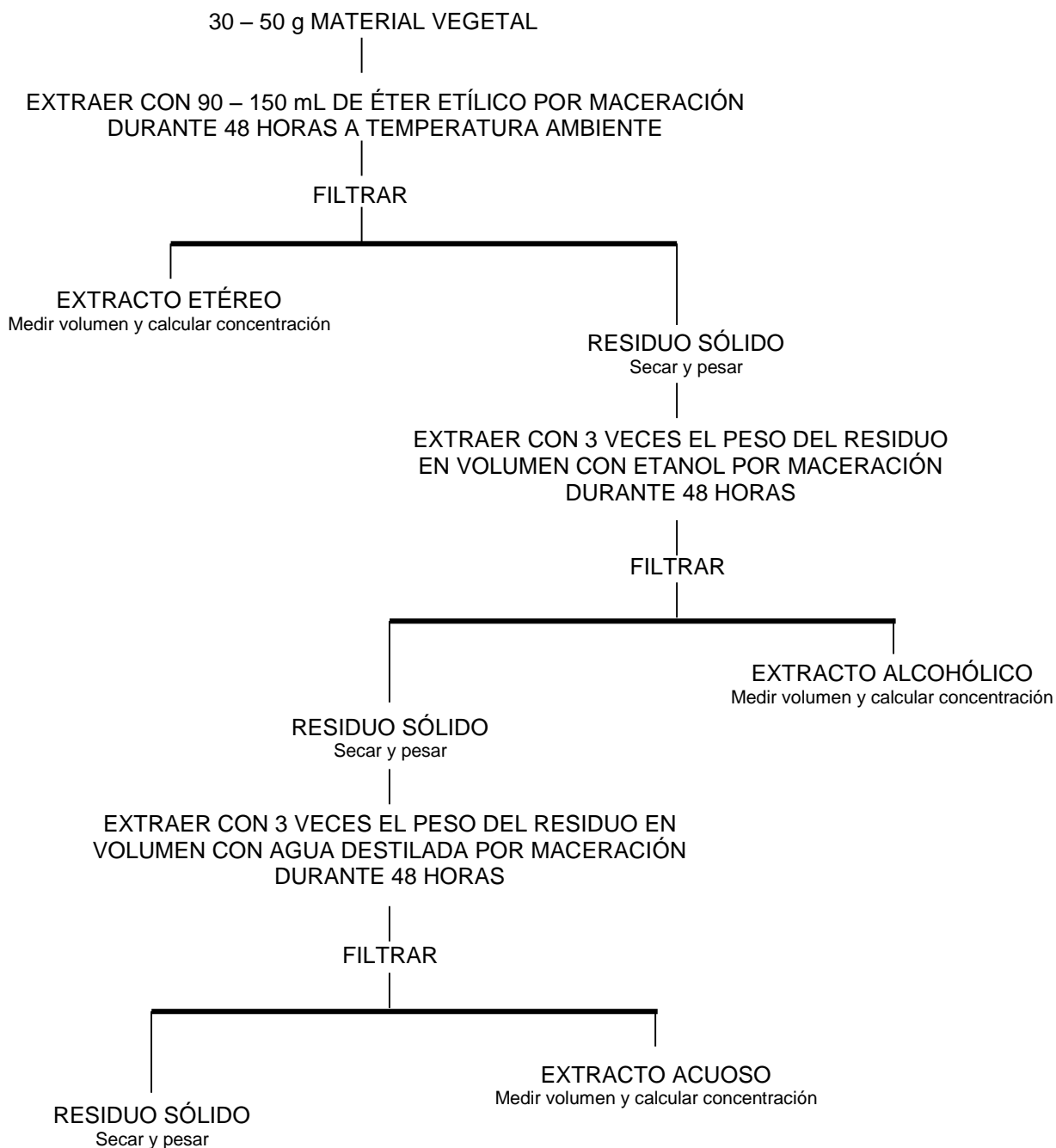
Tels. (511)471-0117, 470-4471,
470-7918, 619-7000 anexo 5703

