

**NO SALE A
DOMICILIO**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Actividad Antioxidante del Extracto
Alcohólico de Hojas de *Verbena littoralis*
Kunth (Verbena) en Iquitos, Loreto, Perú**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO

Presentado por las Bachilleres:

*Milagros Toribia Quispe Espinoza
Angie Carolina Rojas Moncada*

Asesor:

Ing. Cleto Jara Herrera

**IQUITOS – PERÚ
2013**



00 138

DONADO POR:

Milagros Toribia Quispe Espinoza y otro

Iquitos, 17 de 02 de 2014

Actividad Antioxidante del Extracto Alcohólico de Hojas de *Verbena littoralis* Kunth (Verbena) en Iquitos, Loreto, Perú

Milagros Toribia Quispe Espinoza, Angie Carolina Rojas Moncada

RESUMEN:

Introducción: *Verbena littoralis* Kunth (verbena) es una hierba perenne, cultivada y comercializada en los mercados locales de Iquitos, usada en la medicina tradicional para muchas afecciones y presenta un alto potencial antioxidante. **Objetivo:** Evaluar la actividad antioxidante del Extracto alcohólico de hojas de *Verbena littoralis* Kunth (verbena) mediante espectrofotometría utilizando como indicadores los radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). **Método:** La actividad antioxidante fue evaluada utilizando la actividad secuestradora del DPPH, actividad inhibidora de la formación del radical hidroxilo. **Resultados:** Se obtuvo un rendimiento de 1,40 %, el IC₅₀ fue 213 ± 1.80 µg/ml con un 80.2 % de máxima inhibición. **Conclusión:** Se concluye que, los metabolitos secundarios presentes en el extracto alcohólico de las hojas de *Verbena littoralis* Kunth (verbena) tienen actividad antioxidante a las dosis ensayadas.

Palabras claves: *Verbena littoralis* Kunth, verbena, actividad antioxidante, radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	3
1.1.- PROBLEMA DE INVESTIGACION	3
1.1.1.- Descripción del Problema	3
1.1.2.- Formulación del Problema	4
1.2.- JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	5
1.3.- OBJETIVOS	7
1.3.1.- General	7
1.3.2.- Específicos	7
1.4.- HIPÓTESIS	8
1.5.- DETERMINACIÓN DE VARIABLES	8
1.6.- INDICADORES	8
1.7.- OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	9

2.1.- <i>Verbena littoralis</i> Kunth - VERBENA	11
2.2.1.- Antecedentes	11
2.2.2.- Clasificación Taxonómica	12
2.2.3.- Descripción Botánica	13
2.2.4.- Fitoquímica	13
2.2.5.- Uso En La Medicina Tradicional	15
2.2.6.- Distribución Geográfica	16
2.2.- ESTRÉS OXIDATIVO	16
2.2.1.- Introducción	16
2.2.2.- Radicales Libres	17
2.2.2.1.- Fuentes de radicales libres	19
2.2.2.2.- Peroxidación lipídica	21
2.2.2.3.- Daño oxidativo a proteínas	22
2.2.2.4.- Daño oxidativo al ADN	23
2.3.- ANTIOXIDANTES	24
2.3.1.- Introducción	24
2.3.2.- Definición	24
2.3.2.1.- Glutation	25
2.3.2.2.- Superóxido dismutasas	26
2.3.2.3.- Catalasas	26
2.3.2.4.- Glutation peroxidasa	26
2.3.2.5.- Glutation reductasas	27
2.3.2.6.- Ascorbato	27
2.3.2.7.- Vitamina E	27
2.3.2.8.- Carotenoides	28
2.3.2.9.- Otros antioxidantes	29

2.3.3.- Regulación génica de enzimas antioxidantes	30
2.3.4.- Estructura y Clasificación de los Antioxidantes tipo Flavonoides	31
4.- MÉTODOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	33
2.4.1.- Introducción	33
2.4.2.- Aplicación de métodos químicos para determinar Actividad Antioxidante	35
2.4.3.- Determinación de Antocianos Totales (AT)	36
2.4.4.- Determinación De Fenoles Totales (FT)	37
2.4.5.- Actividad Antioxidante	37
2.4.5.1.- Método ABTS	37
2.4.5.2.- Método DPPH	38
2.4.5.3.- Método DMPD	39
CAPÍTULO III: MÉTODO, POBLACION, MUESTRA E INSTRUMENTOS	40
3.1.- METODOLOGÍA	40
3.1.1.- Tipo de Estudio	40
3.1.2.- Diseño del Estudio	40
3.1.3.- Diagrama de Flujo	42
3.1.4.- Procedimiento Experimental	43
3.1.4.1.- Identificación y Taxonomía de la Muestra Vegetal	43
3.1.4.2.- Procesamiento de las Muestras Botánicas	43
3.1.4.3.- Determinación de Materia Seca	43
3.1.5.- Obtención De Extractos	43
3.1.6.- Determinación del Rendimiento	44
3.1.7.- Actividad Antioxidante	44
3.1.7.1.- Inhibición del radical DPPH	44
3.1.7.2.- Inhibición de Radicales Peróxilos	46
3.1.7.3.- Concentración de Polifenoles Totales	48
3.1.7.4.- Oxidación de Proteínas (carbonilos)	49

2.3.3.- Regulación génica de enzimas antioxidantes	30
2.3.4.- Estructura y Clasificación de los Antioxidantes tipo Flavonoides	31
4.- MÉTODOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	33
2.4.1.- Introducción	33
2.4.2.- Aplicación de métodos químicos para determinar Actividad Antioxidante	35
2.4.3.- Determinación de Antocianos Totales (AT)	36
2.4.4.- Determinación De Fenoles Totales (FT)	37
2.4.5.- Actividad Antioxidante	37
2.4.5.1.- Método ABTS	37
2.4.5.2.- Método DPPH	38
2.4.5.3.- Método DMPD	39
CAPÍTULO III: MÉTODO, POBLACION, MUESTRA E INSTRUMENTOS	40
3.1.- METODOLOGÍA	40
3.1.1.- Tipo de Estudio	40
3.1.2.- Diseño del Estudio	40
3.1.3.- Diagrama de Flujo	42
3.1.4.- Procedimiento Experimental	43
3.1.4.1.- Identificación y Taxonomía de la Muestra Vegetal	43
3.1.4.2.- Procesamiento de las Muestras Botánicas	43
3.1.4.3.- Determinación de Materia Seca	43
3.1.5.- Obtención De Extractos	43
3.1.6.- Determinación del Rendimiento	44
3.1.7.- Actividad Antioxidante	44
3.1.7.1.- Inhibición del radical DPPH	44
3.1.7.2.- Inhibición de Radicales Peróxilos	46
3.1.7.3.- Concentración de Polifenoles Totales	48
3.1.7.4.- Oxidación de Proteínas (carbonilos)	49

3.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	52
3.2.1.- Lugar de Estudio	52
3.2.2.- Población en Estudio	52
3.2.3.- Muestra en Estudio	52
3.2.4.- Criterios de Selección de la Muestra Botánica	52
3.2.5.- Lugar de Muestreo	53
3.3.- INSTRUMENTOS	54
3.3.1.- Reactivos	54
3.3.2.- Equipos	55
3.3.3.- Materiales	55
3.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
CAPÍTULO IV: RESULTADOS, DISCUSION y CONCLUSION	57
4.1.- RESULTADOS	57
4.1.1.- Rendimiento en Materia Seca	57
4.1.2.- Actividad Antioxidante	58
4.1.2.1.- Inhibición del radical DPPH	58
4.1.2.2.- Inhibición de Radicales Peroxilos	60
4.1.2.3.- Concentración de Polifenoles Totales	62
4.1.2.4.- Oxidación de Proteínas	64
4.2.- DISCUSION	65
4.3.- CONCLUSION	68
4.4.- RECOMENDACIÓN	69
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	70

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen múltiples reportes que demuestran la capacidad antioxidante de plantas, frutas y vegetales que han sido utilizadas en tratamientos médicos tradicionales durante muchos años en diversas partes del mundo. La actividad antioxidante de dichas plantas se debe principalmente a compuestos no nutricionales que presentan una gran actividad biológica, tales como polifenoles, vitaminas y minerales ^{1,2}. Entre los polifenoles mayormente encontrados en los materiales vegetales estudiados se encuentran los flavonoides, isoflavonas, flavonas, quercitina, catequinas, isocatequinas y colorantes como betalaínas e indicaxantina ^{3,4,5}.

La acción antioxidante presente en estas plantas es importante debido a que puede ayudar a las personas que las consumen a combatir enfermedades provocadas por una reacción de radicales libres o especies reactivas del oxígeno, nitrógeno o hierro ⁶. Los radicales libres son moléculas con un electrón desapareado, capaces de favorecer reacciones en cadena muy dañinas para el organismo, desencadenando un fenómeno conocido como estrés oxidativo. Dicho fenómeno ha sido recientemente asociado a enfermedades tales como Alzheimer, cáncer, además de algunas enfermedades cardiovasculares, debido a mecanismos de peroxidación lipídica, daño al DNA y proteínas, entre otros ⁷⁻¹⁰.

Estudios recientes sugieren la existencia de seis especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan daño oxidativo al cuerpo humano: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales peroxilos (ROO°), radical hidroxilo (HO°), oxígeno (O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$) ⁶. Un método sencillo, fácil y rápido de llevar a cabo, desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995) para determinar actividad antioxidante de alimentos y compuestos secundarios, utiliza al radical estable 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)¹². En interacción con DPPH, los antioxidantes transfieren electrones o átomos de hidrógeno a este compuesto y así neutralizan su propiedad de radical libre ¹¹.

La característica de la reacción es un efecto decolorante sobre el DPPH de azul-violeta a amarillo¹². Una inhibición de por lo menos 50 % de la concentración de DPPH representa una buena actividad antioxidante.

La actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales de las hojas de *Verbena litoralis* Kunth (verbena) no han sido estudiados extensivamente, sin embargo este trabajo pretende recopilar la información para contribuir al conocimiento y uso de la “VERBENA”, como una alternativa que enriquezca y conlleve al uso racional de este recurso por las comunidades rurales de la región.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1.1.- Descripción del Problema

La utilización de las plantas como agentes terapéuticos en la atención primaria de la salud, se ha mantenido a lo largo del tiempo y puede afirmarse que aproximadamente el 60-80% de la población mundial todavía depende en gran parte de los tratamientos tradicionales que implican el uso de extractos de plantas o de sus principios activos.^{13 - 15}. En algunas comunidades, donde grupos étnicos utilizan la fitoterapia popular entre sus terapéuticas ancestrales, las plantas medicinales forman parte de su acervo cultural¹⁵. Asimismo, en aquellos contextos culturales, donde la población de escasos recursos económicos, tiene dificultad para recibir atención médica y a tener acceso a medicamentos, también se recurre a la medicina tradicional^{15 - 22}. Sin embargo, en la actualidad existe una necesidad urgente, en dirigir esfuerzos para el rescate y conservación de la medicina tradicional, así como inventariar el uso tradicional de las plantas con valor terapéutico, ya que está ocurriendo una rápida pérdida de este conocimiento, debido a la utilización irracional de algunas especies y a la degradación de los ambientes naturales^{24 - 26}.

Por otra parte, se está prestando atención a la utilización de técnicas cuantitativas que permitan estimar la importancia relativa de ciertas plantas medicinales, en comparación con otras, dentro del mismo contexto cultural ^{24, 27}. Estas técnicas, se basan en el consenso de los informantes como criterio cuantitativo, bajo el supuesto de que un elevado número de citas para un uso específico, es indicativo de la validación social-histórica de la relación entre la planta y el problema de salud, indicando también una mayor probabilidad de su eficacia y de la presencia de actividad farmacológica ^{27 - 29}.

El Perú, es uno de los tres países más importantes por su alta diversidad de especies³⁰. Presenta una mega diversidad rica en plantas medicinales nativas, que es uno de los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional³¹. La Amazonía peruana representa las 3/4 partes del territorio nacional, poblada por diferentes etnias poseedoras de grandes conocimientos y experiencias empíricas en la utilización de plantas para uso medicinal²⁵, en ella se han reportado 3140 especies útiles de las cuales aproximadamente 1044 especies tienen uso medicinal³².

En la región Amazónica, la literatura relacionada con la utilización de plantas como agentes terapéuticos, aún es escasa ³³. En tal sentido, la presente investigación constituye un aporte a la etnobotánica médica, pues pretende evaluar la actividad antioxidante de plantas medicinales comúnmente utilizadas por nuestros pobladores de nuestra región.

1.1.2.- Formulación del Problema

¿Tiene el extracto alcohólico de hojas de “*Verbena littoralis* Kunth” (verbena) componentes fenólicos con actividad antioxidante?

1.2.- JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La importancia de investigar especies vegetales se desprende de su uso tradicional. En efecto, la Medicina Tradicional (MT) constituye una fuente primaria para el mantenimiento de la salud. Gran parte de la MT se fundamenta en el uso de extractos vegetales o de sus componentes activos; es por esto que en la actualidad ha tomado mucha fuerza el estudio de su respectiva actividad biológica, especialmente antioxidante luego de descubrir que muchas enfermedades se presentan, en forma asociada, a estados de estrés oxidativo ^{34 - 36}.

Numerosos estudios en el mundo, muestran que las plantas son fuente importante de compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos, carotenoides, etc.). El Perú, es uno de los países más importantes en Latinoamérica por su alta diversidad de especies botánicas ³⁷. La Amazonía peruana representa las 3/4 partes del territorio peruano, que posee una sociedad étnica de grandes conocimientos y experiencias empíricas en la utilización de las plantas para la medicina tradicional ³³. Sin embargo, a pesar de ser difundido, se requiere hacer más extensivo de su conocimiento para el beneficio de todo el país, por medio de técnicas de investigación moderna y reconocidas, evaluándose científica y racionalmente estas especies ³⁷, es por ello que la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP) a través de su Oficina de Investigación establece Lineamiento de Política de Investigación en busca de potenciar el conocimiento ancestral de nuestra amazonia loreana estudiando especies de amplia distribución en el campo de la medicina tradicional en general.

La creación de una línea de productos fitofarmacéuticos incentivaría la actividad empresarial con beneficios directos e indirectos para nuestra región ³³. Por ejemplo plantas con alta actividad antioxidante capaces de inhibir la tasa de oxidación de los radicales libres, permitiendo retardar el proceso de envejecimiento, crecimiento anormal de células (cáncer), enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, diabetes, reumatismo y otros ^{7 - 10}. Los radicales libres DPPH (2,2'-difetil-1-picrilhidrazilo) y peroxilos son indicadores para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa ³⁷.

Es normal observar en los poblados rurales y escasamente en los huertos familiares urbanizados, la siembra de especies botánicas oriundas de la Amazonía, pero, con mayor frecuencia especies introducidas, principalmente para usos medicinales. *Verbena littorales*, perteneciente a la familia Verbenaceae ^{38, 39} llamada comúnmente “ verbena” es una hierba perenne de cultivo relativamente fácil y se encuentra introducida en el Perú, también cultivada y comercializada en el mercado local de Iquitos, usada en la medicina tradicional para afecciones gastrointestinales y respiratorias, diabetes, desórdenes menstruales, antitusiva, antiespasmódica, diurética, emenagogo, emoliente, estimulante, expectorante, febrífugo, sedante, sudorífica y tónica ^{33, 40}.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de *Verbena littoralis* Kunth (verbena) mediante métodos espectrofotométricos.

1.3.- OBJETIVOS

1.3.1.- General

Determinar la capacidad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de verbena - *Verbena littoralis* Kunth - utilizando espectrofotometría.

1. 3.2.- Específicos

- Determinar la capacidad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de verbena - *Verbena littoralis* Kunth – mediante el método espectrofotométrico utilizando como indicadores los radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de verbena - *Verbena littoralis* Kunth – mediante el método espectrofotométrico del secuestro del radical peroxilo.
- Determinar la concentración de polifenoles totales en el extracto alcohólico de hojas de verbena - *Verbena littoralis* Kunth.
- Evaluar la capacidad del extracto alcohólico de hojas de verbena - *Verbena littoralis* Kunth – de proteger proteínas contra la acción de oxidantes.

1.4.- HIPÓTESIS

El extracto alcohólico obtenido de hojas de verbena - *Verbena littoralis* Kunth **SI tienen** compuestos fenólicos con capacidad antioxidante utilizando espectrofotometría.

1.5.- DETERMINACIÓN DE VARIABLES

1.5.1.- Variable Independiente (X)

- Extracto alcohólico obtenido de hojas de verbena - *Verbena littoralis* Kunth

1.5.2.- Variable Dependiente (Y)

- Actividad Antioxidante

1.6.- INDICADORES

1.6.1.- Independiente (X): La concentración depende del tipo de prueba.

