Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Determinación de metabolitos secundarios, actividad antioxidante *in vitro*, formulación y elaboración de una crema dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de *Minthostachys mollis* ("muña")

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Mg. Carlos Alfredo CANO PÉREZ

ASESOR

Dr. Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cano, C. (2021). *Determinación de metabolitos secundarios, actividad antioxidante in vitro, formulación y elaboración de una crema dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de Minthostachys mollis ("muña")*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica Química, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

METADATOS COMPLEMENTARIOS

Datos de autor	
Nombres y apellidos	CARLOS ALFREDO CANO PEREZ
DNI	06062363
URL de ORCID	
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	PABLO ENRIQUE BONILLA RIVERA
DNI	07212707
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7286-6810
Datos de la investigación	
Grupo de investigación	REPRONAT
Financiamiento	Autofinanciado
Ubicación geográfica de la investigación	1- Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Dirección: Jr. Puno 1002. Cercadode Lima 15001. Perú. Coordenadas: Latitud: S12.0552758; Longitud: O77.0256027
Año o rango de años que la investigación abarcó.	Desde Enero 2018 a dic.2019
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Siendo las **15:00 hrs. del 25 de junio de 2021** se reunieron mediante la plataforma de Google Meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de Tesis, presidido por la Dra. Norma Julia Ramos Cevallos e integrado por los siguientes miembros: Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (Asesor), Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo y Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino; para la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada: **Determinación de metabolitos secundarios, actividad antioxidante *in vitro*, formulación y elaboración de una crema dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de *Minthostachys mollis* ("muña")** presentado por el Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos **CARLOS ALFREDO CANO PÉREZ.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de Tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

..... **DIECISÉIS (16)** .....

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos **CARLOS ALFREDO CANO PÉREZ**, el Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las 17.00 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 17.20 hrs. del 25 de junio de 2021.

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P.P., T.C.)
Presidenta

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (P. P, T.C.)
Miembro - Asesor

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P. P., T.C.)
Miembro

Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

.....

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Al Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, amigo y asesor en todos mis estudios de posgrado por su paciencia y asesoría académica.

Al Mg. Q.F Rubén Valdivieso Izquierdo por su invalorable apoyo y colaboración.

Al jurado informante de la tesis: Dr. Víctor Luis Izaguirre Pasquel.

Al jurado Examinador y Calificador:

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos. (Presidenta)
Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera. (Miembro-Asesor)
Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo. (Miembro)
Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino. (Miembro)

A todos ellos por sus valiosas contribuciones y sugerencias

ÍNDICE

RESUMEN i

ABSTRACT ii

RÉSUMÉ iii

I. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Situación problemática 2

1.2 Formulación del problema 2

1.3 Justificación 3

1.4 Objetivos 4

1.5 Hipótesis 5

1.6 Identificación de variables 5

II. GENERALIDADES 6

2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación 6

2.2 Antecedentes de la investigación 7

2.3 Bases teóricas 8

2.3.1 Aspectos botánicos 8

III. PARTE EXPERIMENTAL 17

3.1 Tipo y diseño del trabajo de investigación 17

3.2 Recolección del material biológico 18

3.3 Clasificación taxonómica 18

3.4 Tratamiento de la muestra 18

3.5 Preparación del extracto 18

3.6 Marcha fitoquímica 19

3.7 Análisis Cromatográfico del Extracto 19

3.8 Elaboración del producto dermocosmético 20

3.9 Determinación de la actividad antioxidante del extracto y la crema dermocosmética 20
3.10 Análisis estadístico 21
IV. RESULTADOS 22
V. DISCUSIÓN 39
VI. CONCLUSIONES 44
VII. RECOMENDACIONES 45
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46
IX. ANEXOS 50

Lista de figuras

PÁGINAS

Figura 1. *Minthostachys mollis, var. mandoniana (Briq.) Schmidt Leb "muña"*…….. 9

Figura 2. Clasificación de Flavonoides…….. 11

Figura 3. Secuestro de ERO por los polifenoles. (Núñez & Quispe)……. 15

Figura 4. Flujograma de la investigación…… 17

Figura 5. Flujograma de la obtención del extracto hidroalcohólico …… 19

Figura 6. Capacidad Antioxidante del Extracto de Muña a diferentes concentraciones del extracto según el método del DPPH…… 28

Figura 7. Capacidad Antioxidante de la Vitamina C a diferentes concentraciones de Vit C, según el método del DPPH……... 28

Figura 8. Capacidad Antioxidante del Trolox C a diferentes concentraciones de Trolox, según el método Expresado como CI50% frente al DPPH …….. 29

Figura 9. Capacidad Antioxidante del Extracto de Muña a diferentes concentraciones del extracto de muña por el método ABTS …… 31

Figura 10. Capacidad Antioxidante de la Vitamina C a diferentes concentraciones de Vit C por el método ABTS …… 32

Figura 11. Capacidad Antioxidante del Trolox Expresado a diferentes concentraciones de Trolox por el método ABTS…… 32

Figura 12. Porcentaje de inhibición de la Capacidad antioxidante de la crema base por el método DPPH …… 35

Figura 13. Capacidad Antioxidante de la Crema al 0,1% por el método del DPPH…… 36

Figura 14. Capacidad Antioxidante de la Crema al 0,5% por el método del DPPH……..... 37

Figura 15. Capacidad Antioxidante de la Crema al 1% por el método del DPPH…… 38

Figura 16. Capacidad Antioxidante como Concentración Inhibitoria (CI 50%) de la Cremas por el método del DPPH……..... 38

Lista de tablas

PÁGINAS

Tabla 1. Composición de la emulsión dermocosmética…… 20

Tabla 2. Rendimiento del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Minthostachys mollis* "muña" var. mandoniana. ..……. 22

Tabla 3. Marcha Fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) …….. 22

Tabla 4. Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) …….. 23

Tabla 5. Propuesta de componentes químicos en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) …… 24

Tabla 6. Absorbancia, % de Inhibición y CI50% según concentraciones del Trolox frente al método DPPH. ……..…… 27

Tabla 7. Absorbancia, % de Inhibición y CI50% según concentraciones de la Vitamina C frente al método DPPH. ……. 27

Tabla 8. Absorbancia, % de Inhibición y CI50% según concentraciones del extracto de muña frente al método DPPH…… 27

Tabla 9. Absorbancia, % inhibición y CI50%, según concentraciones del Trolox frente al método ABTS.…… 30

Tabla 10. Absorbancia, % inhibición y CI50%, según concentraciones de la Vitamina C frente al método ABTS.…… 30

Tabla 11. Absorbancia, % inhibición y CI50%, según concentraciones del Extracto de muña frente al método ABTS.……. 31

Tabla 12. Capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña), Vitamina C y Trolox (expresado como CI50%) DPPH, ABTS…... 33

Tabla 13. Capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña), Vitamina C y Trolox (expresado como CI50%) DPPH, ABTS…… 33

Tabla 14. Características organolépticas y fisicoquímicas de la crema con el extracto hidroalcohólico de *Minthostachys mollis*……. 34

Tabla 15. Absorbancia y porcentaje de Inhibición de la Capacidad Antioxidante de la Crema Base según el método DPPH…… 34

Tabla 16. Absorbancia, % de inhibición y CI 50% de la Actividad antioxidante de la crema al 0,1% (F2) según el método DPPH…….. …… 35

Tabla 17. Absorbancia, % de inhibición y CI 50% de la Actividad antioxidante de la crema al 0,5% (F3) según el método DPPH…….. …….. 36

Tabla 18. Actividad antioxidante de la crema al 1% frente al DPPH……. 37

RESUMEN

El objetivo de la tesis fue reconocer algunos tipos de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) mediante técnicas espectrofotométricas y preparar una forma dermocosmética (crema) determinando su capacidad antioxidante en ambos casos. La muestra vegetal fue colectada en el caserío de Huamanguilla (3276 msnm), Huanta, Ayacucho. El extracto se preparó con hojas pulverizadas de *Minthostachys mollis* (muña), mediante maceración hidroalcohólica, se realizó la marcha de solubilidad con solventes de diferente polaridad, también la marcha fitoquimica, luego se separaron algunos metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina obteniéndose 12 fracciones las que fueron leídas al espectrofotómetro UV-vis. Mediante espectroscopia UV visible, se propone la estructura química de cinco flavonas y una flavanona. En el extracto hidroalcohólico se encontró buena capacidad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS. Por el método DPPH el valor de la capacidad antioxidante del extracto de muña equivalente a Trolox (CAEET) fue 13,071 mg muestra/mg Trolox y el valor de la capacidad antioxidante del extracto de muña equivalente a Vitamina C (CAEEVC) fue 13,046 mg muestra /mg Vitamina C, respectivamente. Por el método ABTS el valor de la capacidad antioxidante del extracto de muña equivalente a Trolox (CAEET) fue 2,186 mg muestra/mg Trolox y el valor de la capacidad antioxidante del extracto de muña equivalente a Vitamina C(CAEEVC) fue 2,449 mg muestra /mg Vitamina C, respectivamente. La capacidad antioxidante equivalente a Trolox TEAC de las pre-formulaciones dermocosméticas (PF1, PF2, PF3 y PF4) fueron 3315,000; 1506,500; 827,769 y 743.406 mg /g muestra respectivamente ($p < 0.05$). Siendo PF4 al 1% la que presentó mayor actividad antioxidante.

Palabras clave: *Minthostachys mollis*, DPPH, ABTS, crema dermocosmética, espectroscopia UV-vis.

ABSTRACT

The objective of the thesis was to recognize some types of secondary metabolites in the hydroalcoholic extract of *Minthostachys mollis* leaves (muña) using spectrophotometric techniques and to prepare a dermocosmetic form (cream) determining its antioxidant capacity in both cases. The plant sample was collected in the hamlet of Huamanguilla (3276 masl), Huanta, Ayacucho. The extract was prepared with powdered leaves of *Minthostachys mollis* (muña), by means of hydroalcoholic maceration, the solubility march was carried out with solvents of different polarity, also the phytochemical march, then some secondary metabolites were separated by thin layer chromatography obtaining 12 fractions, which were read to the UV-vis spectrophotometer. Using UV visible spectroscopy, the chemical structure of five flavones and one flavanone is proposed. Good antioxidant capacity was found in the hydroalcoholic extract using the DPPH and ABTS methods. By the DPPH method the value of the antioxidant capacity of the muña extract equivalent to Trolox (CAEET) was 13.071 mg sample / mg Trolox and the value of the antioxidant capacity of the extract of muña equivalent to Vitamin C (CAEEVC) was 13.046 mg sample / mg Vitamin C respectively. By the ABTS method, the value of the antioxidant capacity of the muña extract equivalent to Trolox (CAEET) was 2,186 mg sample / mg Trolox and the value of the antioxidant capacity of the muña extract equivalent to Vitamin C (CAEEVC) was 2,449 mg sample / mg Vitamin C respectively. The antioxidant capacity equivalent to Trolox TEAC of the dermocosmetic pre-formulations (PF1, PF2, PF3 and PF4) were 3315,000; 1506,500; 827,769 and 743,406 mg / g sample respectively ($p < 0.05$). Being PF4 at 1% the one that presented the highest antioxidant activity.

Keywords: *Minthostachys mollis*, DPPH, ABTS, dermo-cosmetic cream, UV-vis spectroscopy.

RÉSUME

L'objectif de la thèse était de reconnaître certains types de métabolites secondaires dans l'extrait hydroalcoolique de feuilles de *Minthostachys mollis* (muña) à l'aide de techniques spectrophotométriques et de préparer une forme dermocosmétique (crème) déterminant sa capacité antioxydante dans les deux cas. L'échantillon de plante a été collecté dans le hameau de Huamanguilla (3276 m d'altitude), Huanta, Ayacucho. L'extrait a été préparé avec des feuilles en poudre de *Minthostachys mollis* (muña), au moyen d'une macération hydroalcoolique, la marche de solubilité a été réalisée avec des solvants de polarité différente, également la marche phytochimique, puis certains métabolites secondaires ont été séparés par chromatographie sur couche mince obtenant 12 fractions celles qui ont été lues au spectrophotomètre UV-vis. En utilisant la spectroscopie UV visible, la structure chimique de cinq flavones et d'une flavanone est proposée. Une bonne capacité antioxydante a été trouvée dans l'extrait hydroalcoolique en utilisant les méthodes DPPH et ABTS. Par la méthode DPPH, la valeur de la capacité antioxydante de l'extrait de muña équivalent au Trolox (CAEET) était de 13 071 mg échantillon / mg Trolox et la valeur de la capacité antioxydante de l'extrait muña équivalent à la vitamine C (CAEEVC) était de 13 046 mg échantillon / mg de vitamine C respectivement. Par la méthode ABTS, la valeur de la capacité antioxydante de l'extrait de muña équivalent au Trolox (CAEET) était de 2 186 mg échantillon / mg Trolox et la valeur de la capacité antioxydante de l'extrait muña équivalent à la vitamine C (CAEEVC) était de 2 449 mg échantillon / mg de vitamine C respectivement. La capacité antioxydante équivalente au Trolox TEAC des pré-formulations dermocosmétiques (PF1, PF2, PF3 et PF4) était de 3315 000; 1506 500 ; 827 769 et 743 406 mg/g d'échantillon respectivement ($p < 0,05$). Étant à 1% de PF4 celui qui présentait l'activité antioxydante la plus élevée.

Mots clés: Minthostachys mollis, DPPH, ABTS, crème dermo-cosmétique, spectroscopie UV-vis.

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos para el envejecimiento de la piel y las condiciones dermatológicas. La exposición continua a factores ambientales conduce a alteraciones en el tejido conectivo debido a la formación de peróxidos lipídicos y especies reactivas de oxígeno (EROS), así como a la acción de las enzimas, lo que resulta en varios trastornos de la piel[1].

La formación de radicales libres es controlada naturalmente por varios compuestos beneficiosos conocidos como antioxidantes. Estos son eliminadores de radicales libres que brindan protección al cuerpo humano mediante la inhibición de varias reacciones de cadena oxidante. Las EROS generadas reaccionan con diversas biomoléculas presentes en la piel y desempeñan un papel importante en sus trastornos. En este sentido, la aplicación tópica de antioxidantes proporciona una estrategia eficiente para enriquecer el sistema cutáneo endógeno, lo que lleva a una disminución del daño oxidativo mediado por radiación UV y previene enfermedades mediadas por estrés oxidativo[2].

Las sustancias bioactivas ampliamente distribuidas en las plantas como son los compuestos fenólicos comprenden una gran diversidad de metabolitos, como los flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavonas, etc.) y varias clases de no flavonoides (ácidos fenólicos, ligninas, estilbenos). Los antioxidantes naturales son efectivos para prevenir la formación de radicales libres al eliminarlos o promover su descomposición y suprimir los trastornos[1].

El aceite esencial de la especie *Minthostachys mollis* “muña” ha sido estudiada como antibacteriana (*Helicobacter pylori, Shigella dysenteriae, Salmonella typhi y Pseudomonas aeruginosa* etc. antimicótica (*Candida albicans)*. Por lo que el objetivo de la presente tesis es demostrar *in vitro* la actividad antioxidante contra la radiación UV del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* “muña” sobre la piel; siendo esta una actividad aún no investigada de esta especie en nuestro país.

1.1 Situación problemática

La piel humana está expuesta repetidamente a diversas influencias ambientales que dañan el ADN y, por lo tanto, requiere numerosos mecanismos endógenos para proteger, reducir y reparar dicho daño. Estos mecanismos incluyen el aumento del grosor epidérmico, los mecanismos de reparación del ADN, la apoptosis, las enzimas antioxidantes y, por último, la pigmentación de la piel[3].

Se ha creído tradicionalmente que la pigmentación de la piel es el factor fotoprotector más importante, ya que la melanina, además de funcionar como un absorbente UV de banda ancha, tiene propiedades antioxidantes y de eliminación de radicales. En vista de la creciente incidencia del cáncer de piel inducido por los rayos UV y el agotamiento progresivo de la capa de ozono, que contrasta con la percepción pública de que el bronceado es saludable, se entiende mejor el papel de la melanina en la prevención del daño al ADN inducido por los rayos UV[3].

Para minimizar los efectos nocivos de la radiación ultravioleta, se debe continuar la educación pública sobre las medidas fotoprotectoras. Si bien existe una amplia variedad de agentes con estas propiedades que van desde los antioxidantes hasta los extractos de plantas y las enzimas reparadoras de ADN, sería deseable una mejor comprensión de la melanina, sus propiedades fotoprotectoras y las contribuciones de los melanocitos al cáncer. Esto debería permitir nuevos enfoques para modular de manera segura la pigmentación en ausencia del sol para aumentar la pigmentación por razones cosméticas, así como para prevenir el cáncer de piel[2-4].

