



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
“Dr. José Rafael Luna”
Trabajo de Grado II**



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
LOS EXTRACTOS DE *Satureja nubigena*. Briq RECOLECTADAS
EN EL MUNICIPIO CARDENAL QUINTERO DEL ESTADO
MÉRIDA**

Autora:

Nancy Uzcátegui

C.I: V- 24.373.542

Tutor(a):

Prof. María Eugenia Rondón

Mérida, enero de 2023



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
“Dr. José Rafael Luna”
Trabajo de Grado II



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
LOS EXTRACTOS DE *Satureja nubigena*. Briq RECOLECTADAS
EN EL MUNICIPIO CARDENAL QUINTERO DEL ESTADO
MÉRIDA**

**Trabajo de Grado para obtener el título de Licenciada en
Bioanálisis**

Autora:

Nancy Uzcátegui

C.I: V- 24.373.542

Tutor(a):

Prof. María Eugenia Rondón

Mérida, enero de 2023

Dedicatoria

A Dios por ser el autor de cada segundo de mi vida, porque él merece todo cuanto él nos da; por llevarme de su mano y colocar personas maravillosas en mi camino para lograr sus proyectos en mí.

A mi hermano, Luis Alberto Uzcátegui, quién me dio su apoyo incondicional, y por designios de Dios contempla esté logro desde el cielo, te amo hermano, sé que celebras conmigo.

A mis padres, Nancy González y José Uzcátegui, por su amor, atención y compañía, gracias por estar siempre para mí, recordándome que puedo lograrlo, por su apoyo en todo momento, por sembrar en mí, grandes valores que edifican mi vida. Los amo y no me alcanzará la vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí, este logro es de ustedes.

A mis hermanos Paola y José por ser parte fundamental de mi vida, por apoyarme y brindarme su amor y alegría, gracias por formar parte de mis logros.

A mi amiga Yasney Molina por ser la mejor compañera que la universidad y la vida me regalo, gracias por cada trasnocho, compartir, risas y preocupaciones; gracias por siempre estar a mi lado, te quiero.

Uzcátegui González, Nancy Andreina

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme vivir este maravilloso momento, por escribir mi historia desde el vientre de mi madre, por darme su compañía en todo momento y conducirme en este hermoso viaje llamado vida.

Gracias a la Ilustre Universidad de Los Andes por abrirme las puertas de su corazón para formarme y ser parte de ella. También a nuestra Facultad de Farmacia y Bioanálisis por permitirme ser una hija más de sus espacios y cosechar en mí, tantos conocimientos sembrados desde el primer día; y con ello a todos los profesionales que allí hacen vida, gracias por compartir sus conocimientos y experiencias.

Gracias a mi familia, quien me ha apoyado en cada eslabón de este sueño y que sigue allí para sonreír conmigo.

Gracias a mi tutora Profesora María Eugenia Rondón por ser el pilar fundamental de este proyecto, por sus enseñanzas, amistad y paciencia; gracias por el amor y dedicación con el que haces tu trabajo, Dios te bendiga.

Uzcátegui González, Nancy Andreina

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	4
Planteamiento del problema	4
Justificación de la investigación	8
Objetivos de la investigación	10
Alcances y limitaciones de la investigación	11
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	12
Trabajos previos	12
Antecedentes históricos	16
Bases teóricas	17
Aproximación teórica sobre los metabolitos secundarios de las plantas	17
Aproximación teórica sobre los tipos de fitoquímicos	19
Aproximación teórica sobre los radicales libres y el estrés oxidativo generado en el organismo	21
Familia de las Lamiaceae	25
Género <i>Satureja</i>	26
<i>Satureja nubigena</i>	25
Descripción botánica	26
Propiedades farmacológicas	27
Clasificación taxonómica	28
Composición química de <i>Satureja nubigena</i>	29
Extractos de plantas	31
Método de detección de los extractos	31
Radicales libres	34

Formación de los radicales libres	35
Antioxidante	36
Clasificación de los antioxidantes	36
Mecanismo de acción de los antioxidantes	38
Capacidad antioxidante de los flavonoides	40
Carotenoides	40
Actividad antioxidante de los carotenoides	40
Estrés oxidativo	42
Fuentes naturales de los antioxidantes	43
Determinación de la actividad antioxidante	44
Definición operacional de términos	47
Operacionalización de las variables	49
Hipótesis	50
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	53
Tipo de investigación	53
Diseño de la investigación	53
Población y muestra	54
Sistema de variables	55
Procedimientos de la investigación	55
Diseño de análisis	59
Variables estadísticas	59
Aspectos administrativos	60
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
Tamizaje Fitoquímico	62
Cuantificación de Fenoles Totales	67
Actividad Antioxidante	68
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
Conclusiones	73
Recomendaciones	74
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFÍAS	75

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Operacionalización de la variable dependiente actividad antimicrobiana.	51
2	Operacionalización de la variable independiente composición química de los extractos de <i>Satureja nubigena</i> .	52
3	Variables estadísticas según su naturaleza, escala de medición e indicadores estadísticos.	58
4	Tamizaje fitoquímico de los metabolitos secundarios del extracto alcohólico de <i>Satureja nubigena</i>	60
5	Contenido de fenoles totales del extracto metanólico de <i>S. nubigena</i> .	68
6	Ensayo preliminar de la actividad antioxidante del extracto metanólico.	70
7	Porcentaje de Inhibición del extracto metanólico de <i>S. nubigena</i> a distintas concentraciones.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	Generación de ROS, a partir de oxígeno en estado triplete	22
2	Mecanismo de la peroxidación lipídica	23
3	Efecto de ROS sobre proteínas	23
4	Características diagnosticas de la familia Lamiaceae. A) Rama florida, B) Flor, C) Diagrama floral.	25
5	Distribución geográfica de <i>S. nubigena</i>	26
6	<i>Satureja nubigena</i>	27
7	Estructura química de un flavonoide	29
8	Taninos condensados (catequina y galocatequina) y taninos hidrolizables (ácido gálico y elágico)	30
9	Estructura química de un triterpeno	31
10	Maceración	32
11	Lixiviación	32
12	Método de Soxhlet	33
13	Extracción por microondas	34
14	Mecanismo de los antioxidantes para estabilizar a un radical libre	39
15	Características estructurales de flavonoides con actividad atrapada de radicales libres	41
16	Participación del β -caroteno en la formación de ERON	41
17	Reacción química entre el DPPH y un antioxidante	45
18	Curva de calibración del ácido gálico	67
19	Ecuación de la recta para las distintas concentraciones empleadas del extracto metanólico de <i>S. nubigena</i>	71



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
“Dr. José Rafael Luna”
Trabajo de Grado II



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS
EXTRACTOS DE *Satureja nubigena*. Briq RECOLECTADAS EN EL
MUNICIPIO CARDENAL QUINTERO DEL ESTADO MÉRIDA

Proyecto de Investigación

Autora:

Nancy Uzcátegui

Tutor(a):

Prof. María Eugenia Rondón

RESUMEN

La planta *Satureja nubigena* pertenece a la familia Lamiaceae, caracterizada por tener compuestos químicos con actividad antioxidante *in vitro* como flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides. El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de *Satureja nubigena* recolectadas en el Municipio Cardenal Quintero del estado Mérida. El tipo de investigación es confirmatoria y el diseño de campo, laboratorio, transversal, contemporánea y bivariable. En cuanto a la metodología, se recolectó el material vegetal en su hábitat natural en el Sector La Amarilla, de la población de Santo Domingo, municipio Cardenal Quintero, estado Mérida, la cual se procesó en el Laboratorio de Investigación de la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Como resultado, se obtuvo el extracto metanólico de las partes aéreas de *S. nubigena*, encontrando en su composición química taninos, fenoles, flavonoides, antraquinonas y cumarinas; presencia moderada de saponinas y triterpenos, y ligera presencia de alcaloides. Además, un contenido fenólico de $61,20 \pm 0,19$ mgEAG/100g; con una actividad antioxidante con un IC₅₀ de $2,85 \pm 1,66$ mg/mL. En base a los datos obtenidos la planta *Satureja nubigena* es una buena fuente de antioxidantes, dándole un valor agregado a la planta.

Palabras claves: *Satureja nubigena*, actividad antioxidante, composición química, extractos, radicales libres.

INTRODUCCIÓN

El uso y consumo de plantas medicinales por el ser humano desde la antigüedad, consta en testimonios históricos pertenecientes a diferentes civilizaciones. Al inicio el hombre las empleo solo guiado por su instinto, después empíricamente y posterior a eso, en forma racional al conocer sus beneficios y propiedades medicinales sin fundamentación científica (Illescas y Lovato, 2020).

De esta manera, una planta medicinal es considerada como un complejo laboratorio de síntesis y degradaciones en el que generalmente coexisten componentes con diversas estructuras químicas, y su efecto en muchas ocasiones se debe a varios de estos componentes denominados principios activos (Torres, 2013).

Las plantas, especialmente las especies aromáticas y sus extractos, han tenido un creciente interés, tanto en la industria alimentaria como en la investigación científica, debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, que les permite competir con otros antioxidantes naturales y con los sintéticos utilizados actualmente (Gallego, 2016).

Con relación a la actividad antioxidante, se conoce como la capacidad o propiedad que posee un agente, bien sea un compuesto químico, natural o sintético, de evitar o prevenir el proceso oxidativo de otras moléculas, actuando como donador de electrones (Cano y Marino, 2005).

Asimismo, ante la falta de moléculas antioxidantes en el organismo, ya sea por baja producción, factores externos negativos y especialmente en personas con edades avanzadas, se puede generar estrés oxidativo, el cual es el resultado de un exceso de radicales libres en el cuerpo humano, contribuyendo al desarrollo de enfermedades cancerígenas, cerebrovasculares, neurodegenerativas, entre otras (Mora, 2002).

De allí, la necesidad de buscar alternativas de origen natural, como lo son las plantas a través de la obtención de sus extractos naturales (Usano, Palá, y Díaz, 2014). Por lo tanto, la actividad antioxidante de las plantas está relacionada con la presencia de metabolitos secundarios y su bajo potencial de oxidación, lo que les da la capacidad de estabilizar los radicales libres (Torres, 2013).

Como se ha señalado, los extractos de plantas son una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenidos por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. En general, los extractos son soluciones diluidas de metabolitos secundarios (Montes, 2014).

Además, por medio de diversos estudios se conoce que la mayoría de las especies vegetales poseen propiedades antioxidantes, bactericidas, antiinflamatorias, antivirales, antipiréticas, insecticidas y fungicidas. Del mismo modo, está bien documentado que ciertas especies poseen sustancias activas capaces de combatir eficazmente numerosas enfermedades presentes en la actualidad (Miranda et al, 2012).

Por otro lado, uno de los principales métodos de evaluación de la actividad antioxidante, es el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) desarrollado por Brand-Williams y otros, en 1995. Se basa en la reducción de la absorbancia medida a 517 nm del radical DPPH, por antioxidantes. La solución de DPPH disuelta en metanol o etanol, reacciona con el sustrato antioxidante, el cual dona un átomo de hidrógeno, cambiando el reactivo DPPH de color violeta a amarillo. El cambio de color debe ser monitoreado al instante y a los 30 minutos, con agitación continua con la ayuda de un espectrofotómetro, esto para la determinación de los parámetros de las propiedades antioxidantes (Tovar, 2013).

Este proyecto de investigación ha sido ordenado en cinco (5) capítulos. El primero, corresponde al Capítulo I, que incluye el planteamiento del problema, justificación de la investigación, objetivos de la investigación,

alcances y limitaciones de la investigación. Seguido a este, el Capítulo II, que representa el marco teórico, está estructurado en trabajos previos, antecedentes históricos, antecedentes teóricos, definición operacional de términos, operacionalización de las variables y las hipótesis. Siguiendo este orden se encuentra el Capítulo III, titulado marco metodológico, que contiene el tipo de investigación, diseño de investigación, población, muestra, sistema de variables, procedimientos o metodología, diseño de análisis y variables estadísticas. En el Capítulo IV se encuentran los resultados y discusión; y finalmente el Capítulo V, las conclusiones y recomendaciones, finalizando con la bibliohemerografía del proyecto de investigación.

De esta manera, es de gran importancia la búsqueda de antioxidantes de origen vegetal con propiedades eliminadoras de radicales libres que podrían tener relevancia como agentes terapéuticos en varias enfermedades causadas por estrés oxidativo, a pesar de esto son pocas las investigaciones que se han encontrado acerca de sustancias naturales con actividad antioxidantes en extractos obtenidos a partir de *Satureja nubigena*.

Por ello, el objetivo general de esta investigación es confirmar la relación causa-efecto entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de *Satureja nubigena* recolectada en el municipio Cardenal Quintero del estado Mérida, en el Laboratorio de Investigaciones de la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Las plantas medicinales han sido usadas desde hace muchos siglos para aliviar síntomas y tratar enfermedades. La medicina tradicional ha ganado un gran interés tanto para el uso preventivo, para el tratamiento de enfermedades, así como también, para la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos (OMS, 2000)

Además, en la mayoría de las plantas se encuentran compuestos químicos que le confieren alguna propiedad específica, es decir, sustancias responsables que le proporcionan valor terapéutico y curativo a la planta. De allí pues, que la actividad biológica depende de la composición química, atribuido no solo a un compuesto específico sino a la acción combinada de varios de ellos (Montes, 2014).

Dichas sustancias se obtienen a partir de las plantas a través de procedimientos utilizando solventes orgánicos, dando como resultado extractos vegetales, que comprende la mezcla compleja de compuestos con actividades farmacológicas (Montes, 2014).

Por esta razón, el estudio científico de las plantas medicinales es una fuente relevante para el descubrimiento de nuevos fármacos que luego se sintetizan. Pero también permite un conocimiento más profundo que conduce a que muchos productos naturales sean reconocidos como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan el nivel de los fármacos de síntesis (Vivot, Sánchez, Cacik y Sequin, 2012).

Por otro lado, numerosos estudios han puesto en manifiesto la relación existente entre el estrés oxidativo, el envejecimiento celular y algunas enfermedades. El estilo de vida actual está favoreciendo la acumulación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno en el organismo y como consecuencia de ello un aumento del estrés oxidativo a nivel fisiológico (López, 2016).

En efecto, un desequilibrio del balance entre prooxidantes y antioxidantes, por reducción de los niveles de antioxidantes y/o por el incremento de la producción de oxidantes, traen consecuencias patológicas como: la arteriosclerosis, envejecimiento prematuro, infarto del miocardio, carcinogénesis, accidentes cerebro-vasculares, virosis y artritis, entre otros (Torres et al, 2013).

Por su parte, numerosos estudios de plantas medicinales se han realizado desde hace décadas, a causa del uso potencial como fuente de sustancias con propiedades biológicas. Uno de los componentes principales de las plantas son los antioxidantes, sustancias existentes en determinados alimentos que actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres, causantes de los procesos de envejecimiento y otras enfermedades (Gutiérrez et al., 2007).

De esta manera, estas propiedades se deben a gran cantidad de sustancias, como por ejemplo, flavonoides, terpenoides, carotenoides, vitaminas, entre otros. Las hierbas y especias usadas, por lo general para condimentar platos, se han caracterizado por ser una excelente fuente de compuestos fenólicos, aportando grandes beneficios frente a la rancidez oxidativa. Actualmente, un pequeño número de plantas se usan como antioxidantes en la industria alimentaria e incluso se han usado en el desarrollo de fitomedicamentos calificados como fitofármacos; por todo ello también representan un rol importante en la industria farmacéutica (Gallego, 2016).