- Secuestro de radical DPPH: (10, 30, 100, 300, 1000 $\mu\text{g/ml}$)
- Secuestro de radical peroxilo: (10, 30, 100, 300, 1000 $\mu\text{g/ml}$)
- Polifenoles totales: 20 mg/ml
- Oxidación de carbonilos: 20 mg/ml

1.6.2.- Dependientes (Y): Grado de Absorbancia dependiendo el tipo de prueba.

- Secuestro de radical DPPH: $\lambda_{515 \text{ nm}}$
- Secuestro de radical peroxilo: $\lambda_{414 \text{ nm}}$
- Polifenoles totales: $\lambda_{700 \text{ nm}}$
- Oxidación de carbonilos: $\lambda_{370 \text{ nm}}$

1.7.- OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Cuadro N° 1: VARIABLE INDEPENDIENTE

Variable Independiente	Definición conceptual	Indicador	Índices	Definición operacional	Escala y tipo de variable
Extracto alcohólico de hojas de <i>Verbena littoralis</i> Kunth “verbena”.	Material vegetal, que mediante un proceso de mezclas: etanol al 70 % se obtiene el extracto alcohólico, extrayendo todos los metabolitos solubles en ella sin hacer variar su composición química.	Las hojas de <i>Verbena littoralis</i> Kunth “verbena”. Colectadas a las primeras horas de la mañana, entre las 8 a 10 am, con una cantidad de 2 kg.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Especie recolectada ▪ Cantidad usada ▪ Hora de la colecta ▪ Parte utilizada ▪ Temperatura de secado ▪ Solvente utilizado 	La especie vegetal secada y pesada, puesto en contacto con etanol por 8 horas a temperatura ambiente.	<p>Escala nominal</p> <p>Tipo de variable cualitativa y/o cuantitativa</p>

Cuadro N° 2: VARIABLE DEPENDIENTE

Variable Dependiente	Definición conceptual	Indicador	Índices	Definición operacional	Escala y tipo de variable
Actividad Antioxidante	La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, se asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de éstos; por tanto nos enfocamos a monitorear que el extracto alcohólico capture radicales o inhiba su formación.	Grado de Absorbancia en el medio de reacción versus el tiempo que presenta las muestras inoculadas expuestas a los diferentes ensayos de actividad antioxidante.	<p>Diferentes longitudes de ondas por el cual se medirá la absorbancia, de acuerdo al tipo de ensayo:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Secuestro de radical DPPH: $\lambda_{515 \text{ nm}}$ ▪ Secuestro de radical peroxilo: $\lambda_{414 \text{ nm}}$ ▪ Polifenoles totales: $\lambda_{700 \text{ nm}}$ ▪ Oxidación de carbonilos: $\lambda_{370 \text{ nm}}$ 	Consiste en cuantificar la reducción de la absorbancia del radical por antioxidantes presentes en el extracto alcohólico a diferentes longitudes de onda, dependiendo el tipo de ensayo a realizar.	<p>Escala nominal.</p> <p>Tipo de variable cualitativa y/o cuantitativa</p>

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.- *Verbena littoralis* Kunth- VERBENA

2.2.1.- Antecedentes

La familia Verbenaceae comprende aproximadamente 100 géneros de distribución tropical y subtropical ⁴¹, y dentro del género *Verbena*, con aproximadamente 250 especies distribuidas preferentemente en las regiones tropicales y templadas de América. *Verbena littoralis* Kunth, es conocida comúnmente como *garbancito del campo*.

Se han aislado e identificado según Umaña-Rojas (1990), algunos constituyentes químicos de la parte aérea de *Verbena littoralis*, del extracto alcohólico acuoso residual, obtenido por partición previa del extracto alcohólico original con diclorometano, se aislaron dos iridoides conocidos como verbenalín y brasósido, reportados en *Verbena officinalis* y *Verbena brasiliensis*, respectivamente ⁴².

Li *et al.* (2003 a, b) y Castro-Gamboa (2004) reporta la presencia de esteroides, triterpenos, y chalconas bioactivas ⁴³⁻⁴⁵.

Castro-Gamboa (2004). Se presenta el aislamiento e identificación de 2 nuevos metabolitos secundarios de naturaleza terpénica tipo iridoidal, presentes en el extracto clorofórmico obtenido de la parte aérea en *Verbena littoralis* Kunth, *6S-hidroxi-8S-metil-4-metilen-hexahidro-ciclopenta[c]piran-3-ona* y *6S,9S-dihidroxi-8S-metil-4-metilen-hexahidro-ciclopenta[c]piran-3-ona*, cuyo potencial biológico asociado a iridoides tenga actividad bactericida así como levaduras, relajación de peristaltismo intestinal y actividad antioxidante ³².

Souza *et al.* (2005). Reporta presencia de flavonoides, antracenosidos, saponinas hemolíticas, taninos catéquicos y carotenóides. En menor concentración presenta aceites volátiles, cumarinas y mucilagos. No reporta presencia de alcaloides y taninos gálicos ⁴⁶.

Jaramillo *et al.* (2008) mediante los métodos DPPH y β -CLAMS muestra que los tallos de *Verbena littoralis* tienen la mejor actividad **antioxidante interruptora** ⁴⁷.

2.2.2.- Clasificación Taxonómica

Según el sistema de clasificación de Adolf Engler, modificado por Hans Melchior (1964) ⁴⁸, su clasificación taxonómica es la siguiente:

REINO	: PLANTAE
DIVISIÓN	: ANGIOSPERMAE
SUB DIVISION	:MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	: ASTERIDAE
ORDEN	:LAMIALES
FAMILIA	: VERBENACEAE
GÉNERO	: <i>Verbena</i>
ESPECIE	: <i>littoralis</i>
NOMBRE CIENTIFICO	: <i>Verbena littoralis</i> Kunth ^{38,49}
NOMBRE VULGAR	: Verbena(Perú), gervãozinho-do-campo (Brasil) ³⁵

2.2.3.- Descripción Botánica

Verbena littoralis se caracteriza por su tallo cuadrangular, hojas ovadas, ovado-lanceoladas, lanceoladas, espatuladas o lineares, de base afilada, con pecíolo corto, y también por sus inflorescencias que son característicamente largas y muy poco densas cuando se compara con las especies con las cual puede ser confundida eventualmente (*Verbena bonariensis* L. y *V. brasiliensis* Vell.)⁵⁰.

Se reconoce, flores pequeñas de alrededor de 4 mm, lilas claras, que no son fuertemente bilabiadas, en una espiga delgada (hasta 6 mm en diámetro), brácteas de la inflorescencia alrededor de 2/3 tan largas como el cáliz, hojas generalmente simples (a veces un poco trilobadas) y normalmente aserradas en la mitad superior de la hoja, con forma variable pero generalmente delgadas y con el tubo de las flores (corolas) con pelos internos y externos^{49,51-53}.

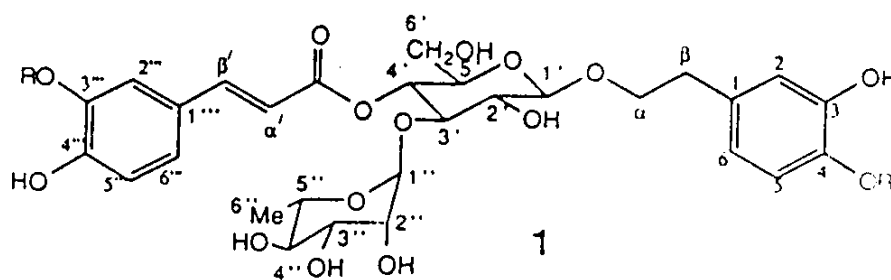
2.2.4.- Fitoquímica

El rendimiento del extracto seco fue de 3,03% y 1,42% para el extracto acuoso y etanólico, respectivamente. Los extractos presentaron flavonoides, cardioativos, antracenosidos, saponinas hemolíticas, taninos catéquicos y carotenóides. En menor concentración fue detectada a presencia de aceites esenciales, cumarinas y mucilagos. No se observó presencia de alcaloides y taninos gálicos⁴³⁻⁴⁶.

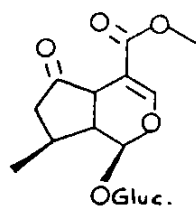
La información preliminar etnobotánica y fitoquímica informa sobre *Verbena littoralis* Kunth fueron publicadas y varios constituyentes como dímeros de litorachalcona (2',4',3'',2''',4''-pentahidroxi-4-O-4''-tetrahidrobichalcona), el cual se aisló de la parte aérea de *Verbena littoralis* Kunth, además e encontró 2 flavonoides conocidos 4'-hidroxiwogoninay 8,3'-dimetoxi-5,7,4'-trihidroxi flavona^{43,44}.

También se aisló compuestos iridoidos, 6*S*-hidroxi-8*S*- metil - 4 - metilene - hexahidro - ciclopenta[*c*]piran - 3-onay 6*S*,9*S*- dihidroxi-8*S* - metil - 4 - metilene - hexahidro-ciclopenta[*c*]piran - 3-ona, fueron aislado de la parte aéreas de *Verbena litoralis*. Los iridoidos presentaron actividad antioxidante contra 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)⁴⁵.

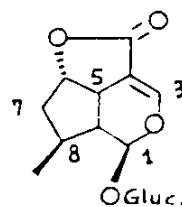
De las hojas de *Verbena litoralis* HBK también se aislaron sustancias neurológicamente activas, como verbenachalcona ⁵⁴, litoralisona ⁵⁵, litorachalcona ⁴⁴, cafeoilglicósido, verbascosido (1), y dos compuestos de naturaleza iridoidal: verbenalín (2) y Brasósido (3)⁵⁶.



R = H



2



3

2.2.5.- Uso En La Medicina Tradicional

Verbena litoralis Kunth es comúnmente usado tradicionalmente en Centro y Sur-América contra diarrea, fiebre, desordenes gastrointestinal y algunas enfermedades de transmisiones sexuales ^{56 - 58}.

Esta especie es una hierba popularmente utilizada al Sur de Brasil como desintoxicante del organismo, en diarreas y desordenes gastrointestinales, y también por sus propiedades antifebriles. Además de eso, recientemente han sido publicados trabajos sobre actividad antimicrobiana, antioxidante y sobre la actividad activadora del factor de crecimiento neural presentada por compuestos encontrados en esa planta ^{43 - 45, 59}.

Carrillo-Rosario *et al.* (2006) reporta el uso tradicional, mediante la metodología TRAMIL, a la decocción de las ramas de *Verbena litoralis* "Verbena" administradas vía oral para gripe, Tos y dolor de cuerpo⁶⁰. En diferentes contextos culturales, como Argentina, *Verbena litoralis* H.B.K., son utilizadas para las misma dolencia ^{61, 62}.

La parte aérea de la *Verbena litoralis* HBK fma. albiflora (syn.: *Verbena litoralis* var. Albiflora Moldenke) ⁶³ es usado como antihelmitico y antirreumático por gente que vive en el callejón de Huaylas ⁴⁰. Esta planta es usada en Costa Rica para el tratamiento de diarreas, se encontraron presencia de cafeoilglicósido e iridoidalglicósidos⁵⁶.

Recientemente se han reportados propiedades analgésicas y antimicrobiana para el verbascosido ⁶⁴(1) y han sido estudiados algunos iridoides como potenciales agentes antimicrobiales ⁶⁵ y antitumorales ⁶⁶. Estos estudios han demostrado que los iridoides, como glucósido, no tiene actividad alguna, sin embargo, bajo hidrolisis enzimática potencia la actividad antimicrobiana y antitumoral. También han sido publicados trabajos sobre la actividad antimicrobiana, antioxidante y también sobre la actividad activadora del factor de crecimiento neuronal presentada por compuestos encontrados de esta planta ^{43 - 55, 59}.

2.2.6.- Distribución Geográfica

Probablemente es nativa de Sudamérica⁶⁷, la familia Verbenaceae comprende aproximadamente 100 géneros de distribución tropical y subtropical⁶⁸, y dentro de este género *Verbena*, con aproximadamente 250 especies distribuidas preferentemente en las regiones tropicales de América. *Verbena litoralis* Kunth, es conocida comúnmente como gervãozinho-do-campo. Esta planta vegeta en la región andina de Chile o Perú, Guayanas, Venezuela, Argentina⁶⁹, en las regiones Sudeste y Sul de Brasil, también, puede ser encontrada eventualmente en Australia y África.

2.2.- ESTRÉS OXIDATIVO

2.2.1.- Introducción

Se suele admitir que los primeros experimentos controlados que demostraron el efecto tóxico del oxígeno sobre los organismos animales fueron realizados por *Paul Bert* a finales del siglo pasado. Desde entonces, y a pesar de la gran acumulación de descripciones sobre los efectos nocivos del oxígeno a muchos niveles de observación, durante mucho tiempo se careció de teorías que pudiesen explicar su toxicidad. El primer mecanismo general propuesto consistió en suponer que el oxígeno inactivaba enzimas que presentaban grupos tiólicos esenciales en su forma reducida, -SH. Aunque este mecanismo está claro, hoy en día no puede explicar más que una pequeña parte de los procesos celulares alterados por el oxígeno. Sin embargo, uno de los principales sistemas protectores frente a este tipo de inactivación es el tripéptido glutatión, una sustancia importante en la defensa frente a los radicales libres⁷⁰.

En la naturaleza casi todo es oxidado por el oxígeno, las reacciones de óxido-reducción, como la fotosíntesis y el metabolismo aeróbico de eucariotas y muchos procariotas, son muy importantes, puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas. Pero este oxígeno que es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada

de radicales libres de oxígeno (RLO) que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc). Este proceso se denomina estrés oxidativo.

En la actualidad numerosas enfermedades han sido vinculadas a estrés oxidativo. Se tienen evidencias que permiten postular mecanismos a través de los cuales se produce, por ejemplo, la aterosclerosis. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes está asociado a la fisiopatología de aterosclerosis, cáncer, porfirias, cataratas, sobrecarga de hierro y cobre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otras demencias, diabetes, malaria, artritis, enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas y otras. Asimismo, el proceso biológico del envejecimiento se acelera en relación directa con la magnitud del estrés oxidativo

Para evitar el exceso de radicales libres han aparecido una serie de defensas antioxidantes. Unas son endógenas, como las enzimas antioxidantes y el glutatión, y otras exógenas, como las vitaminas E y C, los carotenoides, y se pueden obtener de una dieta equilibrada.

2.2.2.- Radicales Libres

Hoy sabemos que la mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que la utilización del oxígeno por las células da lugar a la generación de radicales libres. Un radical libre es una molécula o átomo que posee un electrón desapareado en su orbital más externo. La teoría de la toxicidad del oxígeno por radicales libres fue propuesta por primera vez por la investigadora argentina *Rebeca Gershman* en 1954⁷¹.

La vía univalente de reducción del oxígeno (Figura 1) da lugar a tres formas incompletamente reducidas del oxígeno entre éste y el agua, el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, que no es un radical pero puede generarlos, y el radical hidroxilo.

O₂, VIA UNIVALENTE

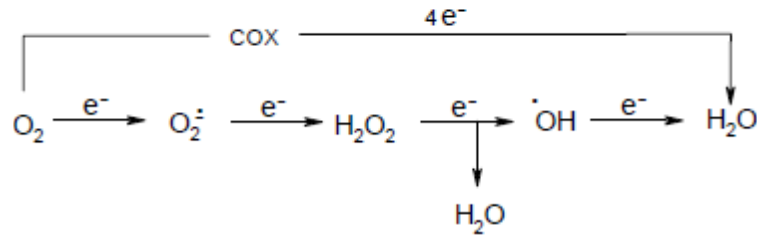


Figura N° 1. En la vía univalente de reducción del oxígeno se forman especies activas incompletamente reducidas por adición secuencial de electrones de uno en uno en el siguiente orden: radical superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y el radical hidroxilo (OH[•]). En cambio, la adición de cuatro electrones al oxígeno, como ocurre en la citocromo oxidasa mitocondrial (COX), permite su reducción a agua sin que se liberen radicales de oxígeno.

El radical superóxido carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas. Sin embargo, en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación del radical superóxido y del peróxido de hidrógeno en la reacción de *Fenton* o *Haber-Weiss* da lugar a radical hidroxilo (Figura 2).

HABER-WEISS, FENTON

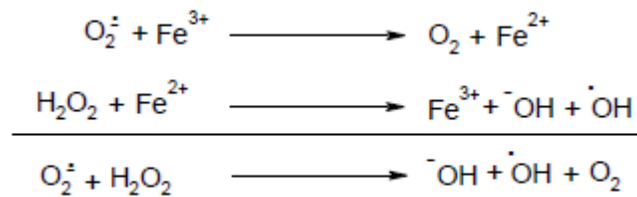


Figura N° 2. En la reacción de *Haber-Weiss* o de *Fenton*, el superóxido reduce el hierro férrico a ferroso, y éste se reduce monoeléctricamente al peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación del radical hidroxilo, altamente reactivo. El hierro no se consume en el proceso, actuando como catalizador del mismo. El cobre puede substituir al hierro oscilando entre las valencias +2 y +1.