1.2 Formulación del problema

¿La elaboración de la crema a base del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* “muña” presentan metabolitos secundarios que tendrían actividad antioxidante?

1.3 Justificación

1.3.1 Justificación teórica

La importancia de los antioxidantes fenólicos ha aumentado notablemente en la última década debido a su alta capacidad para eliminar los radicales libres. Las plantas ricas en compuestos fenólicos podrían usarse, por ejemplo, para la prevención de los efectos dañinos de la piel por la radiación UV[1].

Los compuestos fenólicos se pueden administrar al organismo en forma de, extractos de plantas, como medicamentos, suplementos dietéticos y cosméticos. La composición del extracto en compuestos fenólicos está fuertemente influenciada por el método extractivo y el uso de solventes.

Hay aproximadamente 4000 flavonoides identificados a la fecha. Estos flavonoides son frecuentemente utilizados para inhibir la tirosinasa responsable de producir melanina. Esta última protege la piel contra el daño de luz UV absorbiendo la misma y eliminando las especies reactivas de oxígeno (EROS)[1].

La actividad excesiva de tirosinasa conduce a una producción excesiva de melanina. La acumulación anormal y la biosíntesis de los pigmentos de melanina son responsables de trastornos de la piel como el melasma, las pecas y el lentigo senil. Se han intentado numerosos métodos para encontrar sustancias químicas que inhiban la actividad catalítica de la tirosinasa y alteren la síntesis o liberación de pigmentos de melanina. Muchos de estos compuestos tienen una actividad inhibidora de la tirosinasa, que conduce a la disminución de la producción total de melanina. El ácido kójico, la arbutina y diferentes tipos de extractos vegetales o de hierbas son algunos de los inhibidores de la tirosinasa que se usan en la actualidad[1, 2].

Evaluando el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* “muña”, frente al daño ambiental en la piel, se podrán desarrollar nuevas formas farmacéuticas elaboradas a base de plantas nativas medicinales propias de nuestra biodiversidad, generando alternativas de tratamiento en contraposición a las drogas de naturaleza sintética o química; ya que actualmente en el campo referente a los metabolitos secundarios (flavonoides) se ha focalizado la atención en investigación de muchas patologías.

1.3.2 Justificación práctica

Se realizará la propuesta de estructuras de algunos metabolitos secundarios, la elaboración de una fórmula dermocosmética y la determinación de su actividad antioxidante a partir del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante *In vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña” y de los diferentes porcentajes del extracto en las formulaciones dermocosméticas.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”.
2. Proponer la estructura química de metabolitos prevalentes en el extracto de la muestra, formular y preparar una crema dermocosmética a base del extracto en diferentes porcentajes.
3. Determinar la capacidad antioxidante de los diferentes porcentajes del extracto en las formulaciones dermocosméticas.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis general

El extracto etanólico de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”, y las formulaciones dermocosméticas con diferentes porcentajes del extracto, tienen actividad antioxidante.

1.5.2 Hipótesis Específicas

1) El extracto etanólico de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”, presenta buena capacidad antioxidante.
2) El extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* “muña” presenta compuestos fenólicos tipo flavonoides en buena cantidad, y en diferentes concentraciones de crema dermocosmética.
3) Cada formulación dermocosmética con diferentes porcentajes del extracto etanólico de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”, poseen actividad antioxidante.

1.6 Identificación de las variables

a) Variable independiente:

Concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña” en las formulaciones dermocosméticas.

b) Variable dependiente:

La capacidad antioxidante de cada formulación dermocosmética.

II. GENERALIDADES

2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación

Aunque los ingredientes naturales se han utilizado tradicionalmente durante siglos para los propósitos de cuidado de la piel, se están convirtiendo en más frecuentes en las formulaciones contemporáneas. El término "natural" se define como algo o un ingrediente que es producido por la naturaleza o encontrado en la naturaleza y se extrae directamente de las plantas o productos de origen animal. Estos pueden incluir hierbas, frutas, flores, hojas, minerales, agua y tierra. El uso de las plantas con fines medicinales es tan antiguo como la humanidad y, en los próximos años, es probable que veamos la aparición en el mercado de nuevos productos que contienen aceites naturales y hierbas. Las plantas fueron la principal fuente de todos los cosméticos antes del uso de sustancias sintéticas con propiedades similares. Las moléculas de la planta siendo particularmente interesantes para nuevas investigaciones, sin embargo, el uso de extractos requiere prestar especial atención a la extracción, las relaciones de planta a solvente y el contenido de ingredientes activos[1].

Además, el uso de extractos de plantas en productos para el cuidado de la piel se destaca por la demanda de los consumidores, quienes están cada vez más preocupados por la compra de productos ecológicos. Sin embargo, los consumidores a menudo no son conscientes del hecho de que los productos naturales son una mezcla compleja de muchos compuestos químicos que pueden ser responsables del desarrollo de reacciones adversas. Para superar este problema potencial, los investigadores deben caracterizar químicamente sus extractos con respecto a la composición. Además, el potencial citotóxico *in vitro* de los extractos podría realizarse en varias líneas celulares humanas, antes de que el uso en humanos y el potencial irritante de las formulaciones cosméticas se puedan analizar. Estos procedimientos pueden ser un activo para garantizar la seguridad de los consumidores que optan por utilizar productos naturales y, en consecuencia, la aceptabilidad del producto comercializado[5].

2.2 Antecedentes de la investigación

2.2.1 Antecedentes nacionales

Castañeda B et al. (2010) En su trabajo de investigación: Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas, estudió la capacidad antioxidante de veintinueve extractos de plantas medicinales entre ellos el de:" *Minthostachys mollis* "muña", "por el método de la decoloración del radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo (DPPH). Encontrando al evaluar la capacidad antioxidante a las concentraciones de 1 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL y 200 ug/mL fueron: muña (E. Acuoso de hojas) 92.41% a 50 ug/ mL, en comparación con el ácido ascórbico (Vitamina C) que presentó una actividad antioxidante en promedio de 92.82%[6].

Hammond B. et al (1998) en su investigación de: Encuesta de plantas medicinales tradicionales del Callejón de Huaylas, Departamento de Ancash, Perú, señala que la infusión de las hojas de *Minthostachys mollis* Grisebach se usa como digestivo, antihelmíntico y afrodisíaco en el Callejón de Huaylas. La acción digestiva de M. *mollis* ha sido corroborada por un uso similar en Argentina. Además, también en este país, se ha utilizado una decocción de ramas y hojas secas de M. *mollis* como antidiarreico y en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio y urinario. Se descubrió que el extracto es inactivo contra *Pseudomonas aeruginosa* (Pérez y Anesini, 1994). La evidencia experimental ha demostrado que M. *mollis* es mutagénico a una concentración de 30 µg / mL del extracto crudo[7].

Neyra Espinoza et al (2018) en su investigación "demostró la actividad fungicida y fungistática in *vitro* del extracto metanólico de la *Minthostachys mollis* (muña) sobre cepa de *Candida albicans* ATCC®1023 por medio de la técnica de difusión en agar observándose halos de inhibición de 47.72±6.67mm y 46.58±6.42mm respectivamente"[8].

Arriola R. (2018) en su investigación comparó el efecto antibacteriano *In vitro* entre el extracto hidroetanólico y el extracto acuoso de *Minthostachys mollis* contra Enterococcus faecalis ATCC 29212 el cual se encontró "a las de concentraciones de 15 mg/ml, 30 mg/ml y 45 mg/ml del extracto hidroetanólico de *Minthostachys mollis* es superior al del extracto acuoso de *Minthostachys mollis* contra *Enterococcus faecalis,* pero menor al generado por gluconato de clorhexidina al 2%"[9].

2.2.2 Antecedentes internacionales

*Campo Fernández et al (2017) en su artículo "*Composición química y actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las partes aéreas de *Minthostachys mollis* Griseb", evaluó "la composición química y la actividad antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* del extracto etanólico de la especie *M. mollis*. El extracto etanólico de la droga vegetal estudiada podría, ser empleado como medicina natural complementaria en afecciones provocadas por *S. aureus* por la actividad antibacteriana que posee"[10].

Calabrese E et al. (2010) concluyó que un nuevo compuesto aislado de la fracción hidrófila de un extracto de metanol acuoso al 50% de hojas de romero, llamado Rosm1, tenía una fuerte actividad antioxidante y es capaz de inhibir las reacciones mediadas por radicales libres y el daño cutáneo inducido por el estrés. Revelaron esto mediante pruebas *in vitro* de inhibición de la reducción del citocromo c o nitroblue tetrazolium, así como mediante el análisis de la susceptibilidad del ácido linoleico a la descomposición peroxidativa. Mostró una fuerte actividad antioxidante similar a la vitamina E. Esta actividad antioxidante también se observó in vivo al exponer los lípidos de la superficie de la piel al estrés oxidativo, realizado en ausencia y presencia de antioxidantes agregados, o después de la aplicación tópica de este compuesto en la piel de voluntarios humanos sanos, cuyos lípidos superficiales fueron analizados para determinar la resistencia al estrés oxidativo[5].

2.3. Bases teóricas

2.3.1 Aspectos botánicos

A. Clasificación botánica

La muestra vegetal en estudio fue clasificada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el Biólogo Mg. Asunción A. Cano E. según el sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE: ASTERIDAE
ORDEN: LAMIALES
FAMILIA: LAMIACEAE
GÉNERO: Minthostachys
ESPECIE: *Minthostachys mollis,* var. mandoniana (Briq.) Schmidt Leb
Nombre vulgar: "muña"

- ***B. Descripción morfológica***

Minthostachys mollis, var. **mandoniana (Briq.) Schmidt Leb "muña",** es una planta de 0.9 a 1.5 m de altura, de aspecto bien tupido en hojas, las mismas que son opuestas y aserradas presentando pelos en los peciolos y en la cara inferior de las hojas. Las flores son pequeñas y blancas; irregulares o zigomorfas[11].



Figura 1. *Minthostachys mollis*, var. mandoniana (Briq.) Schmidt Leb "muña"

C. Compuestos polifenólicos

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. En particular, pertenecen a una clase de metabolitos secundarios de plantas que tienen una estructura polifenólica, ampliamente encontrada en frutas, verduras y ciertas bebidas. Los flavonoides están asociados con un amplio espectro de efectos que promueven la salud y son un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas. Esto se debe a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas, junto con su capacidad para modular las funciones clave de las enzimas celulares. También se sabe que son inhibidores potentes de varias enzimas, como la xantina oxidasa (XO), ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa. En la naturaleza, los flavonoides son productos extraídos de plantas y se encuentran en varias partes de ellas. Son utilizados por los vegetales para su crecimiento y defensa y también se encuentran abundantemente en alimentos y bebidas de origen vegetal, como frutas, verduras, té, cacao y vino; por lo tanto, se denominan flavonoides dietéticos. Tienen varios subgrupos, que incluyen chalconas, flavonas, flavonoles e isoflavonas. Por ejemplo, las cebollas y el té son las principales fuentes dietéticas de flavonoles y flavonas[12,13].

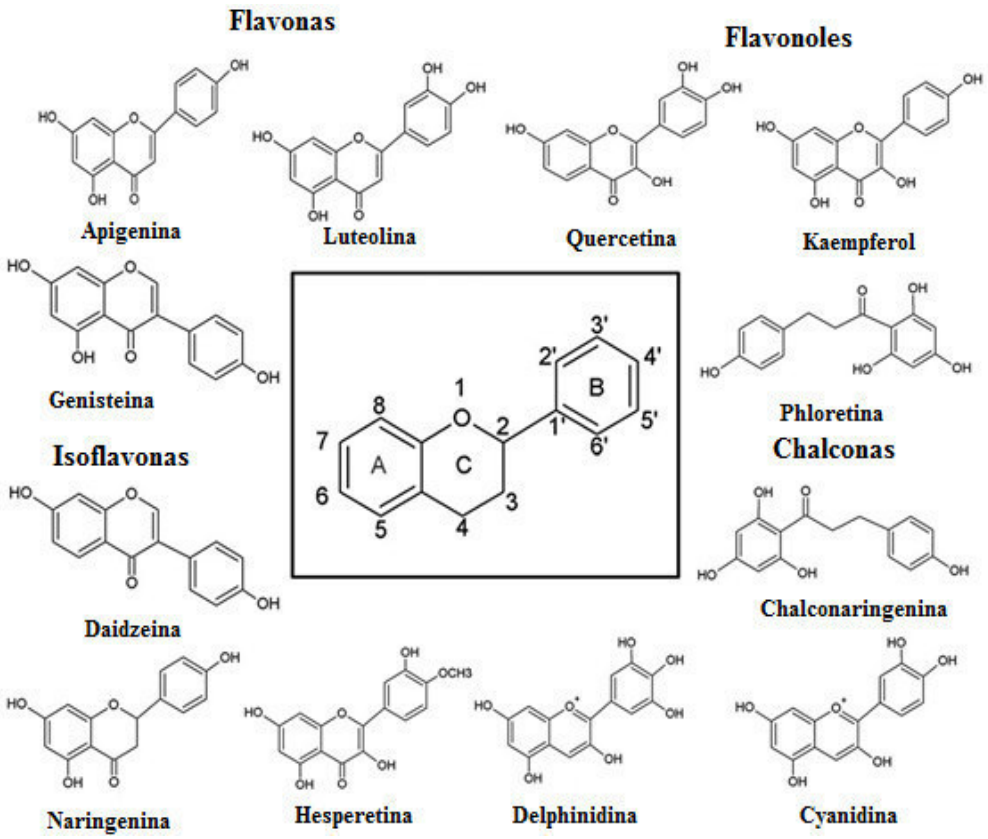


Figura 2. Clasificación de Flavonoides

D. Actividad antioxidante de los polifenoles

Muchos estudios clínicos realizados en las últimas dos décadas han demostrado que los flavonoides ejercen una influencia positiva en la salud y previene muchas enfermedades graves. Estos como antioxidantes son nutracéuticos ideales para neutralizar los radicales libres inducidos por el estrés. Se han informado muchas otras acciones, como en la prevención del cáncer, pero aún son necesarios grandes ensayos clínicos hasta que estos efectos se prueben a fondo[13,14].

Los flavonoides constituyen una gran parte del mercado de nutracéuticos de EE. UU. Cuando Hipócrates, padre de la medicina, dijo que "Que el alimento sea tu medicina, y que tu medicina sea el alimento" probablemente se estaba refiriendo a alimentos con flavonoides[14].

E. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas, generalmente de oxígeno, que han perdido un electrón. Esa pérdida los hace inestables y reactivos. Los radicales libres más peligrosos son los radicales oxi pequeños, móviles y altamente reactivos. Otras variedades atómicas y moleculares peligrosas de oxígeno se conocen como especies reactivas de oxígeno (EROS) [15].

¿Cómo se forman los radicales libres?

Mediante la producción de energía: el proceso de producción de energía en cada célula genera radicales oxi y ROS como residuos tóxicos, de forma continua y abundante. El oxígeno se usa para quemar moléculas de glucosa que actúan como el combustible del cuerpo. En esta operación de liberación de energía, los radicales oxi se desechan como subproductos destructivos.

Mediante estrés: la respuesta al estrés acelera el aparato de creación de energía del cuerpo, aumentando el número de radicales libres como subproducto tóxico. Además, las hormonas que median la reacción de estrés en el cuerpo, el cortisol y las catecolaminas, degeneran en radicales libres[15, 16].

El estrés oxidativo es el daño resultante debido a los desequilibrios redox (aumento de los radicales libres destructivos [especies reactivas de oxígeno (ROS)] y la reducción de la protección / vías antioxidantes) y está relacionado con el envejecimiento en muchos tejidos, incluida la piel. En el envejecimiento de la piel existen diferencias bioenergéticas entre los queratinocitos y los fibroblastos que proporcionan un posible biomarcador de envejecimiento. Las mitocondrias son la principal fuente de estrés oxidativo celular y forman parte de la teoría del ciclo vicioso del envejecimiento. Las fuentes externas e internas de estrés oxidativo incluyen UVR / IR, contaminación (ambiente), estilo de vida (ejercicio y

dieta), alcohol y fumar, todo lo cual puede afectar la piel. Factores externos: los alimentos procesados con frecuencia contienen altos niveles de peróxidos lipídicos, que producen radicales libres que dañan el sistema cardiovascular. El humo del cigarrillo genera altas concentraciones de radicales libres. Gran parte del daño pulmonar asociado con fumar es causado por los radicales libres. La contaminación del aire tiene efectos similares. El alcohol es un potente generador de radicales libres (aunque el vino tinto contiene antioxidantes que contrarrestan este efecto). Además, los radicales libres pueden ser el resultado de todo tipo de radiación electromagnética, incluida la luz solar. La exposición a la luz solar genera radicales libres que envejecen la piel, causando asperezas y arrugas. Si la exposición es prolongada, puede provocar cáncer de piel[13].