e-mail. museohn@unmsm.edu.pe
http://museohn.unmsm.edu.pe

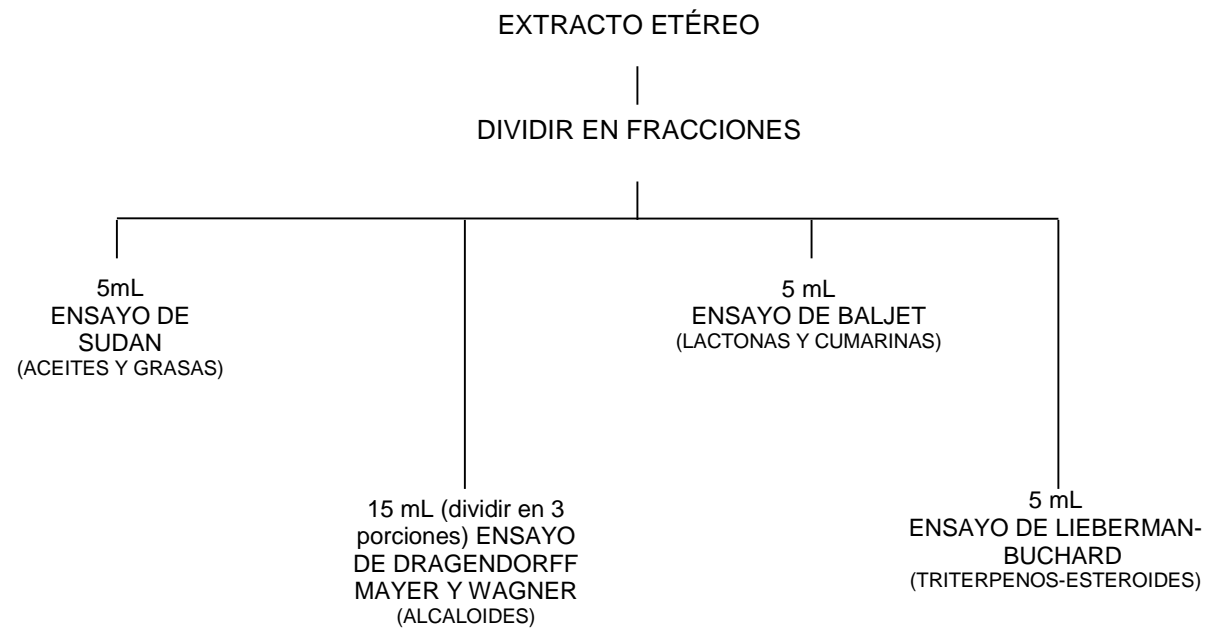
Anexo 3. Diseño Experimental para determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi". Lima - 2016.



Anexo 4. Extracción sucesiva de material vegetal para la aplicación de técnicas de tamizaje fitoquímico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.