La presencia de peróxido de hidrógeno en las células a concentraciones muy superiores a las del radical superóxido, convierte a aquel en una especie con gran capacidad de generar daño oxidativo a pesar de no ser un radical libre y es por ese motivo que se le clasifica dentro del grupo de reactivos biológicos llamados especies reactivas de oxígeno (EROs). El radical hidroxilo es considerado hoy el principal indicador del ataque a todo tipo de macromoléculas, aunque existen otros iniciadores propuestos, y es una de las especies más reactivas del organismo. Puede reaccionar inespecíficamente con casi cualquier molécula a 2-3 diámetros moleculares de su lugar de formación. Debido a su reactividad, su difusión a larga distancia está disminuida y sería el peróxido de hidrógeno el responsable del daño oxidativo entre fracciones subcelulares. Se ha demostrado generación de peróxido de hidrógeno y radical superóxido en casi todas las fracciones celulares. La presencia de metales de transición de la reacción de Fenton convierte al hierro y al cobre en agentes esenciales como catalizadores del daño oxidativo.

Por otra parte, si al oxígeno basal (forma triplete) se le suministra energía suficiente, sufre una inversión de espín, lo que le confiere una gran reactividad (forma singlete). Las reacciones oxidativas en las que interviene el oxígeno singlete se manifiestan por la emisión espontánea de quimioluminiscencia de baja intensidad en todo tipo de células.

2.2.2.1.- Fuentes de radicales libres

En los tejidos sanos la fuente principal de radicales libres son las mitocondrias debido a que son las responsables del 80% de consumo del oxígeno celular y a que los radicales libres en los sistemas biológicos proceden, en último término, del metabolismo del oxígeno por vía univalente. De los cuatro complejos responsables del transporte electrónico en la cadena respiratoria, se ha observado producción de radicales libres en mitocondrias aisladas en el Complejo I y en el Complejo II ^{72,73}. En el caso del Complejo I los generadores de radicales libres son los centros hierro-sulfurados, mientras que en Complejo

II pueden ser la semiquinona o el citocromo b^{73, 74}. Entre las posibles consecuencias de la producción mitocondrial de radicales libres está el Parkinson⁷⁴, el proceso de envejecimiento⁷⁵ caracterizado por un acusado daño del ADN mitocondrial, lo que podría contribuir a la acumulación de deleciones y mutaciones encontradas en los tejidos post-mitóticos de este ADN en los individuos viejos.

La segunda fuente principal de radicales libres son los fagocitos del sistema inmune. Al encontrarse con un agente infeccioso, éstos experimentan un aumento acusado de consumo de oxígeno (estallido respiratorio) en la membrana plasmática donde el complejo enzimático NADPH oxidasa, se activa y produce radicales de oxígeno a partir de oxígeno basal.

Estos RLs contribuyen de forma acusada a la destrucción o inactivación del agente infeccioso de modo directo. Aunque esto es útil para el organismo, en muchos procesos patológicos se produce infiltración secundaria de estas células del sistema inmune en los tipos de cánceres, lo que podría deberse al daño prolongado por células fagocíticas en el material genético del tejido órganos afectados. Así, se ha propuesto que el daño oxidativo durante la hiperóxia, el síndrome de isquemia-reperfusión, el ejercicio, la endotoxina en el choque séptico, la esclerosis múltiple, el humo del tabaco o las fibras de asbestos, puede deberse a la producción excesiva de RLs por células fagocíticas. Además, la inflamación crónica está asociada con mucho inflamado⁷⁶.

De todos modos, cuando los niveles de RLs se controlan adecuadamente, estos también intervienen en procesos útiles para el individuo como la defensa frente a la infección, la destoxicación de xenobióticos, la reducción de ribonucleósidos, las acciones de hidrolasas y dioxigenasas, la carboxilación del glutámico o la señalización celular por óxido nítrico (un radical libre).

2.2.2.2.- Peroxidación lipídica

Todo proceso de peroxidación de macromoléculas ocurre en tres etapas bien definidas: iniciación, propagación y terminación. En la peroxidación lipídica la iniciación consiste en la extracción de un electrón de un átomo de carbono contiguo a un doble enlace por parte de un iniciador como el radical hidroxilo (Figura 3).

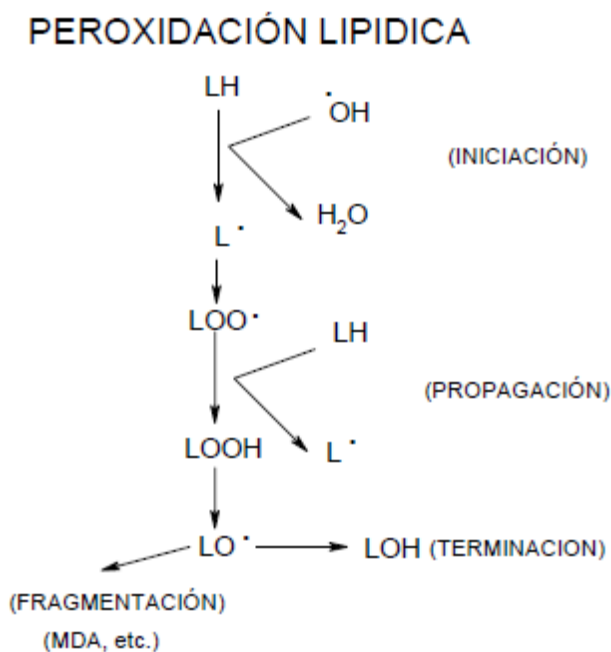


Figura N° 3. Esquema resumen de las reacciones principales de la peroxidación lipídica. LH = lípido inactivo; LO = radical lipídico alquilo; LOO = radical lipídico peroxilo; LOOH = hidropéroxido lipídico; LO = radical lipídico alcoxilo; LOH = Hidróxido lipídico (estable).

Los ácidos grasos poliinsaturados son los más sensibles al ataque por radicales libres debido a la posesión de dobles enlaces. Se forma así un radical alquilo ($\text{L}\cdot$) que se convierte en peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) por adición de oxígeno y que en varias reacciones, como su reducción a hidropéroxido (LOOH), puede dar lugar a la propagación de la peroxidación al generar otro radical alquilo ($\text{L}\cdot$) en el ácido graso contiguo de la membrana.

La propagación explica que una sola iniciación pueda dañar un gran número de moléculas. La reacción se termina por la reacción de radicales contiguos, dando lugar a puentes cruzados (L-L), o mediante la fragmentación del ácido graso en gran número de productos como el malondialdehído (el marcador más ampliamente utilizado), el 4-hidroxinonanal o alcanos que aparecen en el aire suspirado (base del único método de medida no invasivo)⁷⁷.

El hierro es un estimulador de la peroxidación lipídica, pudiendo participar en las reacciones de iniciación o propagación. Se estimula mediante concentraciones bajas de un reductor como ascorbato (peroxidación no enzimática), o tiene lugar con la participación de NADPH como reductor y de cadenas de transporte electrónico como la microsomal (peroxidación enzimática). También puede ser estimulada por el oxígeno singlete, ozono o radicales halógeno. *In vivo*, la medida de hidroperóxidos de fosfolípidos se ha realizado por detección quimioluminiscente post-columna tras separación mediante HPLC^{78,79}.

2.2.2.3.- Daño oxidativo a proteínas

Las proteínas pueden ser atacadas incluso a nivel de estructura primaria. Muchos estudios han dado lugar a la conclusión de que el peróxido de hidrógeno y las formas reducidas del hierro y el cobre, generados por oxidasas de función mixta, interaccionan en los sitios de unión de estos metales a las proteínas, produciendo RLs que oxidan inmediatamente a los residuos de aminoácidos vecinos. Este proceso se considera específico del sitio de unión del metal. Los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo son His, Pro, Arg, Lys y Cys. Como consecuencia se forman grupos carbonilo o se producen conversiones de unos aminoácidos en otros. La medida del daño oxidativo en muestras biológicas se suele realizar mediante la valoración de grupos carbonilo por barrido espectrofotométrico o mediante isótopos.

2.2.2.4.- Daño oxidativo al ADN

Los RLs reaccionan con los componentes del ADN mediante adición o abstracción. En presencia de oxígeno, se forman radicales peroxilo por adición del mismo a las bases o al azúcar del ADN. Las reacciones posteriores de los radicales formados en el ADN dan lugar a más de una veintena de productos. También se forman puentes cruzados ADN-proteína. Según los estudios liderados por *Bruce Ames*⁷⁶, el daño oxidativo al ADN y la mitogénesis son dos causas importantes del cáncer.

En el caso del ADN nuclear se cree que el hierro juega un papel importante en el daño oxidativo, al ser uno de los contraiones de la macromolécula. Si el peróxido de hidrógeno llega al núcleo, reacciona con el hierro ferroso, generando radical hidroxilo que ataca en ese mismo lugar al azúcar o la base, produciendo roturas de la hebra y modificaciones en las bases. Estas lesiones pueden dar lugar a mutaciones y a fenómenos carcinogénicos.

El daño oxidativo al ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear⁸⁰. Esto se debe, sobre todo, a la cercanía de dicho ADN al lugar principal de generación de RLs en la célula sana, la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Además, carece de histonas y poliaminas que puedan protegerlo y su capacidad de reparación es mínima en relación con la del ADN nuclear. Como consecuencia, las deleciones y mutaciones son mucho más frecuentes. De todas formas, la mayor parte de los genes se encuentran en el núcleo, no en la mitocondria.

El problema actual es la falta de conocimiento acerca del mecanismo por el cual el daño oxidativo se transmite desde las mitocondrias hasta el núcleo. En cualquier caso, se sabe que en la membrana nuclear existe también una cadena de transporte electrónico de función fisiológica incierta que también genera RLs, aunque de modo mucho menos intenso que en las mitocondrias.

2.3.- ANTIOXIDANTES

2.3.1.- Introducción

El hecho de que siempre exista un cierto nivel de daño oxidativo supone que una fracción de los RLs generados en el organismo son capaces de alcanzar sus dianas moleculares antes de que puedan ser eliminados por mecanismos antioxidantes. Sin embargo, la mayor parte de los radicales libres son eliminados mediante antioxidantes. Los antioxidantes son aquellas sustancias presentes a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas) que retarda o previene su oxidación. El antioxidante, al chocar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. De hecho, el mantenimiento de la homeostasis redox del tejido sólo es posible mediante un equilibrio entre la intensidad de generación y la intensidad de eliminación de RLs. Así, cuando aumenta la producción de RLs, debido a causas exógenas, o endógenas como puede ocurrir en el ejercicio o el hipermetabolismo, se puede dar una regulación compensadora a la alza en las defensas antioxidantes. Cuando este equilibrio entre generación y destrucción de RLs se altera, la célula entra en un proceso degradativo patológico.

2.3.2.- Definición

El término antioxidante originalmente se refiere en específico a la especie química que previene el consumo de oxígeno molecular. El posible mecanismo de acción fue estudiado por *Moreau y Dufraisse*(1926) quienes reconocieron que una sustancia con actividad antioxidante es como si la sustancia por si misma fuera el objetivo de la oxidación. El mecanismo de como la vitamina E previene el proceso de peroxidación en lípidos conduce a la comprensión de los antioxidantes como agentes reductores que evitan la reacción oxidante atrapando las especies reactivas antes que causen daño a las células ⁸¹. En este sentido se considera que los antioxidantes son necesarios para prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), algunas de las cuales son radicales libres.

Un radical libre es una especie que contiene uno o más electrones desapareados, es decir, electrones solitarios en un orbital atómico o molecular ⁸². Las especies como el peróxido de hidrogeno H₂O₂ o radicales libres como el hidroxilo OH• son moléculas inestables y altamente reactivas que pueden dañar las células por reacciones químicas en cadena tales como la formación de aductos de DNA que podrían causar cáncer o muerte celular.

Todas las células contienen por lo tanto, antioxidantes que sirven para reducir o prevenir este daño. Los antioxidantes son especialmente importantes en la mitocondria de células eucarióticas pues el oxígeno como parte del proceso de generación de energía, produce especies reactivas oxigenadas ^{83,84}.

Existen diversos sistemas antioxidantes celulares:

2.3.2.1.- Glutation:

Se trata de un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina que constituye el principal tiol no proteico celular. Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiólico de la cisteína. Puede actuar como antioxidante en reacciones enzimáticas (como la de la GPx) o no enzimáticas. Protege a la oxidación de los grupos –SH esenciales de las proteínas.

También puede reaccionar con RLs como el superóxido o el hidroxilo. Al reaccionar con oxidantes el GSH se oxida a GSSG, que es muy tóxico para las células, por lo que éstas tienden a mantener una relación GSSG/GSH hepática enormemente baja, mediante la reducción del GSSH a GSH con la glutatión reductasa o exportándolo activamente al exterior celular. También se ha descrito la capacidad del GSH para realizar reacciones de extinción del O₂ singlete, devolviéndolo a su estado basal no reactivo (triplete).

2.3.2.2.- Superóxido dismutasas:

Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas que eliminan el radical superóxido. Durante la reacción una molécula de superóxido se oxida hasta O_2 , mientras la otra se reduce a H_2O_2 . Por tanto, más que eliminar formas activas de oxígeno, esta enzima transforma una en otra. En animales existen en 2 formas: la SOD Cu-Zn que abunda en el citoplasma, y la SOD Mn, que abunda en las mitocondrias.

2.3.2.3.- Catalasas:

Las catalasas catalizan dos tipos de reacciones. En la reacción catalítica se produce la dismutación de dos moléculas de H_2O_2 en dos moléculas de H_2O . En la reacción peroxidativa se utiliza un sustrato inespecífico como reductor para transformar una sola molécula de H_2O_2 en dos de H_2O . Es decir, en este caso la enzima actúa como una peroxidasa.

La enzima tiene una K_m y una V_{max} muy altas por el H_2O_2 , lo que la convierte en principio en más adecuada para eliminar el H_2O_2 celular cuando su concentración sube mucho. Se encuentra en el citosol.

2.3.2.4.- Glutation peroxidasa:

Las glutacion peroxidasas (GPx) eliminan hidroperóxidos, tanto orgánicos (ROOH) como inorgánicos (H_2O_2), utilizando glutatión reducido (GSH) como reductor. Está presente tanto en el citosol como en las mitocondrias. No pueden trabajar en la fracción lipídica, por lo que eliminarían los ROOH lipídicos, reduciéndoles a sus formas estables (ROH), sólo tras la liberación previa del ácido graso peroxidado desde la membrana al citosol por parte de las fosfolipasas.

2.3.2.5.- Glutation reductasas:

Las glutatión reductasas reducen una molécula de glutatión oxidado (GSSG) a dos de GSH a expensas de equivalentes de reducción en forma de NADPH. Presentan flavina adenina dinucleótido (FAD) como coenzima. Están presentes en el citosol y las mitocondrias.

Además existen muchos de los compuestos antioxidantes provienen de fuentes naturales como son los granos, frutas y algunos vegetales; mientras que algunos otros son sintetizados artificialmente como las vitaminas C, E, carotenos y ácidos fenólicos ^{85,86}.

2.3.2.6.- Ascorbato

Los antioxidantes de bajo peso molecular son también muy importantes para la homeostasis redox. El ascorbato puede existir en tres estados redox: ascorbato (reducido), radical semidehidroascorbato (AFR) y dehidroascorbato (DHA). Puede eliminar radical superóxido, radical hidroxilo o el H₂O₂, y también extinguir O₂singlete ⁸⁸. Según algunos autores, el carácter preventivo ampliamente aceptado de las dietas ricas en frutas y verduras frente a muchos cánceres podría deberse a su alto contenido en antioxidantes como el ascorbato.

2.3.2.7.- Vitamina E

En la naturaleza existen ocho sustancias con actividad de vitamina E, el d- α , d- β , d- γ , y el d- δ -tocoferol y los correspondientes tocotrienoles. De ellos, el α -tocoferol es el que muestra más actividad biológica. La vitamina E suele ser el principal antioxidante de las membranas en las células animales. Su actividad antioxidante se debe al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol.

Su solubilidad en la membrana le permite la accesibilidad directa a radicales peroxilo (ROO.) que serían reducidos a hidroperóxidos, los cuales serían entonces degradados hasta alcoholes por la GPx. Esta reacción impide que los radicales peroxilo oxiden otra sustancia orgánica, es decir, impide la reacción de propagación, que es la principal causante de la peroxidación lipídica. De otra manera, también es posible la reacción con los radicales alcoxilo (RO.), lo que podría ser de utilidad en caso de que la reacción anterior no fuera eficiente.