F. Mecanismo de acción de la actividad antioxidante

Numerosos estudios han atribuido los efectos nutraceuticos de los flavonoides a la actividad antioxidante, y la mayoría de estos ensayos se deben a mecanismos de eliminación de radicales libres. Sin embargo, esos resultados son a menudo ambiguos e incomparables basados en diferentes especies oxidantes o métodos analíticos aplicados. En general, los mecanismos subyacentes a su propiedad antioxidante son la eliminación de radicales libres y la actividad quelante de iones metálicos de transición. Debido a la reducción de las actividades de los grupos fenólicos hidroxilo, los flavonoides pueden donar hidrógeno. Junto con la deslocalización de los productos de radicales fenoxi, los flavonoides pueden proteger contra diversos daños causados por EROS. Por otro lado, los flavonoides pueden quelar metales de transición que pueden promover la formación de radicales hidroxilo en formas reducidas en virtud de la reacción de Fenton en condiciones anormales.

Casi todos los grupos de flavonoides tienen la capacidad de actuar como antioxidantes. Las flavonas y las catequinas parecen ser los flavonoides más poderosos para proteger el cuerpo contra las especies reactivas de oxígeno. Los mecanismos y la secuencia de eventos por los cuales los radicales libres interfieren con las funciones celulares no se entienden completamente, pero uno de los eventos más importantes parece ser la peroxidación lipídica, lo que resulta en daño a la membrana celular, el cual provoca un cambio en la carga neta de la célula, cambiando la presión osmótica, lo que lleva a la hinchazón y finalmente a la apoptosis (muerte celular). Para protegerse de las especies reactivas de oxígeno, los organismos vivos han desarrollado varios mecanismos efectivos. Los mecanismos de defensa antioxidante del cuerpo incluyen no solo las enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, sino también las contrapartes no enzimáticas como el glutatión, el ácido ascórbico y el α-tocoferol[17].

Hanasaki et al. encontraron que algunos de los flavonoides pueden eliminar directamente los superóxidos, mientras que otros flavonoides pueden eliminar el radical altamente reactivo derivado del oxígeno llamado peroxinitrito. Descubrieron que los flavonoides, como la epicatequina y la rutina, son poderosos eliminadores de radicales y la capacidad de eliminación de la rutina puede deberse a su actividad inhibidora sobre la enzima XO.

Kerry y Abbey informaron que al eliminar los radicales, los flavonoides pueden inhibir la oxidación de LDL en estudios *in vitro*. Además mencionaron que esta acción protege el LDL. En teoría, los flavonoides pueden tener una acción preventiva contra la aterosclerosis[17,18].

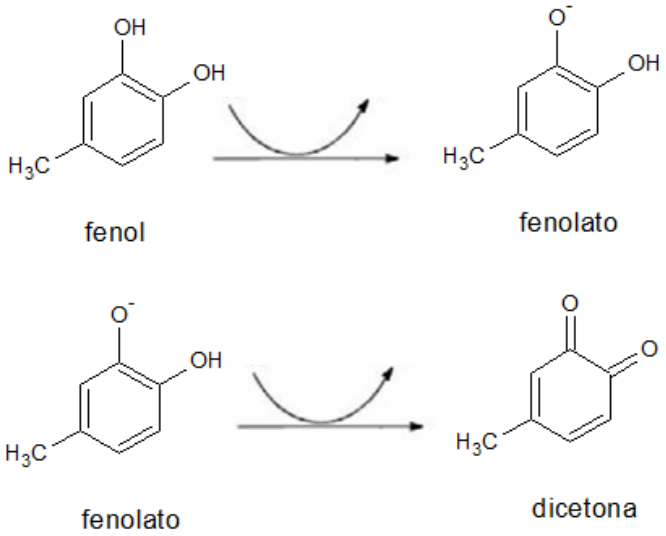


Figura Nº 3. Secuestro de ERO por los polifenoles. (Núñez & Quispe)

Se han realizado numerosos estudios in vitro para evaluar la capacidad antioxidante total (CAT) de los productos fitoquímicos. Hasta ahora, sin embargo, no existe un método oficial, y por lo tanto se recomienda que cada evaluación se realice con varias condiciones de oxidación y diferentes métodos de medición[19].

G. Antioxidantes en dermatología

La formación de radicales libres es controlada naturalmente por varios compuestos beneficiosos conocidos como antioxidantes. Estos son carroñeros radicales que proporcionan protección al cuerpo humano mediante la inhibición de diversas reacciones oxidantes en cadena. Las EROS generadas reaccionan exógenamente con diversas biomoléculas presentes en la piel y juegan un papel importante en los trastornos cutáneos. En este sentido, la aplicación tópica de antioxidantes proporciona una estrategia eficiente para enriquecer el sistema cutáneo endógeno, lo que conduce a una disminución del daño oxidativo mediado por la radiación UV y a prevenir enfermedades mediadas por el estrés oxidativo[20].

Los antioxidantes naturales son efectivos para prevenir la formación de radicales libres al eliminarlos o promover su descomposición y suprimir los trastornos.

Algunos compuestos inhiben el inicio o la propagación de reacciones en cadena oxidativas, previniendo o reparando el daño oxidativo causado por las células del cuerpo promovidas por el oxígeno La importancia de los antioxidantes fenólicos ha aumentado notablemente en la última década debido a su alta capacidad para eliminar los radicales libres Las plantas ricas en fenólicos podrían usarse, por ejemplo, para prevenir los efectos nocivos de la radiación UV en la piel[20, 21].

El cáncer de piel ha aumentado en los últimos años, sin embargo las formulaciones comerciales son utilizadas como filtros solares para proteger sólo contra el eritema solar. Muchos de los principios activos presentes en los filtros solares muestran toxicidad y poca eficacia.

H. Cremas dermocosméticas

Son formas farmacéuticas semisólidas que, al ser aplicadas sobre la piel con fines cosméticos, y al formularse con ingredientes activos (extractos de plantas o algas, aceites, oleorresinas), ayudan a esta a mantenerla y protegerla[22, 23].

Hyland C. et al señaló que la investigación en el ámbito del rejuvenecimiento de la piel, como la fitoterapia, se encuentran a un ritmo sorprendente en el mercado cosmecéutico. Sin embargo, muchos de estos productos que están clasificados como cosmecéuticos no están validados y no tienen que ser aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos para establecer la eficacia y la seguridad. Por lo tanto, debemos formularnos la pregunta: "¿Existe evidencia científica para validar el mecanismo de estos nuevos tratamientos?". Evaluamos las principales cremas antienvejecimiento actualmente en el mercado que evalúan específicamente sus ingredientes botánicos. Algunos de los ingredientes botánicos más comunes que están fuera del mercado son: *Rosmarinus officinalis, Vitis vinifera* (extracto de semilla de uva), Citronellol, Limonene, *Oenothera biennis* (onagra), *Glycyrrhiza glabra* (extracto de regaliz), extracto de semilla de *Aframomum angustifolium*, ñame salvaje), N6 furfuryladenine (kinetin), y Ergothioneine[5].

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Tipo y diseño de la investigación

Analítica, experimental y transversal o sincrónica.

Unidad de análisis. Extracto hidroalcohólico *de Minthostachys mollis" muña"*.

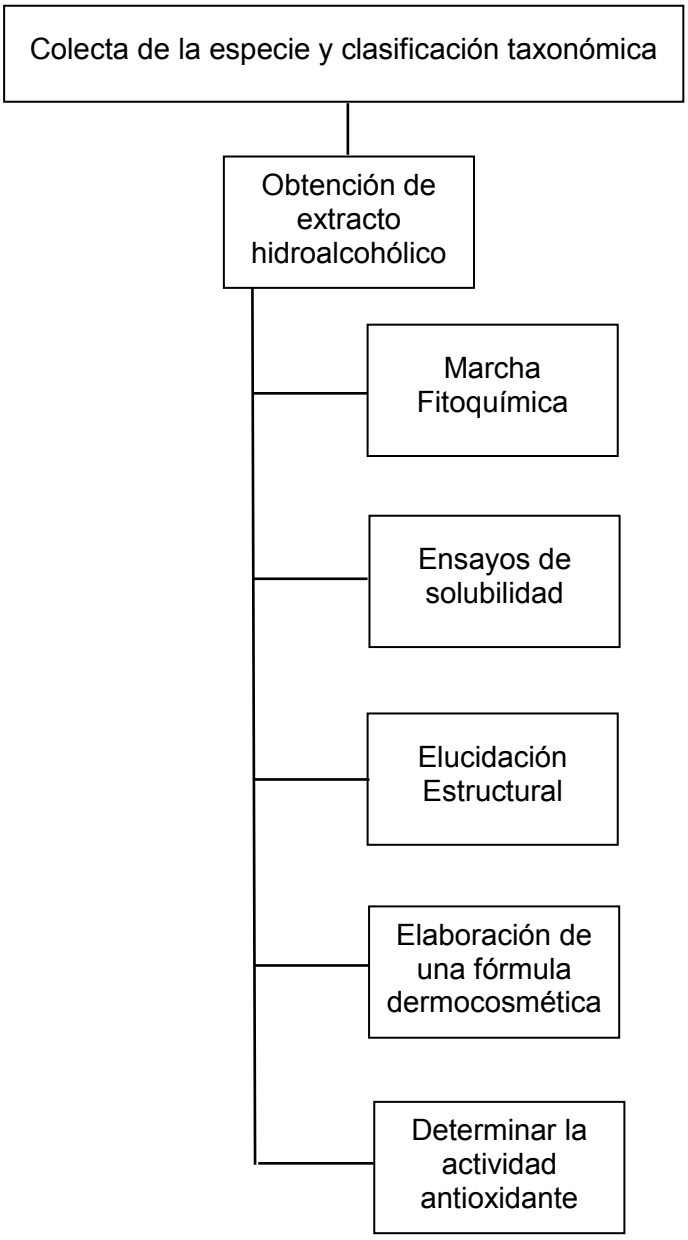


Figura 4. Flujograma de la investigación

3.2 Recolección del material biológico

Fue colectada en el distrito de Huamanguilla (3276 msnm), 13°00’40” S 74°10´24” O; provincia de Huanta, Región Ayacucho.

3.3 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según el sistema de Clasificación de Cronquist dada en 1988. (Anexo 1)

3.4 Tratamiento de la muestra

En el laboratorio de Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, se procedió a lavar las hojas con agua destilada y el secado en estufa a 37°C, a la muestra seca se realizó la molienda utilizando el mortero de porcelana; hasta obtener polvo homogéneo.

3.5 Preparación del extracto:

Se utilizó 100 g de hojas secas en polvo de *Minthostachys mollis* (“muña”) para realizar la extracción hidroalcohólica. Se agregó 500 mL de alcohol etílico al 70 % y se dejó en maceración durante siete días, agitando la mezcla dos veces al día. Luego, se filtró con papel Whatman N° 40 y se obtuvo un líquido verdoso, el cual se llevó a una estufa de aire circulante, a una temperatura no mayor a 40 °C por tres días, para la evaporación del agente extractivo, obteniéndose el extracto seco.

El proceso de extracción se realizó en el laboratorio del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. (Figura 5)

El extracto así obtenido se utilizó para realizar la prueba de solubilidad, la marcha fitoquímica, determinación del efecto antioxidante, formulación y preparación de una crema dermocosmética y la propuesta de estructuras de los metabolitos mayoritarios presentes en el extracto hidroalcohólico mediante espectroscopia UV-vis. Luego se visualizaron y separaron algunos metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina (CCF) a escala preparativa y se determinaron los espectros UV-vis de los componentes químicos aislados[24].



Figura 5. Flujograma de la obtención del extracto hidroalcohólico

3.6 Marcha fitoquímica

Se realizó la marcha fitoquímica y los ensayos de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis,* en relación a los metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, flavonoides, antraquinonas, saponinas, taninos; alcaloides), empleando reactivos de coloración y precipitación[25].

3. 7 Análisis Cromatográfico del Extracto

Mediante la técnica de cromatografía en capa fina preparativa se aislaron metabolitos secundarios. Se usó como fase estacionaria Sílica Gel G-60 y fase móvil diclorometano: metanol en la proporción de 3:1; y como revelador la lámpara de luz UV. Se obtuvieron 12 fracciones que presentaron fluorescencia a la luz UV a 366 nm.

Se llevaron al análisis espectrofotométrico UV en el rango de 200 a 400nm descartándose 6 fracciones, finalmente al analizar los espectros UV de las fracciones F1, F2, F5, F6, F7 y F11 y al comparar las longitudes de onda de los picos de cada fracción con tablas publicadas por Mabry *et al*. permitió proponer estructuras[24].

3.8 Elaboración del producto dermocosmético

Se formularon cuatro emulsiones dermocosméticas (Tabla 1). Se prepararon tres cremas con la adición del extracto hidroalcohólico de hojas *de Minthostachys mollis* a concentraciones 0,1; 0,5 y 1% ; y una sin la adición del extracto.

Tabla 1. Composición de la emulsión dermocosmética

INGREDIENTES	Conc. %
Cera Lanette N	12,00
Cetiol V	8,00
Emulgade	0,60
Propilenglicol	5,00
Metilparabeno	0,20
Propilparabeno	0,15
Extracto	0,1 –0,5-1,0
Agua c.s.p.	100,00

3.9 Determinación de la actividad antioxidante del extracto y la crema dermocosmética.

Se realizó utilizando los métodos 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y 2,2´-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). La Vitamina C y el Trolox se usan como patrones de comparación para con los extractos[27-29].

3.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados mediante los paquetes estadísticos, Microsoft Excel 2010 y el programa SPSS (*Stadistical Package for Socials Sciences*) versión 21. En lo referente a la capacidad antioxidante se determinó la Concentración inhibitoria al 50% (CI50%) que es un valor único, para analizar si los grupos o tratamientos (las diferentes concentraciones) presentaron diferentes resultados se procesó el análisis de varianza mediante el ANOVA, unidireccional para comparar las medias de los grupos o tratamientos, seguido de la comparación múltiple a través de la prueba de Tukey para verificar diferencias significativas entre las medias; una probabilidad del 5% o menos ($p \leq 0,05$) fue considerada como estadísticamente significativa (Anexo 2-7).

IV. RESULTADOS

4.1 Análisis e interpretación de resultados.

4.1.1 Extracción y rendimiento

En la Tabla 2, se muestra el rendimiento de la muestra, previamente desecada.

Tabla 2. Rendimiento del extracto hidroalcohólico de la hojas de *Minthostachys mollis* "muña" var. mandoniana.

Parte de la planta usada	Peso de muestra fresca	Peso de muestra seca (Secado a 40º C)	Rendimiento del extracto hidroalcohólico
Hojas	100 g	80,57 g	6,59 %

Fuente Propia.

4.1.2 Marcha fitoquímica

En la marcha fitoquímica (Tabla 3) se identificaron los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, alcaloides, glicósidos y esteroides.

Tabla 3. Marcha Fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña)

REACTIVO	RESULTADO	METABOLITO
$FeCl_3$	+++	Compuestos fenólicos
Shinoda	+++	Flavonoides
$AlCl_3$	+++	Flavonoides
Reactivo de Dragendorff	++	Alcaloides
Reactivo de Mayer	++	Alcaloides
Gelatina/ Na(OH)	++	Taninos
Reactivo de Molish	++	Glicósidos
Reactivo de Liberman	++	Esteroides/terpenoides
Ninhidrina	-	Aminoácidos libres

Leyenda: (+++) Abundante, (++) Regular, (+) Poco, (-) Ausencia
Fuente propia.

Con respecto a la prueba de solubilidad (Tabla 4), se determinó que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis (muña)* fue soluble con solventes orgánicos de polaridad creciente.