Así, los extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos se consideran buenos candidatos para su uso como antioxidantes, se ha demostrado que compuestos terpénicos con carácter fenólico aislados de especias y/o hierbas aromáticas poseen gran capacidad antioxidante. En estudios precedentes se han demostrado que utilizar productos naturales como extractos de plantas, frutas, verduras y especias comestibles actúan sobre los procesos degradativos de lípidos y son una alternativa a los productos sintéticos, que en algunos casos podrían ser perjudiciales para la salud y el medio ambiente (Gallego, 2016).

Aunado a esto, se ha encontrado que una de las especies de la Familia Lamiaceae como *Satureja nubigena*, es empleada como remedio tradicional, por lo que no es tóxica. Debido a esto, existen investigaciones relacionadas con la actividad antioxidante de la especie en estudio. Algunos de estos se explican a continuación:

En el 2020 Illescas y Lovato, en su trabajo estudiaron el perfil fitoquímico de los extractos de *S. nubigena*, encontrando en la composición química del extracto etéreo compuestos grasos, agrupamientos lactónicos y triterpenos/ esteroides; en el extracto etanólico identificaron agrupamientos lactónicos, catequinas, saponinas, compuestos fenólicos en manera regular y quinonas/benzoquinonas; y por último en el extracto acuoso encontraron azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, mucílagos y principios amargos que fueron reconocidos saboreando una gota del extracto. De esta manera, afirmaron que las aplicaciones de los compuestos de la planta son esenciales en el campo de la agroindustria, ya que pueden ser empleados como agentes antioxidantes, aminoácidos emulsificantes, efectos conservadores para complementar el desarrollo de alimentos o productos más sanos y libres de compuestos químicos en la formulación de los productos.

Por otro lado, Rodríguez (2019), determinó los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts “*panisara*”,

en la cual, los metabolitos secundarios identificados en los extractos etanólico, acuoso y diclorometánico fueron: compuestos fenólicos, taninos, triterpenos, esteroides, flavonoides y alcaloides. Para la actividad antioxidante los resultados obtenidos fueron mayores en el extracto sonificado etanólico de 45%, infusión y decocción.

Finalmente, en el 2018 Noriega et al., publicaron un trabajo científico el cual tuvo como objetivo evaluar y dilucidar la composición química y sus actividades antioxidantes y antimicrobiana del aceite esencial de la especie *Clinopodium nubigenum*. La metodología que utilizaron incluyó la cromatografía de espectrometría de masas para determinar la composición química. Además, para probar su capacidad antioxidante utilizaron los métodos de 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) y el ensayo de blanqueo de β -caroteno, y para la susceptibilidad de los microorganismos emplearon el ensayo de difusión de pozo.

Concluyendo, que la especie muestra un potencial medicinal prometedor que exhibe una actividad antibacteriana y antioxidante significativa en diferentes concentraciones. Por esta razón, es interesante conocer la relación entre compuestos que potencian tal efecto. Respecto a la actividad antioxidante, aumentó con la mayor concentración de aceite esencial en las diluciones preparadas, además su actividad antioxidante se le atribuyó al timol y el acetato de carvacrol como compuestos principales. Estos datos sugieren una alternativa natural interesante como atrapador de radicales libres en el organismo.

Luego de describir la situación actual del evento de estudio, la autora de esta investigación formula el siguiente enunciado holoprático:

¿Cuál es la relación que existe entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de *Satureja nubigena*. Briq recolectada en el Municipio Cardenal Quintero del estado Mérida, en el Laboratorio de Investigaciones de la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia

y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023?

Justificación de la Investigación

Las razones que llevaron a la autora a seleccionar el tema de estudio, son el por qué se realiza la investigación. De este modo, en los últimos años ha aumentado el número de enfermedades cuyo factor más preponderante ha sido el estrés oxidativo, producido cuando el ataque oxidativo de los radicales libres supera las defensas antioxidantes del cuerpo. Algunas patologías asignadas parcial o totalmente a dichos radicales libres son: el envejecimiento, dermatitis de contacto, gota, alzheimer, esclerosis múltiple, pancreatitis, Parkinson, demencia senil, colitis y cáncer (López, 2014).

De esta manera, en la naturaleza existen numerosas alternativas de antioxidantes naturales entre los cuales se encuentran las vitaminas y compuestos fenólicos principalmente; los cuales se estudian ampliamente para atenuar los efectos de algunas enfermedades degenerativas.

Asimismo, los antioxidantes son un grupo de moléculas reconocidas por su capacidad para neutralizar los radicales libres; estas sustancias han surgido como una alternativa para combatir deficiencias asociadas al estrés oxidativo, tales como las enfermedades cardiovasculares, reumáticas y eventos tan comunes en los seres humanos como el envejecimiento (López y Echeverri, 2007).

Por ello, diversas entidades de salud buscan urgentes alternativas terapéuticas innovadoras en el campo farmacológico, destacando los beneficios terapéuticos de las plantas medicinales debido a la presencia de metabolitos secundarios (Ginocchio y Pérez, 2019). Así, las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico (Montes, 2014).

Por lo tanto, motiva el estudio científico de las plantas y en especial los extractos vegetales, que comprende la mezcla compleja de compuestos con actividades farmacológicas (Montes, 2014; Vivot, Sánchez, Cacik y Sequin, 2012). Estos extractos, proporcionan oportunidades ilimitadas para el descubrimiento de antioxidantes naturales que puedan ser utilizadas para evitar el desarrollo de enfermedades producidas por el exceso de radicales libres en el organismo y aún más reconocidos como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan el nivel de los fármacos de síntesis.

Además, las plantas aromáticas de la familia Lamiaceae son usadas como especies o infusiones y han sido ampliamente estudiadas por la presencia de antioxidantes. Dentro de esta familia se encuentra el género *Satureja* el cual ha sido objeto de varias investigaciones acerca de la actividad antioxidante en aceites esenciales y en diversos extractos. Sin embargo, son muy pocas las investigaciones acerca de la actividad antioxidante en la especie *Satureja nubigena*. De tal manera el estudio de *S. nubigena* permitirá corroborar que el extracto contenga compuestos químicos con actividad antioxidante.

Ahora bien, dentro de las potencialidades consideradas cabe destacar la posibilidad de conocer los tipos de metabolitos secundarios presentes en la planta de *Satureja nubigena*. Así se ha verificado en varios estudios, del género *Satureja* presenta actividades biológicas como bactericida, fungicida, antioxidante y antiparasitaria. Además, es debido a la presencia de diversos compuestos químicos (Fernández, Huaman, y Bardales, 2014).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación causa-efecto entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de *Satureja nubigena*. Briq recolectadas en el Municipio Cardenal Quintero del estado Mérida, en el Laboratorio de Investigaciones de la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023.

Objetivos Específicos

- Analizar la correspondencia entre los metabolitos secundarios del extracto metanólico de *Satureja nubigena* y las pruebas de tamizaje fitoquímico.
- Determinar el contenido total de fenoles en el extracto metanólico de las partes aéreas de *Satureja nubigena*.
- Realizar estudios *in vitro* de la actividad antioxidante del extracto metanólico, a través de la reducción del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH).
- Verificar la relación de causa-efecto entre los metabolitos secundarios de *Satureja nubigena* y la actividad antioxidante del extracto obtenido.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de la investigación está relacionado con la profundidad que se obtendrá sobre la problemática de estudio, durante el proceso de investigación (Hernández, Fernández y Baptista, 2014). Así mismo, éste tiene correspondencia con verbos logros como: exploratorio, descriptivo, analítico, comparativo, explicativo, predictivo, proyectivo, interactivo, confirmatorio, y evaluativo (Hurtado, 2015). De esta manera, el estudio permitirá confirmar la relación existente entre la actividad antioxidante y la composición química del extracto obtenido de *Satureja nubigena* recolectada en Municipio Cardenal Quintero del estado Mérida; por tal motivo el alcance de la investigación es confirmatorio.

Limitaciones de la Investigación

Son obstáculos que eventualmente pudieran presentarse durante el desarrollo del estudio y que escapan del control del investigador (Arias, 2006). Durante la ejecución de este proyecto de investigación, la principal limitación se podría centrar en la recolección de las muestras botánicas, ya que el hábitat natural de la especie es en zonas de montañas a una altura superior a los 3500 msnm. Por lo tanto, se requiere el acompañamiento de personas con conocimiento de las zonas, de personal profesional expertos en el reconocimiento de las especies y de tener las condiciones físicas adecuadas para desplazarse hasta alturas superiores a la mencionada anteriormente. Es importante resaltar que los constantes cambios climáticos, y la disponibilidad de los materiales de laboratorio pueden afectar el logro de la investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Diversos estudios permiten afirmar hoy en día que los extractos vegetales presentan actividad antioxidante. Es innegable el gran aporte medicinal que, desde épocas ancestrales, nos otorgan las plantas cuyos fitoconstituyentes han demostrado ser una rica fuente de antioxidantes. Por ello surge la necesidad de confirmar la actividad antioxidante y composición química de la especie *Satureja nubigena*. A continuación, se muestran algunos estudios realizados sobre el tema:

En 2018 Noriega et al., publicaron en la revista Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy un trabajo titulado: Aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze: composición química, actividad antioxidante y prueba antimicrobiana contra patógenos respiratorios. En el cual, tuvieron como objetivo evaluar y dilucidar la composición química, y sus actividades antioxidantes y antimicrobianas. La metodología que utilizaron incluyó la cromatografía de espectrometría de masas para determinar la composición química. Además, para probar la susceptibilidad de los microorganismos, se utilizó el ensayo de difusión de pozo.

Cabe destacar que, la especie muestra un potencial medicinal prometedor que exhibe una actividad antibacteriana significativa en diferentes concentraciones contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mutans*. Así mismo, se evidenció que el aceite esencial de *C. nubigenum* (Kunth.) Kuntze mostró una actividad

antioxidante significativa atribuido a la presencia de uno de sus principales componentes, acetato de carvacrol. Por esta razón, es interesante conocer la relación entre compuestos que potencian tal efecto.

Asimismo, el trabajo realizado por Rodríguez en 2019, tuvo como objetivo determinar los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts “*panisara*”. Por consiguiente, prepararon seis extractos, cuatro fueron sonicados (diclorometano, agua, etanol de 96% y 45%) a 40 °C por 15 min, y dos extractos acuosos (infusión y decocción al 5% p/v). Realizaron el tamizaje fitoquímico en todos los extractos evidenciando la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, triterpenos y esteroides. Los compuestos fenólicos fueron cuantificados mediante el método de Folin-Ciocalteu, cuyos valores fluctuaron entre 297,04 ± 17,51 mg EAG/g MSM y 8,52 ± 1,38 mg EAG/g MSM. También evaluaron la actividad antioxidante por el método de 2,2-difenil-1- picrilhidracilo (DPPH), cuyos valores fluctuaron entre 400,97 ± 10,70 mg ET/g MSM y 189,55 ± 2,12 mg ET/g MSM. Finalmente, concluyeron que la mayor concentración se obtuvo en el extracto sonificado etanol de 45% e infusión; 400,97 ± 10,70 mg ET/g MSM y 415,94 ± 4,41 mg ET/g MSM, respectivamente. La menor concentración observada fue en el extracto sonificado diclorometánico con un 189,55 ± 2,12 mg ET/g MSM.

Por último, el trabajo realizado por Illescas y Lovato, (2020) en la Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador; titulado como: “Estudio del perfil fitoquímico y posibles aplicaciones de los extractos alcohólicos, etéreo y acuoso del sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze)”, proponen como objetivo, evaluar el perfil fitoquímico y posibles aplicaciones de los extractos alcohólicos, etéreo y acuoso del sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze), en el campo farmacéutico y agroindustrial,

En cuanto al procedimiento empleado, seleccionaron las plantas y lavaron con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0,05% para eliminar microorganismos y restos de tierra. Realizaron un proceso de secado

permitiendo que la planta conserve sus compuestos activos. Posteriormente en los laboratorios de la facultad de CAREN, se molió hasta obtener el polvo de droga cruda homogéneo, luego de ello la muestra seca fue sometida a tres extracciones sucesivas con el fin de obtener los principios activos, para lo cual se utilizaron los siguientes solventes: éter etílico al 99%, etanol $\geq 70\%$ y agua destilada.

Por consiguiente, realizaron el tamizaje fitoquímico, en el cual encontraron los siguientes principios activos en el extracto de droga cruda: en el extracto etéreo compuestos grasos, agrupamientos lactónicos y triterpenos, en el extracto etanólico se evidencio agrupamientos lactónicos, catequinas, saponinas y quinonas y en el extracto acuoso azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, mucilagos y principios amargos, que son compuestos importantes tanto para el campo farmacéutico, ya que pueden ser empleados como agentes antioxidantes y antimicrobianos, así como también en el campo agroindustrial.

***Satureja nubigena* como antioxidante**

Existen algunas investigaciones realizadas acerca de la actividad antioxidante de plantas de *Satureja nubigena*, tanto en aceites esenciales como en extractos dentro de los que se encuentran los siguientes:

(Guerra, 2016), determinó la actividad antioxidante de dos aceites esenciales de especies andinas *Clinopodium nubigenum* (Kunt) Kuntze y *Baccharis latifolia*, los cuales fueron obtenidos por hidrodestilación. En los estudios de valoración de la capacidad captadora de radicales libres DPPH y ABTS, así como en la prueba de evaluación antioxidante β caroteno test, *Clinopodium nubigenum* presentó la mejor actividad antioxidante.

(Marquina et al, 2013), determinaron las actividades antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales de *Satureja sericea* Briquet

“romerito del campo” y de *Satureja nubigena* Briquet “pachachancua”, procedentes de la región Cajamarca. Para la actividad antioxidante utilizaron los métodos de (DPPH) y la capacidad inhibitoria de hemólisis ocasionada por AAPH; obteniéndose como resultados que los aceites esenciales de ambas especies aromáticas mostraron capacidad atrapadora de radicales libres DPPH, pero fue la actividad antioxidante *S. nubigena* la que mostró diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0,001$; IC = 95%) con respecto *S. sericea*. Los resultados del ensayo de AAPH también fueron favorables para *S. nubigena*, que se mostró como un buen inhibidor de hemólisis inducida por el AAPH, a las concentraciones de 100, 150, 250 y 300 μL , resultados estadísticamente muy significativos ($p < 0,001$) comparado a *S. sericea*.

(Carrillo, 2009), Determinó la actividad antioxidante de *Satureja macrostema*, y los compuestos que tenían dicha actividad; obtuvieron los extractos de hexano, cloroformo y metanol, estos extractos fueron sometidos al ensayo de decoloración de β -caroteno, indicando que únicamente el extracto metanólico presentó actividad antioxidante. Debido a lo anterior, determinaron el contenido total de fenoles al extracto metanólico (596.96 ± 7.8 mg EAG/100 g de hojas frescas) y la actividad antioxidante a través de la técnica del radical DPPH ($\text{IC}_{50} = 315.82 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$).

Posteriormente el extracto metanólico fue sometido al proceso de biofraccionamiento por métodos cromatográficos, obteniendo 3 compuestos puros: (1) 5, Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, (2) 7-C-[α L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopiranosido]-5, hidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona y (3) 5,4'- dimetoxi-7,3',5'-trihidroxi-3-O-[β -D-ramnosido]-flavanona. El compuesto 3 presentó 75% de actividad antioxidante ($\text{IC}_{50} = 93.31 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$), con respecto al del ácido ascórbico ($\text{IC}_{50} = 123.46 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$).

(Prieto et al., 2007), determinó la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Satureja montana* y *Origanum vulgare*, en modelos *in vitro* de formación inducida de 3- nitrotirosina y malondialdehído, dos biomarcadores reconocidas de estrés oxidativo. Los aceites esenciales mostraron una significativa actividad al reducir la formación de 3- nitrotirosina (IC50 de 43.9 µg/ml para *S. montana* y 19.2 µg/ml para *O. vulgare*), también inhibieron la formación de malondialdehído (IC50 de 27.2 µg/ml y 17.0 µg/ml respectivamente).