En ambos casos, la vitamina E se convierte en radical tocoferilo (VitEO.), pero el sistema sólo es funcional si la forma reducida de la vitamina E (VitEOH) se regenera a la misma velocidad con la que se degrada. Se ha propuesto que este papel regenerador podría correr a cargo del ascorbato, ocurriendo la interacción en la interfase citosol-membrana.

La vitamina E es especialmente importante en orgánulos, tejidos y dietas que contienen niveles relativamente altos de ácidos grasos poliinsaturados, para evitar su degradación oxidativa.

2.3.2.8.- Carotenoides

Junto con la vitamina E, los carotenoides son los antioxidantes principales de las membranas biológicas. Tiene una gran capacidad para dar lugar a reacciones de extinción de O₂ singlete y también pueden reaccionar con RLs. Aparecen en cantidades apreciables en los tejidos y en el plasma. Los más importantes son el α- y β-caroteno, la luteína, el licopeno, la zeaxantina y la criptoxantina. El β-caroteno y los tocoferoles se protegen mutuamente frente a la pérdida por oxidación y muestran efectos sinérgicos en microsomas^{89,90}.

2.3.2.9.- Otros antioxidantes

Existen otras muchas sustancias con capacidad antioxidante que pueden producirse en el organismo o provenir de la dieta, como el ácido úrico, la bilirrubina, la transferrina, la ferritina, los quelantes de iones metálicos, proteínas con actividad ferroxidasa, polifenoles, flavonoides, aminos aromáticos o el ácido lipóico. Entre los antioxidantes fenólicos potentes presentes en el mundo vegetal se encuentran la curcumina, las catequinas, la quercetina, el kaempferol o el ácido caféico. La ubiquinona (coenzima Q) se ha mostrado que actúa como antioxidante⁹¹.

Para que una sustancia sea un antioxidante *in vivo*, la reacción debe darse a las concentraciones que ocurren en los tejidos y el líquido extracelular. Eso se cumple en el caso de los antioxidantes endógenos.

Existe un gran número de antioxidantes sintéticos. Algunos de ellos que cabe mencionar son: N-acetilcisteína, ésteres de GSH, probucol, nitecapona, penicilamina, aminosalicilatos, nitróxidos o el tamoxifeno.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos encontrados en las plantas como frutas y vegetales, que son excelentes antioxidantes. Comúnmente se encuentran también en el té, principalmente té verde, en el vino y en las frutas que fueron cosechadas hasta su maduración se encuentran gran cantidad de flavonoides, carotenoides, licopenes, todos con una potente acción antioxidante.

En el caso de los antioxidantes sintéticos de tipo bifenol la acción se realiza sobre el radical libre obteniendo la quinona correspondiente neutralizando el radical (Figura 4) ⁹². Estudios computacionales indican que el bifenol adopta una geometría *cisoid* con los dos anillos aromáticos formando un ángulo dihedro de 50° donde los dos grupos OH están estabilizados entre ellos a través de enlaces intramoleculares.

Al unirse un radical, los grupos OH se estabilizan por un único enlace intramolecular. Este enlace intramolecular, junto con el efecto electrónico desfavorable de los sustituyentes de la ciclohexadiona, hace que el segundo OH fenólico sea mucho menos reactivo que el primero. Al unirse el segundo radical se forman dos quinonas neutralizando el radical.

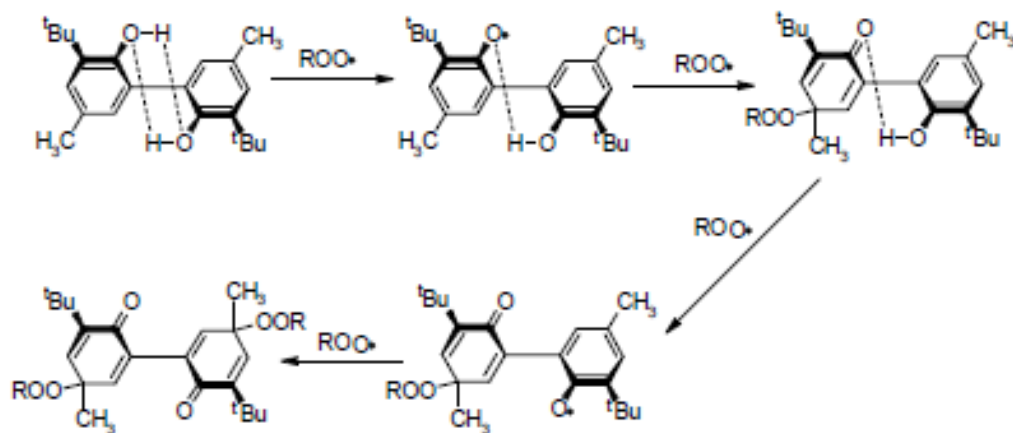


Figura N° 4. Antioxidante bifénol neutralizando un radical libre.

La contaminación atmosférica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos de elementos que generan radicales libres que ingerimos o inhalamos. Este exceso no puede ya ser eliminado por el cuerpo y, en su labor de captación de electrones, los radicales libres dañan las membranas de nuestras células, llegando finalmente a destruir y mutar su información genética, facilitando así el camino para que se desarrollen diversos tipos de enfermedades.

2.3.3.- Regulación génica de enzimas antioxidantes

Las concentraciones de enzimas antioxidantes en las células están sujetas a regulación génica, de forma que aumentan rápidamente en respuesta a factores de transcripción que detectan cambios en el nivel de estrés oxidativo ⁸⁷.

2.3.4.- Estructura y Clasificación de los Antioxidantes tipo Flavonoides

Los flavonoides son moléculas polifenólicas que pueden ser vistos como dos anillos de benceno unidos por una pequeña cadena de tres carbonos. Uno de estos átomos de carbono está siempre conectado a uno de los anillos de benceno; ya sea directamente o por puente de hidrógeno, formando así un tercer anillo en el centro, el cual puede tener cinco o seis miembros (Figura 5).

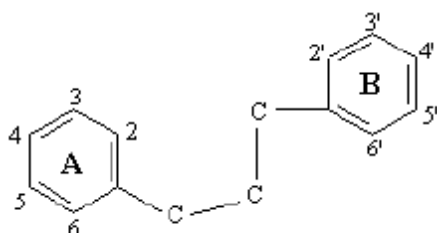


Figura N° 5. Estructura de los flavonoides

La estructura química de los flavonoides se basa en un esqueleto donde el segundo anillo aromático B se une en la posición 2, 3 o 4 (Figura 6)

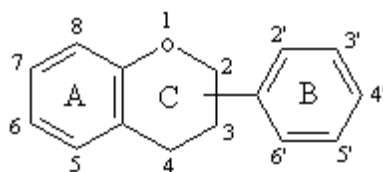
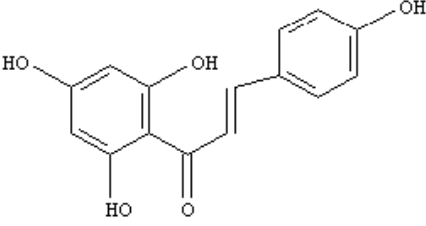
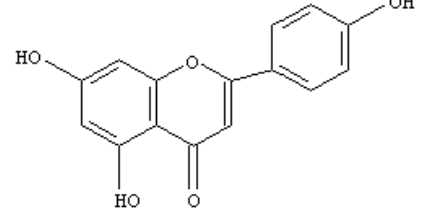
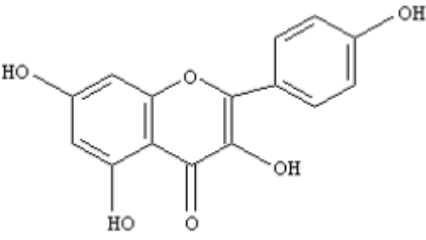
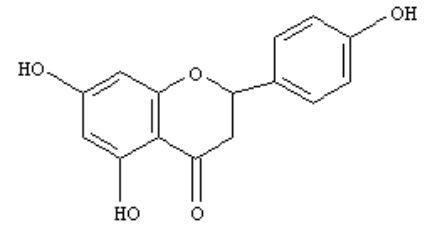
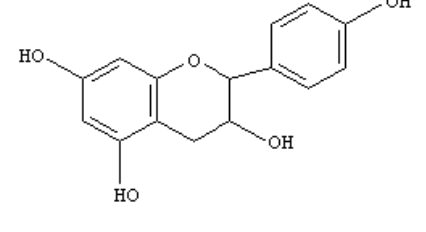
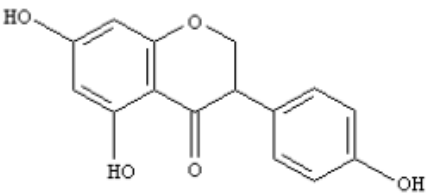


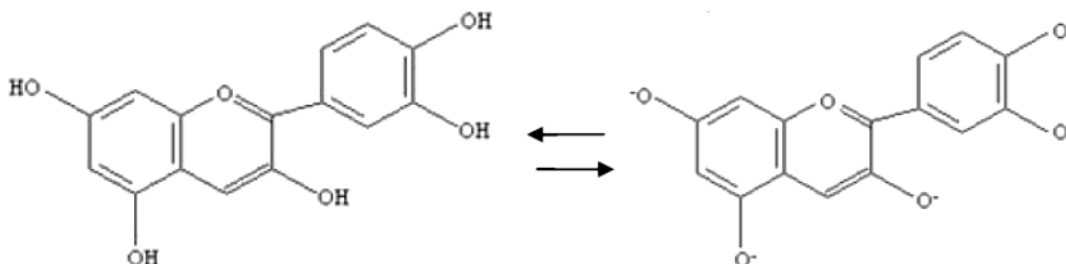
Figura N° 6. Estructura de los flavonoides II

Se han caracterizado más de 5000 flavonoides que existen en la naturaleza proveniente de varias plantas; se clasifican en varios subgrupos de acuerdo a la posición del sustituyente sobre el anillo C. Tanto el estado de oxidación del anillo heterocíclico como la posición del anillo B, son importantes para la clasificación ^{93, 94}. Los principales subgrupos de flavonoides son: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas e isoflavonoides (Tabla 1)

Tabla 1. Estructura de los principales grupos de flavonoides.

Nombre	Estructura
chalconas	 <chem>Oc1ccc(cc1)/C=C/C(=O)c2cc(O)c(O)cc2</chem>
flavonas	 <chem>Oc1ccc(cc1)C2=C(O)c3cc(O)c(O)cc3O2</chem>
flavonoles	 <chem>Oc1ccc(cc1)C2=C(O)c3cc(O)c(O)cc3O2</chem>
flavononas	 <chem>Oc1ccc(cc1)C2=C(O)c3cc(O)c(O)cc3O2</chem>
antocianinas	 <chem>Oc1ccc(cc1)C2=C(O)c3cc(O)c(O)cc3O2</chem>
isoflavonoides	 <chem>Oc1ccc(cc1)C2=C(O)c3cc(O)c(O)cc3O2</chem>

Las antocianinas son el más importante grupo de pigmentos en plantas, visibles para el ojo humano por ejemplo, las antocianidinas de la especie *hidrangea* dan coloración roja en medio ácido y azul en medio básico (FiguraN° 7).



FiguraN° 7. Antocianidinas de la hidrangea

2.4.- MÉTODOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.4.1.- Introducción:

Las especies oxigénicas reactivas (ROS), formadas metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado (Radical libre) en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada reactividad ⁹⁵.

Las ROS producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen del daño celular. Actúan sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas celulares, produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL); sobre los glúcidos, alterando las funciones celulares tales como las asociadas con la actividad de las interleuquinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores; sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización; sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis ⁹⁵.

En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la producción de radicales libres como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, procesos de isquemia/reperfusión, diabetes, asfixia de neonato, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento, entre otros ^{13, 15, 96}. Además, un creciente número de estudios soportan la teoría que el estrés oxidativo está envuelto en la progresión de VIH ⁹⁷.

Los métodos de medición de la actividad antioxidante muestran extrema diversidad; muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno singlete ⁹⁸, y fuentes de radicales libres ⁹⁹.

La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación. Este es el principio de los métodos más modernos de ensayo tales como los ensayos de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y phycoerythrin ⁹⁸.

2.4.2.- Aplicación de métodos químicos para determinar Actividad Antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante ^{98, 100 - 102} ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración ^{103, 104}. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*.

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo ^{102, 105- 107}. Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (EROS) ^{108 - 112}.

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. ^{98,105,108,113}. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP) ^{111, 112, 114, 115}, enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica ^{116, 117}. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico, y el DMPD solo en medio acuoso ^{98,111, 114, 118}.

El radical ABTS•+ tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm^{110,118} y el DMPD a 505 nm¹¹⁸.

2.4.3.- Determinación de Antocianos Totales (AT)

Método por diferencia de pH. Permite la estimación alternativa del contenido de antocianos totales¹⁰⁹. Se utilizan dos sistemas tampón: ácido clorhídrico/ cloruro de potasio de pH 1,0 (0,025 M) y ácido acético/ acetato sódico de pH 4,5 (0,4 M). A 0,2 mL de una muestra diluida (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,100-1,200 a 510 nm) se añaden 1,8 mL de la correspondiente disolución tampón y se mide la absorbancia frente a un blanco a 510 y 700 nm. Se calcula la absorbancia final a partir de:

$$A = (A_{\text{max. vis}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\text{max. vis}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

La concentración de pigmentos monoméricos en el extracto se expresa en cianidina-3-glucósido.

$$\text{Antocianos monoméricos (mg/100 g)} = \frac{A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 100}{(\epsilon \times 1)}$$

A = Absorbancia;

PM = peso molecular

FD = Factor de dilución;

ϵ = absorptividad molar

La concentración final de antocianos (mg/100 g) se calcula en base al volumen de extracto y peso de muestra. Se expresa en cianidina 3-glucósido (PM: 449,2 y ϵ : 26900).

2.4.4.- Determinación de Fenoles Totales (FT)

El método espectrofotométrico desarrollado por *Folin y Ciocalteu*,¹¹⁹ para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. 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. Los resultados se expresan en μg de ácido gálico por 100 mg de muestra.

2.4.5.- Actividad Antioxidante:

2.4.5.1.- Método ABTS

Según la metodología desarrollada por *REet al.*¹¹¹ y descrita por *Kuskoskiet al.*¹¹⁷ el radical $ABTS^{\bullet+}$ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $ABTS^{\bullet+}$ se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,1$) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas (antocianos) se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 μL de la muestra. A 980 μL de dilución del radical $ABTS^{\bullet+}$ así generado se le determina la A_{754} a 30°C , se añade 20 μL de la muestra (dilución de antocianos) y se mide de nuevo la A_{754} pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua transcurridos 7 minutos.

El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 μM (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL).

Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C), en este último caso por tratarse de alimentos.

2.4.5.2.- Método DPPH

Este método, desarrollado por *Brand-Willamset al.*¹², se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH•, por antioxidantes. Con modificaciones el método descrito por *Kimet al.*¹¹⁰, 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 (A_0) y pasados los 30 y 60 minutos (A_f).

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.

El DPPH(1,1-difenil-2-picrilhidrazil) esta molécula es unradical libre químicamente estable que no forma dímeros como sucede con otrosradicales libres. Una solución de DPPH• es color morado y da máximos de absorción en 328 y 514 nm; cuando se mezcla con una sustancia que pueda donar uno o varios átomos de hidrógeno, la concentración del radical DPPH•disminuye mientras aparece la forma reducida DPPH-H provocando un cambio en el color de morado a amarillo y la absorbancia de la solución decrece. La decoloración resultante está directamente ligada a la estequiometria de la reacción (Figura 8).

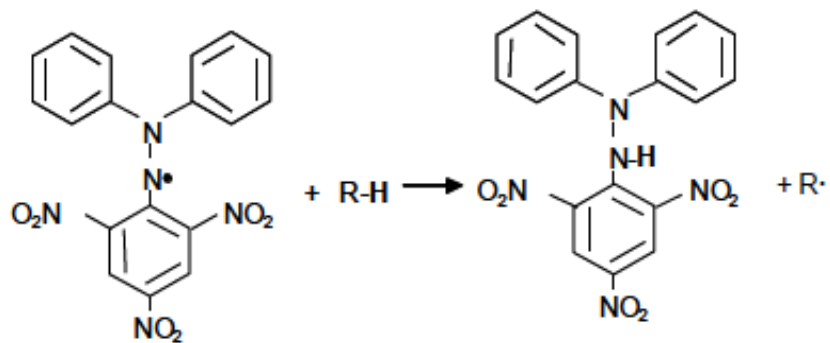


Figura N° 8. Abstracción de un átomo de hidrógeno por el radical DPPH.