Tabla 4. Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña)

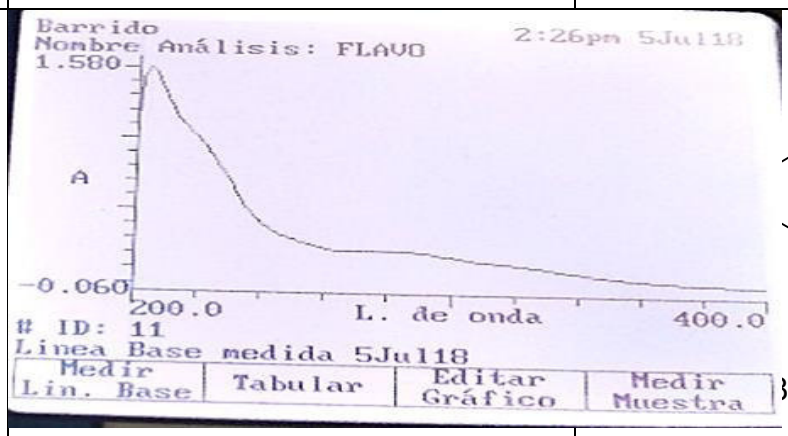
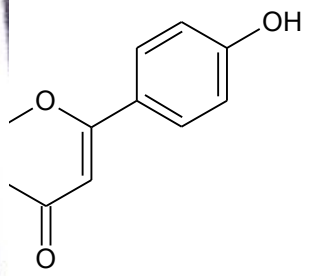
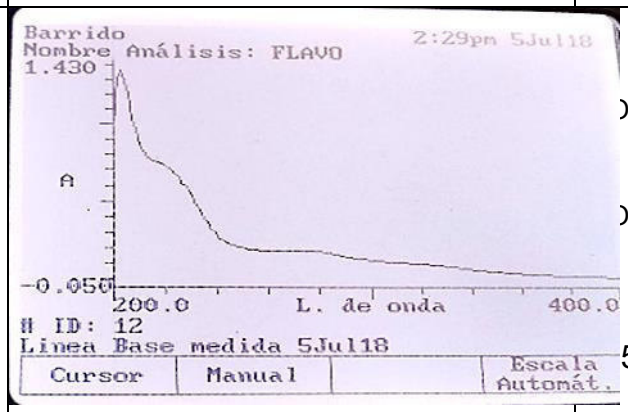
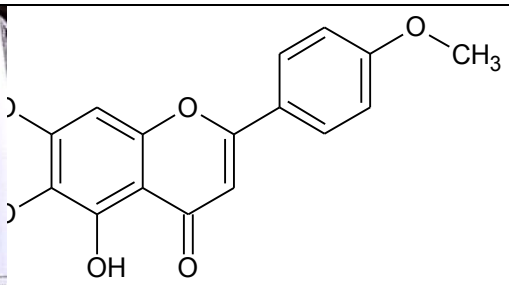
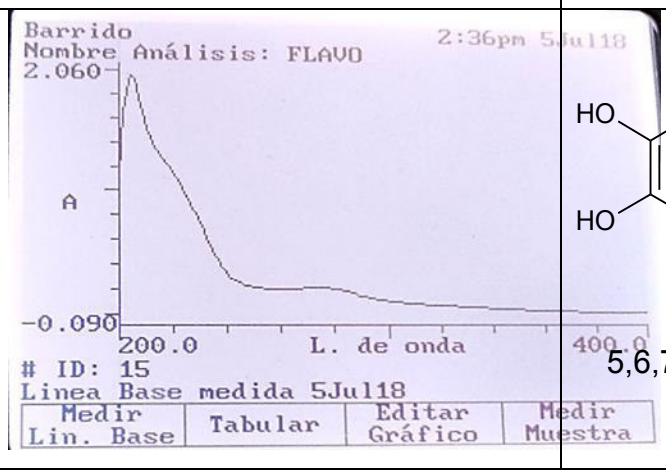
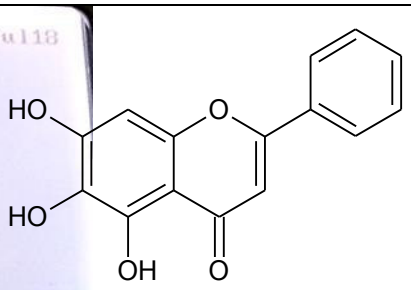
Nº	SOLVENTES	FÓRMULA	RESULTADO
1	Agua destilada	H_2O	+
2	Etanol	EtOH	+++
3	Metanol	MeOH	+++
4	n-butanol	N -BuOH	++
5	Cloroformo	$CHCl_3$	++
6	Acetato de etilo	EtOAc	++
7	Éter etílico	Et_2O	+
8	Diclorometano	CH_2Cl_2	++

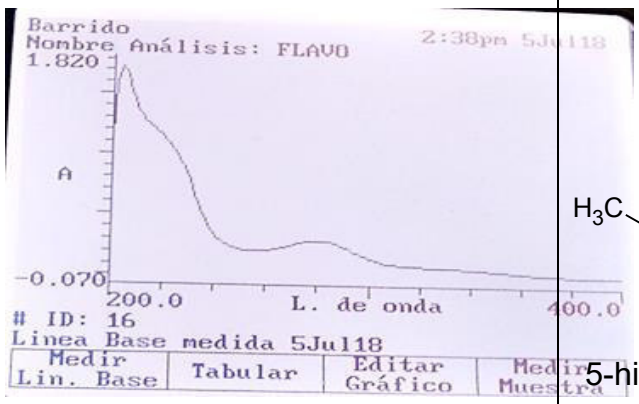
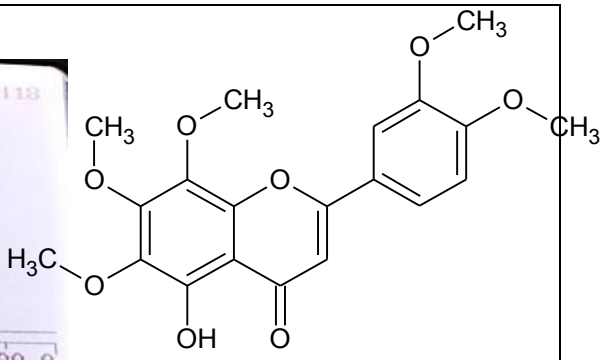
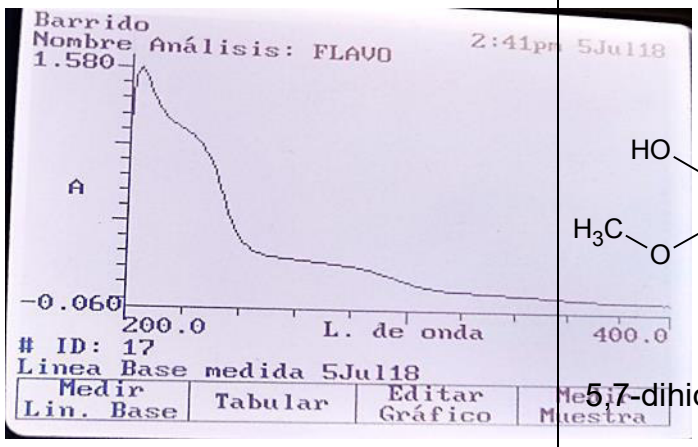
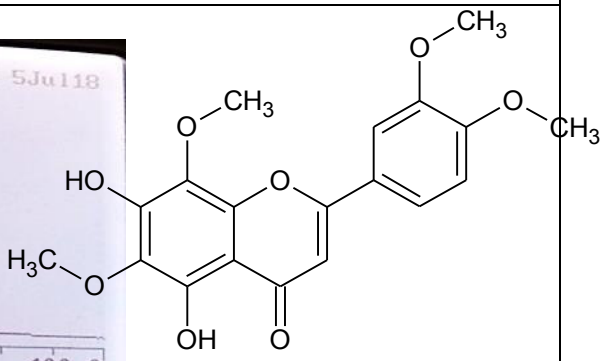
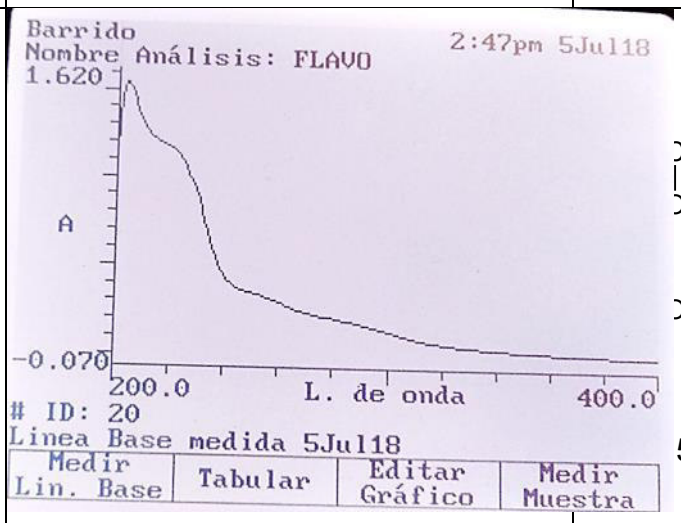
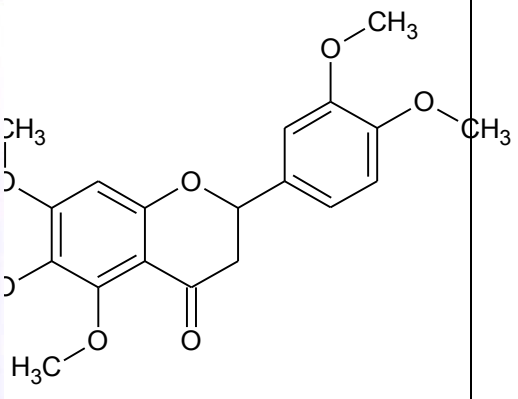
Leyenda: (+++) Muy soluble, (++) Soluble, (+) Poco soluble, (-) Insoluble.
Fuente propia.

4.1.3 Análisis Cromatográfico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña), se realizó cromatografía en capa fina analítica y luego cromatografía en capa fina a escala preparativa con el sistema de solventes diclorometano: metanol (3:1), aislándose 12 fracciones, de los componentes mayoritarios.

Propuesta de Estructuras mediante Espectroscopia UV-vis,: En la Tabla 5, se indican las fracciones aisladas del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña), en etanol, se realizó su espectro de absorción en el rango de 200 a 400 nanómetros y comparados con lo publicado por Mabry *et al*. y otras literaturas científicas para proponer estructuras de seis compuestos fenólicos mayoritarios tipo flavonoides.[24,25]

Tabla 5: Propuesta de componentes químicos en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña)

N° Muestra	$\lambda_{máx}^{EtOH}$ (nm)	ESPECTROS UV DE ABSORCION	ESTRUCTURA QUÍMICA PROPUESTA
1	280,330		 -tetrahidroxiflavona
2	274,316		 5,6,7-trihidroxi- 4´- metoxiflavona
5	274,311		 5,6,7-trihidroxi flavona

6	282,336		 5-hidroxi-3´,4´,6,7,8-pentametoxi flavona
7	279,338		 5,7-dihidroxi-3´,4´,6,8-tetrametoxi flavona
11	284,335		 5,6,7- pentametoxi flavanona

Fuente propia

4.1.4 Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Capacidad de captura del radical libre DPPH: propuesto por Brand-Williams et al (1995), método que permite evaluar la actividad de sustancias frente al radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) 0.1 M en metanol que tiene un color violeta intenso que se pierde progresivamente cuando se añade sustancias antioxidantes. El ácido ascórbico y el Trolox se usan como soluciones controles. Las mediciones se hacen a una longitud de onda de 517 nm.

Técnica Operatoria

Se prepara varias soluciones del extracto acuoso a diferentes concentraciones.

	B	**Control**	**Extracto**
Extracto	---	---	0,4 mL
Metanol	1,2 ml	0,4 mL	---
DPPH 0,1 M	----	0,8 mL	0,8 mL

Incubar por 30 minutos en la oscuridad y luego medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 517 nm.

Se determina la Capacidad antioxidante expresada como la Concentración Inhibitoria al 50 % (CI 50%) que equivale hallar la concentración del extracto que inhibe el 50 % la lectura del control.

Igualmente se determina la capacidad antioxidante de la vitamina C y del Trolox, los cuales se comparan con el extracto.

Cómo se observará en las Tablas 6, 7 y 8 , las absorbancias de la capacidad antioxidante van disminuyendo y aumentando el porcentaje de inhibición conforme aumenta las concentraciones según el método de DPPH en la muestra, en los controles de referencia como la Vit C y el Trolox, dichos resultados muestra la existencia de la capacidad antioxidante en la muestra y los controles (Figuras 6, 7 y 8) ; se requiere analizar la concentración (en la muestra y controles) que permita calcular la concentración inhibitoria al 50 %

(CI50%) para ello se ensaya a diferentes concentraciones y con estos datos se determina la CI50% (a partir de las Figuras 6, 7 y 8) o de las ecuaciones de la recta de las respectivas figuras hallando la concentración que absorbe 50 % de la absorbancia del control (a concentración 0 de Trolox) que se obtuvo el valor de 0,682 de absorbancia).

Tabla 6. Absorbancia, % de Inhibición y CI50% según concentraciones del Trolox frente al método DPPH.

DPPH [Trolox] mg%	TROLOX ABSORBANCIA	INHIBIC. %	CI50% mg%
0	0,682	0	
5	0,515	24,4868035	
10	0,35	48,6803519	10,42
16	0,16	76,5395894	
20	0,029	95,7478006	

Tabla 7. Absorbancia, % de Inhibición y CI50% según concentraciones de la Vitamina C frente al método DPPH.

DPPH [Ext] ug/ml	Vit C ABSORBANCIA	INHIBIC. %	CI50% ug/ml
0	0,682	0	
5	0,503	26,2463343	
10	0,35	48,6803519	10,44
16	0,158	76,8328446	
20	0,031	95,4545455	

Tabla 8. Absorbancia, % de Inhibición y CI50% según concentraciones del extracto de muña frente al método DPPH.

DPPH [Ext] mg%	EXTRACTO ABSORBANCIA	INHIBIC. %	CI 50 mg%
0	0,716	0	
5	0,618	13,6871508	
10	0,462	35,4748603	13,62
16	0,316	55,8659218	
20	0,18	74,8603352	

El análisis de varianza entre los resultados se usó el ANOVA y posteriormente el método de Tukey con nivel de significancia del 5% ($p<0,05$) (Anexo 2)

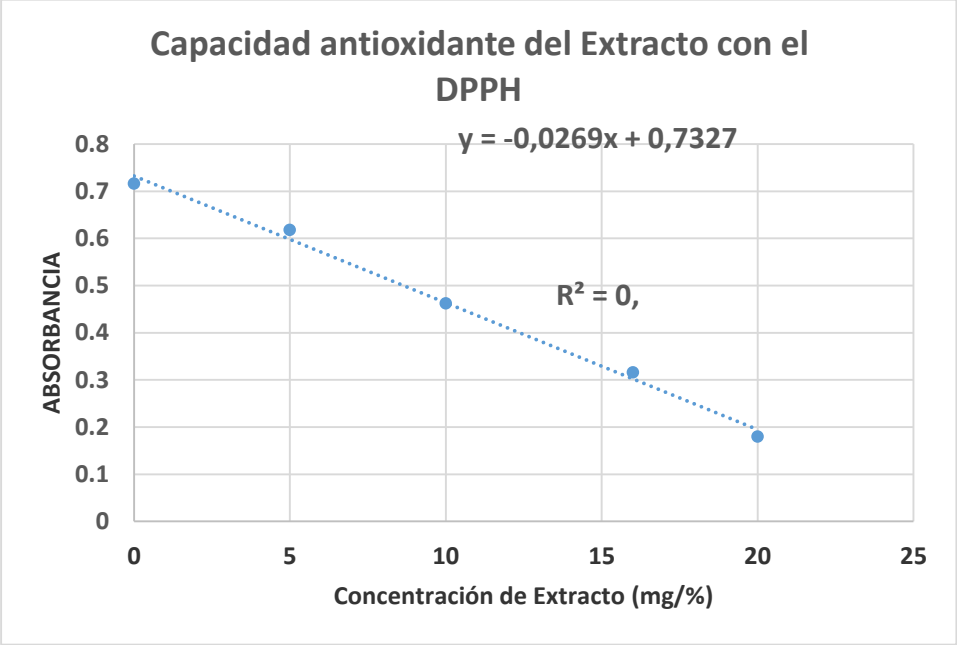


Figura 6. Capacidad Antioxidante del Extracto de Muña a diferentes concentraciones del extracto según el método del DPPH