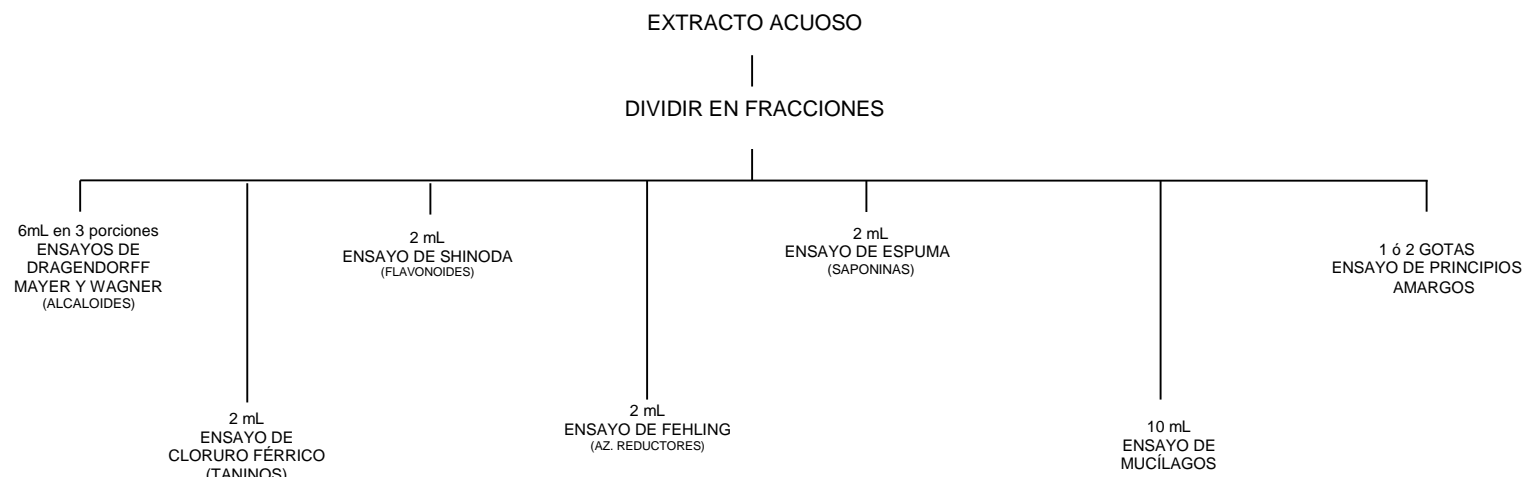
Anexo 5. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etéreo de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.



Anexo 6. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

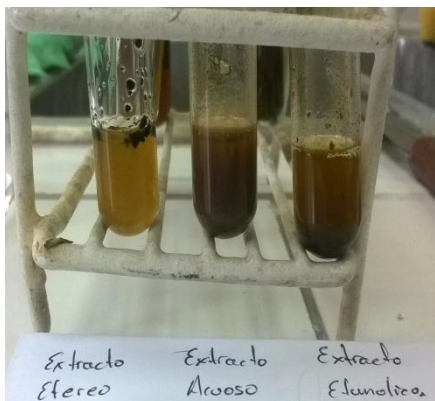


Anexo 7. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.



Anexo 8. Identificación de metabolitos secundarios de los extractos Etéreo, alcohólico y acuoso de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi". Lima - 2016.

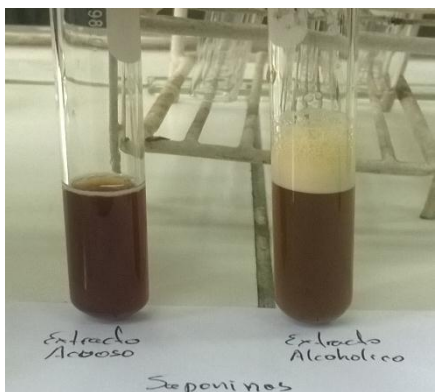
1.



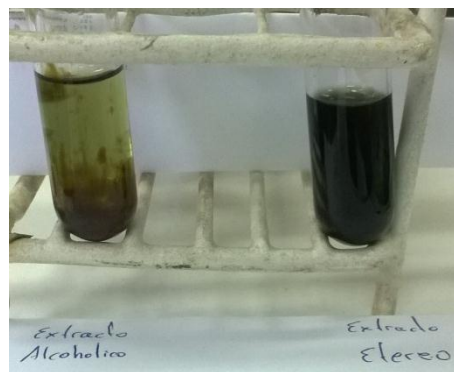
2.



3.



4.



5.