Antecedentes Históricos

Desde la prehistoria se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones. El conocimiento que la humanidad ha tenido sobre las plantas ha sido transmitido de padre a hijo, medico, sacerdote a los aprendices, principalmente de manera verbal (Marcano y Hasegawa, 2002).

Además, se estima que hay 250.000 a 500.000 especies de plantas en la tierra, un porcentaje relativamente pequeño (1 a 10%), de estos se utiliza como alimento tanto por los seres humanos como por otras especies animales. Es posible que se utilicen aún más con fines medicinales. Hipócrates (a finales del siglo V aC) mencionó entre 300 y 400 plantas medicinales. En el siglo I dC, Dioscórides escribió *De Materia Médica.*, un catálogo de plantas medicinales que se convirtió en el prototipo de las farmacopeas modernas. Así mismo, la Biblia ofrece descripciones de aproximadamente 30 plantas curativas (Cowan, 1999).

De este modo, el hombre a través del tiempo ha encontrado en los recursos naturales la solución a diferentes problemáticas, empleando las plantas a nivel alimenticio, industrial y medicinal, convirtiéndose de esta manera, en materias primas de vital importancia para el avance de la humanidad. Es así como los productos naturales han desempeñado un papel

importante en el desarrollo de fármacos, los cuales han sido la base de las primeras medicinas permitiendo el descubrimiento de diferentes productos, entre ellos los antioxidantes (Corzo, 2012).

Durante muchos años, el significado adaptativo de muchos metabolitos secundarios era desconocido, el estudio de estos compuestos fue iniciado por los químicos orgánicos del siglo diecinueve y principios del siglo veinte, quienes se interesaron en estas sustancias y las llamaron productos naturales, debido a su importancia como drogas, venenos, sabores y materias industriales (Taiz y Zeiger, 2006).

Bases Teóricas

Aproximación Teórica sobre los Metabolitos Secundarios de las plantas

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no tienen una función directa en el crecimiento, desarrollo, procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, etc. Estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales, compuestos de bajo peso molecular, que se diferencian de los metabolitos primarios (aminoácidos, azúcares, lípidos, nucleótidos) en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, por lo que muchos de esos componentes resultan útiles en la clasificación sistemática de la especie o familia, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2006).

Sin embargo, se creía que estos compuestos eran sencillamente productos finales del metabolismo sin función o metabolitos de desecho. Pero no es así, posteriormente se descubrió que muchos metabolitos

secundarios tenían importantes funciones ecológicas en las plantas como atrayentes de polinizadores y dispersadores de semillas, agentes en la competencia planta-planta, así como también, protegen de la ingestión por herbívoros y de la infección por patógenos microbianos (Taiz y Zeiger, 2006).

Por su parte, se han descrito más de 30.000 sustancias que pueden ser consideradas en esta categoría. Algunas solamente hacen que la planta tenga un sabor desagradable para el microorganismo, mientras que otras llegan a provocar su muerte. Por lo tanto, se piensa que la producción de metabolitos secundarios evolucionó en las plantas como respuesta a las presiones de la selección natural que imponen precisamente los microorganismos, teniendo más probabilidades de sobrevivir (Taiz y Zeiger, 2006).

De esta manera, la clasificación puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, a su información, a la fuente de producción o a su acción biológica, puesto que un metabolito puede ser ubicado dentro de varios grupos. Aparentemente, la forma más acertada de clasificación corresponde a las vías químicas por las cuales un organismo los elabora dentro de lo que se denomina biosíntesis (Guarnizo y Martínez, 2009).

Por tanto, han sido incluidos en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados. Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides y se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de los cuales se encuentran carotenos, glicósidos cardiotónicos, taxol, entre otros. Entre los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos,

antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre otras (Pérez y Jiménez, 2011).

Por otro lado, los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 4.000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacológica. Por otra parte, los glucósidos cianogénicos, se consideran posiblemente, los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa (Pérez y Jiménez, 2011).

El reconocimiento de estas importantes propiedades biológicas de los metabolitos secundarios ha permitido el desarrollo de este campo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Además, el creciente interés sobre los diversos efectos biológicos ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen las plantas, especialmente en las interacciones ecológicas (Guarnizo y Martínez, 2009).

Aproximación teórica sobre los tipos de fitoquímicos presentes en las plantas

Las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, la mayoría de las cuales son fenoles o sus derivados sustituidos con oxígeno, llamados también fitoquímicos, son una serie de sustancias que se encuentran en las plantas con actividad biológica de los cuales al menos 12.000 han sido aislados, un número estimado en menos del 10% del total. En muchos casos, estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos, como los terpenoides, dan a las plantas sus olores; otros (quinonas y taninos) son responsables del pigmento

vegetal. Muchos compuestos son responsables del sabor y algunas de las mismas hierbas y especias utilizadas por los humanos para sazonar los compuestos medicinales útiles (Cowan, 1999).

-Flavonoides: son pigmentos naturales presentes en los vegetales, con efectos antioxidantes protegiendo al organismo de los rayos ultravioleta, la polución ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos; tienen un alto contenido de vitamina C, además tienen propiedades antiinflamatorias. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Cárdenas, 2017).

-Taninos: tienen la capacidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides y saponinas desempeñando en las plantas una acción defensiva. Los taninos son capaces de captar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica, además inhiben la autooxidación del ácido ascórbico (Cárdenas, 2017).

-Saponinas: Forman parte de los heterósidos, tienen acción emoliente, antiinflamatoria y calmante de afecciones como la dermatitis. Adicionalmente, alivian los edemas (Fernández, 2013).

-Cumarinas: se ha suscitado un interés alto gracias a sus propiedades farmacológicas como antimicrobianas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antivirales, antioxidantes e inhibidoras de enzimas, asociadas a su anillo de fenil que presentan (Herrera et al, 2017).

-Alcaloides: son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica (Avalos y Pérez, 2009).

Aproximación teórica sobre los radicales libres y el estrés oxidativo generado en el organismo

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular, al mismo tiempo que entraña un peligro potencial debido a sus especiales características paramagnéticas, responsables de la formación de intermediarios dotados de una alta reactividad, conocidas como especies reactivas del oxígeno (ERO) (González et al., 2001).

Muchas especies reactivas del oxígeno son radicales libres (RL). Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados en los orbitales atómicos. Estos electrones desapareados confieren al radical una gran reactividad química; ya que, al ser inestables, tienen tendencia a ceder o a captar un electrón de otra molécula o radical para conseguir una configuración electrónica estable (López y Echeverri, 2007).

De esta manera, las especies reactivas del oxígeno (ROS), son: los productos de la ruptura o de la excitación de la molécula de oxígeno, esto es, oxígeno atómico, ozono (O^3) y oxígeno singlete (1O_2), y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas. La formación de estas últimas es una consecuencia de que el oxígeno presenta dos electrones desapareados en su capa de valencia, con lo que puede sufrir una serie de reducciones mono-electrónicas que conducen a la formación de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$) (Figura 1). De todas las ROS, el radical hidroxilo es el más tóxico y el responsable de la mayor parte de los daños celulares relacionados con el estrés oxidativo. Reacciona rápidamente, justo en el entorno donde se forma, oxidando lípidos, proteínas y provocando importantes lesiones en el DNA (Molina, 2012).

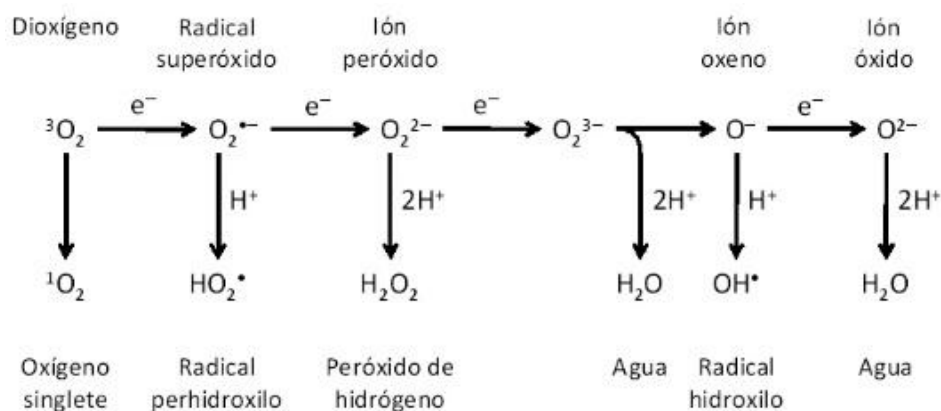


Figura 1. Generación de ROS, a partir de oxígeno en estado triplete.

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

- Sobre lípidos poliinsaturados de las membranas, produciendo pérdida de la fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL). Los lípidos son probablemente las biomoléculas más susceptibles al ataque de los radicales libres. Las especies reactivas de oxígeno, en particular el radical hidroxilo, tienen como objetivo preferente los ácidos grasos poliinsaturados que formen parte de la fase lipídica de las membranas celulares. La PL se desarrolla mediante una serie de reacciones en cadena (Figura 2). Una vez puesta en marcha, se propaga rápidamente, dando lugar a lesiones que disminuyen la fluidez de las membranas.

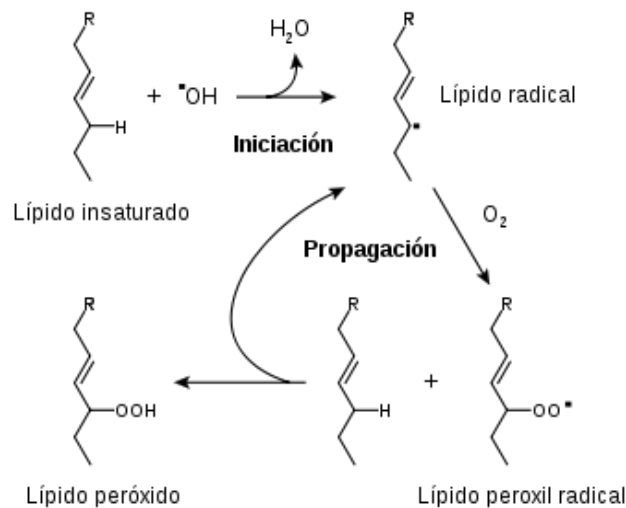


Figura 2. Mecanismo de la peroxidación lipídica.

- Sobre las proteínas, produciendo inactivación y desnaturalización. De hecho, las proteínas también pueden ser atacadas por las ROS, produciéndose cambios estructurales y funcionales; aunque, no son tan susceptibles como los ácidos grasos poliinsaturados, al presentar menores posibilidades para la progresión de las reacciones en cadena. El ataque de los radicales libres a las proteínas únicamente se produce cuando existe una acumulación de radicales, o cuando el ataque, facilitado por la unión de la proteína a un ion de un metal de transición, converge en un lugar concreto de la proteína (Figura 3).



Figura 3. Efecto de ROS sobre proteínas

- Sobre los ácidos nucleicos, mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis. Las lesiones oxidativas del DNA en condiciones metabólicas normales son elevadas; pero existe un grupo de enzimas reparadoras que solucionan estas lesiones. Por lo tanto, las lesiones oxidativas y las mutaciones van acumulándose con la edad y pueden contribuir al desarrollo de enfermedades como el cáncer y procesos inflamatorios crónicos.

El estrés oxidativo se puede definir como el estado en el cual el nivel de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes del organismo, como resultado de un desequilibrio entre los sistemas de formación y eliminación de especies reactivas del oxígeno, además son implicadas en la Etiología de diferentes enfermedades degenerativas (Finkel y Holbrook, 2000).

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que el organismo también utiliza a estos compuestos oxidantes en beneficio propio, pudiendo actuar a distintos niveles: a) como 3 señales intercelulares y reguladoras de genes implicados en el proceso de crecimiento y desarrollo celular, b) como inductores de la expresión de genes, c) en la regulación de la estructura y función de determinadas proteínas, d) interviene en el control del tono muscular, e) interviene en la síntesis de tiroxina en la glándula de tiroides, f) participa en los procesos de eliminación de patógenos, entre otros aspectos importantes (González, 2021).

Familia de las Lamiaceae

Debe su nombre a la forma de su corola o cáliz, divididos en dos partes desiguales en forma de labios. Son plantas herbáceas, matas o arbustos provistos de pelos y glándulas con aceites aromáticos, de hojas opuestas o verticaladas, 8 flores hermafroditas y fruto compuesto de cuatro núculas o aquenios (tetraquenio) (Figura 4). Esta familia agrupa plantas aromáticas y medicinales muy conocidas como el orégano, romero, albahaca, melisa, menta o hierbabuena, salvia, mejorana, y las famosas lavandas (Caguana y Quinaluisa, 2017).

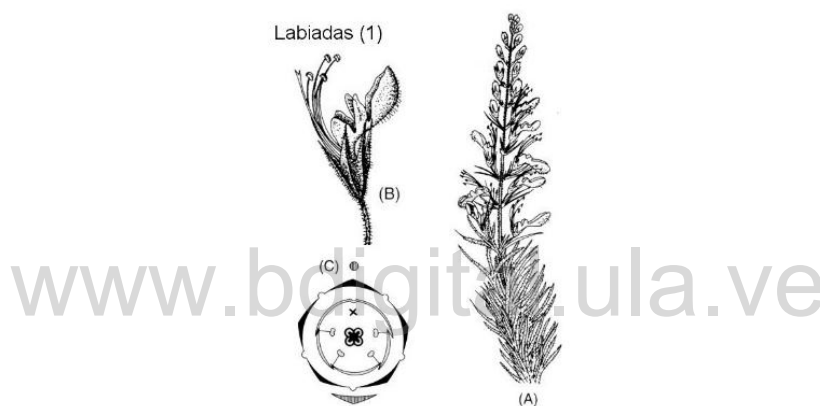


Figura 4. Características diagnósticas de la familia Lamiaceae. A) Rama florida, B) Flor, C) Diagrama floral.

Género *Satureja* L.

Comprende 30 especies, la mayoría de ellas presentes en regiones templadas del hemisferio norte; está representada por 2 especies: *Satureja nubigena* (Kunth) Briq, la cual habita en el páramo, es una hierba pequeña, postrada, de hojas muy pequeñas, pubescentes y flores de corola blanca; forma colonias o cojines pequeños en bordes de caminos y entre las macollas de pasto y *Satureja brownei* (Sw.) Briq., crece asociada a pastos y otras hierbas en potreros por debajo de 3.000 metros. Es una planta

pequeña y fuertemente aromática, de follaje glabro y flores pequeñas de corola rosada, su nombre regional es poleo (Vargas, 2002).

Satureja nubigena

Es una planta aromática perteneciente a la familia Lamiaceae, se conoce también con el sinónimo de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Briq, *Micromeria nubigena* (Kunth) Benth, y *Timo nubigenus* Kunth (Gilardoni y cols., 2011). Es una planta silvestre que se encuentra a lo largo de los caminos o formando parte en los densos matorrales de los cerros y pajonales. Nace de manera espontánea en tierra de climas fríos, con suelos ricos en nutrientes y algo húmedos (Caguana y Quinaluisa, 2017). Crece ampliamente en América latina entre 3.000-4.000 msnm planta nativa de los Andes de Ecuador, Perú y Bolivia, además crece en zonas altas y pedregosas de Venezuela, Brasil y Argentina, en los lugares más húmedos como próximos a las corrientes de agua (Gilardoni et al., 2011) (Figura 5).