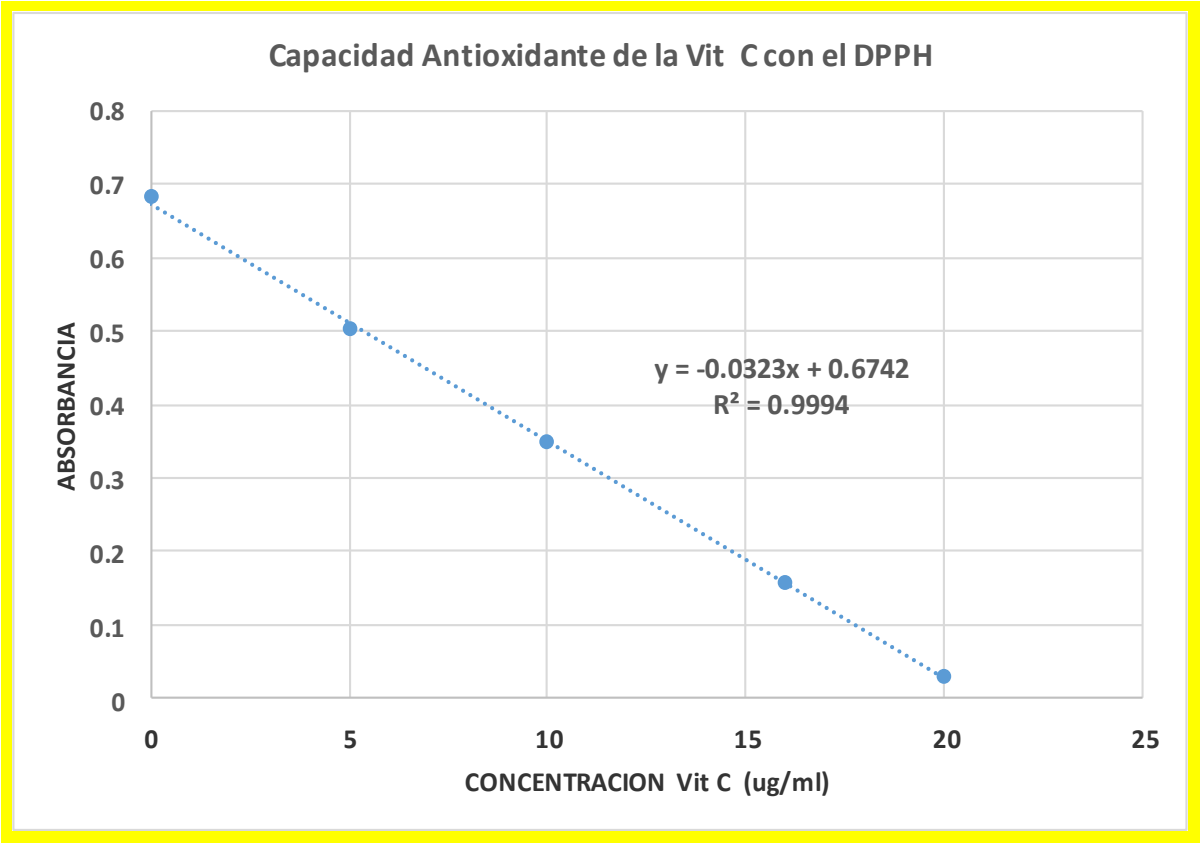


Figura 7. Capacidad Antioxidante de la Vitamina C a diferentes concentraciones de Vit C, según el método del DPPH

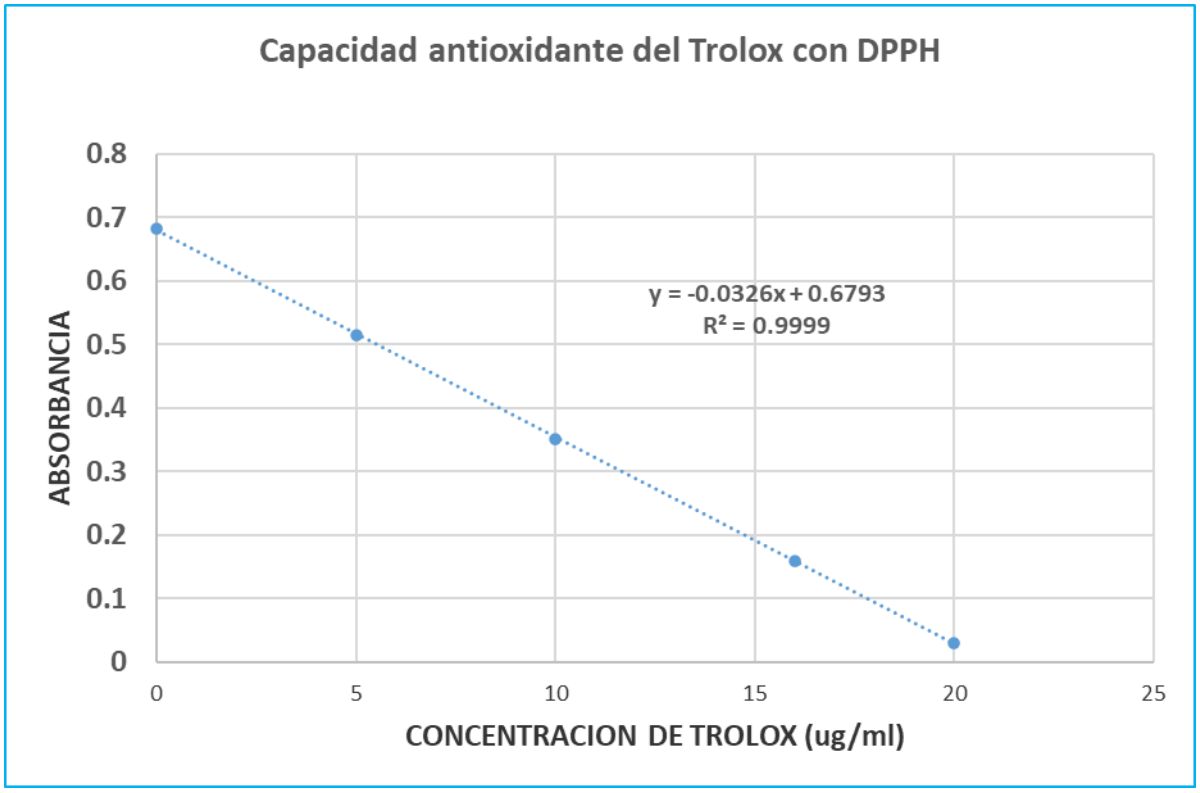


Figura 8. Capacidad Antioxidante del Trolox C a diferentes concentraciones de Trolox, según el método Expresado como CI50% frente al DPPH

La capacidad antioxidante según el método DPPH en la muestra, Vit C y Trolox expresados en concentración inhibitoria del 50 % (CI50%) fueron: 136,2; 10,42 y 10,44 ug/ml respectivamente, indicando que la muestra presenta actividad antioxidante pero no tanto como en los controles (Vit C y Trolox); con estos datos se puede estimar la capacidad antioxidante de la muestra (EXTRACTO) equivalente a Trolox (CAEET) con un valor de 13,071 mg extracto /mg Trolox y la capacidad antioxidante del extracto de muña equivalente a Vit C (CAEEVC) con un valor de 13,046 mg extracto/mg Trolox.

4.1.5 Método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín) -6-sulfónico (ABTS$^{\bullet+}$)

El ensayo (ABTS) 2,2´-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) se fundamenta en la eliminación del catión radical ABTS + por los antioxidantes presentes en una muestra. El radical ABTS tiene típicamente un color verde

azulado con valores máximos a la absorbancia en 734 nm y 815 nm. Cuando hay sustancias antioxidantes en el medio de reacción, capturan el radical libre, que se refleja en una pérdida de color y, por lo tanto, una disminución de la absorbancia, en proporción cuantitativa a la concentración de antioxidantes presentes.

Al estudiar la actividad antioxidante de la muestra y los controles referentes (Vit C y Trolox) según el método ABTS, los resultados se detallan en las Tablas 9, 10 y 11; donde se observa que a mayor concentración las absorbancias disminuyen y aumentan los porcentajes de inhibición, estos resultados muestran que el extracto si presenta actividad antioxidante y para estimar la CI50% se requiere de estos resultados o de las gráficas de las Figuras 9, 10 y 11.

Tabla 9. Absorbancia, % inhibición y CI50%, según concentraciones del Trolox frente al método ABTS.

ABTS [Trolox] ug/ml	TROLOX ABSORBANCIA	INHIBIC. %	CI50% ug/ml
0	0,668	0	
5	0,571	14,5209581	
10	0,479	28,2934132	17,79
16	0,354	47,005988	
20	0,300	55,0898204	

Tabla 10. Absorbancia, % inhibición y CI50%, según concentraciones de la Vitamina C frente al método ABTS.

ABTS [Vit C] ug/ml	Vit C ABSORBANCIA	INHIBC. %	CI50% ug/ml
0	0,668	0	
5	0,559	16,3173653	
10	0,451	32,4850299	15,88
16	0,325	51,3473054	
20	0,248	62,8742515	

Tabla 11. Absorbancia, % inhibición y CI50%, según concentraciones del Extracto de muña frente al método ABTS.

ABTS [Ext] mg%	EXTRACTO ABSORBANCIA	INHIBIC. %	CI 50 mg%
0	0,652	0	
16	0,51	21,77914110	
24	0,489	25,00000000	38,89
32	0,423	35,12269939	
40	0,285	56,28834356	

El análisis de varianza entre los resultados se usó el ANOVA y posteriormente el método de Tukey con nivel de significancia del 5% ($p<0,05$) (Anexo 3).

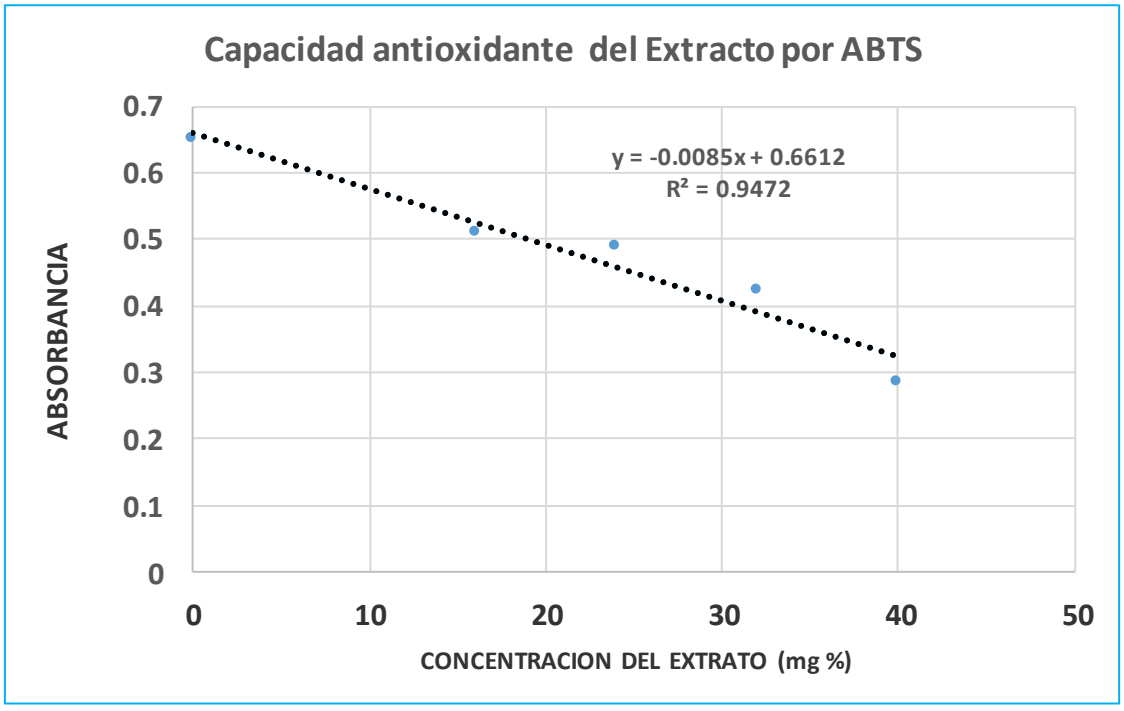


Figura 9. Capacidad Antioxidante del Extracto de Muña a diferentes concentraciones del extracto de muña por el método ABTS

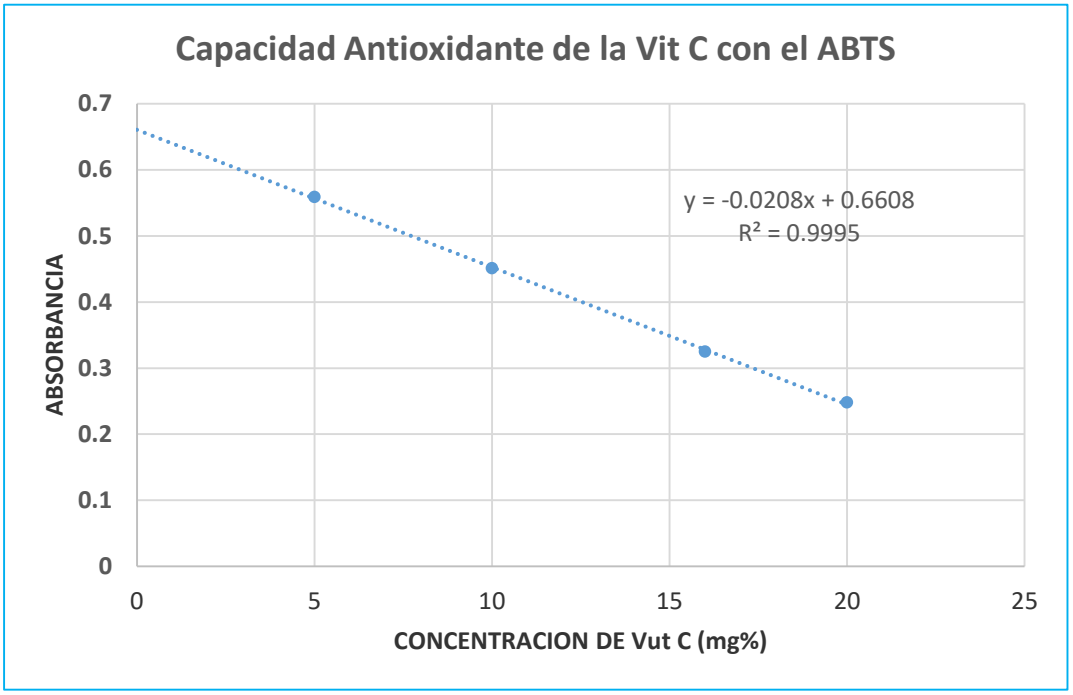


Figura 10. Capacidad Antioxidante de la Vitamina C a diferentes concentraciones de Vit C por el método ABTS

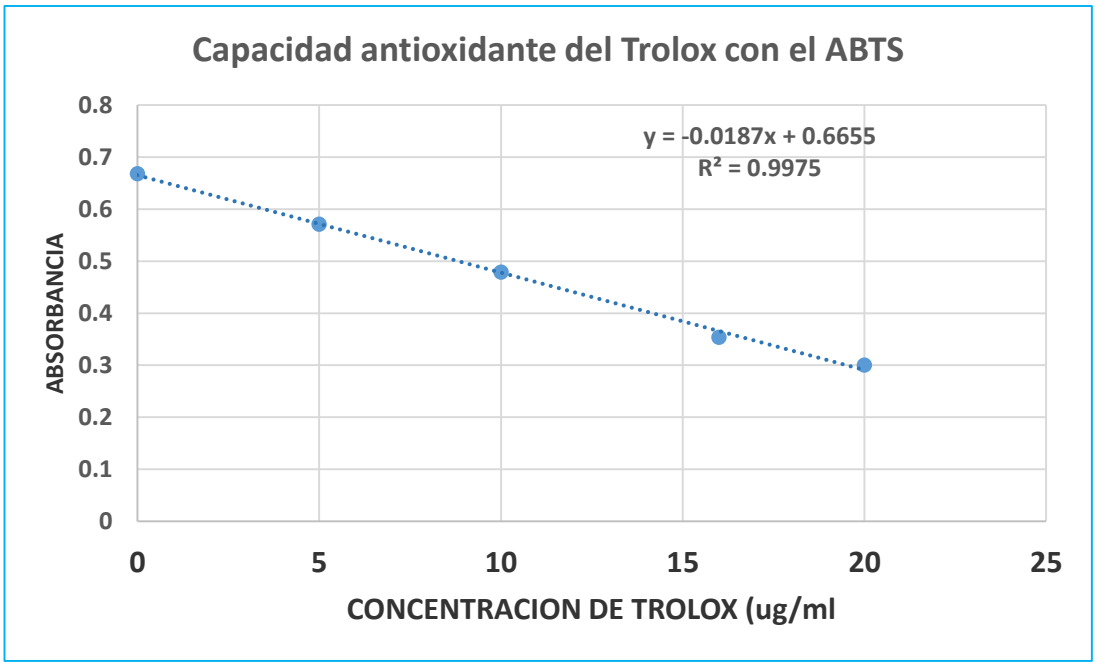


Figura 11. Capacidad Antioxidante del Trolox Expresado a diferentes concentraciones de Trolox por el método ABTS

Para comparar la actividad antioxidante entre el extracto y los referentes de comparación (Vit C y Trolox) por los dos métodos (DPPH y ABTS) se requiere una Tabla resumen del CI50% por ello en la Tabla 12 se describe la Capacidad antioxidante expresado en el CI 50%, donde a menor valor de CI 50% la capacidad antioxidante es mayor; por lo que según el método DPPH el Trolox presenta mayor actividad antioxidante, luego la Vit C y por último le muestra del extracto hidroalcohólico de muña, en el método ABTS la Vit C presenta mayor actividad antioxidante, luego el Trolox y finalmente la muestra de extracto hidroalcohólico de muña.