1. Ensayo de Dragendorff
2. Ensayo de Fehling
3. Ensayo de Saponinas
4. Ensayo de Lieberman Burchard
5. Ensayo de Shinoda

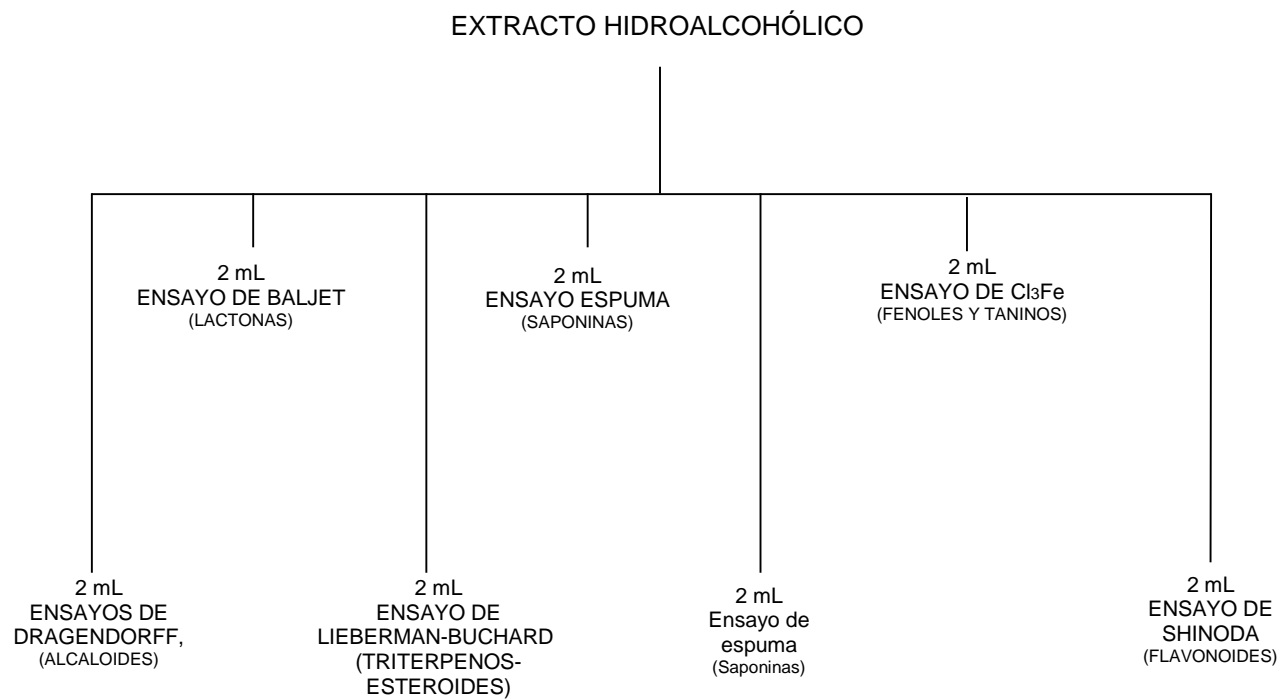
Anexo 9. Evaporación del alcohol del extracto hidroalcohólico de las hojas *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi". Lima - 2016.



Anexo 10. Extracto hidroalcohólico concentrado de las hojas *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi". Lima - 2016.



Anexo 11. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.



Anexo 12. Determinación del porcentaje de cenizas totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi". Lima - 2016.



Anexo 13. Criterios de solubilidad según USP 39 para la determinación del solvente para el extracto hidroalcohólico de las hojas *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

Termino descriptivo	Partes de disolvente requeridas para 1 parte de soluto
Muy soluble	Menos de una parte
Fácilmente soluble	De una a 10 partes
Soluble	De 10 a 30 partes
Moderadamente soluble	De 30 a 100 partes
Poco soluble	De 100 a 1000 partes
Muy poco soluble	De 1000 a 10 000 partes
Prácticamente insoluble	Más de 10 000 partes.

Anexo 14. Distribución de los grupos de ensayo del extracto hidroalcohólico de las hojas *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi – chiuchi” al 1ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL y 200 ug/mL. Lima - 2016.

Grupo	Blanco de muestra (1,5 mL de muestra + 3,0 mL de metanol)*	Patrón de referencia (1,5 mL metanol + 3,0 mL DPPH)	Muestra problema (1,5 mL de muestra + 3,0 mL de DPPH)											
			Extracto 1 ug/mL			Extracto 50 ug/mL			Extracto 100 ug/mL			Extracto 200 ug/mL		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	X													
2		X												
3			X	X	X									
4						X	X	X						
5									X	X	X			
6												X	X	X

* El blanco de muestra se realizará para cada concentración del extracto.