Este método no es específico a ningún tipo de antioxidante en particular, por lo tanto aplica para evaluar una capacidad antioxidante total. Es importante mencionar que los resultados obtenidos presentan tendencias similares al reportado usando otros métodos ^{12, 120, 121}.

2.4.5.3.- Método DMPD

Se determina la actividad antioxidante aplicando el método propuesto por Fogliano *et al*¹¹⁸. Este se basa en añadir 1 mL de la disolución de DMPD 100 mM a 100 mL de disolución tamponada con ácido acético/ acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 mL de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados (DMPD•). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90 (±0,1), a 506 nm. Se añade 50 µL de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos (a 25°C) se hace otra medida de absorbancia a 506 nm.

La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (en mM o µM) o bien en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C (mg/L o mg/100 g).

CAPÍTULO III

MÉTODO, POBLACION, MUESTRA Y MATERIALES

3.1.- METODOLOGÍA

3.1.1.- Tipo de Estudio

Se empleó el siguiente tipo de investigación:

- *Experimental*, porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que modifica el comportamiento de las variables en estudio, las mismas que fueron medidos en determinados momentos.
- *Descriptivo*: porque el estudio describió e interpretó en forma clara y detallada los hechos obtenidos en la investigación.
- *Prospectivo*, porque se desarrolló hacia delante del tiempo.
- *Longitudinal*, porque permitió realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

3.1.2.- Diseño del Estudio

El contenido de compuestos fenólicos totales fue determinado con base a la curvaestándar previamente establecida con ácido gálico. Para la determinación de lacapacidad antioxidante se utilizó un diseño simple al azar teniendo como variableindependiente la concentración del extracto, y como variable dependiente lacapacidad antioxidante de los extractos, expresada como porcentaje.

Ambas variables de estudio nos permitieron realizar una comparación de todos los resultados obtenidos y determinar el IC_{50} , es decir la concentración del antioxidante requerida para inhibir el 50% de la actividad de los radicales de prueba.

Repeticiones Concentración	R1	R2	R3	Total de concentraciones (Y_i)
C1	Y11	Y12	Y13	Y1
C2	Y21	Y22	Y23	Y2
C3	Y31	Y32	Y33	Y3
C4	Y41	Y42	Y43	Y4
C5	Y51	Y52	Y53	Y5
$\Sigma (Y_j)$	Y.1	Y.2	Y.3	Y..

3.1.3.- Diagrama de Flujo

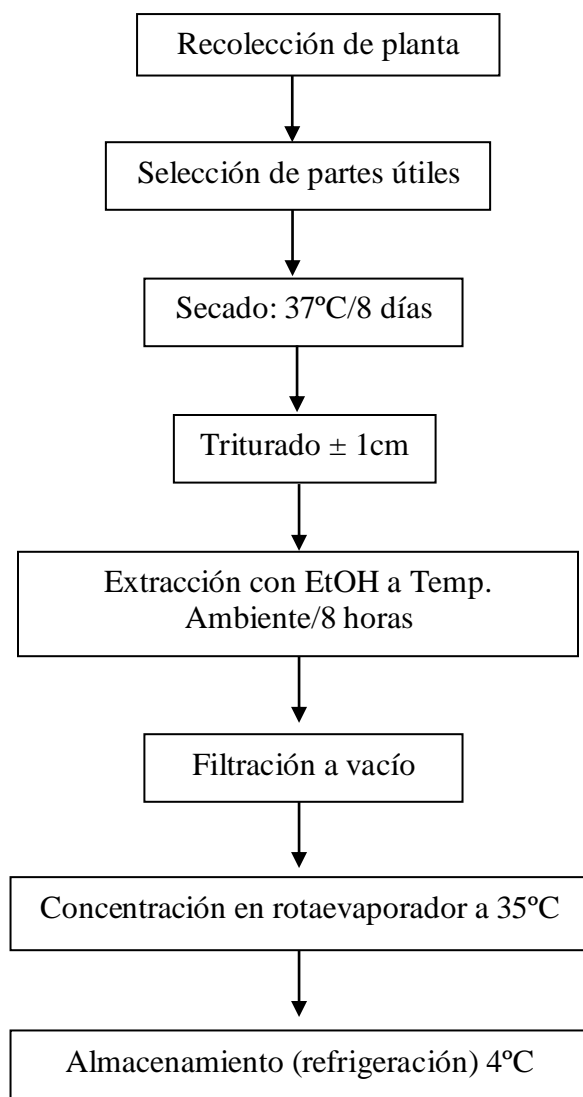


Figura N° 9. Diagrama de flujo del proceso de obtención de los extractos totales.

3.1.4.- Procedimiento Experimental

3.1.4.1.- Identificación y Taxonomía de la Muestra Vegetal:

La especie en estudio, fue llevada al *Herbarium Amazonense* (AMAZ) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, para su respectiva determinación botánica. Con la muestra recolectada, el botánico determino la categoría taxonómica y caracterizo las partes estructurales, sobre todo las hojas de la especie en el campo y el laboratorio, utilizo estereoscopio y escalímetro para las mediciones respectivas.

3.1.4.2.-Procesamiento de las Muestras Botánicas:

El material colectado (hojas), fue procesado y analizado en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP) ubicada en Nina Rumi (Carretera Iquitos- Nauta), Distrito de San Juan Bautista.

3.1.4.3.-Determinación de Materia Seca:

Para la obtención de materia seca se colectaron hojas de *Verbena litoralis* Kunth sanas y frescas, luego se procedió a secar las hojas (6 repeticiones a pesos constantes), el cual fue sometido a calentamiento en una estufa a 60° C por 16 horas.

3.1.5.- Obtención de Extractos:

Las hojas de *Verbena litoralis* K. fueron sometidos a etanol al 70% por 8 horas en un matraz y luego se procedió a destilar en rotavapor

3.1.6.- Determinación del Rendimiento

Para el cálculo de los porcentajes de rendimientos se utilizó la siguiente ecuación:

Peso del extracto

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso de la muestra total}} \times 100$$

3.1.7.- Actividad Antioxidante:

3.1.7.1.- Inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Este método se realizó siguiendo la metodología descrita por Miller *et al.*¹²³ (2001); Piscoya *et al.*¹²⁴(2001); Sandoval *et al.*¹²⁵(2000); Sandoval *et al.*¹²⁶(2002); Sandoval&Okuhama¹²⁷(2003), con mucha bioseguridad¹²².Se prepararon soluciones crecientes de trabajo del extracto alcohólico de verbena (concentración final, µg/ml.)

Concentración final, µg/ml	Concentración de verbena, mg/ml	Solución stock de verbena (20 mg/ml)	Solvente utilizado, µl	Volumen final, µl
10	0.4	20 µl	980	1000
30	1.2	60 µl	940	1000
100	4.0	200 µl	800	1000
300	12.0	600 µl	400	1000
1000	20.0	1000 µl	-	1000

- Se prepararon soluciones para la evaluación de la inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Verbena, μg/ml	Solución de trabajo, μl	100 μM DPPH μl	Volumen final, μl
10	25	975	1000
30	25	975	1000
100	25	975	1000
300	25	975	1000
1000	25	975	1000

- Se preparó la solución stock de 1 mM de DPPH en etanol al 95 %
- A partir de la solución stock de DPPH, se preparó la solución de trabajo diario de 100 μM DPPH
- Una parte alícuota (25 μl) de cada solución de trabajo de extracto de verbena fue agregada en cada cubeta de poliestireno y mezclada en 975 μl de 100 μM DPPH, previamente se hizo la lectura de la solución de trabajo diario de 100 μM DPPH
- Las lecturas de las absorbancias se hicieron en un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 515 nm. Cada absorbancia fue leída a intervalos de 30 segundos durante 5 minutos. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicados
- La inhibición del secuestro del radical DPPH por soluciones crecientes de extractos de verbena, fue determinada por la siguiente expresión:

$$\text{Inhibición DPPH, \%} = \frac{(\mathbf{Ac} - \mathbf{Am})}{\mathbf{Ac}} \times 100$$

Dónde: **Ac**, es la absorbancia del control (100 μM DPPH), y **Am**, es la absorbancia de la muestra (soluciones crecientes de extractos de verbena) en tiempo **n**

3.1.7.2.- Inhibición de RadicalesPeróxilos

Se evaluó la capacidad de inhibición de peróxilos, descrito por *Sandoval et.al.*¹²⁶(2002); *Sandoval&Okuhama*,¹²⁷(2003), con mucha bioseguridad ¹²².

- Se prepararon soluciones crecientes de trabajo del extracto etanólico de verbena (de la misma forma que el método anterior)
- Se prepararon soluciones crecientes para evaluar el secuestro de radicales peróxilos:

Verbena, µg/ml	Solución de trabajo, µl	Peroxilos µl	Volumen final, µl
10	10	990	1000
30	10	990	1000
100	10	990	1000
300	10	990	1000
1000	10	990	1000

- Se prepararon por separado soluciones stock de los siguientes radicales, utilizando como disolvente agua destilada para cada solución: 2.25 mM de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS) y 20 mM de 2,2'-azobis (2-amidopropano) hidrócloride (ABAP)
- Se preparó buffer fosfato a pH 7.4: 154 mM de cloruro de sodio, 2.7 mM de fosfato de sodio hepta hidratado y 2.7 mM de fosfato de potasio disueltos en agua destilada.

- Luego se mezclaron las dos soluciones stock de radicales (10% de cada solución) y el buffer fosfato (80% de solución), los cuales fueron incubados en baño maría a 70°C por 1 hora. Esta mezcla fue denominada solución peroxilos.
- Seguidamente se enfrió en hielo a la solución de peroxilos, dando como resultados una coloración verdosa.
- Se tomó una alícuota (10 µl) de la solución de trabajo de verbena, para ser mezclada en 990 µl de la solución peroxilos en una cubeta de poliestireno, previamente se hizo la lectura de la solución peroxilo, todas las lecturas de la absorbancia fueron realizadas con un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 414 nm.
- La inhibición de radicales peroxilos por solución crecientes de extracto de verbena, fue determinada por la siguiente expresión:

$$\text{Inhibición Peroxilos, \%} = [(\mathbf{Ac} - \mathbf{Am}) / \mathbf{Ac}] \times 100$$

Dónde: **Ac**, es la absorbancia del control (solución peroxilos), y **Am**, es la absorbancia de la muestra (solución creciente de extractos alcohólico de verbena)

3.1.7.3.- Concentración de Polifenoles Totales

Este método fue descrito por *Sandoval et al.*¹²⁸ (2001), Lotito & Frei¹²⁹ (2004) con mucha bioseguridad¹²², fue modificado como sigue:

- Se prepararon las siguientes soluciones stock por separado. Carbonato de sodio al 20% disuelto en agua destilada, y 50 mM de (+)-catequina en metanol absoluto.
- En base a la solución stock de (+)-catequina se prepararon las siguientes soluciones estándares:

Concentración final, mg/ml	Solución de catequina, μ l	Metanol, μ l	Volumen final, μ l
3	207 (stock)	793	1000
1	333	667	1000
0.3	300	700	1000
0.1	333	667	1000
0	0	1000	1000

- Se agregó 1.58 ml de agua destilada a cada microtubo (control, estándares y muestra). Toda reacción fue realizado por triplicado
- Se volvió agregar 20 μ l de agua destilada al control, en el caso de los estándares, solo se agregó 20 μ l de cada solución estándar de catequina. Mientras, que en los microtubos de las muestras, se trabajó con el stock del extracto alcohólico de verbena (20 μ l)
- Seguidamente se agregó a cada microtubo, 100 μ l de solución de fenol de folin-ciocalteu, se vorteció y dejo reposar por 1 minuto a temperatura ambiente
- Seguidamente se adiciono 300 μ l de carbonato de sodio al 20 %, se mesclaron cuidadosamente y se dejó incubando durante 2 horas a temperatura ambiente

- Luego se procedió a adicionar 1 ml de solución incubada de cada microtubo, en una cubeta de poliestireno, para ser leídas las absorbancias en un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 700 nm. Previamente, se realizó la curva estándar generada por las absorbancias obtenidas de catequina.
- Para la determinación de la concentración de polifenoles totales se utilizó la siguiente expresión.

$$\text{Polifenoles, mg/ml} = [(\mathbf{Ac} - \mathbf{Am}) / \mathbf{Ac}] \times \mathbf{n}$$

Dónde: **Ac**, es la absorbancia del control, y **Am**, es la absorbancia de la muestra (solución stock de extracto alcohólico de verbena), y **n**, es el factor para corregir la dilución de la muestra.

3.1.7.4.- Oxidación de Proteínas (carbonilos)

La determinación de carbonilos fue descrita por *Duhet al.*,¹³⁰ (1999); *Sandoval et al.*¹²⁸(2001), con mucha bioseguridad¹²².

- Se prepararon las siguientes soluciones stock (utilizando como disolvente agua destilada) por separados: 0.1 g/ml de albumina de suero bovino, 1 mM de cloruro férrico, 20 mM de peróxido de hidrogeno al 30 %, 2 mM de L-ácido ascórbico, 2 M de ácido clorhídrico, 20 % de ácido tricloroacético, 20 mM de fosfato de potasio a pH 6.5. También se preparó la solución de etanol absoluto en acetato de etilo (1.1, v/v)
- Paralelo se hicieron otras soluciones. 20 mM de 2,4-Dinitrofenilhidrazine disuelto en 2 M de ácido clorhídrico, buffer fosfato pH 7.4 (20 mM de fosfato de potasio, 154 mM de cloruro de sodio, y 2.7 mM fosfato de sodio hepta hidratado todo disuelto en agua destilada), también se preparó la

solución de 6 M de guanidina hidrocloreto en 100 ml de 20 mM de fosfato de potasio, pero a un pH de 2.3 con la adición del ácido tricloroacético.

- Se agregó a cada microtubo (control y muestra) los siguientes volúmenes provenientes de las soluciones stock preparadas, para llegar a las concentraciones finales en un volumen final de 1 ml

Concentración final (microtubo)	Soluciones requeridas (stock)	Volumen μ l
-	Buffer fosfato a pH 7.4	300
20 mg/ml	Albumina suero bovino	200
100 μ M	Cloruro férrico	100
2 mM	Peróxido de hidrógeno	100
200 μ M	Ácido ascórbico	100
-	Muestra (extracto alcohólico de verbena)	200
Volumen final		1000

- En el caso del control, se agregó 200 μ l de agua destilada. A toda esta mezcla se le denominó mezcla reacción. Control y muestras fueron realizados por triplicados
- Se incubó la mezcla reacción a 37°C en baño maría durante una hora. Luego se agregó 500 μ l de 20 mM 2,4-Dinitrofenilhidrazina disuelto en 2 M de ácido clorhídrico y se vorteció bien
- Se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, preferiblemente bajo oscuridad, vorteciendo entre 10 – 15 minutos.
- Se agregó 500 μ l de ácido tricloroacético al 20 %, previo enfriamiento, se vorteció y centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos

- Se descartaron los sobrenadantes de cada mezcla reacción, para así tener solo las proteínas precipitadas en forma de pellets
- Los pellets fueron lavados tres veces, con 1 ml de solución de etanol en acetato de etilo (1:1, v/v). Entre cada lavado se centrifugo a 3000 rpm por 10 minutos y descartando el sobrenadante.
- A cada precipitado final, se les adiciono 2ml de la solución preparada de 6 M guanidina hidrocloreto a pH 2.3, se vorteció e incubo a 37°C en baño maría por 15 minutos. Seguidamente se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos
- Luego se obtuvieron alícuotas de 1000 µl de sobrenadante (control y muestra) en cada cubeta de poliestireno para ser leída las absorbancias en un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 370 nm.

El contenido de carbonilos fue calculado usando la siguiente expresión:

$$C = \text{Abs. } 370 \text{ nm} \times 45.45 \text{ nmol/ml}$$

Donde, **Abs. 370 nm** son las absorbancia (control y muestra) obtenidas a una longitud de onda de 370 nm, **45.45 nmol/ml**, es el coeficiente de absorción, y **C**, es el contenido de carbonilos presentes/ml

3.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1.- Lugar de Estudio

El trabajo Farmacognósticos se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP) ubicada en Nina Rumi (Carretera Iquitos- Nauta), Distrito de San Juan Bautista. La determinación del contenido fenólico se realizaron en los ambientes del Laboratorio de Ingeniería de Alimentos ubicado en la Planta Piloto de la UNAP ubicado en la Av. Freyre N° 610 – Iquitos. La capacidad antioxidante mediante DPPH se realizó en el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP), ubicado en el km. 4.5 de la carretera Iquitos – Nauta.

3.2.2.- Población en Estudio

La población vegetal en estudio lo constituye las unidades de la especie vegetales de *Verbena litorales* Kunth. (Verbena).

3.2.3.- Muestra en Estudio

Está constituida por las hojas sanas de *Verbena litorales* Kunth. (Verbena).