Tabla 12. Capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña), Vitamina C y Trolox (expresado como $CI_{50\%}$) frente a DPPH y ABTS

	$CI_{50\%}$ (DPPH)	$CI_{50\%}$ (ABTS)
Muña	**136,2 ug/mL**	**388,9 ug/mL**
Vitamina C	**10,44 ug/mL**	**15,88 ug/mL**
Trolox	**10,42 ug/mL**	**17,79 ug/mL**

En la Tabla 13 se detalla la capacidad antioxidante según los métodos (DPPH y ABTS) expresado en equivalentes a los controles (Vit C y Trolox) y como porcentaje (tomando los controles como el 100 %) observamos que en términos de porcentajes el extracto presenta alrededor del 7,6 % de la capacidad antioxidante de los controles según el método DPPH y alrededor del 41 a 46 % para Vit C y Trolox respectivamente.

Tabla 13. Capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) equivalente a Vitamina C (CAEEVC) y equivalente a Trolox (CAEET) por los métodos DPPH y ABTS

Extracto/Método	CAEEVC	CAEET	100 % Vit C	100 % Trolox
Extracto (Muña) Ante DPPH	**13,046**	**13,071**	**7,66 %**	**7,65 %**
Extracto (Muña) Ante ABTS	**2,449**	**2,186**	**40,83 %**	**45,75 %**

4.1.6 Resultados de la Preparación de la Crema dermocosmética.

En la Tabla 14 se muestran las cremas formuladas a partir del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* las cuales se sometieron a los procedimientos de características organolépticas y fisicoquímicas.

Tabla 14. Características organolépticas y fisicoquímicas de la crema con el extracto hidroalcohólico de *Minthostachys mollis.*

Características	Crema Base(F1)	0,1% (F2)	0,5% (F3)	1%(F4)
Aspecto	Emulsión homogénea	Emulsión homogénea	Emulsión homogénea	Emulsión homogénea
Color	Blanco	Verde claro	Verde oscuro	Verde oscuro
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
Ph	5,70	6,4	6,5	6,8
Viscosidad (cP)	16 240	16 550	16 560	16 565

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS CREMAS POR EL METODO DPPH

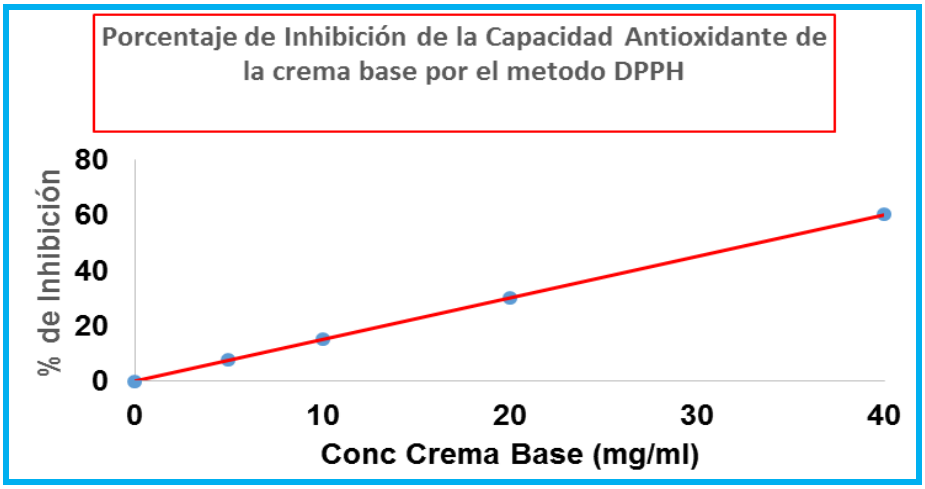
En la Tabla 15 se describe las absorbancias y el porcentaje de inhibición de la Capacidad antioxidante de la Crema Base según el método de DDPH, se observa que la absorbancia disminuye conforme se incrementa la concentración de la crema base por lo que se afirma que la crema presenta actividad antioxidante, el porcentaje de inhibición se incrementa conforme se incrementa la concentración de la crema base.

TABLA N° 15. Absorbancia y porcentaje de Inhibición de la Capacidad Antioxidante de la Crema Base (F1) según el método DPPH

Conc Crema Base (mg/ml)	Absorbancia	% Inhibición
0,0	**0,682**	**0,00**
5,00	**0,631**	**7,7**
10,00	**0,582**	**15,10**
20,00	**0,476**	**30,20**
40,00	**0,272**	**60,39**

El análisis de varianza entre los resultados se usó el ANOVA y posteriormente el método de Tukey con nivel de significancia del 5% ($p<0,05$) (anexo 4).

En la Figura 12 se detalla la gráfica del porcentaje de inhibición de la capacidad antioxidante según el método DPPH y la concentración de la Crema Base.



La **CI 50% de la Crema base = 33,15 mg/ml = 3315 mg % = 3,315 %**

Figura 12: Porcentaje de inhibición de la Capacidad antioxidante de la crema base por el método DPPH.

En la Tabla 16 se describe los resultados de las absorbancias, % de inhibición y el CI 50% de la crema al 0,1 % (F2) según el método DPPH, donde se observa que la crema al 0,1% si presenta capacidad antioxidante por el método DPPH; también se observa que el porcentaje de inhibición es directamente proporcional a la dilución de la crema (o concentración de la crema), con un CI50% del orden de 1507,32 g%.

Tabla 16. Absorbancia, % de inhibición y CI 50% de la Actividad antioxidante de la crema al 0,1% (F2) según el método DPPH

Dilución	Abs (DPPH)	Inhibición %	Dil 50 %	CI50 mg %
0	0,682			
0,25	0,62	9,09		
0,5	0,515	24,48	1,1957	1507,32
0,75	0,474	30,49		
1	0,396	41,93		

En el análisis de varianza entre los resultados se usó ANOVA y posteriormente el método de Tukey con nivel de significancia del 5% ($p<0,05$) (anexo 5).

En la Figura 13 se presenta la Capacidad antioxidante de la Crema al 0,1 % de extracto presente en la crema por el método DPPH, donde se observa que a mayor concentración de la crema se obtiene mayor capacidad antioxidante (presenta menor lectura de absorbancia).

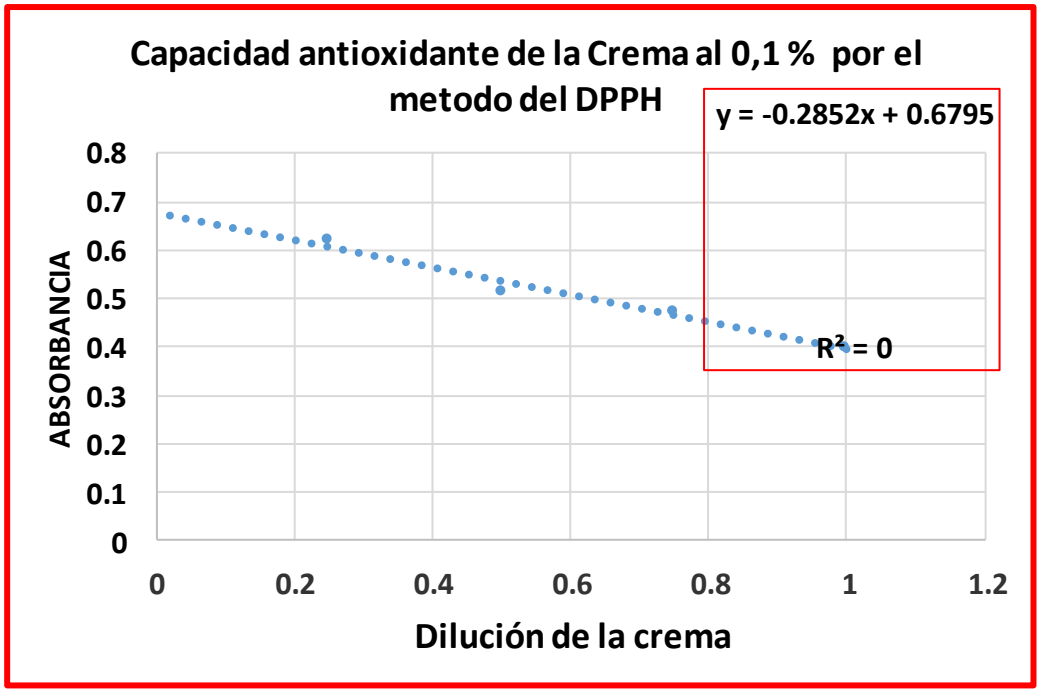


Figura 13. Capacidad Antioxidante de la Crema al 0,1% por el método del DPPH.

En la Tabla 17 se describe los resultados de las absorbancias, % de inhibición y el CI 50% de la crema al 0,5 % (F3) según el método DPPH, donde se observa que la crema al 0,5% si presenta capacidad antioxidante; también se observa que el porcentaje de inhibición es directamente proporcional a la dilución de la crema (o concentración de la crema), con un CI50% del orden de 827,769 g

Tabla 17. Absorbancia, % de inhibición y CI 50% de la Actividad antioxidante de la crema al 0,5% (F3) según el método DPPH

Dilución	Abs (DPPH)	Inhibiciòn %	Dil 50 %	CI50 mg %
0	0,682			
0,25	0,603	11,58		
0,5	0,387	43,25	0,7274	827,769
0,75	0,307	54,98		
1	0,244	64,22		

En el análisis de varianza entre los resultados se usó ANOVA y posteriormente el método de Tukey con nivel de significancia del 5% (p<0,05) (anexo 6).

En la Figura 14 se presenta la Capacidad antioxidante de la Crema al 0,5 % de extracto presente en la crema por el método DPPH, donde se observa que a mayor concentración de la crema se obtiene mayor capacidad antioxidante (presenta menor lectura de absorbancia)

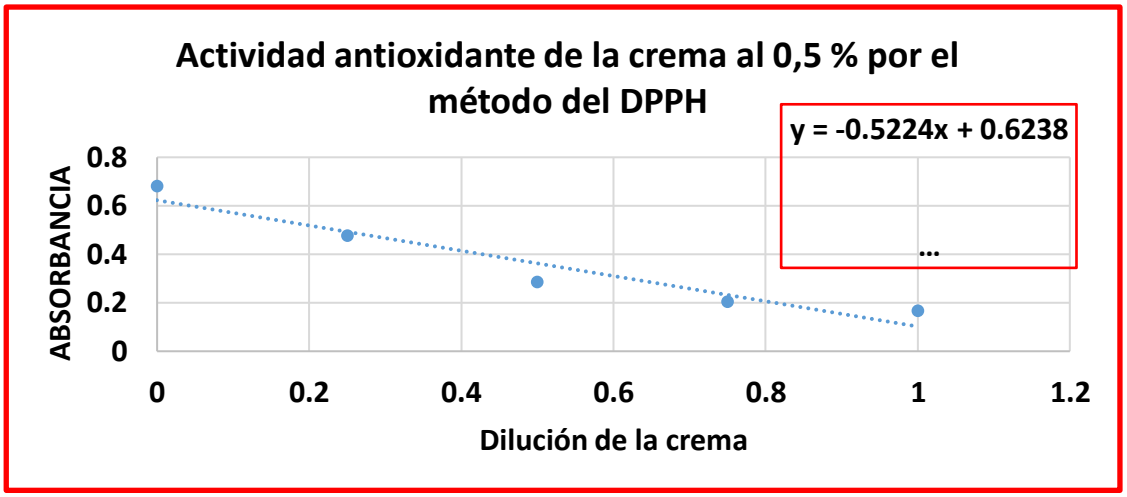


Figura 14. Capacidad Antioxidante de la Crema al 0,5% por el método del DPPH.

En la Tabla 18 se describe los resultados de las absorbancias, % de inhibición y el CI 50% de la crema al 1 % (F4) según el método DPPH, donde se observa que la crema al 1% si presenta capacidad antioxidante; también se observa que el porcentaje de inhibición es directamente proporcional a la dilución de la crema (o concentración de la crema), con un CI50% del orden de 743,406 g%.

Tabla 18. Actividad antioxidante de la crema al 1% frente al DPPH (F4)

Dilución	Abs (DPPH)	Inhibición %	Dil 50 %	CI50 mg %
0	0,682			
0,25	0,477	30,05		
0,5	0,285	58,21	0,6533	743,406
0,75	0,203	70,23		
1	0,166	75,65		

En el análisis de varianza entre los resultados se usó ANOVA y posteriormente el método de Tukey con nivel de significancia del 5% (p<0,05) (anexo 5).

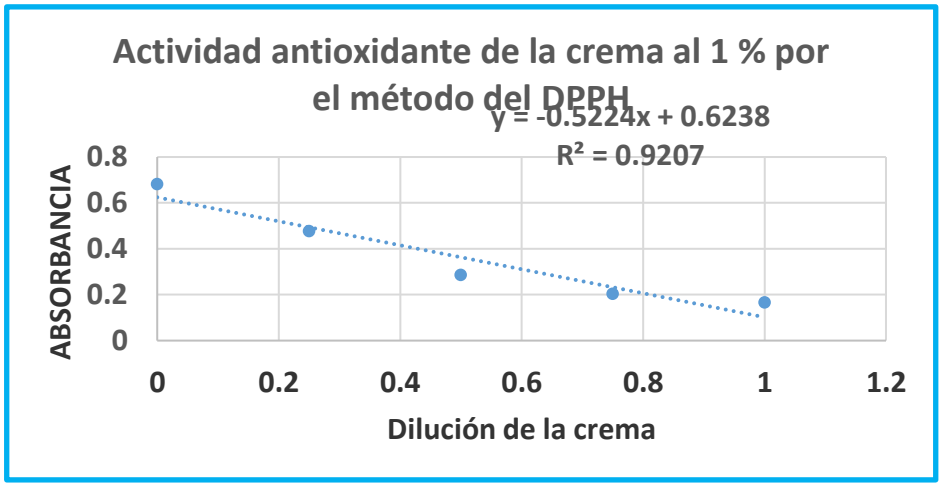


Figura 15. Capacidad Antioxidante de la Crema al 1% por el método del DPPH.

Para comparar la actividad antioxidante de la crema a diferentes tratamientos de extracto (a diferentes concentraciones de crema) se requiere del valor CI50%, dicho resumen se detalla en la Figura 16, observamos que, a mayor concentración de la Crema, mayor actividad antioxidante, según el método DPPH; por lo tanto, la crema al 1% presenta mayor actividad antioxidante que en las otras cremas (al presentar menor valor de CI50%).

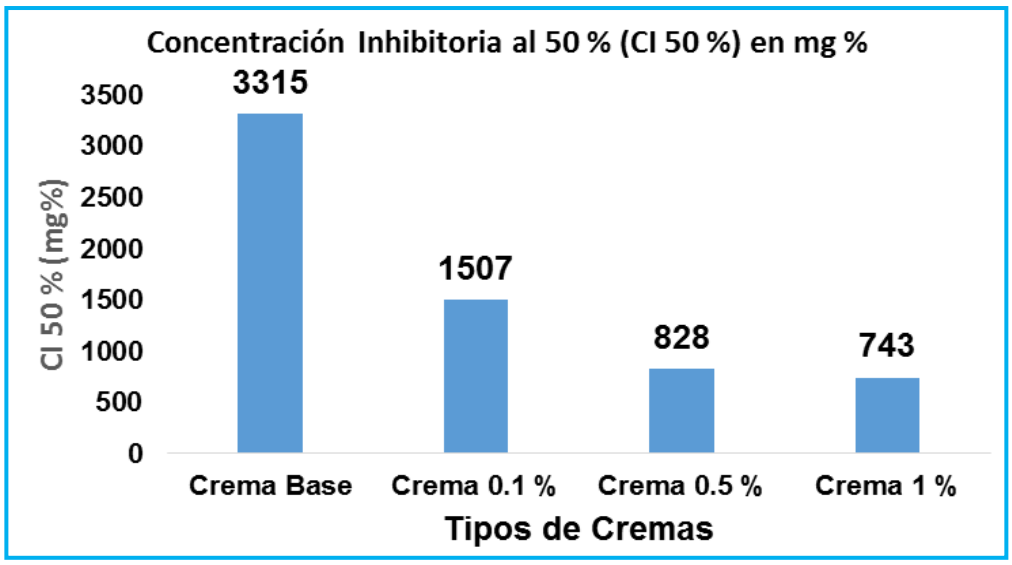


Figura 16. Capacidad Antioxidante como Concentración Inhibitoria (CI 50%) de las Cremas por el método del DPPH.