Anexo 15. Preparación de muestras de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi – chiuchi” y Vitamina C a diferentes concentraciones para su lectura en el espectrofotómetro. Lima - 2016.



Anexo 16. Determinación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi” por el método espectrofotométrico. Lima - 2016.



Anexo 17. Datos descriptivos de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi” y Vitamina C a concentraciones de 1 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/ mL y 200 ug/mL . Lima - 2016.

Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
EXTRACTO 1ug/mL	3	80,5938	1,68257	,97143	76,4140	84,7735	78,81	82,16
50ug/mL	3	91,8292	,33415	,19292	90,9991	92,6592	91,54	92,19
100ug/mL	3	96,6146	,10045	,05800	96,3650	96,8641	96,50	96,69
200ug/mL	3	94,0313	,09375	,05413	93,7984	94,2641	93,94	94,13
Total	12	90,7672	6,42680	1,85526	86,6838	94,8506	78,81	96,69
VITAMINA C 1ug/mL	3	69,9688	,44305	,25579	68,8682	71,0693	69,47	70,31
50ug/mL	3	92,5417	,65650	,37903	90,9108	94,1725	91,88	93,19
100ug/mL	3	95,3646	,10045	,05800	95,1150	95,6141	95,25	95,44
200ug/mL	3	93,9063	,03125	,01804	93,8286	93,9839	93,88	93,94
Total	12	87,9453	10,89563	3,14530	81,0226	94,8681	69,47	95,44

Anexo 18. Análisis de varianza de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
EXTRACTO	Inter-grupos	448,418	3	149,473	201,882	,000
	Intra-grupos	5,923	8	,740		
	Total	454,341	11			
PATRON	Inter-grupos	1304,585	3	434,862	2724,926	,000
	Intra-grupos	1,277	8	,160		
	Total	1305,862	11			

Anexo 19. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la actividad antioxidante por captación de radicales libres del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. "chiuchi - chiuchi". Lima - 2016.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) FACTOR	(J) FACTOR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
EXTRACTO	HSD de Tukey	1ug/mL	50ug/mL	-11,23542 [*]	,70257	,000	-13,4853	-8,9856
			100ug/mL	-16,02083 [*]	,70257	,000	-18,2707	-13,7710
			200ug/mL	-13,43750 [*]	,70257	,000	-15,6874	-11,1876
		50ug/mL	1ug/mL	11,23542 [*]	,70257	,000	8,9856	13,4853
			100ug/mL	-4,78542 [*]	,70257	,001	-7,0353	-2,5356
			200ug/mL	-2,20208	,70257	,055	-4,4519	,0478
		100ug/mL	1ug/mL	16,02083 [*]	,70257	,000	13,7710	18,2707
			50ug/mL	4,78542 [*]	,70257	,001	2,5356	7,0353
			200ug/mL	2,58333 [*]	,70257	,026	,3335	4,8332
		200ug/mL	1ug/mL	13,43750 [*]	,70257	,000	11,1876	15,6874
			50ug/mL	2,20208	,70257	,055	-,0478	4,4519
			100ug/mL	-2,58333 [*]	,70257	,026	-4,8332	-,3335
PATRON	HSD de Tukey	1ug/mL	50ug/mL	-22,57292 [*]	,32618	,000	-23,6174	-21,5284
			100ug/mL	-25,39583 [*]	,32618	,000	-26,4404	-24,3513
			200ug/mL	-23,93750 [*]	,32618	,000	-24,9820	-22,8930
		50ug/mL	1ug/mL	22,57292 [*]	,32618	,000	21,5284	23,6174
			100ug/mL	-2,82292 [*]	,32618	,000	-3,8674	-1,7784
			200ug/mL	-1,36458 [*]	,32618	,013	-2,4091	-,3201
		100ug/mL	1ug/mL	25,39583 [*]	,32618	,000	24,3513	26,4404
			50ug/mL	2,82292 [*]	,32618	,000	1,7784	3,8674
			200ug/mL	1,45833 [*]	,32618	,009	,4138	2,5029
		200ug/mL	1ug/mL	23,93750 [*]	,32618	,000	22,8930	24,9820
			50ug/mL	1,36458 [*]	,32618	,013	,3201	2,4091
			100ug/mL	-1,45833 [*]	,32618	,009	-2,5029	-,4138

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Anexo 20. Análisis comparativo t de student de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi” y la vitamina C. Lima - 2016.