Figura 5: Distribución geográfica de *S. nubigena*

Descripción botánica

Planta herbácea, vascular, rastrera y aromática, altura máxima de 15 cm posee raíz fibrosa y pivotante. Tallo de color café rojizo con ramificaciones verticiladas. Hojas simples opuestas de forma oval- lanceoladas con la base ligeramente truncada. Miden hasta 4mm



de largo. Flores zigomorfas y labiadas de 3 a 5 mm. Posee 5 sépalos de color verde y 5 pétalos (Figura 6). Fruto seco indehisciente y tetraquenio; habita en los páramos y cordilleras de Venezuela y países como Colombia, Costa rica, Ecuador, Panamá y Perú en un rango altitudinal de 3500 a 4500 msnm. (Fonseca, 2016)

Figura 6. *Satureja nubigena*

Propiedades farmacológicas

Esta planta ha sido utilizada desde la antigüedad por la etnia Saraguro, debido a que presenta propiedades fármaco activas: analgésica, digestiva, antiespasmódica, antidisentérica, antiemética, antiinflamatoria, expectorante, antioxidante, antibacterial, fortificante y calmante. Es muy utilizada en casos de reumas, hemorragias, cólicos, limpiados (antiséptica), dolor molar, úlceras bucales y de la garganta, siendo su uso etnomédico en dicha región especialmente para el tratamiento del dolor dentario. Toda la planta en infusión, se utiliza para el mal de altura. Sus hojas en emplasto se utilizan para el dolor de cabeza (Lituma y Molina, 2008).

El tipo es una hierba cálida cuyas cualidades se usan para aumentar la temperatura corporal y así evitar o curar el soroche sobre todo en lugares muy fríos, es un gran digestivo, por su fuerte aroma ayuda a descongestionar nariz, mejora las afecciones respiratorias como ronquera, catarro, tos y pulmonía, es un excelente antiséptico y antiinflamatorio usado para hacer

gárgaras cuando se tiene afecciones en la garganta, o para cicatrizar heridas y detener hemorragias, aplicado sobre las quemaduras alivia y sana la afección, además es empleado en tratamientos contra la infección por parásitos intestinales. En Latacunga-Ecuador se usa la infusión del tipo con la flor de amapola o también la infusión de tipo con la flor de espinoso para curar la tos (Caguana y Quinaluisa, 2017).

Clasificación taxonómica.

Reino: Plantae.

Filo: Angiospermae.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Lamiales.

Familia: Lamiaceae.

Género: *Satureja*.

Especie: *S. nubigena*.

Autor: (Kunth) Briq.

Altitud: 3000 y 4000 m.s.n.m.

Región: Sierra.

Sinónimo: *Clinopodium nubigenum*, *Micromeria nubigena*, *Thymus nubigenus* (Gálvez y Chávez, 2017)



Composición química de la especie de *Satureja nubigena*

La proporción de cada componente influye en el estado de desarrollo de la planta, así como los factores climáticos y ecológicos (Gálvez y Chávez, 2017). Entre los componentes químicos presentes en la especie vegetal *Satureja nubigena* tenemos:

Flavonoides

Los flavonoides son sustancias fenólicas hidroxiladas, pero se presentan como una unidad C 6 - C 3 unida a un anillo aromático. Dado que se sabe que son sintetizados por las plantas en respuesta a una infección microbiana, no debería sorprender que se haya encontrado que *in vitro* son sustancias antimicrobianas eficaces contra una amplia gama de microorganismos. Su actividad se debe probablemente a su capacidad para formar complejos con proteínas extracelulares y solubles y para formar complejos con paredes celulares bacterianas (Cowan, 1999).

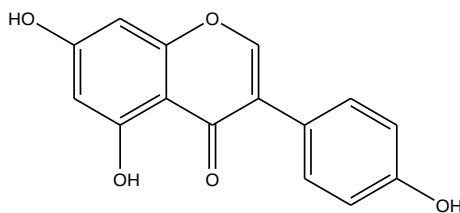


Figura 7. Estructura química de un flavonoide

Taninos

"Tanino" es un nombre descriptivo general para un grupo de sustancias fenólicas poliméricas, el peso molecular varía de 500 a 3.000, y se encuentran en casi todas las partes de la planta: corteza, madera, hojas,

frutos y raíces. Se dividen en dos grupos, taninos hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables se basan en ácido gálico, generalmente como esteres múltiples con d -glucosa, mientras que los más numerosos taninos condensados (llamados proantocianidinas) se derivan de monómeros de flavonoides. Este grupo de compuestos ha recibido una gran atención en los últimos años, ya que se sugirió que el consumo de bebidas que contienen taninos, especialmente los téis verdes y los vinos tintos, puede curar o prevenir una variedad de males (Cowan, 1999).

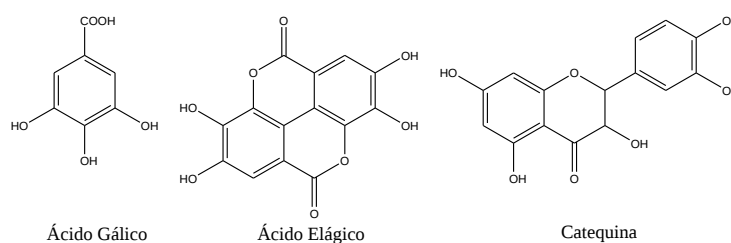


Figura 8. Taninos condensados (catequina) y taninos hidrolizables (ácido gálico y elágico).

Triterpenos

Los terpenos constituyen uno de los grandes grupos de compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, como de los componentes de esencias, bálsamos y resinas, las fitohormonas. Este grupo está integrado por aproximadamente 22.000 estructuras diferentes y engloba sustancias que comparten un origen biosintético común (Marcano y Hasegawa, 2002). La unidad fundamental que define estos esqueletos contiene cinco átomos de carbono y se conoce como isopreno. De acuerdo al número de unidades de isopreno recibe su nombre por presentar tres unidades de isopreno (Pérez, 2009). El mecanismo de acción de los terpenos no se entiende completamente, pero se especula que involucra la ruptura de la membrana por los compuestos lipófilos (Cowan, 1999).

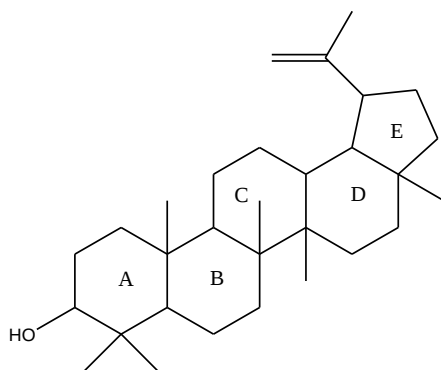


Figura 9. Estructura química de un triterpeno.

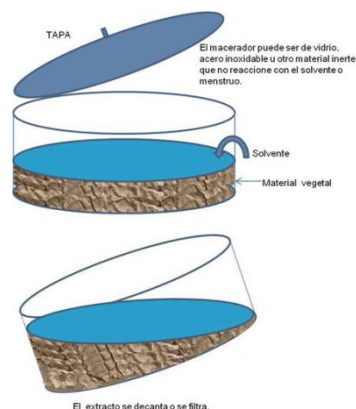
Extractos de plantas

Se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes. Es una mezcla compleja de compuestos con actividad farmacológica, formada por un principio activo (con la supuesta actividad) dentro de una matriz, en principio, sin actividad terapéutica. Los extractos vegetales son la forma más usada como ingrediente farmacéutico activo de las plantas medicinales. Por esta razón, para la elaboración de medicamentos a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo (Montes, 2014).

Método de obtención de los extractos

Los extractos de plantas medicinales se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. El alcohol, al contrario que

el agua, es un solvente no polar, y por lo tanto penetra fácilmente en los tejidos, y permite obtener moléculas insolubles en agua. Cabe destacar que, la extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la



industria química y farmacéutica. Los métodos de extracción por maceración y la percolación o lixiviación son los más utilizados (Montes, 2014).

En la **maceración**, el material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta el agotamiento de la

droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla **Figura 10.** Maceración es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto (Montes, 2014).

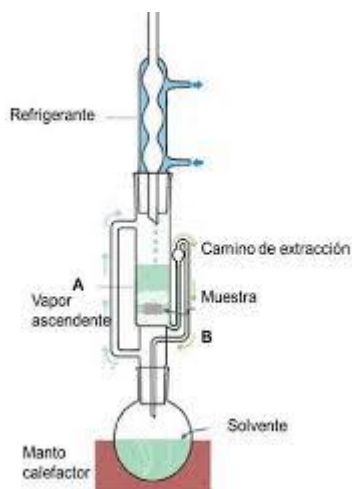
También, la **percolación o lixiviación** consiste en que el material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente de forma tal que el solvente cubra la capa de sólido en el tanque percolador. El solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el



Figura 11. Lixiviación concentración

fluído obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto. Dependiendo del grado de de los extractivos, los extractos pueden clasificarse en extractos fluidos o líquidos, extractos semisólidos o blandos y extractos secos (Montes, 2014).

Además, otro procedimiento de extracción sólido- líquido es el **método de**



Sohxlet, el cual se utiliza generalmente para aislar los componentes lipídicos de una muestra por medio de un solvente. La extracción Soxhlet implica el contacto sólido: líquido para la remoción de uno o varios compuestos de un sólido por disolución en una fase líquida de reflujo. Para dicho montaje, la parte sólida se colocó en una cavidad que, mediante el paso del tiempo, se

llenó gradualmente con la fase líquida de extracción por la condensación de los vapores en un matraz de destilación. Cuando el líquido alcance un nivel preestablecido, un sifón vuelve a introducir el contenido que se encontraba en la cavidad dentro del matraz de destilación, llevando dentro los compuestos extraídos de la materia sólida que se empleó. Este proceso se repitió hasta obtener una completa extracción (Angarita, 2019)

Así como también, cabe señalar la **extracción asistida por microondas** consiste en el calentamiento del disolvente utilizado el cual se encuentra en contacto con la muestra. El proceso implica la perturbación de los enlaces por puente de hidrógeno, como resultado de la rotación de dipolos por la radiación en las moléculas y la migración de iones; con la consiguiente penetración del solvente en la matriz, y transporte al seno del líquido de los componentes. La rapidez en el calentamiento es la principal ventaja de las microondas frente a los métodos tradicionalmente empleados en la extracción con disolventes, que causan el calentamiento a partir de la

transmisión de la energía al material de forma indirecta, como radiación, convección, conducción, entre otros (Salomón et al. 2013).

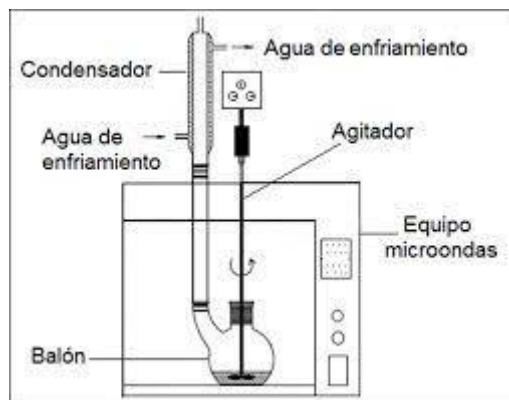


Figura 13. Extracción por microondas.

Radicales Libres

Los radicales libres son especies químicas, atómicas o moleculares, con un electrón desapareado en su orbital más externo. Este tipo de configuración electrónica hace que sean muy inestables y altamente reactivos, pudiendo alterar estructuras biológicas fundamentales como lípidos de membrana, ácidos nucleicos y proteínas. Todo ello se traduce en un aumento del estrés oxidativo, que está directamente relacionado con el envejecimiento celular y algunos procesos fisiopatológicos como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cataratas y determinadas formas de cáncer (López et al, 2007).

Los radicales libres son sustancias químicas reactivas que se producen durante el metabolismo normal, pero su acumulación se puede deber a factores como la disminución de antioxidantes fisiológicos (Grisham y McCord, 1986).

Formación de los radicales libres

El origen y procedencia es muy variado, se producen normalmente durante el metabolismo aeróbico celular, a través de reacciones enzimáticas a nivel mitocondrial, en las células fagocíticas para contribuir a la destrucción de patógenos, en el metabolismo de ciertos productos químicos (etanol, tetracloruro de carbono), etc. (López et al, 2007).

Sin embargo, los radicales libres también se pueden generar "accidentalmente" a partir de reacciones no enzimáticas como las que se producen por reacción del oxígeno con compuestos orgánicos o las iniciadas por radiaciones ionizantes. También, el organismo está expuesto a agentes oxidantes ambientales como la contaminación atmosférica, el humo del tabaco, algunos hábitos alimenticios, etc. (López et al, 2007).

Además, los radicales libres se pueden formar a partir de diversos mecanismos, siendo la adición de un electrón a una molécula estable el más común. Una vez que estos son formados, buscan el modo de conseguir una configuración electrónica estable, razón por la cual interactúan con otras moléculas a través de reacciones de óxido reducción (redox). En dichas circunstancias, hay una transferencia de electrones que necesariamente implican la reducción (ganancia de electrones) y oxidación (pérdida de electrones) de las moléculas participantes (Corrales y Muñoz, 2012).

Por lo tanto, dicho mecanismo genera que la producción de radicales libres sea una reacción en cadena, ya que al reaccionar un radical libre con una molécula no radical inevitablemente esta última pasa a ser un RL. Dicha reacción en cadena solamente se detendrá cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí (Corrales y Muñoz, 2012).

Antioxidante

Un antioxidante es cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación, entregando uno o más de sus electrones para estabilizar algún componente biológico desapareado por efecto del ataque de radicales libres (Kobus et al, 2014).

Clasificación de los antioxidantes

Las sustancias antioxidantes se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y el sistema no enzimático; también conocidos como endógenos y exógenos respectivamente, los cuales pueden actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular. El sistema no enzimático o exógeno está integrado principalmente por sustancias como las vitaminas A, E, C, carotenoides y los minerales selenio y zinc, que incorporamos con la alimentación (Céspedes y Sánchez, 2000).

- **Sistema enzimático**

Se considera como la primera línea de defensa primaria, y se encarga de evitar el acúmulo de EROS como; el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los RL (34, 67). Dentro del sistema de defensa antioxidante enzimático se encuentran las siguientes enzimas:

- Superóxido Dismutasa (SOD), que elimina el anión superóxido mediante su conversión a peróxido de hidrógeno. Las células humanas poseen una enzima SOD en la mitocondria con manganeso en su centro activo, y una enzima SOD con zinc y cobre en su centro activo, presente en mayor cantidad en el citosol.

- Catalasa, es una hemoproteína que se concentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias, se encarga de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
- Glutación peroxidasa (GPx), es una selenoproteína, en presencia de GSH, como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en moléculas inofensivas (agua y alcohol), evitando la formación de radicales libres (Pérez, 2007).

- **Sistema no enzimático**

Son un conjunto de moléculas tanto hidrófobas como hidrofílicas que tienen como función; capturar RL y generar moléculas menos nocivas para la célula, mediante la adición de un electrón al RL con el objetivo de estabilizarlo. Dentro del sistema de defensa antioxidante no enzimático se encuentra:

- Vitamina C: es un antioxidante hidrosoluble con un alto poder reductor. Participa en el metabolismo intermediario y oxidativo, en la reabsorción de hierro, es necesaria para la respuesta inmune, actúa como cofactor para numerosas enzimas implicadas en la biosíntesis de colágeno, carnitina y algunos neurotransmisores, y puede atrapar una gran variedad de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en medios acuosos. La vitamina C se considera esencial, ya que no puede ser sintetizada por los humanos, debido a que carecen de la enzima que cataliza la etapa final de oxidación; por lo tanto, debe adquirirse la vitamina a través de la alimentación.
- La vitamina E: está constituida por varios tipos de compuestos naturales, de los cuales α -tocoferol tiene la mayor actividad biológica (antioxidante y estabilidad de las membranas). Se calcula que cada molécula de vitamina E es capaz de proteger 500 moléculas de

fosfolípidos. Representa la principal defensa contra el daño oxidativo de la membrana en los tejidos humanos.