V. DISCUSIÓN

La marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) muestra abundantes compuestos fenólicos tipo flavonoides y presencia de otros metabolitos secundarios tales como alcaloides, taninos, glicósidos, esteroides y terpenoides, siendo los flavonoides y compuestos fenólicos los más abundantes, esto se puede observar en la tabla 3. Estos metabolitos también fueron reportados por Castillo (2010) "en extracto acuoso y metanólico de las hojas de *Minthostachys mollis*"[12,26].

La prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) permitió establecer que contiene mayormente metabolitos secundarios solubles en etanol y en metanol; además parcialmente solubles en solventes de mediana polaridad como acetato de etilo, cloroformo, diclorometano; lo que indicaría que los componentes mayoritarios son de alta y mediana polaridad. Tabla 4.

El Análisis cromatográfico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) mediante cromatografía en capa fina analítica y a escala preparativa, dio como resultado una buena separación con el sistema de solventes diclorometano: metanol (3:1), revelándose los cromatogramas con lámpara de luz ultravioleta a 366 nm, y reveladores cromogénicos que indicaron la presencia de flavonoides, aislándose 12 fracciones[25].

Propuesta de Estructuras mediante Espectroscopia UV-vis, mediante el ensayo de solubilidad y la marcha fitoquímica se encontró abundante cantidad de compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) (Tablas 3 y 4). Mediante ensayos cromatográficos se detectaron e identificaron metabolitos secundarios tipo flavonoides, los que fueron confirmados por reacciones de coloración y precipitación.

Los espectros UV de flavonoides en etanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. Flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas, banda I de mayor longitud de onda

en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo y banda II entre 250 - 280 nm debida al anillo característico A de funcionalidad benzoílo. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310 - 350 nm, los flavonoles 3-O-sustituidos en 330 - 360 nm y los flavonoles entre 350 - 385 nanómetros[24, 25].

Los metabolitos secundarios de las fracciones F1, F2, F5, F6, F7 y F11 aislados por cromatografía en capa fina a escala preparativa, con etanol 96º y luego leídos al espectrofotómetro UV-Visible en etanol, y al comparar los espectros obtenidos con las tablas de Mabry *et al*[24], se observó que cinco correspondían a flavonas y uno a flavanona.(Tabla 5)

F1: $\lambda_{máx}^{EtOH}$: 280, 330 nm 4',5,7,8-tetrahidroxiflavona; F2 $\lambda_{máx}^{EtOH}$: 274, 316 nm 5, 6, 7-trihidroxi - 4'-metoxiflavona; F5 $\lambda_{máx}^{EtOH}$: 274, 311 nm 5, 6, 7-trihidroxiflavona; F6 $\lambda_{máx}^{EtOH}$: 282, 336 nm 5-hidroxi-3´,4´,6,7,8-pentametoxiflavona; F7 $\lambda_{máx}^{EtOH}$: 279, 338 nm 5,7-dihidroxi-3´,4´,6,8-tetrametoxiflavona; F11 $\lambda_{máx}^{EtOH}$: 284, 335 nm 3´,4´,5,6,7-pentametoxiflavanona.

El presente trabajo evaluó la actividad antioxidante *in vitro*, utilizando dos ensayos: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2′-azinobis- (3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Además, compararon los ensayos DPPH y ABTS, los cuales se fundamentan en la eliminación de radicales (ABTS, DPPH), convirtiéndolo en un producto incoloro. El grado de esta decoloración afecta la cantidad de radicales que se ha eliminado. Los métodos que utilizan la eliminación de ABTS o DPPH se encuentran entre los métodos espectrofotométricos más populares para determinar la capacidad antioxidante en alimentos y compuestos químicos[22, 23].

Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar la Capacidad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Minthostachys mollis* "muña" (Tablas 12 y 13). La $CI_{50\%}$ corresponde a la concentración del extracto (ug/mL) que reduce en un 50% la absorbancia de una solución metanólica de DPPH como control a 517 nm. La Vitamina C y el Trolox se utilizan como referencia o control en las determinaciones de la Capacidad antioxidante. Los valores de

$CI_{50\%}$ se interpretan: a menor valor de $CI_{50\%}$ le corresponde mayor Capacidad antioxidante.

“Los resultados encontrados se encuentran dentro del rango señalado para el extracto acuoso al 10% p/v de las hojas, de *Minthostachys mollis* (muña), que fueron: 92,41 y 94,72% a 50 y 100 ug/mL y de 94,08 y 97,27% para la vitamina C”[6].

Floegel A; evaluó que “mediante el ensayo ABTS●+ se obtuvieron porcentajes de actividad antioxidante mucho más altos que por medio del método de DPPH● lo cual concuerda con datos reportados. Hay algunas razones por medio de las cuales se podría dar explicación a este hecho, la primera se basa en la longitud de onda a la cual se realizaron las medidas para cada ensayo. Para el ensayo ABTS●+ se tomó una longitud de onda de 732 nm, mientras que, para el ensayo DPPH● se midió a 517 nm. Otra razón podría ser el mecanismo de reacción del DPPH• con los antioxidantes, lo cual está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos; es decir, un antioxidante pequeño con mayor acceso al radical mostrará mejor actividad antioxidante, teniendo presente que el DPPH• está impedido estéricamente[27].

La capacidad antioxidante evaluada por el método ABTS equivalente a Vitamina C y Trolox (TEAC y VCEAC) fue significativamente mayor que la evaluada por el método DPPH. El ensayo DPPH (TEAC) subestimó la capacidad antioxidante en aproximadamente un 68% en comparación con el ensayo ABTS (TEAC). Tres posibles razones pueden ser responsables de esto: en primer lugar, en el caso de ABTS, las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 734 nm, mientras que se seleccionaron 515 nm para DPPH. Esta subestimación de TEAC por los radicales DPPH es de esperar ya que la región visible, con compuestos coloreados, como antocianinas y carotenoides, presentados en la muestra de prueba, puede tener los espectros que se superponen con DPPH a 515 nm y, por lo tanto, interfiere con las mediciones. Una segunda posible razón podría deberse a los mecanismos de reacción del DPPH y los eliminadores de radicales libres, que también están

influenciados por las conformaciones estructurales de los antioxidantes. Por lo tanto, las moléculas pequeñas que tienen un mejor acceso al sitio radical tienen una actividad antioxidante aparente más alta con esta prueba. La tercera explicación posible podría deberse a que las reacciones de DPPH con ciertos fenoles, como el eugenol y sus derivados, son reversibles, lo que resulta en bajas lecturas de actividad antioxidante[23].

Con respecto a la aplicabilidad con cada uno de estos ensayos establecidos, DPPH es un radical libre que se adquiere directamente sin preparación (listo para disolverse), mientras que el catión radical ABTS (ABTS • +), debe ser generado por enzimas (peroxidasa y mioglobina) o reacciones químicas. (Dióxido de manganeso y persulfato de potasio). En términos del tiempo de ejecución con estos métodos, la principal desventaja del ensayo DPPH es el hecho de que los extractos reaccionan más lentamente con DPPH (30 min) que con ABTS (7 min). Además, el ABTS se puede solubilizar en medios acuosos y orgánicos, en los que se puede medir la actividad antioxidante debido a la naturaleza hidrofílica y lipofílica de estos compuestos en las muestras. Sin embargo, DDPH se ha aplicado rutinariamente en extractos acuosos-orgánicos. “Se sugiere que los valores de la capacidad antioxidante deben compararse cuando las mediciones han sido hechas por el mismo método y con el mismo solvente. p.ej. como capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) o capacidad antioxidante equivalente de vitamina C (VCEAC). Además, hay dos tipos de ensayos. Un enfoque se basa en una transferencia de electrones e implica la reducción de un oxidante coloreado, en ensayo ABTS, DPPH y FRAP. En especificación, el ensayo ABTS se basa en la generación de un ABTS • + azul / verde que puede reducirse con antioxidantes; mientras que el ensayo DPPH se basa en la reducción del DPPH • púrpura a 1,1-difenil-2-picrilhidrazina. Ambos ensayos son convenientes en su aplicación y, por lo tanto, los más populares; sin embargo, son limitados ya que usan radicales no fisiológicos[29-33].

Se evaluó la capacidad antioxidante de las cremas las cuales contenían diferentes concentraciones del extracto (tabla 19) *in vitro*, por el método DPPH• los resultados del IC50 muestran que a mayor porcentaje de extracto contenido

en la crema, el IC50 es menor; lo que significa que menor será la cantidad requerida de la crema para inhibir el 50% del radical libre DPPH• y a la vez mayor capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante equivalente a Trolox TEAC de las pre-formulaciones dermocosméticas (F1, F2, F3 y F4) fueron 3315,000; 1506,500; 827,769 y 743,406 mg/g muestra respectivamente, demostrándose un incremento en cuanto la concentración del extracto incorporado de muña, en la crema con extracto hidroalcohólico tiene actividad antioxidante. “Esta variación con respecto al extracto hidroalcohólico de “muña “podría deberse a la reacción de los excipientes de la crema, con los compuestos activos como son los flavonoides y compuestos fenólicos, el extracto hidroalcohólico podría haber extraído compuestos medianamente polares, los cuales podrían haber reaccionado con los excipientes de la misma[22].

En los resultados obtenidos en el presente estudio, es evidente que la interacción de un potencial antioxidante con DPPH depende de su conformación estructural. Ciertos compuestos reaccionan muy rápidamente con el DPPH reduciendo una cantidad de moléculas de DPPH que corresponden al número de grupos hidroxilo disponible. Sin embargo, para la mayoría de los compuestos probados el mecanismo es más complejo.

Para una mejor comprensión de los mecanismos que implican el DPPH y los antioxidantes potenciales, sería interesante caracterizar los productos intermedios de reacción. Para hacer esto, es necesario separar estos compuestos por cromatografía e identificarlos[34-36].

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña), mostró importante presencia de flavonoides con significativa actividad antioxidante por el método de DPPH● y ABTS●+.

2. Mediante CCF a escala preparativa se aislaron varias fracciones que fueron analizadas mediante espectroscopía UV. Se proponen cinco flavonas y una flavanona.

3. Las cremas dermocosméticas del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) mostraron actividad antioxidante por el método de DPPH●.

VII. RECOMENDACIONES

1. Aplicar otras técnicas para determinar la capacidad antioxidante de la crema y con ello respaldar los resultados de dicho estudio, ya que en la investigación solo se utilizó el método de DPPH, porque al realizar el método de ABTS precipitaba
2. Complementar la investigación de la capacidad antioxidante con estudios *in vivo* para demostrar su capacidad antioxidante, ya que el presente estudio fue *in vitro.*
3. Realizar en el producto terminado, pruebas de estabilidad acelerada y a tiempo real para tener conocimiento del efecto antioxidante en el tiempo.
4. Elucidación estructural por espectrometría de masas para la identificación química de los compuestos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ribeiro A, Estanqueiro M, Oliveira B, Sousa J. Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products. Cosmetics. 2015; Vol 2: 48-65.
2. Brenner M, Hearing V. The Protective Role of melanin Against UV Damage in Human Skin. Photochemistry and Photobiology. 2008; 84: 539–549.
3. Bickers D, Athar M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. Journal of Investigative Dermatology. 2006; 126: 2565–2575.
4. Birch-Machin MA, Bowman A. Oxidative stress and ageing. Br J Dermatol. 2016; 175:26–9.
5. Cronin H, Draelos Z. Top 10 botanical ingredients in 2010 anti-aging creams. Journal of Cosmetic Dermatology. 2010; 9: 218–225.
6. Castañeda C, Ramos LL. E, Ibáñez V. L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico 2008; Vol. 8.
7. Hammond GB, Fernández ID, Villegas LF, Vaisberg AJ. A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas, Department of Ancash, Peru. J Ethnopharmacol. 1998; 61(1):17–30.
8. Neyra Espinoza LCJ, Armas Gálvez NM. Evaluación in vitro de la actividad fungicida y fungistática del extracto metanólico de *Minthostachys mollis* (muña) sobre cepa de *Candida albicans* ATCC®1023 [Internet]. UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS; 2018. Available from: http://hdl.handle.net/10757/625175
9. Arriola García RF. Comparación del efecto antibacteriano in vitro entre el extracto hidroetanólico y el extracto acuoso de *Minthostachys mollis* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [Internet]. Transtornos Alimenticios. Universidad Señor de Sipán; 2013. Available from: http://www.ub.edu.ar/posgrados/continua/archivos_segundo_semestre/Diagnóstico y Tratamiento de los Trastornos Alimentarios.pdf
10. Campo Fernández M y col. Composición química y actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las partes aéreas de *Minthostachys mollis* Griseb. 2019;51(2).

11. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad Antimicotica *in vitro* y Elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “MUÑA”. Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2006.
12. Martínez A. Los flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 2005.
13. Patel JM. A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids. Lethbridge Undergrad Res J [Internet]. 2008; 3(2). Available from: http://www.lurj.org/article.php/vol3n2/flavonoids.xml
14. Lin JK, Weng MS. Flavonoids as nutraceuticals: A Review. Sci Flavonoids. 2006;7(September):213–38.
15. Addor FAS. Antioxidants in dermatology. An Bras Dermatol. 2017;92(3):356–62.
16. Pai V, Shukla P et al. Antioxidants in dermatology, Indian Dermatology Online Journal - April-June 2014 - Volume 5 - Issue 2.
17. Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.2018; 13 (1): 12- 23. doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004
18. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. J Nutr Sci. 2016;5.
19. Zulueta A, Esteve MJ, Frígola Ana. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Elsevier. Food Chemistry. 2009: 310–316.
20. Castellanos G, Pérez D. Antioxidants in Dermatology. CMQ. 2010; 8(4): 272-277.
21. Magliano J. Antioxidantes de uso tópico en Dermatología. Tendencias en medicina. 2014: 91-96.
22. Cuevas M, Lozano N. Actividad antioxidante y composición de ácidos grasos, tocoferoles y tocotrienoles en tres variedades de *Chenopodium quinoa* Willdenow y elaboración de una crema dermocosmética antienvejecimiento. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2017.

23. Rodríguez J. Determinación de polifenoles, actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y elaboración de una fórmula dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe. Unidad de Postgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2017.
24. Mabry T, Markhan K, Thomas M. The systematic identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. 1970. p 16- 147.
25. Lock de Ugaz. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. Segunda Edición. Fondo Editorial de la Pontifica Universidad Católica del Perú. 1994.
26. Castillo E. Análisis Fitoquímico y Efecto Sinérgico Protector de las Hojas de *Minthostachys mollis* y *Malva sylvestris* sobre la Mucosa Gástrica de *Rattus* Var. Albinus. Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo. 2010.
27. Anna Floegel, Dae-Ok Kim, Sang-Jin Chung, Sung I. Koo, Ock K. Chun. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Journal of Food Composition and Analysis 2011;24: 1043–1048.
28. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm. -Wiss. U.Technol. 1995; 28: 25-30.
29. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. Elsevier. 1999; 26(9/10): 1231-1237.
30. Beserra Almeida M, Machado de Sousa P, Campos Arriaga A, Matias do Prado G, Carvalho Magalhães C. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. Brazil: Elsevier; 2011.
31. Geissman T. “The Chemistry of Flavonoid Compounds”. New York: Pergamon Press; 1962.
32. Vit P, Santiago B, Pérez-Pérez E. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. Intercencia. 2014; 39(5): 350-353.

33. Paladino S. “Actividad Antioxidante de los compuestos fenolicos contenidos en las semillas de la vid Vitis vinifera”. Tesis de Magister en Ciencia de los Alimentos. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 2013.
34. Shiozawa R, Inoue Y, Murata I, Kanamoto I. Effect of antioxidant activity of caffeic acid with cyclodextrins using ground mixture method. Asian J Pharm Sci [Internet]. 2018; 13(1):24–33. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.006
35. Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive compounds from plants used in Peruvian traditional medicine. Nat Prod Commun. 2016; 11(3):315–37.
36. Tovar Del Rio J. Determinación de la actividad antioxidante por dpph y abts de 30 plantas recolectadas en la eco región cafetera. Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.