Prueba de muestras independientes									
	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
CON1 Se han asumido varianzas iguales	2,936	,162	10,577	4	,000	10,62500	1,00455	7,83593	13,41407
CON2 Se han asumido varianzas iguales	0,000	1,000	0,000	4	1,000	0,00000	,27283	-,75750	,75750
CON3 Se han asumido varianzas iguales	0,000	1,000	15,240	4	,000	1,25000	,08202	1,02227	1,47773
CON4 Se han asumido varianzas iguales	1,600	,275	2,191	4	,094	,12500	,05705	-,03341	,28341

Anexo 21. Matriz de consistencia

Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium breviflorum* (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi”. Lima - 2016.

Titulo	Problema	Objetivos	Marco Teórico	Hipótesis	Variables	Metodología
Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “Chiuchi - Chiuchi”. Lima - 2016.	¿Tendrá actividad antioxidante extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “Chiuchi - Chiuchi”?	<p>Objetivo general: Evaluar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “Chiuchi - chiuchi”</p> <p>Objetivos específicos: - identificar los principales metabolitos secundarios que se encuentran en las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “Chiuchi - chiuchi” - Evaluar los parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “Chiuchi - chiuchi” - Determinar la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “Chiuchi - chiuchi”</p>	<p><i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi - chuchi” es una especie medicinal usada tradicionalmente en dolores estomacales, bronquitis. No existen estudios de la actividad farmacológica, pero algunas especies del género <i>Clinopodium</i> presentan actividad farmacológica. Efecto antioxidante del extracto acuoso liofilizado de las hojas de <i>Satureja breviclalyx</i> Epl. (Palomino, 2005), Composición química, actividad anti-Helicobacter Pylori y antioxidante del aceite esencial de <i>Satureja breviclalyx</i> Epl. (Carhuapoma, 2007), Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de las hojas de <i>Satureja breviclalyx</i> Epl. (Mendoza, 2007), Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Satureja breviclalyx</i> Epl. en cerebro de ratas recién nacidas en un modelo de hipoxia isquemica (Toma, 2008). CG-EM de compuestos fitoactivos del aceite esencial de <i>Satureja Incana</i> (<i>Clinopodium Breviflorum</i>). (Ricardi, 2014). La actividad antioxidante de isoflavonas fitoestrogénicas (Rice, 1997).</p>	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “Chiuchi-chiuchi” tiene actividad antioxidante.	<p>Variable Independiente: Concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. “chiuchi - chiuchi</p> <p>Indicadores: Concentración de 1 ug/mL Concentración de 50 ug/mL Concentración de 100 ug/mL Concentración de 200 ug/mL</p> <p>Variable Dependiente: Actividad antioxidante</p> <p>Indicador: Decoloración del radical DPPH.</p>	<p>Tipo de investigación: Básica - experimental.</p> <p>Población: <i>Clinopodium breviflorum</i> (Benth) Govaerts. en el centro poblado de Umancocha, distrito y provincia de Tarma, departamento de Junín</p> <p>Muestra: 1 kg. de hojas.</p> <p>Metodología: La actividad antioxidante será determinada según Aguilar (2010)</p> <p>Análisis estadístico: Los datos se reportaran en tablas y gráficos. La significancia estadística será determinada mediante el análisis de varianza y la prueba de Tukey al 95 %. Se determinará la diferencia estadística entre el extracto y el patrón mediante la prueba de T-student.</p>