- Glutatión: consiste en un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y es considerado el compuesto tiólico de bajo peso molecular, de mayor abundancia en las células de los mamíferos. Actúa sobre el peróxido de hidrógeno, superóxido y el radical hidroxilo.
- Flavonoides polifenólicos: se encuentran un amplio grupo de compuestos fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas) que actúan como quelantes de metales, además, capturan de forma in vitro ERO y ERN. Pueden ser de tipo lipo e hidrosolubles y se ubican tanto intra como extracelularmente. Dentro de este grupo se encuentran la vitamina E, la vitamina A, la ubiquinona (coenzima Q), la albúmina, el ácido lipoico, el fibrinógeno, la bilirrubina y la glucosa (Sánchez, 2013)

www.bdigital.ula.ve

Mecanismo de acción de los antioxidantes

Los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, aumentando la remoción de ROS, inhibiendo la formación de dichas especies, y/o revirtiendo un daño oxidativo ya generado.

Entre los mecanismos de Remoción de ROS, destacan:

- Atrapamiento directo de ROS: se refiere a la capacidad que tienen muchos antioxidantes para actuar como estabilizadores de radicales libres a través de la cesión de un electrón. Tal mecanismo, definido como “SET” (single electrón transfer), permite que el radical libre pierda su condición por “apareamiento” de su electrón desapareado. Una consecuencia para el antioxidante es que, como resultado de ceder un electrón, éste se convierte en un radical libre y termina

oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno.



Figura 14. Mecanismo de los antioxidantes para estabilizar a un radical libre.

Asimismo, ciertos antioxidantes pueden actuar estabilizando especies reactivas a través de un mecanismo que implica “la adición directa del radical a su estructura”. Ejemplo de este tipo de acción antioxidante es la promovida por carotenos como beta-caroteno. Como resultado de tal reacción, el radical libre (ejemplo, peroxilo) pierde su condición, y el caroteno es modificado covalentemente, convirtiéndose en un radical libre que a través de reacciones sucesivas es oxidado y convertido en derivados epóxido y carbonilos de notablemente menor reactividad.

- Inducción de enzimas que remueven ROS: Se basa en la capacidad que tienen algunos antioxidantes para inducir la síntesis de enzimas antioxidantes. Entre estas destacan las siguientes: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión-S-, glutatión reductasa, y sulfoxi-metionina-reductasa. La acción antioxidante de dichas enzimas se traduce en una disminución del estado redox celular.

Entre los mecanismos de inhibición de la formación de ROS, destacan:

- Inhibición o represión de enzimas formadoras de ROS: Algunos antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de ROS. Lo pueden hacer inhibiendo la actividad catalítica de enzimas pro-oxidantes involucradas en la generación de especies reactivas. Por lo tanto, su acción antioxidante se basa en la exhibición de estructuras que pueden interactuar con los sitios reguladores y/o catalíticos de tales enzimas. Ejemplos de estos son los polifenoles provenientes de la dieta.
- Inhibición de la formación de ROS dependiente de metales: Un segundo mecanismo que también implica la inhibición de la formación de especies reactivas se relaciona con contraponer la capacidad que tienen ciertos metales de transición, como hierro y cobre (ambos en su estado reducido), para catalizar la formación de radicales superóxido a partir de oxígeno, y de radicales hidroxilo, a partir de peróxido de hidrógeno. Aquellas moléculas que tienen la habilidad de unir tales metales, formando complejos o quelatos, logran inhibir la actividad redox de éstos, previniendo la formación de las especies reactivas anteriormente mencionadas (Fuentes, et al. 2017).

Capacidad antioxidante de los flavonoides

Los flavonoides tienen la capacidad de donar electrones debido a la presencia de anillos aromáticos en su estructura, que son susceptibles de sufrir el desapareamiento de electrones por desplazamiento (Ramírez et al., 2001). De esta forma su potencial antioxidante depende del número y de la posición de los grupos hidroxilo, así como de la presencia de grupos dadores de electrones en su estructura química (Miller, 1997).

En los flavonoides la presencia de grupos hidroxilo en la posición 3' y 4' del anillo B se ha relacionado con un alto potencial antioxidante, debido a

que al formarse el radical por pérdida de electrones, la molécula resultante presenta una alta estabilidad (Miller, 1997) (Figura 15).

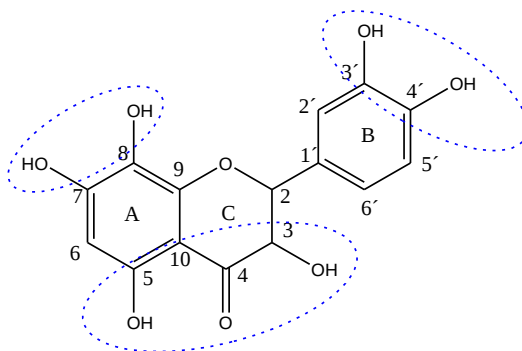


Figura 15. Características estructurales de flavonoides con actividad atrapada de radicales libres

Carotenoides

Los carotenoides son metabolitos secundarios producidos por plantas superiores, algas y hongos que están constituidos por un esqueleto de 40 carbonos (C40). También son producidos por bacterias que tienen la capacidad de sintetizar carotenoides con una amplia variedad de esqueletos de C40 y C30 (Pérez et al., 2011). Su estructura básica puede ser la causa del potencial antioxidante de los carotenoides mientras que sus grupos terminales, podrían ser una explicación de las diferentes formas en las que los carotenoides individuales interactúan con membranas biológicas. (Swaminathan, 2008).

Los carotenoides, junto con los flavonoides y las clorofilas, son los pigmentos vegetales más distribuidos en la naturaleza. Juegan un importante papel como antioxidantes y factores provitamínicos en muchos organismos, que se deben incluirlos en la dieta debido a que sólo los organismos fotosintéticos, y ciertas bacterias y hongos, son capaces de sintetizarlos como se mencionó anteriormente. Sus aplicaciones en la industria

agroalimentaria, cosmética y acuícola, así como sus ventajas nutricionales y terapéuticas se basan en su color y en su alta capacidad antioxidante (Dichiara, 2019).

Actividad antioxidante de los carotenoides

En cuanto a la actividad antioxidante de los carotenoides, existe una considerable cantidad de evidencia de la interacción in Vitro de β - caroteno con radicales libres, debido a sus propiedades como antioxidante (rompiendo cadenas de reacciones perjudiciales) y su capacidad de estabilizar el oxígeno libre, que es en general una capacidad común para la mayoría de carotenoides conocidos (Krisky, 1989).

Esta actividad marcada de los carotenoides hacia los radicales libres y sus efectos antioxidantes se relaciona a su habilidad para donar electrones o átomos de hidrógeno y lo propensos que son para oxidarse. Existen opiniones en las que además de tener una actividad antioxidante; luego de sus reacciones forman aductos radicalarios no reactantes, relativamente estables; con tendencia a decaer o unirse con los radicales atacantes, formando igualmente productos estables (Everett, 1996).

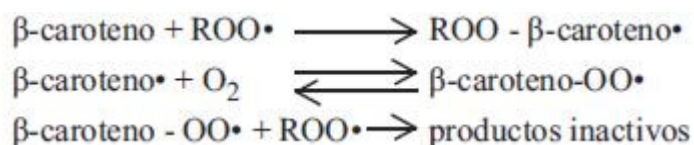


Figura 16. Participación del β -caroteno en la formación de ERON.

Estrés oxidativo

Según Sánchez y Méndez (2013), las formas reducidas del O_2 se denominan especies reactivas de oxígeno –ROS-; en las que se incluyen

radicales libres y peróxido de hidrógeno - H_2O_2 -. Los efectos benéficos de las ROS se presentan a bajas concentraciones, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula; como defensa contra agentes infecciosos y sistemas de señalización celular. (Sánchez y Méndez, 2013).

Es importante resaltar que el equilibrio entre los efectos benéficos y perjudiciales de los radicales libres, es un aspecto muy importante para los organismos vivos, lo cual se logra mediante mecanismos de “regulación REDOX” que protegen a los organismos vivos del estrés oxidativo, manteniendo el control del estado de oxidación a través de los sistemas antioxidantes y captadores de radicales libres (Sánchez y Méndez, 2013).

Independientemente de su fuente, los radicales libres establecen un potencial peligro para los seres vivos, debido a que afectan lípidos, proteínas y ácidos nucleicos e inclusive llegan a provocar muerte celular; como respuesta al daño causado, el organismo se defiende debilitando dicha oxidación mediante la acción de moléculas antioxidantes, pero si la oxidación no es detenida el proceso se llama estrés oxidativo (Pérez, 2014).

Fuentes naturales de los antioxidantes

La fuente más importante de antioxidantes es la naturaleza, los seres humanos deben consumir habitualmente frutas y verduras, ya que estas disponen de altos contenidos de polifenoles y poseen características biológicas extensas, entre las cuales se encuentra la captación de radicales libres. El número de polifenoles naturales ha sido estimado en más de un millón, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinados con: un ácido orgánico, un azúcar o formando polímeros, de manera que, sus diferentes enlaces generan una gran variedad de compuestos. Sin embargo, la bioactividad se atribuye al fragmento aglicona, no al azúcar (Pérez, 2014)

Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante no se puede medir directamente, pero puede ser determinada por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlada. En la actualidad se han acogido diversas técnicas espectrofotométricas, las que determinan la capacidad antioxidante frente a sustancias cromógenas, donde se da una pérdida de color proporcional con la concentración (Vintimilla, 2013).

Por lo tanto, la actividad antioxidante se puede evaluar directamente o analizando la actividad secuestradora de radicales libres. Los métodos DPPH y ABTS son parámetros para determinar la actividad antioxidante, midiendo la actividad secuestradora o captadora de radicales libres (Pérez et al, 2003).

Los métodos para evaluar la actividad antioxidante tienen como fundamento comprobar que un compuesto antioxidante evite la oxidación de un sustrato oxidable por parte de un agente oxidativo. Un ejemplo es el método de decoloración del β -caroteno, el cual mide la actividad antioxidante del aceite esencial disminuyendo o no la decoloración oxidativa de la emulsión β -caroteno. La inhibición o reducción del proceso oxidativo depende de la actividad antioxidante y concentración del compuesto o muestra (Guerra, 2016)

Método DPPH

DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) propuesto por Blois en 1958, consiste en un método de captación de radicales libres muy usado para determinar la

actividad antioxidante de frutas (zumos), verduras, café, entre otros. Su fundamento se basa en la aceptación de un electrón o átomo de hidrógeno por la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazina, que en solución en metanol es de color violeta intenso (Figura 17).

Este estudio requiere de un espectrofotómetro que mediante una longitud de onda de 517 nm es medida la absorbancia a medida que el electrón es aceptado, en la cual la solución DPPH al reaccionar con un sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta presente en la solución inicial se desvanece, pasando del color violeta a un color amarillo (reducción del radical libre por antioxidantes), siendo el amarillo un color indicador de las propiedades antioxidantes de las muestras analizadas de interés.

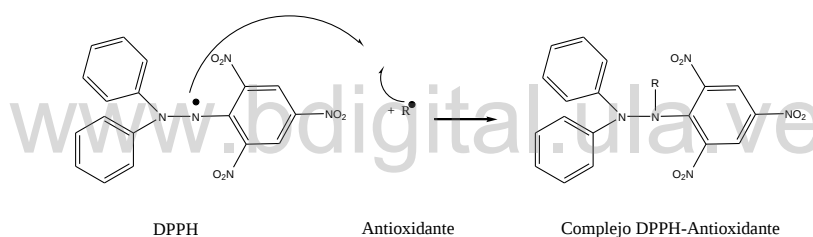


Figura 17. Reacción química entre el DPPH y un antioxidante.

Para la realización de este método, inicialmente se debe preparar las soluciones patrones donde se disuelven 2 mg de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo en 100 mL de metanol grado analítico, como patrón de referencia se utiliza una solución stock de quercetina a diferentes concentraciones: 100 µg/mL, 50 µg/mL y 25 µg/mL y para la realización de las mediciones en el espectrofotómetro se adiciona a la celda 1 mL de DPPH más 200 µL de cada uno de los extractos a evaluar de forma separada, con diferentes concentraciones a estudiar, dejando actuar entre 10 a 20 minutos y posteriormente se observa el cambio cualitativo de color.

Cabe resaltar, la absorbancia inicial es registrada en el minuto cero sin el antioxidante de referencia y el registro de absorbancia se realiza después de adicionar el antioxidante de referencia cada 30 segundos durante 10 minutos. Como resultado se obtiene una curva de referencia y se indica el porcentaje de captación se calcula con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Captación DPPH} = A \text{ Inicial} - A \text{ final} \times 100 / A \text{ inicial}$$

Donde, el porcentaje de captación representa la pérdida del color purpura a amarillo del radical DPPH*, cuando se agrega un compuesto antioxidante, disminuye así la absorbancia de la solución, que es medida a 517 nm (Ruiz, 2020).

Método ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfúrico)

El proceso consiste en la formación de un compuesto cromóforo verde-azulado generado por la radicalización del reactivo ABTS por la reacción con persulfato de potasio, esto a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas. El radical ABTS formado se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre $0,70 \pm 0,2$ a una longitud de onda de 754 nm. Al igual que el método DPPH, el cambio de color es monitoreado por medio de un espectrofotómetro UV para Reacción del radical DPPH con agente antioxidante. La medición se la realiza al instante (Kuskoski et al, 2005).

Método de decoloración del β -caroteno

La prueba del β -caroteno test se la realiza en base al método de Miller (1971). Esta técnica mide la capacidad de ciertas sustancias o extractos de impedir la oxidación del β -caroteno en una emulsión con ácido linoleico (Pérez, et al, 2003).

La técnica se fundamenta en la decoloración por oxidación del β -caroteno en presencia de ácido linoleico, esto en una emulsión acuosa con tween 20 como agente emulsificante. La decoloración ocurre cuando el β -caroteno reacciona con los radicales libres generados por el ácido linoleico o metil lineolato (Rojano, et al; 2008). Los radicales libres se generan por degradación oxidativa del ácido linoleico (en su carbono 13) en presencia de un incremento de temperatura.

Las lecturas en las absorbancias disminuyen si los radicales peróxidos del ácido linoleico oxidan al β -caroteno. La presencia de sustancias antioxidantes evita la decoloración oxidativa de la emulsión por la neutralización de los radicales libres (Taga, Miller y Pratt, 1984).

Definición Operacional de Términos

Radical libre

Se define como un átomo o molécula altamente inestable que contiene uno o más electrones desapareados por lo cual es altamente reactivo (Mora, 2002). Al poseer un electrón desapareado o libre tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar una estabilidad electroquímica (Avello y Suwalsky, 2006).

Agente antioxidante

Son sustancias capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, sin perder su estabilidad electroquímica. Actúan donando electrones y evitando que los radicales libres los capten de las células (Tapia, 2018)

Actividad antioxidante

Una molécula con actividad antioxidante posee la capacidad de oxidarse rápidamente, de modo que previenen o detienen una cadena de propagación oxidativa, estabilizando el radical generado y la regeneración del antioxidante; reduciendo el daño oxidativo en el cuerpo humano (Pérez, 2014).

Principios Activos

Son los componentes considerados terapéuticos. Pueden diferir en su número y concentración según la complejidad de la estructura de la planta. Por lo general el principio activo que se halla en cantidad mayoritaria en la planta (por esta razón si se aísla y es posible sintetizarlo en el laboratorio se crean medicamentos convencionales que imitan la actividad de la planta y cuya obtención es más económica (Roldan, 2004).

Producto Natural

Se define “producto natural” o “metabolito secundario”, aquel propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza, a diferencia de los metabolitos primarios o productos bioquímicos que presentan una utilidad definida y que son comunes a todos los seres vivos: carbohidratos, lípidos, proteínas, etc. (Marcano y Hasegawa, 2002).

Fitoquímico

Los fitoquímicos son sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida (por lo menos a corto plazo), pero tienen efectos positivos en la salud (Balch et al., 2000).