3.2.4.- Criterios de Selección de la Muestra Botánica

La selección de las muestras botánicas a estudiar, se realizará tomando en cuenta los siguientes criterios:

- Arbustos jóvenes de tamaño mediano de *Verbena litorales* Kunth. (Verbena)
- Hojas sanas de *Verbena litorales* Kunth. (Verbena)

3.2.5.- Lugar de Muestreo

La muestra a investigar fueron las hojas de *Verbena litoralis* Kunth. “verbena” perteneciente a la familia Verbenaceae; las cuales fueron colectadas en el Jardín

Botánico de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones Allpahuayo del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, en el km 26.5 de la carretera Iquitos – Nauta, situado dentro de la jurisdicción de la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana, provincia de Maynas, Loreto, Perú.

3.3.- INSTRUMENTOS

3.3.1.- Reactivos

- 2,2'-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

- Etanol absoluto
- Agua destilada desionizada (ddH₂O)
- Alcohol de 70° y 96°
- 2,2'-azobis (2-amidopropano) hidroclore (ABAP)
- 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS)
- Fosfato de potasio (KH₂PO₄)
- Fosfato de sodio hepta hidratado (Na₂HPO₄ · 7H₂O)
- Ácido metafosfórico
- Ácido sulfúrico
- 2,4-Dinitrophenylhydrazine (2,4 DNPH)
- Thiourea
- Sulfato de cobre
- (+)- Catequin
- Solución de fenol Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Albúmina de suero bovino (BSA, fracción V, libre de ácidos grasos)
- Fosfato (KH₂PO₄-K₂PO₄, 20 mM, pH 7.4)
- Cloruro férrico (FeCl₃)
- Peroxido de hidrógeno, 30% (w/w) (H₂O₂ 30% v/v)
- Ácido clorhídrico
- Acetato de guanidina
- Ácido tricloroacético
- Acetato de etilo
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Metanol
- Ácido trifluoroacético
- Guanidina hidroclore

3.3.2.- Equipos

- Espectrofotómetro (genesys 10UV)
- Centrífuga 5415D de microtubos (eppendorf)
- Centrífuga de tubos grandes (Hettich)
- Autoclave a vapor (Bugatti)
- Baño maría (Bugatti)
- Estufa eléctrica (HV, ovens)
- Potenciómetro (Oakton)
- Plato caliente eléctrico (Cimarex)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Congelador ultra-low freezer -80°C
- Equipo de destilación (Millipore)
- Vortex (Daigger)
- Termómetro (Family doctor)

3.3.3.- Materiales:

- Tubos (borosilicato resistente al calor)
- Tubos de plástico resistentes al calor (1, 1.5, 2.5, 15 y 20 ml)
- Pipetas, tips, y papel secante y aluminio.
- Guantes de látex
- Cubetas de poliestireno (1 x 1 x 4.5 cm)
- Cubetas de cuarzo (1 x 1 x 4.5 cm)
- Micropipetas (10, 100, 200 y 1000 µl)

3.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento fue ejecutado por triplicado, y los resultados presentados como la media \pm error estándar de la media. En el análisis estadístico se utilizó la prueba t, para el rendimiento en materia seca y el análisis de varianza (ANOVA) con un diseño

completamente al azar para las evaluaciones de inhibición de radicales (DPPH y peróxilos), concentración de polifenoles, ácido ascórbico y el contenido de carbonilos en proteínas. El modelo matemático del diseño completamente al azar es como sigue:

$$Y = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde: μ , media, T_i , efecto de tratamiento y E_{ij} , error experimental

El post análisis se trabajó con la prueba de Tukey – Kramer ($P < 0.05$), mediante el paquete estadístico de GraphPad InStat v.2.0

CAPÍTULO IV

RESULTADOS, DISCUSION, CONCLUSION Y RECOMENDACION

4.1.- RESULTADOS

4.1.1.- Rendimiento en Materia Seca

Los valores del rendimiento en materia seca de las hojas de Verbena - *Verbena littoralis* Kunth, se observa en la Figura N° 10. El valor obtenido fue de 1,40 %.

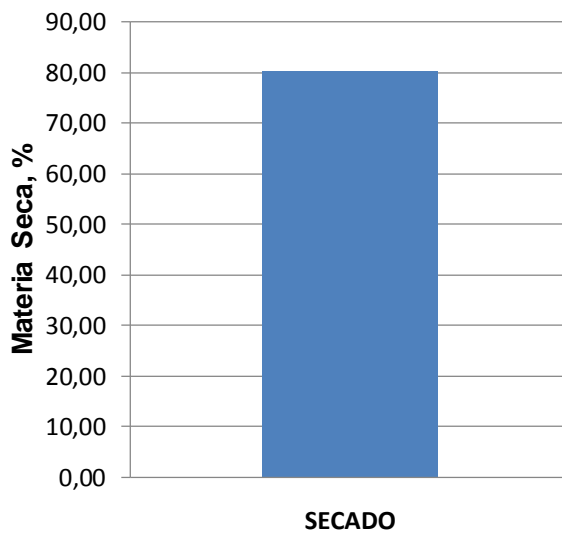


Figura N° 10. Rendimiento en Materia seca de hojas de verbena

4.1.2.- Actividad Antioxidante

4.1.2.1.-Inhibición de Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Los resultados de la inhibición del radical DPPH, expresados como coeficiente de inhibición al 50% (IC₅₀), para el extracto etanólico de verbena, se observa el cuadro 1. La eficiencia del secuestro del DPPH fue obtenida a $213 \pm 1.80 \mu\text{g/ml}$

Cuadro N° 1. Resultados de la inhibición del radical DPPH

Tratamiento	Extracto	IC ₅₀ μg/ml*	Máxima inhibición
T1	Alcohólico hojas frescas	213 ± 1.80	80.2 %

*El valor presenta el promedio \pm error estándar de la media.

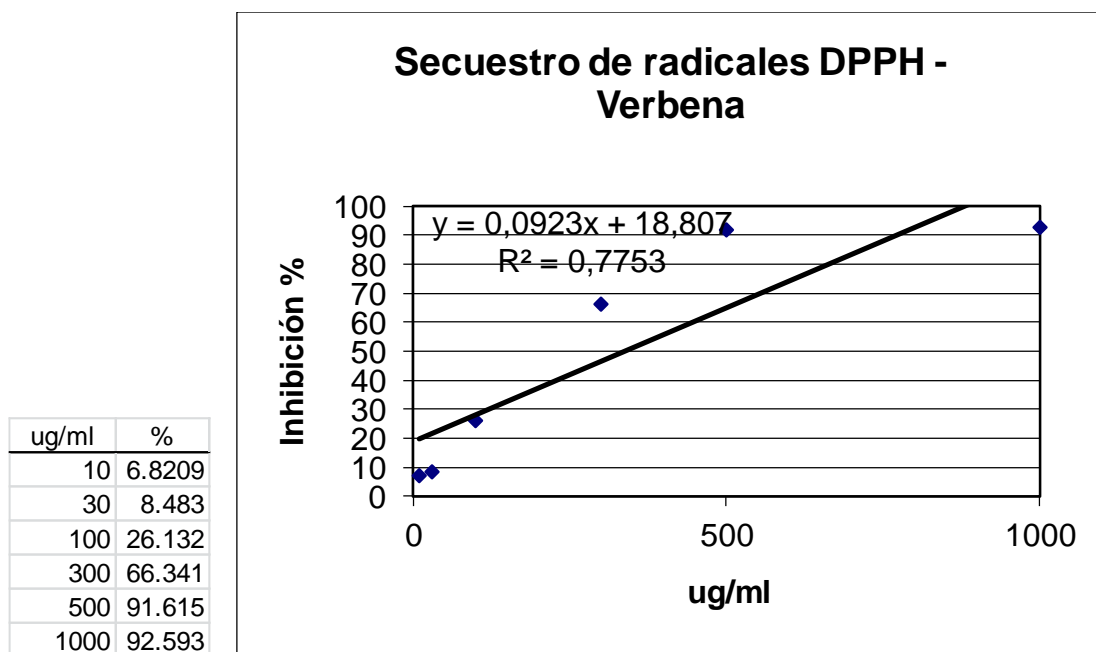


Figura N° 11.- Curva estándar de la inhibición del DPPH

Tabla 2. Muestra: Hojas de Verbena a concentraciones crecientes (10, 30, 100, 300, 500 y 1000 uL/mL) en 1 ml como volumen final.

Nº de lecturas	Lectura DPPH 100 uM	VERBENA																	
		10 uL/mL			30 uL/mL			100 uL/mL			300 uL/mL			500 uL/mL			1000 uL/mL		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1.033	0.982	0.983	1.026	0.955	0.948	0.966	0.830	0.807	0.805	0.388	0.482	0.431	0.310	0.30	0.297	0.078	0.088	0.095
2	1.030	0.978	0.960	0.969	0.949	0.943	0.960	0.809	0.785	0.782	0.369	0.441	0.428	0.300	0.165	0.160	0.076	0.087	0.090
3	1.028	0.976	0.957	0.965	0.946	0.940	0.957	0.801	0.778	0.776	0.355	0.438	0.417	0.245	0.120	0.120	0.074	0.086	0.088
4	1.027	0.974	0.953	0.961	0.944	0.938	0.954	0.798	0.777	0.763	0.333	0.434	0.412	0.132	0.096	0.098	0.074	0.085	0.086
5	1.025	0.972	0.950	0.960	0.942	0.936	0.952	0.791	0.772	0.758	0.328	0.424	0.403	0.102	0.088	0.096	0.073	0.084	0.084
6	1.025	0.970	0.949	0.960	0.940	0.935	0.951	0.785	0.767	0.752	0.320	0.414	0.396	0.098	0.084	0.097	0.073	0.083	0.083
7	1.024	0.969	0.947	0.958	0.938	0.933	0.949	0.782	0.761	0.749	0.310	0.40	0.396	0.093	0.082	0.095	0.072	0.082	0.080
8	1.024	0.968	0.945	0.957	0.937	0.932	0.947	0.780	0.760	0.746	0.306	0.383	0.398	0.091	0.080	0.090	0.073	0.081	0.079
9	1.023	0.967	0.944	0.954	0.935	0.931	0.946	0.777	0.756	0.741	0.304	0.382	0.386	0.089	0.080	0.089	0.072	0.08	0.077
10	1.023	0.965	0.942	0.952	0.934	0.930	0.945	0.775	0.752	0.738	0.299	0.366	0.363	0.088	0.079	0.089	0.072	0.079	0.076
11	1.023	0.964	0.940	0.951	0.932	0.929	0.944	0.773	0.753	0.736	0.294	0.358	0.347	0.088	0.08	0.090	0.072	0.079	0.075
Promedio	1.023	0.9653	0.942	0.9523	0.9337	0.93	0.945	0.775	0.75367	0.7383	0.299	0.36867	0.3653	0.0883	0.07967	0.0893	0.072	0.0793	0.076
% de Inhibición		5.637	7.91789	6.9078	8.7325	9.09091	7.6246	24.242	26.3278	27.827	70.772	63.9622	64.288	91.365	92.2124	91.268	92.962	92.245	92.571
Promedio % Inhib.		6.8209			8.483			26.1323			66.341			91.615			92.593		
Desv. Esta. (SD)		1.14292			0.76439			1.80009			3.84117			0.51964			0.3589		
Error Est. (SE)		0.65986			0.44132			1.039			2.2177			0.300			0.2072		
IC50		6,82±0.66			8,5±0.44			26,13±1.04			66,34±2.22			91,62±0.30			92,6±0.21		

Las lecturas de las absorbancias del DPPH y las muestras fueron registradas cada 30 seg. por 5 min. Las 3 últimas lecturas fueron promediadas.

4.1.2.2.- Inhibición de Radicales Peroxilos

Los resultados de la inhibición de radicales peroxilos, expresados como coeficiente al 50 % (IC₅₀), para el extracto alcohólico de verbena, se observa el cuadro 2. La eficiencia del secuestro de peroxilos, fue de $189 \pm 1.80 \mu\text{g/ml}$

Cuadro N° 2. Resultados de la Inhibición de Radicales Peroxilos

Tratamiento	Extracto	IC ₅₀ μg/ml*	Máxima inhibición %
T1	Alcohólico hojas frescas	189 ± 2.29	80.2 %

*El valor presenta el promedio \pm error estándar de la media.

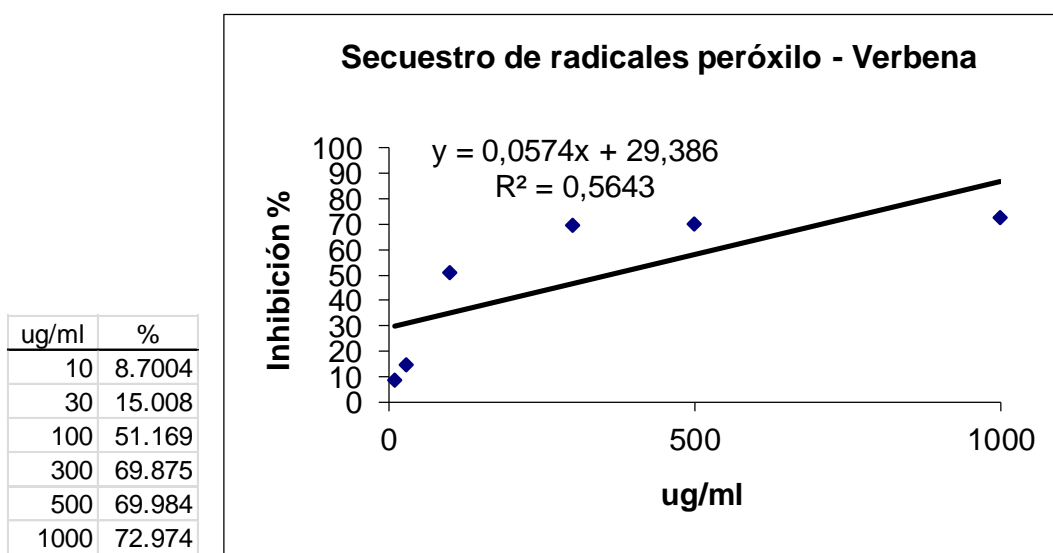


Figura N° 12.- Curva estándar del radical peroxilo para determinar su concentración en la verbena

Tabla 3. Capacidad de inhibición de radicales peróxilos por el extracto alcohólico de las hojas de verbena

Lecturas	Abs 414nm
Radicales	0.613
Peróxilos	

MUESTRA	VERBENA																	
	10 uL/ml			30 uL/mL			100 uL/mL			300 uL/mL			500 uL/mL			1000 uL/mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Abs. 414nm	0.564	0.558	0.557	0.530	0.522	0.511	0.305	0.304	0.289	0.19	0.187	0.177	0.182	0.174	0.196	0.147	0.175	0.175
% Inhibición	7.9934747	8.972	9.1354	13.54	14.85	16.64	50.245	50.41	52.85	69.005	69.494	71.13	70.31	71.615	68.03	76.02	71.45	71.45
Promedio	8.7			15.01			51.17			69.875			69.984			72.97		
Desv Est M	0.618			1.556			1.462			1.1104			1.8166			2.637		
Error Est M	0.357			0.898			0.844			0.6411			1.0488			1.523		
IC50	8,70±0,40			15,01±0,90			51,20±0,84			69,90±0,64			69,98±1,05			72,97±1,52		

4.1.2.3.-Concentración de Polifenoles Totales

El resultado de la concentración de polifenoles totales para el extracto alcohólico de verbena, se observa en el cuadro 3. El contenido de polifenoles totales fue obtenida en 132.88 ± 2.38 mg/ml

Cuadro N° 3.Resultado de la Concentración de Polifenoles Totales

Tratamiento	Extracto	Polifenoles totales mg/ml*
T1	Alcohólico hojas frescas	132.88 ± 2.38

*El valor presenta el promedio \pm error estándar de la media.

Lecturas	Abs. 700 nm
Curva (mg/mL)	
0	0
0.1	0.046
0.3	0.168
1	0.603
3	1.875

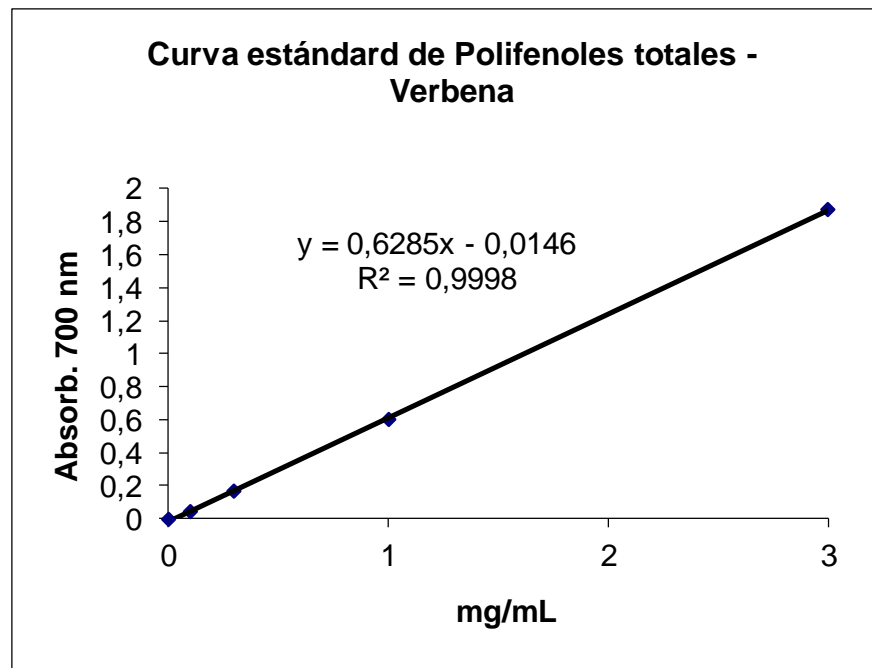


Figura N° 13.- Curva estándar de (+)-catequina para el método de polifenoles totales

Tabla 4. Concentración de polifenoles en extracto de verbena

Lecturas de las Muestras.	Absorbancia 700 nm	Fórmula	Conc.	Factor de dilución	Promedio	Desviación estándar	Error Est. (SE)
Verbena	0.592	0.9187	72.5769 3	79	72.57693	0.2513922	0.14514 1
Verbena	0.590	0.9155	72.3255 4	79			
Verbena	0.594	0.9219	72.8283 2	79			

Cálculos (modificados):

20% Carbonato de sodio 100ml: 2 g Carbonato de sodio en 10 ml agua miliquiu.

50 mM (+)-Catequin en Metanol 1ml:

$$x = (290,28 \text{ g/L}) (0,05\text{M}) (1\text{ml}) / (1000\text{ml}) (1\text{M})$$

$$x = 0,0145 \text{ g de (+)-Catequin en 1ml de Metanol.}$$

Estándares: Stock 50 mM

	[Cat.] mg/ml	V met. uL	V cat. uL	V final uL
0	0	1000	0	1000
1	0.1	667	333	1000
2	0.3	700	300	1000
3	1	667	333	1000
4	3	793	207	1000

mM	uM
0	0
0.345	345
1.035	1035
3.45	3450
10.35	10350

4.1.2.4.-Oxidación de Proteínas

Los resultados de la oxidación de proteínas para los extractos de verbena se observa en el cuadro 4 el contenido de proteínas oxidadas, expresadas como carbonilo fue de 1.18 ± 0.09 carbonilos /ml, sin embargo se observó en el control (+) un mayor contenido de carbonilos, esto se debe a que en la reacción no se incorporó ningún extracto estudiado.

Cuadro N° 4. Resultados de la Oxidación de Proteínas

Tratamiento	Extracto	Oxidación Proteínas carbonilo/ml*
-	Control (+)	19.59 ± 0.09
T1	Alcohólico hojas frescas	57.24 ± 9.98

*El valor presenta el promedio \pm error estándar de la media.

4.2.- DISCUSION

El radical conocido como DPPH es un radical estable, por tal motivo ha sido empleado ampliamente en la determinación de las características antioxidantes de una sustancia o extracto. Si la sustancia evaluada posee actividad antioxidante directa, entonces la misma será capaz de reducir al 2,2 difenil -1-picrilhidracilo por acción directa sobre él, ya sea por transferencia de un electrón o de un radical hidrógeno¹³³. El DPPH absorbe significativamente a 517 nm, por lo que la disminución de la absorción a esta longitud de onda se interpreta como la desaparición del mismo, producto de la acción del antioxidante.

La evaluación de las concentraciones (10, 30, 100, 300, 1000 µg/ml) de extracto alcohólico de verbena, demostraron que a mayor concentración causó mayor inhibición del radical DPPH, encontrándose diferencias significativa ($p < 0.0001$), la eficiencia de inhibir el radical DPPH, fue reflejada como 213 1.80 µg/ml (ver cuadro 1). Se sabe que los radicales libres son compuestos altamente reactivos, pero en presencia de antioxidantes, los radicales libres son inhibidos. Los resultados obtenidos en este estudio siguieron similar tendencia a las publicaciones por Braga *et al*, (2012), quien resalta la elevada actividad antioxidante mediante el método DPPH¹³¹. La bibliografía muestra un elevado número de publicaciones que incluyen la medición de la actividad frente al DPPH, tanto de extractos totales de plantas como de sustancias aisladas. Para extractos totales, las actividades referidas como IC50 varían desde 25 hasta 2021 µg/mL¹³⁹, aun cuando la mayoría de las especies comúnmente informadas como antioxidantes exhiben valores entre los 50 y 250 µg/mL¹⁴⁰⁻¹⁴². Existen productos de algunas especies muy activos, cuyos valores son inferiores a 15 µg/mL¹⁴³. La variación en la actividad de las sustancias puras puede resultar mayor, pero en general las más activas presentan valores bajos de IC50.

De la misma manera, la evaluación de las concentraciones (10, 30, 100, 300, 1000 µg/ml) de extracto alcohólico de verbena, indicaron que a mayor concentración hubo mayor inhibición de radicales peroxilos (ver figura N° 12). La eficiencia de inhibir los radicales peroxilos, son reflejados como los más bajos valores de IC50 (ver cuadro 2)

Con el fin de explicar los mecanismos de la actividad antioxidante de la verbena, se evaluó el contenido de polifenoles totales. Los resultados demostraron que las hojas de verbena poseen polifenoles. Esta característica puede contribuir a suministrar componentes activos como antioxidantes primarios y exterminadores de radicales libres útiles para aliviar problemas de la salud.

La gran cantidad de contenidos polifenólicos se puede atribuir a que las hojas sometidas a un breve tratamiento térmico causa inactivación de la polifenol oxidasa, principal enzima degradadora de polifenoles presentes en plantas. No hay mucha evidencia de trabajos realizados sobre esta planta en estudio en cuanto a concentración de polifenoles totales. Los compuestos polifenólicos ocupan el centro de atención mundial en cuanto a actividad antioxidante respecta¹³⁴⁻¹³⁶ y entre ellos los flavonoides constituyen el tipo de compuesto mayormente estudiado^{137, 138}.

Múltiples autores han intentado establecer una correlación entre la concentración de especies antioxidantes cuantificadas en forma de fenoles totales y la actividad antioxidante frente al radical DPPH. Los resultados son divergentes, mientras algunos obtienen buenos parámetros de correlación¹⁴⁴⁻¹⁴⁶, otros refieren poca correlación entre estas dos variables¹⁴⁷. Una posible explicación a este comportamiento podría estar relacionada con la variación en la composición cualitativa de los extractos. Mientras las técnicas de cuantificación de fenoles no discriminan en la naturaleza de los mismos, la actividad intrínseca de cada uno de ellos es muy diferente. Trabajos recientes establecen la siguiente escala de actividad antioxidante para polifenoles: dímeros de proantocianinas>Flavonoles> Flavonas> ácidos hidroxicinámicos> fenoles simples^{148, 149}. De tal forma, extractos con bajos niveles de fenoles pueden mostrar una buena actividad antioxidante debido a la actividad intrínseca de los mismos, mientras que otros con elevada concentración no resultan tan efectivos como se esperaría. No obstante, es prácticamente una regularidad el hecho de que extractos con elevados niveles de fenoles muestren buena actividad antioxidante¹³⁶.

En nuestros resultados el menor contenido de proteínas oxidadas, expresadas como carbonilos, es mostrado en el cuadro 4. Se conoce que los residuos de aminoácidos de un proteína son susceptibles al daño oxidativo del ataque de radicales hidroxilo, pero ante la presencia de mayor contenido de antioxidante en un compuesto genera protección ante el ataque de fuertes oxidantes como el peróxido de hidrogeno.

La capacidad reductora de un componente sirve como indicador potencial de la actividad antioxidante. Esta propiedad de proteger a las proteínas contra la oxidación, también ha sido investigada para otras especies tales como el frijol (*Phaseolus aereus*) y el capsaicin (compuesto aislado del genero *Capsicum*).

Estos estudios demostraron que evitan la formación de carbonilos en proteínas de albúmina, inducido por el cloruro férrico, peróxido de hidrogeno. Similar a lo observado en este estudio, otros autores han reportado que la inhibición de la oxidación de proteína disminuye con el incremento de la concentración de extractos; es decir a mayor presencia de antioxidante naturales en la planta mayor protección, y estos resultados fueron similares a los obtenidos con extractos metanólico del frijol y tocoferol (*Duh et al.*, 1999)¹³⁰, y efectos del capsaicin (*Luqman & Rizvi*, 2006)¹³².

La capacidad antioxidante de nuestra planta en estudio no es debido a un solo compuesto; en nuestro caso no fue realizado ninguna clase de procedimiento adicional de separación o purificación de carotenoides, flavonoides, iridoides, etc; sin embargo la fitoquímica de esta planta menciona la presencia de muchos flavonoides e iridoides de potencial antioxidante conocido, por lo que se puede afirmar que una combinación de compuestos presentes en el extracto dieron lugar a este efecto antioxidante. Es poco probable que la totalidad de este efecto sea posible sin los flavonoides presentes; sin embargo el origen exacto del potencial antioxidante de los extractos es algo que está más allá del alcance de esta investigación.

4.3.- CONCLUSION

- La eficiencia de inhibición de DPPH y peroxilos tiene directa asociación a la concentración de extracto alcohólico de hojas de verbena
- El proceso de extracción alcohólica permitió obtener un rendimiento con el mayor número de contenidos polifenólicos totales.
- El extracto alcohólico de hojas de verbena protegió a las proteínas ante el ataque de oxidantes
- Colectivamente los resultados demostraron que la verbena es un recurso natural que posee propiedades antioxidantes que puede ser aprovechada para la formulación de nutraceuticos

4.4.- RECOMENDACION

- Realizar estudios mediante cromatografía líquida en alta performance (HPLC) para determinar la composición de compuestos químicos presentes en la verbena con el fin de identificar moléculas con actividad antioxidante.
- Realizar estudios in vivo con los extractos alcohólicos de verbena para demostrar su efecto protector frente a oxidantes
- Propiciar el cultivo de esta especie para generar procesos de transformación e incrementar su valor agregado como producto vegetal posibilitando su industrialización
- Promover la incorporación de la verbena en la producción de nutraceuticos con le fin de contribuir a aliviar problemas de salud causado por estrés oxidativo

4.5.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Khalaf A, Nooman Shakya K Ashok, Al-Othman Atif. El-Agabar Zhana, Farha Husni. 2008. Antioxidant Activity Of Some Common Plants. Turk J. Biol. 51-55
2. Chemah T, C, Aminah A, Noriham A, y Wan Aida W, M. 2010. Determination of pitaya seeds as a natural antioxidant and source of essential fatty acids. International Food Research Journal. 17: 1003-1010
3. Cai W, Gu X y Tang J. 2010. Extraction, purification and characterization of the flavonoids from *Opuntia milpa alta* skin. Czech J. Food Sci. 28: 108-116.
4. Sumaya-Martinez M, T, Cruz-Jaime S, Madrigal-Santillán E, García-Paredes J D, Cariño-Cortes R, Cruz-Cansino N, Valadez-Vega C, Martinez-Cardenas L y Alanís-García, E. 2011. Betalain, Acid Ascorbic, Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Purple, Red, Yellow and White Cactus Pears. Int. J. Sci. 12: 6452-6468
5. Valentao P, E Fernández, F Carvalho, P B Andrade, R M Seabra, M L Bastos (2002) Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. J. Agric. Food Chem. 50:4989-4993
6. Huang D, B Ou, R L Prior (2005) the chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem. 53:1841-1856
7. Butera D, Tesoriere L, Di Guadio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi A M, Kohen Ry Livera M. A. 2002. Antioxidant Activities of Sicilian Prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of its Betalainas: Betanina e Indicaxantina. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 6895-6901

8. Nuengchamnong N, Hermans-Lokkerbol A y Ingkaninan K. 2004. Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin, using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidant activity. Naresuan University Journal.12: 25-37
9. Soler R C, J C Espín, H J Wichers (2000) An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstu_ s. Phytochem. Anal. 11:330-338
10. Bafna A R, S H Mishra (2005) Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn. Ars Pharm. 46:125-38
11. Naik G H, K I Priyadarsini, J G Satav, M M Banavalikar, D P Sohoni, M K Biyani, H Mohan (2003) Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. Phytochemistry 63:97-104
12. Brand-Williams W, M E Cuvelier, C Berset (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss. Technol. 28:25-30
13. World Health Organization. (1990). Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. Technical Report series 797. Geneva: World Health Organization
14. Rodríguez P. 1984. Plantas de la medicina popular venezolana de venta en herbolarios. Publicación de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales. (CONICIT). p. 267
15. World Health Organization (WHO). 1995. Traditional practitioners as primary health care workers: Guidelines for training traditional health practitioners in primary health care. WHO. Geneva. p. 84.

16. Abu-Irmaileh B.E., Afifi F.U. 2003. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. *J. of Ethnopharm.* 89: 193-197
17. Tabuti J.R.S., Lye K.A., Dhillion S.S. 2003. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *J. of Ethnopharm.* 88: 19-44
18. Katewa S.S., Chaudhry B.L., Jain A. 2004. Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *J. of Etnopharm.* 92: 41-46
19. Guarrera P.N., Forti G., Marignoli S. 2005. Ethnobotanical and etnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J. of Etnopharm.* 96:429-444
20. Gupta M.P., Solís P.N., Calderón A.I., Guineau-Sinclair F., Correa M., Galdames C., Guerra C., Espinosa A., Alvenda G.I., Robles G., Ocampo R. 2005. Medical ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama. *J. of Etnopharm.* 96: 389-401
21. Estomba D., Ladio A., Lozada A. (2006). Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from north-western Patagonia. *J. of Etnopharm.* 103: 109-119
22. De Natale A., Pollio A. 2007. Plants species in the Folk Medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy). *J. of Etnopharm.* 109: 295-303
23. Ciniago I., Siebert S. 1998. Medical plants ecology, knowledge and conservation in Kalimantan, Indonesian. *Econ. Bot.* 52 (3): 229-250

24. Ankli A., Sticher O., Heinrich M. 1999. Medical ethnobotany of the Yucatec Maya: Healers' consensus as a quantitative criterion. *Econ. Bot.* 53 (2): 144-160
25. Rengifo, E. (1995). *Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana* 1^{era} Edición. Lima – Perú. Pág. 249
26. Shackleton C.M. 2001. Re-examinig local and market-oriented use of wild species for the conservation of biodiversity. *Environmental Conservation.* 28: 270-278
27. Bruni A., Ballero M., Poli F. 1997. Cuantitative ethnopharmacological study of the Campidano Valley and Urzulei district, Sardinia, Italy. *J. of Etnopharm.* 57: 97-124
28. Hidalgo-Báez D., Ricardi M., Gaviria J., Estrada J. 1999. Contribución a la etnofarmacología de los páramos venezolanos. *Ciencia.* 7(1): 23-32
29. Bermúdez A., Velázquez D. 2002. Etnobotánica médica de una comunidad campesina del estado Trujillo, Venezuela: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. *Rev. Facultad de Farmacia.* 44: 2-6
30. Brack, E. A. 1997. *Amazonía peruana, comunidades indígenas, conocimientos y tierras tituladas.* CEF/ PNUD/UNOPS. Lima- Perú
31. Salaverry O. La complejidad de lo simple: plantas medicinales y sociedad moderna. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2005; 22(4): 245-46

32. Brack, E. A. 2000. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas. Cuzco, Perú.
33. Rengifo, E. (2002). Plantas medicinales y biocidas de la Amazonía peruana para malaria en Loreto. Informe anual. Programa de Investigaciones para el Aprovechamiento Sostenible de la Biodiversidad – Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú
34. Matill HA (1947). Antioxidants. Annu Rev Biochem 16: 177–192
35. German J. "Food processing and lipid oxidation". Adv Exp Med Biol 459: 23–50
36. Soler – Rivas, Cristina et al, An Easy and Fast Test to Compare Total Free Radical Scavenger Capacity of Foodstuffs. Phytochemical Análisis, 2000. 11: p. 330-338
37. Sandoval, M.; Okuhama, N. y Angeles, F. (2001). Primer Curso Internacional: Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidativa y anti-inflamatoria de plantas medicinales de la Amazonía. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú
38. Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University, Press, New York, USA. 1262pp.
39. Martínez, J.; Bernal, H. y Cáceres, A. (2000). Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Santa Fé de Bogotá, D.C., Colombia. 524pp