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o *screening* fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que nos permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Para la obtención de los principios activos es necesario el conocimiento de diferentes técnicas y de fuentes potenciales para la obtención de extractos o de principios activos a partir de un precursor de origen natural. Para los procesos de extracción se parte de la droga y se realiza un proceso extractivo que permite aislar los principios activos directamente a partir de ellas (Herrera y Vela, 2016).

Operacionalización de las Variables

Las variables son conceptos abstractos que se operacionalizan para transformarlos en empíricos (Pérez, 2009). Por esta razón, se operacionaliza la variable dependiente, actividad antioxidante y la variable independiente, composición química de los extractos de *Satureja nubigena* (Tabla 1 y 2).

Hipótesis

Existe relación entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de *Satureja nubigena* recolectadas en el Municipio Cardenal Quintero del estado Mérida, en el Laboratorio de Investigaciones de la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023.

Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente Actividad Antioxidante.

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad Antioxidante	Dependiente Cualitativa Nominal	Capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (Londoño, 2011)
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
A través del método de DPPH, se determina en forma cuantitativa la capacidad antioxidante para estabilizar el radical DPPH, esta medición se realiza espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 517 nm (Londoño, 2012).	Actividad antioxidante presente. Actividad antioxidante ausente.	Cambio de color violeta intenso a amarillo

Fuente: Uzcátegui y Rondón, 2018.

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente composición química del extracto de *Satureja nubigena*.

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química del extracto de <i>Satureja nubigena</i>	Independiente Cualitativa Nominal	Son las sustancias responsables de la acción farmacológica, que le confieren valor terapéutico y curativo a la planta. (Montes, 2014).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
A través del tamizaje fitoquímico, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta. Consiste en la extracción de la planta con	Metabolitos secundarios presente Metabolitos secundarios ausentes	-Alcaloides: viraje de color a rosado o naranja. -Fenoles: Viraje de color a azul oscuro. -Taninos: Viraje de color a verde oscuro. -Cumarinas: Presencia de puntos fluorescentes.

solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación (Herrera y Vela, 2016)		-Saponinas: Presencia de espuma. (Sofowora, 1993)
--	--	--

Fuente: Uzcátegui y Rondón, 2018.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación alude al nivel o grado de profundidad con el que se realizará el estudio y, por lo tanto, el logro de la investigación (Arias, 2006). En ese sentido, la investigación podrá ser exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2015). Cabe resaltar que, para identificar el tipo de investigación es importante conocer la relación que se quiere estudiar. Para tal efecto en esta investigación se estudió una relación causa-efecto, ya que intereso la causa representada por la composición química de los extractos de *Satureja nubigena* y el efecto antioxidante. Por lo tanto, esta investigación es confirmatoria.

Diseño de la Investigación

El diseño de investigación se refiere a la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado, incluye las decisiones que se toman en el proceso de recolección de datos y de experimentación en el caso de investigaciones confirmatorias y evaluativas (Arias, 2006). El diseño implica dónde y cuándo se recopila la información y la amplitud de la información para así dar respuesta a la pregunta de investigación de la forma más idónea posible (Hurtado, 2015). Considerando que el diseño de esta investigación fue de campo, de laboratorio, transversal, contemporáneo y de

rasgo. De campo, ya que la planta *Satureja nubigena* se recolectó en el Sector La Amarilla de la población de Santo Domingo del Municipio Cardenal Quintero, estado Mérida. De laboratorio, debido a que la planta a recolectada se llevó al Laboratorio de Investigación de la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, donde se empleó el método de maceración para la obtención de los extractos. Además, el diseño es transversal y de rasgo, ya que la recolección de la información se realizó en el presente en un solo momento del tiempo e incluye dos tipos de variables.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Una vez definido el evento a estudiar, es necesario determinar en qué o en quién se va a investigar ese evento, es decir, en cuáles seres se manifiesta la situación a estudiar; estos seres son las unidades de estudio (Hurtado, 2015). De acuerdo a lo expuesto, la unidad de investigación está representada por el extracto vegetal obtenido de las partes aéreas de la especie *Satureja nubigena* obtenidas en de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Selección del Tamaño de la Muestra

La muestra es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible, en algunos casos la población es tan grande o inaccesible que no se puede estudiar toda, entonces el investigador tendrá la posibilidad de seleccionar una muestra (Arias, 2006). Para efecto de esta investigación la muestra corresponde al extracto madre seco obtenido por destilación mediante el método de maceración a temperatura ambiente, empleando un solvente polar como el metanol.

Sistema de Variables

Un sistema de variables es un conjunto de características que se puede medir, controlar o estudiar en una investigación, estas son susceptibles de cambios y valores cualitativos o cuantitativos, que se relacionan según su dependencia o función en una investigación (Palella, 2010). Por lo tanto, las variables existentes en esta investigación se encuentran sistematizadas en dependiente e independiente. La variable dependiente es la actividad antioxidante y la variable independiente es la composición química de los extractos de *Satureja nubigena*.

Procedimientos de la Investigación

El material fue recolectado en el sector La Amarilla de la población de Santo Domingo, Municipio Cardenal Quintero, estado Mérida. La identificación de la especie fue realizada por el Ingeniero Forestal Juan Carmona Arzola, de la cual un espécimen se depositó en el Herbario MERR de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Así mismo, el material recolectado se desecó en estufa a 40 °C durante 48 horas y se realizó el proceso de molienda, pesado y almacenamiento hasta su utilización. Posteriormente, el material botánico seco y molido, se sometió a un proceso de extracción a través de maceración el cual consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles (González, 2004). Para esto, se utilizó un solvente polar como el metanol. El extracto se concentró hasta sequedad empleando un rotavapor a presión reducida. El residuo resultante se resguardó en envase herméticamente cerrados, protegidos de la luz y a 4°C.

El extracto obtenido se sometió a ensayos cualitativos preliminares (tamizaje fitoquímico) para establecer la presencia de metabolitos secundarios en la planta. Para realizar los distintos test cualitativos, se siguió la metodología descrita por (Sofowora, 1993):

- Prueba para glucósidos: secar 4 ml de solución de extracto hasta 2 ml, añadir 1-2 ml de hidróxido de amonio y agitar, la aparición de color rojo indica la presencia de glucósidos.
- Prueba de polifenoles y taninos: mezclar el extracto crudo con 2 ml de una solución al 2% de FeCl_3 , una coloración azul-verde indica la presencia de polifenoles y taninos.
- Prueba de flavonoides: mezclar el extracto crudo con pocos fragmentos de cinta de magnesio y añadir HCl concentrado cuidadosamente por las paredes del tubo, la aparición de un color rosa o rojo magenta indica la presencia de flavonoides.
- Prueba de saponinas: mezclar el extracto crudo con 5 ml de agua destilada en un tubo de prueba y agitar durante 30 segundos, la formación de espuma estable (1 cm de altura) indica la presencia de saponinas.
- Prueba de esteroides: mezclar el extracto crudo con 2 ml de cloroformo y al agregar H_2SO_4 concentrado, un color rojo en la capa inferior de cloroformo indicara la presencia de esteroides.
- Prueba de terpenoides: disolver el extracto crudo en 2 ml de cloroformo y evaporar a sequedad, a esto, agregar 2 ml de H_2SO_4 concentrado, una coloración marrón rojiza en la interfaz indica la presencia de terpenoides.
- Prueba de alcaloides: mezclar el extracto crudo con 2 ml de HCl al 1% y calentar suavemente, agregar los reactivos de Mayer y Wagner, una turbidez del precipitado indica la presencia de alcaloides.

- Prueba para cumarinas: concentrar la solución de extracto para producir un residuo, luego disolver los residuos en agua caliente, al enfriarse dividir la solución en dos tubos de ensayo; a un tubo de ensayo, agregue 10% (p / v) de hidróxido de amonio y el otro se utiliza como control, el color de la fluorescencia indica la presencia de cumarinas.

El resultado se registró como presente (+) o ausente (-) según el resultado de cada prueba y se realizó por triplicado. Seguidamente, para confirmar la actividad antioxidante se utilizó el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). Éste método fue originalmente diseñado por Marsden Blois en 1958, y dentro de sus modificaciones posteriores destaca la de Brand-Williams et al., en 1995, y actualmente es el método más utilizado para evaluar actividad antioxidante.

Consiste en utilizar dicho radical estable que al mezclarse con una sustancia que le dona un átomo de hidrógeno pasa a su forma reducida, proceso que se puede observar ya que cuando la molécula se encuentra como radical es coloreada (violeta) y al reducirse se torna amarillo pálido (Poma, 2015)

Para medir el efecto secuestrante de radicales libres de DPPH del extracto y de los compuestos aislados se preparó una solución metanólica de DPPH (6×10^{-2} mM), luego 2,8 mL de esta solución se mezclaron con 0,2 mL de cada muestra en metanol a una concentración de 4 mg/mL. La mezcla de reacción se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia de la mezcla se midió con un espectrofotómetro UV-visible a 517 nm. Como control negativo se empleó una solución de metanol. El porcentaje de inhibición (% I) de radicales libres de DPPH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% I = \left(\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{extracto}}{Abs_{DPPH}} \right) * 100$$

Dónde: Abs DPPH es la absorbancia de la solución metanólica de DPPH, y Absextracto es la absorbancia de la mezcla de la solución metanólica de DPPH más la solución metanólica del extracto.

Para la determinación de la concentración efectiva se tomó solo las muestras que presentaron un porcentaje de inhibición superior a 50 %, para evaluar a diferentes concentraciones (2; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 mg/mL) y se aplicó la metodología descrita anteriormente.

La concentración requerida para obtener el 50 % de la capacidad máxima para secuestrar radicales libres (Concentración Efectiva 50, CE₅₀) se calculó por regresión lineal.

Para la determinación de compuestos fenólicos se realizó por el método colorimétrico empleando el reactivo Folin-Ciocalteu a pH básico el cual mostró una coloración azul sensible de medir a 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV- visible. La solución madre se preparó con ácido gálico a 50 mg/L, y una solución de carbonato de sodio a 0,7 M, siguiendo la metodología descrita por Singleton et al. (Zielinski, 2011)

Para ello, se tomó 1 mL de cada uno de los extractos y se añadió 2 mL del reactivo Folin-Ciocalteu preparado a una concentración de 6,0x10⁻⁵ mM, 2 minutos después se añadió 8 mL de carbonato de sodio a 0,7M, se dejó encubar por treinta minutos para el desarrollo del color azul, propio de la reacción de este tipo de compuestos. Se realizó la lectura espectrofotométrica a 760 nm y se comparó con la curva patrón usando como estándar ácido gálico (fenol); estos ensayos se realizaron por duplicado.

Cálculos: Los resultados se expresaron como mg de Ácido gálico por g de extracto seco, a partir del uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido} = \frac{Cex \times Vex \times 1000}{Pm}$$

Donde: Pm es el peso de la muestra utilizado, Vex es el volumen de extracto utilizado y Cex la concentración encontrada en el extracto

Diseño de Análisis

Una vez obtenidos los datos, es necesario analizarlos a fin de descubrir su significado en términos de los objetivos planteados al principio de la investigación (Hurtado, 2015). Por tal motivo, se procede a su análisis estadístico desde un enfoque cuantitativo, lo cual se refiere a la expresión numérica de los datos y al análisis a través de operaciones matemáticas (Palella, 2010). De esta manera, los datos se organizan en una base de datos, a partir de donde se construyen tablas y gráficos que permiten visualizar los resultados obtenidos de manera sintetizada.

Variables estadísticas

Las variables estadísticas de esa investigación serán clasificadas desde su naturaleza, escala de medición e indicadores estadísticos. El fin, es identificar el indicador estadístico pertinente (tabla 3).

Tabla 3. Variables estadísticas según su naturaleza, escala de medición e indicadores estadísticos.

Variables	Tipo de variable		Escala de medida				Indicador Estadístico
	Cualitativa	Cuantitativa	Nominal	Ordinal	Intervalo	Razón	
Actividad antioxidante	X		X				Frecuencia absoluta y relativa
Terpenos Flavonoides Glicósidos Alcaloides Quinonas Taninos Cumarinas Saponinas	X		X				Frecuencia absoluta y relativa

ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

Los aspectos administrativos comprenden un breve capítulo donde se expresan los recursos y el tiempo necesario para la ejecución de la investigación (Arias, 2006). A continuación, se presenta el tiempo invertido para el desarrollo de esta investigación, ilustrado de acuerdo a cada parte realizada; así como también los gastos necesarios para ejecutarla:

Cronograma de actividades: Diagrama de Gantt

Se expresa mediante un gráfico en el cual se especifican las actividades en función del tiempo de ejecución. Puede representarse mediante un diagrama de Gantt (Arias, 2006).

Actividad	2018	2019	2020	2021	2022
Elección de tema	x				
Arqueo Bibliohemerografico	x				
Capítulo I	x				
Capitulo II	x				
Capitulo III		x			
Capitulo IV		x			
Capítulo V					x
Correcciones generales					x
Entrega del Proyecto de Investigación					x

RUBROS	COSTO (Bs)	Estrategia de financiamiento
Solventes Reactivos Materiales y equipos	1700 Bs	Proyectos de investigación - ULA
Fotocopias impresiones	540 Bs	Recurso Personal
Servicios: Internet	180 Bs	Recurso Personal

Transporte		
Total Presupuestario	2.420 Bs	

Presupuesto

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

Tamizaje Fitoquímico

Los resultados del tamizaje fitoquímico empleando métodos cualitativos para la determinación de la presencia de metabolitos secundarios en el extracto metanólico de *Satureja nubigena* se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico de los metabolitos secundarios del extracto metanólico de *Satureja nubigena*

Compuesto	Prueba	Resultado
Alcaloides	R.D	-
	R.M	+
	R.W	-
Taninos y Polifenoles	FeCl ₃	+++ (Azul intenso)
Flavonoides	NaOH	+++ (turbidez)
	Test de Shinoda	+
Antraquinonas	Test de Borntranger	+++
	H ₂ SO ₄	++
Saponinas	Espuma	-
Esteroles	Test de Salkowsky	-
Triterpenos	Test de Lieberman-Bourchard	++
Cumarinas	Borax	+++

No hay presencia (-), Escaso (+), Moderado (++), Abundante (+++) R.D: Reactivo de Dragendorff, R.M: Reactivo de Mayer, R.W: Reactivo de Wagner

Observando los resultados obtenidos en la tabla 4 se puede inferir que los metabolitos secundarios más abundantes fueron taninos, fenoles, flavonoides, antraquinonas y cumarinas; también se evidenció la presencia moderada de saponinas y triterpenos, además; el extracto de *S. nubigena* mostró ligera presencia de alcaloides cuando se empleó el reactivo de Mayer.

Las pruebas de Shinoda y NaOH al 10% evidenciaron la presencia de flavonoides en el extracto alcohólico, en esta última se observó turbidez correspondiente a la presencia abundante de este metabolito en el extracto de *S. nubigena*, cabe resaltar que los flavonoides son compuestos con capacidad antioxidante. Illesca y Lovato, en 2020 en su estudio del perfil fitoquímico también encontraron flavonoides en los extractos acuosos de *S. nubigena*.

Además, las características de importancia en el uso medicinal del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze se le pueden atribuir a la presencia de los siguientes compuestos: los flavonoides, son los responsables de brindar a la planta propiedades antioxidantes, antitrombótico, combaten fragilidad capilar, protegen al hígado y estómago, le dan a la planta capacidad antibacteriano, antiinflamatoria y analgésica (Guinocchio, 2019)

De esta manera, los flavonoides han mostrado que tienen la mayor capacidad de quitar peroxidación lipídica, prevenir el daño oxidativo del ADN y atraparlas ROS. Noriega, (2009) en su estudio “Actividad antioxidante de *Satureja macrostema*” menciona que existe base científica para decir que la gran actividad antioxidante de los flavonoides, resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de determinadas oxidasas, como la lipooxigenasa, la

ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, NADPH oxidasa y la xantina oxidasa que evita la generación de las ROS *in vivo*, así como los hidroperóxidos orgánicos.