40. Gerald B. Hammond, Irma D. Fernández, León F. Villegas, Abraham J. Vaisberg. A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 61 (1998) 17–30
41. Joly, A.B. (1979) “*Botânica: introdução à taxonomia vegetal*”, 5. ed., Editora Nacional, São Paulo, págs 579s
42. Umaña-Rojas, Eduardo (1990). Estudio fitoquímico de la parte aérea de *Verbena littoralis* (H.B.K.). 53 p. Editorial San José, Universidad de Costa Rica
43. Li Y, Ishibashi M, Chen X and Ohizumi Y. 2003a. Littorachalcone, a new enhancer of NGF-mediated neurite outgrowth, from *Verbena littoralis*. *Chem Pharm Bull* 51: 872-874
44. Li Y, Ishibashi M, Satake M, Chen X, Oshima Y and Ohizumi Y. 2003b. Sterol and triterpenoid constituents of *Verbena littoralis* with NGF-potentiating activity. *J Nat Prod* 66: 696-698
45. Castro-Gamboa I and Castro O. (2004). Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). *Phytochem* 65: 2369-2372.
46. Tiago Juliano Tasso de SOUZA; Melânia Palermo MANFRON; Gilberto Dolejal ZANETTI; Solange Cristina da Silva Martins HOELZEL & Vera Pereira PAGLIARIN. Análise Morfo-Histológica e Fitoquímica de *Verbena littoralis* Kunth. Departamento de Farmacia Industrial, Universidad Federal de Santa María. *Acta Farm. Bonaerense* 24(2): 209-14 (2005)

47. Jaramillo, Ximena; Sarango, Verónica; Burneo, Lorena (2008). Evaluación de la actividad antioxidante de 9 especies vegetales nativas del Sur del Ecuador mediante los métodos DPPH y β -CLAMS. Instituto de Química Aplicada, UTPL. Ecuador.
48. Sistema de clasificación de Englen & Prantl, modificado por Melchor en 1964.
49. Willmann, D., E. M. Schmidt, M. Heinrich y H. Rimpler, 2000. Verbenaceae. En P. D. Dávila A., J. L. Villaseñor R., R. Medina L. y O. Téllez V. (eds.). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 27. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México. D.F.
50. Yeo, P.F. (1989) Kew Bull. 45: 101-20
51. Nash, D. L. & M. Nee, 1984. Verbenaceae (III). En: Sosa, V. (ed.). Flora de Veracruz. Fascículo 41. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México.
52. Pool, A. y R. Rueda, 2001. Verbenaceae. En: Stevens, W. D., C. Ulloa-U., A. Pool y O. M. Montiel (eds.). Flora de Nicaragua. Monographs in Systematic Botany Vol. 85. Missouri Botanical Garden, San Luis, Missouri.
53. Rzedowski, J. & G. C. de Rzedowski, 2002. Verbenaceae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 100. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

54. Li Y, Matsunaga K, Kato R and Ohizumi Y. 2001a. Verbenachalcone, a novel dimeric dihydrochalcone with potentiating activity on nerve growth factor-action from *Verbena littoralis*. J Nat Prod 64: 806-808.
55. Li Y, Matsunaga K, Ishibashi M and Ohizumi Y. 2001b. Littoralisone a novel neuritogenic iridolactone having an unprecedented heptacyclic skeleton including four- and nine-membered rings consisting of glucose from *Verbena littoralis*. J Org Chem 66: 2165–2167
56. Castro, Oscar; Umaña, Eduardo. Potencial Biológico y Químico de *Verbena littoralis*, una planta medicinal usada en Costa Rica usada como agente antidiarreico. Química Nova 13(4). 1990.
57. Pérez-Arbeláez E. (1978). Plantas útiles de Colombia, tercera redacción muy corregida y aumentada. Litografía Arco, 3rd ed., Bogotá: Litografía Arco, Bogotá, Venezuela, 831 p
58. Ocampo Ra and Maffioli A. (1987). El uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica, v. 1, 2nd ed., San José: Litografía e Imprenta Lil, San José, Costa Rica, p. 79–81
59. Cáceres, A. (1999) “Plantas de Uso Medicinal en Guatemala”. Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, p. 369s.
60. Teolinda Carrillo-Rosario y Glenda Moreno. Importancia de las plantas medicinales en el autocuidado de la salud en tres caseríos de Santa Ana Trujillo, Venezuela. Revista de la Facultad de Farmacia Vol. 48 (2) 2006

61. Hilgert N.I. 2001. Plants used in home medicine in Zenta River basin, Northwest Argentina. *J. of Etnopharm.* 76:11-34
62. Scarpa G.F. 2004. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *J. of Etnopharm.* 91: 115-135
63. Brako, L., Zarucchi, J.L., 1993. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Crosby, M.R. (Ed.), vol. 45. Missouri Botanical Garden, Saint Louis
64. Andary, C.; Privat, G.; Chevallet, P.; Orzalesi, H.; Serrano, J.J.; Boucart, M.; *Pharmaco Ed. Sci*, (1980), 35,3
65. Ishuguro, K.; Yamaki, M.; Takagi, S.; *Yayugaku Zachii*, (1982), 102, 755
66. Ishuguro, K.; Yamaki, M.; Takagi, S.; Ikeda, Y.; Kawakami, K.; Ito, K.; Nose, T.; *Chem. Pharm. Bull* (1986), 34, 2375
67. Rzedowski, J. & G. C. de Rzedowski, 2002. Verbenaceae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 100.* Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
68. Joly, A.B. (1979) “Botânica: introdução à taxonomia vegetal”, 5. ed., Editora Nacional, São Paulo, págs 579s.

69. Lorenzi, H. (2000) "Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas", 3ª.ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da flora, São Paulo, 807p.
70. Scheele, C.W. (1977), *Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer*. Uppsala and Leipzig. Section 2. En: Scheele, C.W. "*The collected papers of Carl Wilhelm Scheele*". Bell and sons, London 1931 y Kraus Reprint Co. New York, 1971, pp. 85-178.
71. Gershman, R.; Gilbert, D.L.; Nye, S.W.; Dwyer, P.; Fenn, W.O. *Science* 1954, *119*, 623-626.
72. Turrens, J.F.; Boveris, A. *Biochem. J.* 1980, *191*, 421-427.
73. Boveris, A.; Cadenas, E.; Stoppani, O.M. *Biochem. J.* 1976, *153*, 435-444.
74. Shaspira, A.H.V. *Oxidative Stress and Aging*. Birkhäuser, *Basel*, 1995, pp. 159- 169.
75. Harman, D. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1972, *20*, 145-147.
76. Ames, B.N.; Shigenaga, M.K. *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, chinchester, England, 1993, pp. 1-15.
77. Porter, N.A.; Cldwell, S.E.; Mills, K .A. *Lipids* 1995, *30*, 277-290.
78. Miyazawa, T.; Fujimoto, K.; Suzuki, T.; Yasuda, K. *Methods in Enzymol* 1994, *233C*, 324-332.

79. Cadenas, S.; Lertsiri, S.; Otsuka, M.; Barja, G.; Miyazawa, T. *Free. Rad. Res.* 1996, 26, 485-493.
80. Richter, Ch.; Park, J.W.; Ames, B.N. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988, 85, 6465-6467.
81. G. Wolf, The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill, *J Nutr* 135 (2005) 363-366.
82. B. Halliwell, *Annu. Rev. Nutr.* (1996) 16:33-50.
83. T. Finkel, N.J. Holbrook. *Nature* (2000) 408 (6809): 239-47.
84. I. Rudolf, *J Am Coll Nutr*, 20 (2001) 464S-472S
85. B. Tepe, M. Sokmen, H. Askin Akpulat, A. Sokmen, *Food Chemistry* 92 (2005) 89-92.
86. W. Mullen, S. C. Marks, and A. Crozier, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3148-3157.
87. Harris, E.D. *FASEB J.* 1992, 6, 2675-2683.
88. Sies, H.; Stahl, W. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1992, 669, 7-20.
89. Palozza, P.; Krinsky, N.I. *Free Rad. Biol. Med.* 1991, 11, 407-414
90. Palozza, P.; Krinsky, N.I. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, 297, 184-187.

91. Kanno, T.; Utsumi, T.; Takehara, Y.; Ide, A.; Akiyama, J.; Yoshioka, T.; Horton, A.; Utsumi, K. *Rad. Biol. Med.* 1996, 24, 281-289.
92. Amorati, R.; Lucarini, M.; Mugnaini, V.; Pedulli, G.F. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 5198-5204.
93. Fang Fang, Jing-Ming Li, Qiu-Hong Pan, Wei-Dong Huang. *Food Chemistry* 101 (2007) 428-433.
94. S. Buratti, S. Benedetti, M.S. Cosio. *Talanta* 71 (2007) 1387-1392.
95. Gonzales, M. y Muñis, P. Vall, V. (2001). Actividad antioxidante de la cerveza, estudios in vivo e in vitro. *Centro de información Cerveza y Salud.* 57
96. Dastmalchi, K. Dorman, D. Kosarb, M. Hiltunen, R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract, *LW T* 40, 240 (2007), 239–248
97. Koleva, I., Van Beek, T., Linssen, J., Groot, A., Y Evstatieva, L. (2002). Screening of plants extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemistry Analysis* 13: 8-17
98. Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., *et.al.* (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The royal society of chemistry* 127:183-198
99. Li, C., Yue, W. y Cheng, C. (2003). Antibacterial and DPPH free radical scavenging activities of ethanol extract of propolis collected in taiwan. *Journal of Food and Drugs Analysis* 11(4): 277-282

100. Cintra, R. M. G.;Mancini-Filho, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. *Nutrire*, 22, 49-62, 2001.
101. Moreira, A.V.B.;Mancini-Filho, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. *Nutrire*, 24, 2003.
102. Robards, K; Prenzler, P.D.;Tucker, G.;Swatsitang, P.;Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66, 401-436, 1999.
103. Arena, E.;Fallico, B.;Maccarone, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.*, 74, 423-427, 2001.
104. Moyer, R. A.;Hummer, K. E.;Finn, C.E.;Frei, B.;Wrolstad, R.E. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 519-525, 2002.
105. Prior, R.L.; Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.*,27, 11/12, 1173-1181.
106. Rice-Evans, C.A.;Miller, N.J.;Papaganda, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 20, 933-956, 1996.
107. Satué-Gracia, M.T.;Heinonen, M.;Ankel, E.N. Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.*,45, 3362-3367, 1997

108. Arnous, A.;Makris, D.;Kefalas, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Comp. Anal.*, 15, 655-665, 2002.
109. Giusti, M.M.;Wrolstad, R. E. Unit. F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Anal.Chem.*, Wrolstad, R.E., E.;John Wiley & Sons: New York, 2001.
110. Kim, D-O.;Lee, K.W.;Lee, H.J.;Lee, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3713-3717, 2002.
111. Re, R.;Pellegrini, N.;Proteggente, A.;Pannala, A.;Yang, M.;Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 9/10, 1231-1237, 1999.
112. Sellappan, S.;Akoh, C.C.;Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2432-2438, 2002.
113. Montoya, B.H.;Lemeshko, V.;López, J.B.;Pareja, A.;Urrego, R.;Torres, R. Actividad antioxidativa de algunos extractos vegetales. *Vitae*, 10, 2, 72-79, 2003.
114. Arnao, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 419-421, 2000.
115. Kuskoski,E.M.;Asuero, A.G.;Troncoso, A.M.;Garcia-Parilla, M. C.;Fett, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.*, v. 24, n.4, 691-693, 2004.

116. Imeh, U.;Khokhar, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6301- 6306, 2002.
117. Ishige, K.;Schubert, D.;Sagara, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Rad. Biol. Med.*, 30, 433-446, 2001.
118. Fogliano, V.;Verde, V.;Randazzo, G.;Ritieni, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1035-1040, 1999.
119. Folin, C.;Ciocalteau, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 73, 627-650, 1927.
120. Prakash, Medallion laboratories, Antioxidant activity, Vol 19 No. 2 (2001)
121. Sánchez-Moreno, J. A. Larrauri and F. Saura-Calixto. *J. Sci. Food Agric.*, 76 (1998) 270-276.
122. Hajar Guerra, Gisely. Bioseguridad en el Laboratorio. (2008). BIOSEGURIDAD. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud-INS. Organismo Público Descentralizado del Sector Salud. Pág. 98
123. Miller, M.; Angeles, F.; Reuter, B.; Bobrowski, P. and Sandoval, M. (2001). Dietary antioxidants protect gut epithelial cells from oxidant-induced apoptosis. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 1: 11.
124. Piscocoya, J.; Rodriguez, Z.; Bustamante, S.; Okuhama, N.; Miller, M. and Sandoval, M. (2001). Efficacy and safety of freeze-dried cat's claw in osteoarthritis of the knee: mechanisms of action of the species *Uncaria guianensis*. *Inflamm res* 50: 442-448.

125. Sandoval, M.; Charbonnet, R.; Okuhama, N.; Roberts, J.; Krenova, Z.; Trentacosti, A. and Miller, M. (2000). Cat's claw inhibits TNF α production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. *Free Radic Biol Med*29: 71-78.
126. Sandoval, M.; Okuhama, N.; Zhang, X.; Condezo, L.; Lao, J.; Angeles, F.; Musah, R.; Bobrowski, P. and Miller, M. (2002). Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 9: 325-337.
127. Sandoval, M. y Okuhama, N. (2003). Curso teórico – práctico: técnicas moleculares en investigaciones agrícolas, salud y Biodiversidad amazónica. Centro Investigación Productos Naturales de la Amazonía – Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.
128. Sandoval, M.; Okuhama, N. y Angeles, F. (2001). Primer Curso Internacional: Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidativa y anti-inflamatoria de plantas medicinales de la Amazonía. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú
129. Lotito, S.B. and Frei, B.2004. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (2): 201-211p.
130. Duh, P.D., Du, P.C. and Yen, G.C. 1999. Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 1055 – 1061p.

131. Virgínia F. Braga I; Giselle C. MendesI; Raphael T.R. OliveiraI; Carla Q.G. SoaresI; Cristiano F. ResendeI; Leandro C. PintoII; Reinaldo de SantanaII; Lyderson F. VicciniIII; Nádia R.B. RaposoII; Paulo H.P. PeixotoI. Micropropagation, antinociceptive and antioxidant activities of extracts of *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae). *An. Acad. Bras. Ciênc.* vol.84 no.1 Rio de Janeiro Mar. 2012 Epub Feb 24, 2012
132. Luqman, S. and Rizvi, S. 2006. Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in protein by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytotherapy Research*, 20. 303 – 306p.
133. Mruthunjaya K, Hukkeri V. In vitro Antioxidant and free radical scavenging potential of *Parkinsonia aculeata* L. *Phcog Mag.* 2008; 4(13): 42-51.
134. Lantto TA, Dorman HJD, Shikov AN. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chem.* 2009; 112: 936-43.
135. Diouf PN, Stevanovic T, Cloutier A. Antioxidant properties and polyphenol contents of trembling aspen bark extracts. *Wood Sci. Tech.* 2009; 43: 457-70.
136. Gandin V, Nystrom C, Rundlof AK. Effects of the antioxidant Pycnogenol (R) on cellular redox systems in U1285 human lung carcinoma cells. *FEBS J.* 2009; 276: 532-40.
137. Sonboli A, Mojarrad M, Ebrahimi SN, Enayat SH. Free Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content of Methanolic Extracts from Male Inflorescence of *Salix aegyptiaca* Grown in Iran. *Iran. J. Pharm. Res.* 2010; 9(3): 293-296.
138. Han RM, Tian YX, Liu Y. Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 3780-3785.

139. Katalinic V, Milos M, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* 2006; 94: 550–557.
140. Rathee JS, Birija S, Patro SM, Sunita G, Chattopadhyay S. Antioxidant Activity of *Piper betel* Leaf Extract and its Constituents. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 9046-9054.
141. Latif A, Hussain J, Hamayun M, Gilani SA, Ahmad S, Rehman G, et al. Secondary Metabolites from *Inula britannica* L. and Their Biological Activities (review). *Molecules.* 2010; 15: 1562-1577.
142. Ali EM, Fazel NS, Mohammad NS. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium Caucasicum* Trautv at flowering stage. *Phcog Mag.* 2009; 1(6): 435-439.
143. Ani V, Varadaraj MC, Akhilender N. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.) *Eur. Food Res. Technol.* 2006; 224: 109–115.
144. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006; 97: 654–660.
145. Spigno G, Tramelli L, de Faveri DM. Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* 2007; 81: 200–208.
146. Souza JNS, Silva EM, Loir A, Rees JF, Rogez H, Larondelle Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chem.* 2008; 106: 331-339.

147. Czapecka E, Mareczek A, Leja M. Antioxiadant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem.* 2005; 93: 223–226.
148. Diouf PN, Stevanovica T, Boutin Y. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Ind. Crop Prod.* 2009; 30: 297–303.
149. Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D, et al. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: the role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chem.* 2009; 112: 587–594.