Sumado a ello, también es conocido que inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2, mismo tiempo que estimulan otras con actividad antioxidante reconocida, tales como: la catalasa y la superóxido dismutasa, con lo que interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación en sí. Además, son los flavonoides con un grupo piragalónico, los que poseen una mayor actividad antioxidantes, que los que presentan un núcleo catecólicos (Torres et al, 2013).

Por otra parte, analizando la presencia de los taninos y fenoles empleando una solución de cloruro férrico al 10 %, se pudo evidenciar que esta clase de metabolitos están presentes en cantidades relativamente abundantes ya que la aparición de una coloración azul intensa así lo reveló.

Guinocchio (2019) en su estudio de *Clinopodium nubigenum* también reportó la presencia de triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos y taninos en los extractos.

Así como también Rodríguez en 2019, en su estudio actividad antioxidante de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "*panisara*" identificaron en los extractos etanólicos, acuosos y diclorometánico la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, triterpenos y esteroides, como se reportan en esta investigación para *S. nubigena*. También Leandro et al, 2018 es su trabajo reportaron la presencia de flavonoides, taninos, lípidos, hidratos de carbono, esteroides, triterpenos, antraquinonas, alcaloides y aceite esencial de hojas de *Satureja nubigena* (*pachachamcua*).

Por lo tanto, de los metabolitos antes mencionados se puede afirmar que los compuestos fenólicos como taninos y flavonoides, y algunos terpenos, actúan como antioxidantes, infiriendo así un efecto citoprotector, disminuyendo la lipoperoxidación del tejido gástrico, mecanismo que en diferentes plantas ya se ha comprobado su efecto gastroprotector, antisecretor, antiinflamatorio e inhibidor de la migración de las células inflamatorias y actividad ante los radicales libres; los flavonoides son considerados protectores celulares, conociendo su actividad como antioxidantes; además incrementan las prostaglandinas que se encuentran disminuidas por inhibición de la COX posterior al uso de AINEs. Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.

Por lo expuesto se puede inferir, que los resultados obtenidos en este estudio tienen concordancia con lo encontrado en otras especies de la misma familia y género.

De acuerdo a los resultados observados en la determinación fitoquímica de cumarinas presentes en el extracto metanólico de las hojas de *S. nubigena*, empleando como reactivo Bórax, una coloración verde intensa bajo la luz ultravioleta a longitudes de onda larga (365 nm), puso en evidencia la presencia de esta clase de sustancia en dicho extracto. Es importante señalar que no se han reportado en la literatura científica hasta el momento la presencia de cumarinas en extractos o aceites esenciales de la especie en estudio.

Para la determinación de antraquinonas en el extracto de *S. nubigena*, se emplearon la prueba de Borntranger y la del ácido sulfúrico, observándose en ambos casos la presencia de antraquinonas de forma abundante a

moderada. Cabe resaltar que no se ha reportado la presencia de antraquinonas en estudios anteriores para esta especie.

La presencia de alcaloides fue escasa en el extracto analizado, de las tres pruebas realizadas para la detección de esta clase de metabolitos, solamente cuando se empleó el reactivo de Mayer, la reacción se tornó ligeramente turbia, lo cual es sugerente de la escasa presencia de alcaloides, mientras que las pruebas de Dragendorff y Wagner resultaron claramente negativas.

Similarmente a los resultados observados en estas pruebas, Illesca y Lovato en 2020, realizaron las pruebas para la determinación de alcaloides en los extractos éter, etano y acuoso de *S. nubigena*, sin embargo, su resultado fue negativo en todos los extractos en ensayo. No obstante, Ginocchi evaluó el extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (*Pachachamcua*), reportando la presencia de alcaloides en el mismo.

El tamizaje fitoquímico realizado para terpenos y esteroides evidenció que no hubo presencia de estos compuestos en el extracto metanólico.

Asimismo, los resultados obtenidos en los análisis fitoquímico del estudio de Caicedo y Otavalo en 2007, concluyeron que el componente activo más abundante fueron los triterpenos y esteroides, seguido de los taninos y flavonoides.

También es necesario citar el estudio realizado por Lituma y Molina en 2008, titulado “Determinación del efecto analgésico de *Clinopodium nubigenum*”, en donde su primera conclusión menciona que: “De la marcha fitoquímica realizada sobre el extracto de *C. nubigenum*, se pudo determinar la presencia de diferentes metabolitos como: flavonoides, taninos, leucoantocianinas, compuestos fenólicos y triterpenoides y/o esteroides”

El extracto de *S. nubigena* no produjo espuma al agregar agua y agitar vigorosamente, por lo tanto, se deduce que no presenta saponinas en su contenido fitoquímico.

Cabe resaltar que la cantidad de fitocostituyentes pueden variar en la misma especie por diferentes factores, tales como: tipo de clima, suelo, recolección (fecha y temporada), almacenamiento (luz, humedad y tiempo), además del tipo de solvente, el tiempo de este en contacto y el tamaño de partícula (Barros y Quiroz, 2016).

Cuantificación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales se utilizó el método colorimétrico usando el reactivo de Folin Ciocalteu y empleando la metodología descrita por Singleton *et al.* (1999), para lo cual se realizó una curva de calibración utilizando como referencia una solución de ácido gálico (Figura 18). El método de Folin Ciocalteu es uno de los más utilizados para determinar el contenido de fenoles totales tanto en alimentos como en muestras vegetales (Roginsky y Lissi, 2005).

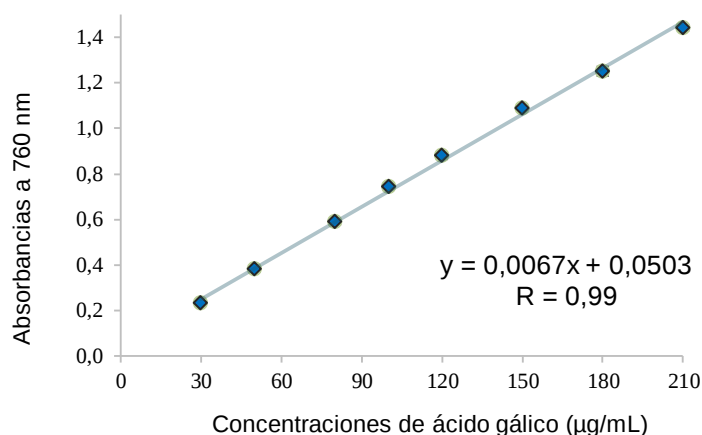


Figura 18. Curva de calibración del ácido gálico

El contenido total de fenoles para el extracto metanólico de las partes aéreas de *S. nubigena* fue determinado usando la ecuación de regresión lineal $y = 0.0667x + 0.0503$, $R = 0.99$ y se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g ext. seco). Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Contenido de fenoles totales del extracto metanólico de *S. nubigena*

Muestra	λ_1	λ_2	λ_3	[] prom	δ
Extracto metanólico	1,444	1,443	1,456	61,20	0,19

λ : Longitud de onda; [] prom: concentración promedio δ : desviación estándar

Como se puede apreciar en la tabla 5, los compuestos fenólicos están presentes a una concentración de $61,20 \pm 0,19$ mgEAG/100g de extracto

seco. Cabe resaltar que el contenido de fenoles totales, son sustancias que se han relacionado con el poder antioxidante de las especies vegetales.

Se consultó en la bibliografía estudios que muestran la cuantificación de fenoles totales en la especie *Satureja nubigena*; Torres reportó en 2013 un total de $1010,6 \pm 18,9$ mg EAG/mLAE, en aceites esenciales, determinado por el Método de Folin-Ciocalteu, también cuantificó el contenido de fenoles para la especie *Satureja sericea* obteniendo como resultado $483,3 \pm 10,5$ mg EAG/mLAE. Alonso en 2009, al extracto metanólico de *Satureja macrostena* le determinó el contenido total de fenoles obteniendo: 596.96 ± 7.8 mg EAG/100 g de hojas frescas, contenido mucho mayor al encontrado en este estudio.

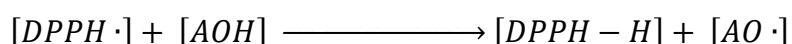
Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de los alimentos y plantas depende de la naturaleza y concentración de los compuestos antioxidantes, la cual varía dentro de una misma familia en el reino vegetal. Este hecho explica que los diferentes alimentos y plantas difieran en su capacidad para prevenir las enfermedades crónicas no transmisibles asociadas al estrés oxidativo (Muñoz et al., 2015). Es importante determinar la capacidad antioxidante de las diferentes especies naturales debido a que el consumo de estas aporta vitamina C, vitamina E y compuestos fenólicos; estos compuestos están ligados a efectos de protección frente a enfermedades asociadas con el estrés oxidativo aumentando la defensa antioxidante (Oliveira, 2014; Vintimilla, 2013).

De esta manera, se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, pero aquella que ha recibido una preferencial atención es la técnica DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos

antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante (Guija et al, 2015).

La reacción se plantea de la siguiente manera:



Esto se interpreta por medio de la IC₅₀, es decir del valor de la concentración de muestra mínima que produce una inhibición del 50% del radical libre (Poma, 2015).

Por consiguiente, la actividad antioxidante del extracto provocó un cambio en el color original de la solución de DPPH•, debido a la presencia de compuestos que presentan la capacidad de donar un átomo de hidrógeno a los radicales libres del DPPH, reduciéndolos a una forma más estable (DPPH-H, 1,1-difenil-2-picrilhidrazina) (Poma, 2015).

El porcentaje de inhibición del extracto a una concentración de 4 mg/mL se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Ensayo preliminar de la actividad antioxidante del extracto metanólico.

ANALITO	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	ABSORBANCIA (nm) 517 nm			% I	% I	% I	%I _{PROM}	δ %I
		λ ₁	λ ₂	λ ₃					
EXTRACTO metanólico	2000	0,140	0,141	0,142	79,710	79,565	79,420	79,565	0,118
	1500	0,176	0,194	0,183	74,493	71,884	73,478	73,285	1,074
	1000	0,193	0,201	0,202	72,029	70,870	70,725	71,208	0,584
	750	0,217	0,214	0,222	68,551	68,986	67,826	68,454	0,478
	500	0,345	0,344	0,342	50,000	50,145	50,435	50,193	0,181
	250	0,235	0,265	0,260	65,942	61,594	62,319	63,285	1,902
PATRONES	DPPH	0,690	0,690	0,690					
	ÁCIDO ASCÓRBICO	0,051	0,048	0,096	92,609	93,043	86,087	90,580	3,182

λ: Desviación estándar; %I: Porcentaje de inhibición; δ: desviación estándar.

Para calcular la IC₅₀ del extracto metanólico se procedió hacer las diluciones a 2; 1,5; 1; 0,750; 0,5 y 0,25 mg/mL.

Los resultados de las lecturas correspondientes se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Porcentaje de Inhibición del extracto metanólico de *S. nubigena* a distintas concentraciones.

Con estos resultados se procedió a calcular el valor de IC₅₀ para el

Muestra	λ1	λ2	λ3	$\bar{\lambda}_{promedio}$	%I	δ
Extracto metanol (4mg/ml)	0,075	0,183	0,098	0,0865	82,80	6,73
Ac. Ascórbico / DPPH	0,051	0,048	0,096	0,065	90,58	3,182
DPPH	0,690	0,690	0,690	0,690		

analito, empleando la ecuación de regresión lineal $Y=40,726x+0,2497$, $R=0,9936$; $Y=41,973x-2,8879$, $R^2=0,991$ y $Y=41,048x-1,9745$; $R^2=0,989$ (Figura 19) hallándose un valor para la IC₅₀ de $2,85\pm 1,66$ mg/mL.

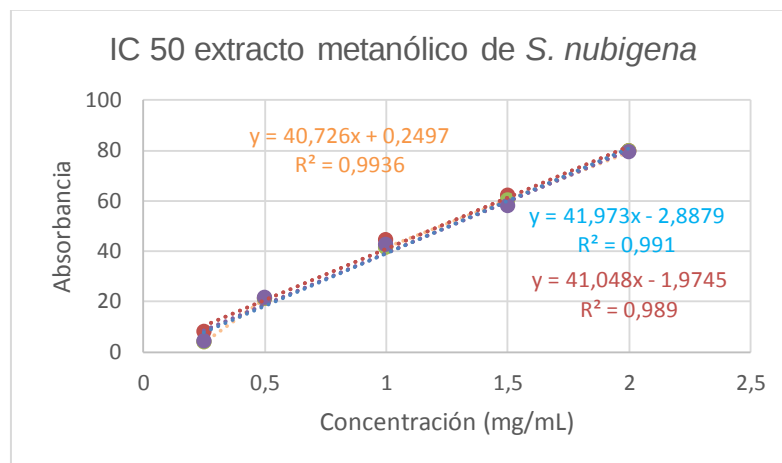


Figura 19. Ecuación de la recta para las distintas concentraciones empleadas del extracto metanólico de *S. nubigena*

De acuerdo a los resultados obtenidos, los extractos de *S. nubigena* y su comparación con un antioxidante por excelencia, como lo es el ácido ascórbico (% inhibición 90,58% en solución patrón), el extracto evidencio un porcentaje de inhibición del radical DPPH mayor al 50%, además presentó actividad de captura del radical DPPH con un IC₅₀ de 2,85±1,66 mg/mL.

Existen pocos reportes en la literatura científica acerca de la actividad antioxidante de *S. nubigena*. Algunos de los resultados están basados en el análisis de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales de esta especie y tan sólo un reporte de la evaluación de extractos. Así tenemos que Guerra en 2016, reportó en los aceites de *Clinopodium nubigenum* una actividad antioxidante de 1,812 ± 0,003 uL/mL; Torres en 2013 afirma que *Satureja nubigena* poseen capacidad atrapadora de radicales libres DPPH en todas las concentraciones ensayadas, dicha capacidad va aumentando a medida que la concentración del aceite también aumenta, mostró a los 10 µL el 68,51 % y a los 300 µL, 99,31% de capacidad atrapadora de radicales libres DPPH.

Asimismo, otros estudios previos encontrados refuerzan los resultados obtenidos en esta investigación, Rodríguez en 2019, encontró actividad

antioxidante del aceite esencial de *Satureja pulchella*; también se ha reportado del extracto etanólico de *Satureja macrostema* con un IC₅₀ de 315.8±1.9 mg/ml, esta actividad puede ser debido a la presencia de flavonas presentes en el extracto metanólico de la planta afirma Alonso en 2009.

De esta manera, *Satureja nubigena* presenta una actividad antioxidante significativa al determinar su capacidad atrapadora de radicales libres a través del método DPPH, aunado a esto se encontró una importante cantidad de compuestos fenólicos, que pudieran ser los responsables de esta actividad biológica, siendo una de las grandes potencialidades de esta especie para utilizarse como alternativa natural antioxidante en la industria farmacéutica.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El extracto metanólico de *S. nubigena* presentó en su composición química taninos, fenoles, flavonoides, antraquinonas y cumarinas; presencia moderada de saponinas y triterpenos, y ligera presencia de alcaloides.
- El extracto metanólico de *S. nubigena* tuvo un contenido de fenólicos de $61,20 \pm 0,19$ mgEAG/100g del extracto seco, el cual puede ser responsable de la actividad antioxidante de la planta.
- Presentó actividad antioxidante con un IC₅₀ de $2,85 \pm 1,66$ mg/mL esta actividad puede ser debido a la presencia de compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico de la planta.
- En base a los datos obtenidos se da respuesta a la hipótesis planteada: si existe relación entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de *Satureja nubigena* recolectadas en el municipio Cardenal Quintero del estado Mérida, en el Laboratorio de Investigaciones de la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta enero de 2023, concluyendo así que la especie *S. nubigena* es una buena fuente de antioxidantes, dándole un valor agregado a la planta a través de su contenido fitoquímico.

Recomendaciones

- Determinar la composición química de *Satureja nubigena* por métodos cromatográficos y espectroscópicos.
- Ampliar el estudio de la capacidad antioxidante de los extractos de *S. nubigena* mediante otros métodos analíticos descritos en la literatura.
- Explorar el posible potencial biológico de *S. nubigena* analizando otras actividades tales como actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena, antiproliferativa, entre otras.

www.bdigital.ula.ve

Referencias Bibliohemerográficas

- Angarita, M. (2019). *Obtención de aceite esencial de semilla de durazno por método soxhlet y arrastre de vapor*. (Tesis de grado). Universidad de América. Bogotá, Colombia
- Arias, F. (2006). **Proyecto de investigación: Introducción a la metodología científica**. Caracas: Editorial EPISTEME.
- Avello, M., y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. **Atenea** (494), 161-172.
- Avalos, A., y Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009
- Balch, F; y Balch, A. (2000). **Recetas Nutritivas Que Curan**. New York.
- Barros E, y Quiroz M. (2019). *Extracción, cuantificación y actividad antioxidante de polifenoles extraíbles totales en cascara de nuez y granos de café* (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de la Paz Ingeniería Bioquímica. Bolivia.
- Caguana, M., y Quinaluisa, V. (2017). *Diagnóstico del potencial agroindustrial del sunfo (Clinopodium nubigenum) y eneldo (Anethum graveolens)* (Tesis de grado). Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga-Ecuador.
- Caicedo E, Otovalo S. *Determinación de temperatura y tiempo de deshidratación para la elaboración de té de sunfo, Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze*. (Tesis de grado). Universidad Técnica del Norte. Ibarra, Ecuador.
- Cano, A. (2005). Actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica en diferentes hojas de tres variedades de lechuga. **Revista internacional de alimentos**. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/10942910500269584>, 521-528
- Cárdenas, C. (2017). *Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de Prosopis pallida "algarrobo"*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Carrillo, N. (2009). *Actividad antioxidante de Satureja macrostema*. (Tesis de Grado). Instituto Politécnico Nacional. México.
- Céspedes, T., y Sánchez, D. (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. **Revista cubana de cardiología**. Recuperado de: http://bvs.sld.cu/revistas/car/vol14_1_00/car08100.pdf

- Corrales, L., y Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. **Publicación Científica en Ciencias Biomédicas**, 10, 135 – 250.
- Corzo D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. **Rev Mex Cienc Farm.** 43 (3). Recuperado de <https://bit.ly/2QQi9Pj>
- Cowan M. (1999). Plants Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews.** 12 (4). Recuperado de <https://cmr.asm.org/content/12/4/564.full>
- Dichiara, E. (2019). *Producción de carotenoides con capacidad antioxidante por Bacillus licheniformis*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Cuyo.
- Everett, S., Dennis, F., Patel, K., Maddix, S., Kundu, S, y Wilson, R. (1996). J. Biol. Chem. Pp: 271, 3983-3994
- Fernández, E., Huaman, R., y Bardales, J. (2014). Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Satureja nubigena* “Pachachamcua” en cepas de *E. coli* y *E. aureus*, Cajamarca-2014. **REV. PERSPECTIVA**, 15 (17). Recuperado de <https://goo.gl/cHnBRN>
- Finkel, T., y Holbrook, N. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature.** 408, 239-247
- Fonseca, E.A. (2016). *Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del sunfo (Clinopodium nubigenum (kunth) kuntze) frente a patógenos de enfermedades respiratorias Staphylococcus aureus ATTC: 25923, Streptococcus pyogenes ATTC: 19615, Streptococcus pneumoniae ATTC: 49619 y Streptococcus mutans ATTC: 25175* (Tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito.
- Fuentes, J.; Atala, E.; Pastene, E.; Carrasco-Pozo, C.; y Speisky, H. (2017). Quercetin Oxidation Paradoxically Enhances Its Antioxidant and Cytoprotective Properties. *J. Agric. Food Chem.* 65: 11002-11010
- Gallego, M. (2016). *Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles*. (Tesis doctoral). Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona
- Gálvez, D. y Chávez, N. (2017). *Efecto citoprotector del decocto de Satureja nubigena “pachachamcua” en modelo agudo de úlcera gástrica inducida con indometacina en especímenes de investigación* (Tesis de grado). Universidad privada Antonio Guillermo Urrelo.

- Gilardoni, G., Magalón, O., Morocho, V., Negri, R., Tosi, S., y Guglielminetti, M. (2011). Phytochemical researches and antimicrobial activity of *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze) raw extracts. *Rev. Bras. Farmacogn*, 21 (5). Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000139>
- Ginocchio, G., y Pérez, R. (2019). *Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze (pachachamcua) sobre cepas de Streptococcus pyogenes ATCC 19615*. (Tesis de grado). Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Perú.
- González, A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas*. (Tesis de grado). Universidad de Colombia, Manizales- Colombia.
- González, S., Muñiz, R., y Valls, B. (2001). *Actividad antioxidante de la cerveza: Estudios in vitro en in vivo*. Universidad de Valencia, 10(8):4-21.
- Grisham, M y McCord, J. (1986). Chemistry and cytotoxicities of reactive oxygen metabolites. *Biology of oxygen radicals*. American Physiological Society. 1-18. Armenia-Quindío-Colombia. Ediciones ELIZCOM S.A.S.
- Guarnizo, F., y Martínez, Y. (2009). *Experimentos de Química Orgánica - Con enfoque en ciencias de la vida*. Armenia, Colombia: EDICIONES ELIZCOM
- Guerra, P. (2016). *Evaluación de la actividad antioxidante Bioautográfica de dos variedades de aceites esenciales andinos Clinopodium nubigenum (Kunt) Kuntze y Baccharis latifolia*. (Tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Ecuador.
- Guija, E., Inocente, M., Ponce, J. y Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante.
- Gutiérrez, A., Ledesma, L., García, I. y Grajales, O. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. **Revista Cubana de Salud Pública**. 33 (1).
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, M. (2014). **Metodología de investigación**. México, Distrito Federal. Mac Graw Hill Education. México, Distrito Federal.
- Herrera, M. y Vela, M. (2016). *Caracterización fitoquímica y parámetros fisicoquímicos de hoja, corteza y raíz de unonopsis floribunda diels (icoja)* (Trabajo de grado). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquito-Perú.

- Herrera, I., Ponce, Q., Liseth, K. (2017). *Determinación de taninos y cumarinas presente en la planta tres filos (baccharis genistelloides) en la Parroquia Mariscal Sucre Cantón Milagro*. (Tesis de Postgrado). Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas).
- Hurtado, J. (2015). **El proyecto de investigación: Comprensión holística de la metodología y la investigación**. Caracas: Ediciones Quirón.
- Illescas, A. Lovato, C. (2020). “*Estudio del perfil fitoquímico y posibles aplicaciones de los extractos alcohólicos, etéreo y acuoso del sunfo (Clinopodium nubigenum (kunth) kuntze)*”. (Tesis de Grado). Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.
- Kobus-Cisowska, J., Flaczyk, E., Rudzińska, M., y Kmiecik, D. (2014). Antioxidant properties of extracts from Ginkgo biloba leaves in meatballs. Meat Science, 97(2), 174–180. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.meatsci>
- Krisky, N. (1989). Free Radical Biol. Med. 7, 617-635.
- Kuklinski, C. (2000). **Farmacognosia. Barcelona**. España: Ediciones Omega.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Food Science and Technology, 25(4)
- Lituma, L. Molina, V. (2008). *Determinación del efecto analgésico del tipo (Clinopodium nubigenum)* (Tesis de grado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- López, V., Aterrera, S., Cavero, R y Calvo, I. (2007). Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. **Rev. de Fitoterapia**. 7 (1), 43-47.
- MacFaddin, J. (2004). **Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica**. Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México, Sao Paulo: Editorial Medica Panamericana
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002), **Fitoquímica Orgánica**, Caracas-Venezuela: Torino. Edición consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Marquina, I., y cols. (2013). Actividad antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales de *Satureja séricea* “romerito del campo” y *Satureja nubigena* “pachachamcua” provenientes de la región de Cajamarca, 2013. *REVISTA PERSPECTIVA*, 17 (1). Recuperado de <http://revistas.upagu.edu.pe/index.php/PE/article/view/502/426>

- Miller, J. (1997). La contribución relativa de los antioxidantes ascórbicos y fenólicos a la actividad antioxidante total de los jugos de frutas de naranja y manzana y la bebida de grosella negra. *Food Chem.* 60: 331-337.
- Miranda, E., Espinosa, J., Centurión, D., Velázquez, J., y Alor, M. (agosto, 2012). Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. *Spondias purpurea* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11 (4). Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85623048007>
- Montes, D. (2014). *Contenido fenólico y actividad antioxidante de extractos metanólicos obtenidos de las hojas y los frutos de Pittosporum pentadrum* (Tesis de grado). Universidad Central “Marta Abreu” de las villas, Cuba.
- Molina, F. (2012). El lado oscuro del oxígeno. *Sebbm Divulgación.* 55: 373-399.
- Mora, R. (2002). Soporte Nutricional Universal. Bogotá, Colombia: Editorial Médica Panamericana
- Noriega, P., Mosquera, T., Osorio, E. y Fonseca, P. (2018). *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze essential oil: Chemical composition, antioxidant activity, and antimicrobial test against respiratory pathogens. *J. Pharmacognosy Phytother*, 10 (9). Recuperado de <https://bit.ly/2Eg9r9V>
- Oliveira, G. (2014). *Capacidad antioxidante de avertroa carambola l. (carambola) frente a sistemas generadores de radicales libres.* (Tesis de Maestría). Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Peru. Recuperado de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3943>
- OMS. (2014). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. Recuperado <http://appswho.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- Palella, S. y Martins, F. (2010). **Metodología de la investigación cuantitativa.** Caracas: Edición FEDUPEL.
- Pérez, A; y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal* 11, (4); 195-211.
- Pérez, A., y Pérez, G. (2014). *Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de ficus citrifolia y*

- caracterización química de los polifenoles. (Tesis Pregrado). Politécnica Salesiana, Quito - Ecuador.
- Pérez, J. (2007). *Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos*. (Tesis de grado). Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10486/1671>
- Pérez, L., Steiger, S., Khaneja, R., Bramley, P., Cutting, S., Sandmann, G., Fraser, P. (2011) *Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange Bacillus spore-formers*. Bioch Biophys Acta (BBA) - Molec Cell Biol of Lipids 1811(3): p 177-185
- Pérez, N. (2009). *Perfil Fitoquímico de cultivos en suspensión de Kalanchoe daigremontiana*. (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional. México.
- Pérez, R., Vargas, R., Martínez, F., García, E., y Hernández, B. (2003). Actividad antioxidante de los alcaloides de Bocconia arborea. Estudio sobre seis métodos de análisis. Ars Pharmaceutica, 44(1), 5-21.
- Poma, E., Inocente, M., Ponce, J., y Zarzosa, E. (2015). *Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante*. Horiz Med.. 15 (1): 57-60. Recuperado de: <https://bit.ly/34GVAUo>
- Prieto, J., Lacopini P., Cioni P., Chericoni, S. (2007). In vitro activity of the essential oils of Origanum vulgare, Satureja montana and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. Food Chemistry. 104(3):889-895.
- Quispe, E. Torrel, P. (2022). *Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de Satureja nubigena "Pachachamcua" comparado con fluconazol en cepas de Candida albicans*. (Tesis de grado). Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo.
- Ramírez, C.; Andersen O, Gardner P, Morrice P, Wood, S. (2001). Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. Free Radical Biol. Med. 9: 1033-1037. Miller NJ, Rice-Evans CA.
- Robles, M. (2010). *Efectos de extractos de productos naturales para controlar la presencia de Campylobacter jejuni y Salmonella spp. en carne molida molida de pollo*. (Tesis de maestría). Universidad autónoma de Nuevo León, México.
- Rodríguez, C. (2019). *Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de Clinopodium pulchellum (Kunt) Govaerts "panisara" procedente del*

- distrito de Cachicadán – La Libertad, Perú.* (Tesis de grado). Universidad Nacional De Trujillo, Perú.
- Roginski, V., y Lissi, E. (2005). Revisión de métodos para determinar la actividad antioxidante rompedora de cadenas en los alimentos. *Química Alimentaria*, 92 (2):235-254
- Roldán, A. (2004). **100 plantas medicinales escogidas**. Editorial EDAF. ISBN: 9788441401600
- Ruiz, S., Malagón, O., Zaragoza, T., y Valarezo, E. (2020). Composición de los aceites esenciales de *artemisia siodori* Hieron, *Siparuna eggersii* Hieron., *Tagetes filifolia* Lag. y *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze de Loja. **Revista de plantas con aceite esencial**. Ecuador 13 (6): 676-69.
- Ryan, K. y Ray, C. (2010). *Sherris Microbiología Médica*. México:
- Salomon, S., Bermello, A., Márquez, T., López, O., González, M., y Llópiz, C. (2013). Extracción asistida por microondas de lípidos de las semillas de *Cucurbita pepo* L. (calabaza). **Rev Cubana Plant Med.** 18, (1), 1028-4796
- Sánchez, E. Castillo, L. y García, P. (2016). *Actividad antimicrobiana. Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience.. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.334>
- Sánchez, M. (2013). *Consumo de Antioxidantes Naturales en Adultos Mayores de entre 65 y 75 años con Dislipidemia*. (Tesis de grado). Universidad Abierta Interamericana
- Sánchez, V. y Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. **Revista Mexicana de Investigación Médica Sur**, 20(3). Recuperado de <http://medicasur.org.mx/pdf-revista/RMS133-AR01>
- Sofowora, E. (1993). **Phytochemical Assays in “Medicinal Plants and Traditional Medicine in África**. Nigeria: Spectrum Books Limited.
- Swaminathan, S., y Priya, K. (2008). Isolation and purification of carotenoids from Marigold flowers. 1-5.
- Taga, S., Miller, E. E., & Pratt, D. E. (1984). *Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants*. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 61(5), 928-931.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). **Fisiología Vegetal**. España: Ediciones Universitat Jaume.
- Tapia E. (2018). *Composición química, actividad antioxidante y antiCandida albicans del aceite esencial de Clinopodium pulchellum (Kunth)*

- Govaerts “*panizara*”. (Tesis doctoral). Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Torres, I., et al. (2013). Actividad antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales de Satureja séricea “romerito del campo” y Satureja nubigena “pachachamcua” provenientes de la región de Cajamarca, 2013. **REVISTA PERSPECTIVA**, 17 (1). Recuperado de <http://revistas.upagu.edu.pe/index.php/PE/article/view/502/426>
- Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera*. (Tesis de grado) Universidad Tecnológica De Pereira, Colombia
- Usano, J., Palá, J., y Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología)*, 7 (2). Recuperado de <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1553/1747>
- Vargas, W. (2002). **Guía ilustrada de plantas de las montañas del Quindío y Los Andes centrales**. Colombia: Editorial Universidad de Caldas.
- Vintimilla, M. (2013). Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos agroindustriales de mango. Recuperado de <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/5752>
- Vivot, P., Sánchez, C., Cacik, F., y Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana de la flora de Entre Ríos, Argentina, 1 (45). Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/cdyt/n45/n>
- Zielinski, A., Avila, S., Ito, V., Nogueira, A., Wosiacki, G., y Isidoro, C. *The Association between Chromaticity, Phenolics, Carotenoids, and In Vitro Antioxidant Activity of Frozen Fruit Pulp in Brazil: An Application of Chemometrics*. Journal of Food Science; 79 (4).