IX. ANEXOS

Anexo 1

Clasificación taxonómica



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

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA Nº091-USM-2017

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

La muestra vegetal (planta completa) recibida **Carlos CANO PEREZ**, estudiante de Doctorado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Minthostachys mollis,*** var. ***mandoniana*** (Briq.) Schmidt-Leb y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Minthostachys*

ESPECIE: ***Minthostachys mollis,*** var. ***mandoniana*** (Briq.) Schmidt-Leb

Nombre vulgar : "muña"
Determinado por: Dra. Joaquina Albán Castillo.

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

Lima, 24 de mayo de 2017

Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

Anexo 2
Análisis de varianza de la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Mintostachys mollis* por el método DPPH

ANOVA

Absorbancia

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,617	4	,154	114,402	,000
Dentro de grupos	,013	10	,001		
Total	,631	14			

Como p ≈ 0,000 < 0,05 entonces las medias entre los grupos NO son iguales, al menos una es diferente a las otras.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Absorbancia
HSD Tukey

(I) Concentración de la muestra	(J) Concentración de la muestra	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
0 mg%	5 mg%	,093000*	,018759	,036	,00868	,17732
	10 mg%	,410000*	,015284	,001	,31993	,50007
	16 mg%	,430013*	,045310	,019	,14473	,71530
	20 mg%	,511000*	,014636	,001	,41179	,61021
5 mg%	0 mg%	-,093000*	,018759	,036	-,17732	-,00868
	10 mg%	,317000*	,013505	,001	,24189	,39211
	16 mg%	,337013*	,044741	,037	,04303	,63100
	20 mg%	,418000*	,012767	,001	,33453	,50147
10 mg%	0 mg%	-,410000*	,015284	,001	-,50007	-,31993
	5 mg%	-,317000*	,013505	,001	-,39211	-,24189
	16 mg%	,020013	,043399	,985	-,30134	,34136
	20 mg%	,101000*	,006688	,001	,06818	,13382
16 mg%	0 mg%	-,430013*	,045310	,019	-,71530	-,14473
	5 mg%	-,337013*	,044741	,037	-,63100	-,04303
	10 mg%	-,020013	,043399	,985	-,34136	,30134
	20 mg%	,080987	,043175	,512	-,24610	,40807
20 mg%	0 mg%	-,511000*	,014636	,001	-,61021	-,41179
	5 mg%	-,418000*	,012767	,001	-,50147	-,33453
	10 mg%	-,101000*	,006688	,001	-,13382	-,06818
	16 mg%	-,080987	,043175	,512	-,40807	,24610

*. La diferencia de medias entre los grupos es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 3
Análisis de varianza de la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Mintostachys mollis* por el método ABTS

ANOVA

Absorbancia

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,215	4	,054	565,936	,000
Dentro de grupos	,001	10	,000		
Total	,215	14			

Como p ≈ 0,000 < 0,05 Entonces las medias entre los grupos NO son iguales, al menos una es diferente a las otras.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Absorbancia
HSD Tukey

(I) Concentración de la muestra	(J) Concentración de la muestra	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
0 mg%	16 mg%	,142000*	,007948	,000	,11584	,16816
	24 mg%	,163000*	,007948	,000	,13684	,18916
	32 mg%	,229000*	,007948	,000	,20284	,25516
	40 mg%	,367000*	,007948	,000	,34084	,39316
16 mg%	0 mg%	-,142000*	,007948	,000	-,16816	-,11584
	24 mg%	,021000	,007948	,135	-,00516	,04716
	32 mg%	,087000*	,007948	,000	,06084	,11316
	40 mg%	,225000*	,007948	,000	,19884	,25116
24 mg%	0 mg%	-,163000*	,007948	,000	-,18916	-,13684
	16 mg%	-,021000	,007948	,135	-,04716	,00516
	32 mg%	,066000*	,007948	,000	,03984	,09216
	40 mg%	,204000*	,007948	,000	,17784	,23016
32 mg%	0 mg%	-,229000*	,007948	,000	-,25516	-,20284
	16 mg%	-,087000*	,007948	,000	-,11316	-,06084
	24 mg%	-,066000*	,007948	,000	-,09216	-,03984
	40 mg%	,138000*	,007948	,000	,11184	,16416
40 mg%	0 mg%	-,367000*	,007948	,000	-,39316	-,34084
	16 mg%	-,225000*	,007948	,000	-,25116	-,19884
	24 mg%	-,204000*	,007948	,000	-,23016	-,17784
	32 mg%	-,138000*	,007948	,000	-,16416	-,11184

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 4
Análisis de varianza de la capacidad antioxidante de la crema base por el método DPPH

ANOVA

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,316	4	,079	202,498	,000
Dentro de grupos	,004	10	,000		
Total	,320	14			

Como p ≈ 0,000 < 0,05 Entonces las medias entre los NO son iguales, al menos una es diferente a las otras.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Absorbancia
HSD Tukey

(I) Concentración de la muestra	(J) Concentración de la muestra	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
0 mg/ml	5 mg/ml	,051000	,016138	,061	-,00211	,10411
	10 mg/ml	,100000*	,016138	,001	,04689	,15311
	20 mg/ml	,206000*	,016138	,000	,15289	,25911
	40 mg/ml	,410000*	,016138	,000	,35689	,46311
5 mg/ml	0 mg/ml	-,051000	,016138	,061	-,10411	,00211
	10 mg/ml	,049000	,016138	,074	-,00411	,10211
	20 mg/ml	,155000*	,016138	,000	,10189	,20811
	40 mg/ml	,359000*	,016138	,000	,30589	,41211
10 mg/ml	0 mg/ml	-,100000*	,016138	,001	-,15311	-,04689
	5 mg/ml	-,049000	,016138	,074	-,10211	,00411
	20 mg/ml	,106000*	,016138	,000	,05289	,15911
	40 mg/ml	,310000*	,016138	,000	,25689	,36311
20 mg/ml	0 mg/ml	-,206000*	,016138	,000	-,25911	-,15289
	5 mg/ml	-,155000*	,016138	,000	-,20811	-,10189
	10 mg/ml	-,106000*	,016138	,000	-,15911	-,05289
	40 mg/ml	,204000*	,016138	,000	,15089	,25711
40 mg/ml	0 mg/ml	-,410000*	,016138	,000	-,46311	-,35689
	5 mg/ml	-,359000*	,016138	,000	-,41211	-,30589
	10 mg/ml	-,310000*	,016138	,000	-,36311	-,25689
	20 mg/ml	-,204000*	,016138	,000	-,25711	-,15089

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 5
Análisis de varianza de la capacidad antioxidante de la crema al 0,1%del extracto hidroalcohólico de *Mintostachys mollis* por el método DPPH

ANOVA

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,157	4	,039	145,496	,000
Dentro de grupos	,003	10	,000		
Total	,159	14			

Como p ≈ 0,000 < 0,05 Entonces las medias entre los grupos NO son iguales, al menos una es diferente a las otras.

Comparaciones múltiples para la Muestra Crema 0,1 % - DPPH

Variable dependiente: Absorbancia
HSD Tukey

(I) Concentración de la muestra	(J) Concentración de la muestra	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
0 mg/ml	3,15 mg/ml	,062000*	,013400	,007	,01790	,10610
	6,30 mg/ml	,167000*	,013400	,000	,12290	,21110
	9,45 mg/ml	,208000*	,013400	,000	,16390	,25210
	12,60 mg/ml	,286000*	,013400	,000	,24190	,33010
3,15 mg/ml	0 mg/ml	-,062000*	,013400	,007	-,10610	-,01790
	6,30 mg/ml	,105000*	,013400	,000	,06090	,14910
	9,45 mg/ml	,146000*	,013400	,000	,10190	,19010
	12,60 mg/ml	,224000*	,013400	,000	,17990	,26810
6,30 mg/ml	0 mg/ml	-,167000*	,013400	,000	-,21110	-,12290
	3,15 mg/ml	-,105000*	,013400	,000	-,14910	-,06090
	9,45 mg/ml	,041000	,013400	,072	-,00310	,08510
	12,60 mg/ml	,119000*	,013400	,000	,07490	,16310
9,45 mg/ml	0 mg/ml	-,208000*	,013400	,000	-,25210	-,16390
	3,15 mg/ml	-,146000*	,013400	,000	-,19010	-,10190
	6,30 mg/ml	-,041000	,013400	,072	-,08510	,00310
	12,60 mg/ml	,078000*	,013400	,001	,03390	,12210
12,60 mg/ml	0 mg/ml	-,286000*	,013400	,000	-,33010	-,24190
	3,15 mg/ml	-,224000*	,013400	,000	-,26810	-,17990
	6,30 mg/ml	-,119000*	,013400	,000	-,16310	-,07490
	9,45 mg/ml	-,078000*	,013400	,001	-,12210	-,03390

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 6
Análisis de varianza de la capacidad antioxidante de la crema al 0,5% del extracto hidroalcohólico de *Mintostachys mollis* por el método DPPH

ANOVA

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,432	4	,108	250,903	,000
Dentro de grupos	,004	10	,000		
Total	,436	14			

Como p ≈ 0,000 < 0,05 Entonces las medias entre los grupos NO son iguales, al menos una es diferente a las otras.

Comparaciones múltiples para la Muestra Crema 0,5 %. DPPH

Variable dependiente: Absorbancia

HSD Tukey

(I) Concentración de la muestra	(J) Concentración de la muestra	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
0 mg/ml	2,84 mg/ml	,079000*	,016937	,006	,02326	,13474
	5,69 mg/ml	,295000*	,016937	,000	,23926	,35074
	8,53 mg/ml	,375000*	,016937	,000	,31926	,43074
	11,38 mg/ml	,438000*	,016937	,000	,38226	,49374
2,84 mg/ml	0 mg/ml	-,079000*	,016937	,006	-,13474	-,02326
	5,69 mg/ml	,216000*	,016937	,000	,16026	,27174
	8,53 mg/ml	,296000*	,016937	,000	,24026	,35174
	11,38 mg/ml	,359000*	,016937	,000	,30326	,41474
5,69 mg/ml	0 mg/ml	-,295000*	,016937	,000	-,35074	-,23926
	2,84 mg/ml	-,216000*	,016937	,000	-,27174	-,16026
	8,53 mg/ml	,080000*	,016937	,006	,02426	,13574
	11,38 mg/ml	,143000*	,016937	,000	,08726	,19874
8,53 mg/ml	0 mg/ml	-,375000*	,016937	,000	-,43074	-,31926
	2,84 mg/ml	-,296000*	,016937	,000	-,35174	-,24026
	5,69 mg/ml	-,080000*	,016937	,006	-,13574	-,02426
	11,38 mg/ml	,063000*	,016937	,026	,00726	,11874
11,38 mg/ml	0 mg/ml	-,438000*	,016937	,000	-,49374	-,38226
	2,84 mg/ml	-,359000*	,016937	,000	-,41474	-,30326
	5,69 mg/ml	-,143000*	,016937	,000	-,19874	-,08726
	8,53 mg/ml	-,063000*	,016937	,026	-,11874	-,00726

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 7
Análisis de varianza de la capacidad antioxidante de la crema al 1,0% del extracto hidroalcohólico de *Mintostachys mollis* por el método DPPH

ANOVA

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,556	4	,139	634,163	,000
Dentro de grupos	,002	10	,000		
Total	,558	14			

Como p ≈ 0,000 < 0,05 entonces las medias entre los grupos NO son iguales, al menos una es diferente a las otras.

Comparaciones múltiples para la Muestra Crema 1 % . DPPH

Variable dependiente: Absorbancia Crema 1 %

HSD Tukey

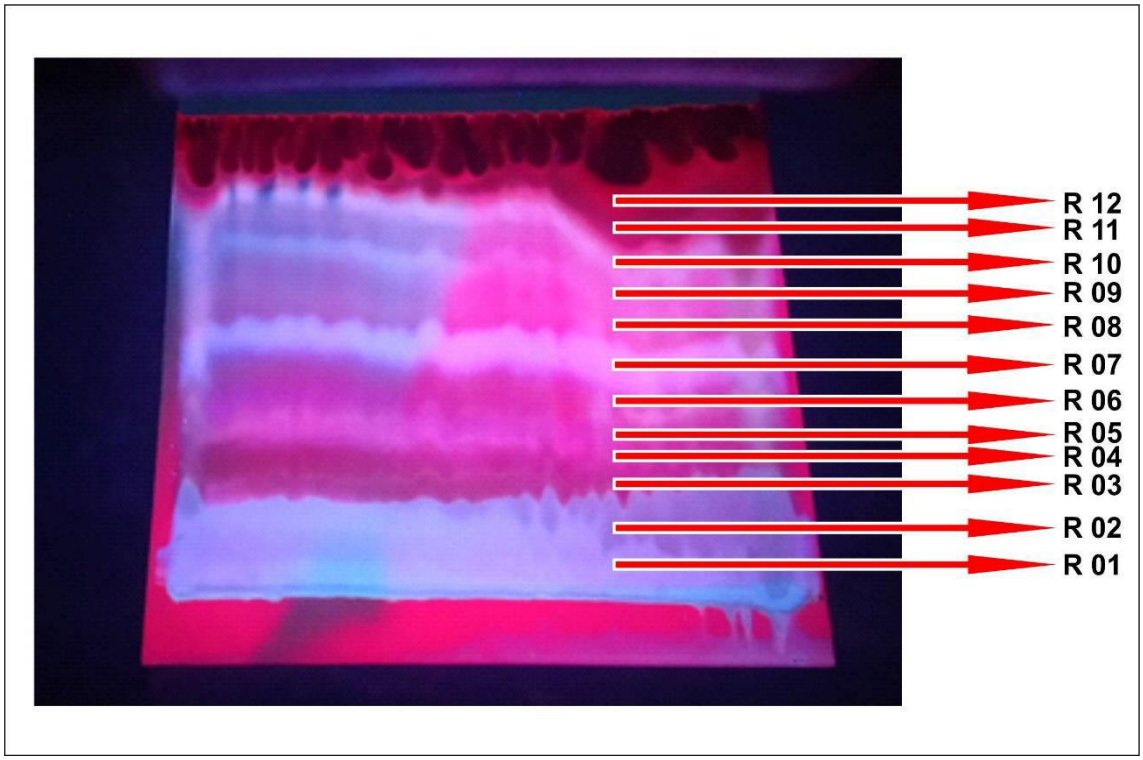
(I) Concentración de la muestra	(J) Concentración de la muestra	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
0 mg/ml	2,46 mg/ml	,205000*	,012085	,000	,16523	,24477
	4,93 mg/ml	,397000*	,012085	,000	,35723	,43677
	7,40 mg/ml	,479000*	,012085	,000	,43923	,51877
	9,86 mg/ml	,516000*	,012085	,000	,47623	,55577
2,46 mg/ml	0 mg/ml	-,205000*	,012085	,000	-,24477	-,16523
	4,93 mg/ml	,192000*	,012085	,000	,15223	,23177
	7,40 mg/ml	,274000*	,012085	,000	,23423	,31377
	9,86 mg/ml	,311000*	,012085	,000	,27123	,35077
4,93 mg/ml	0 mg/ml	-,397000*	,012085	,000	-,43677	-,35723
	2,46 mg/ml	-,192000*	,012085	,000	-,23177	-,15223
	7,40 mg/ml	,082000*	,012085	,000	,04223	,12177
	9,86 mg/ml	,119000*	,012085	,000	,07923	,15877
7,40 mg/ml	0 mg/ml	-,479000*	,012085	,000	-,51877	-,43923
	2,46 mg/ml	-,274000*	,012085	,000	-,31377	-,23423
	4,93 mg/ml	-,082000*	,012085	,000	-,12177	-,04223
	9,86 mg/ml	,037000	,012085	,071	-,00277	,07677
9,86 mg/ml	0 mg/ml	-,516000*	,012085	,000	-,55577	-,47623
	2,46 mg/ml	-,311000*	,012085	,000	-,35077	-,27123
	4,93 mg/ml	-,119000*	,012085	,000	-,15877	-,07923
	7,40 mg/ml	-,037000	,012085	,071	-,07677	,00277

* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

NOTA:
TODOS LOS RESULTADOS DEMUESTRA QUE LAS MEDIAS ENTRE LOS GRUPOS SON DIFERENTES ENTRE SI; por presentar p < 0,05.

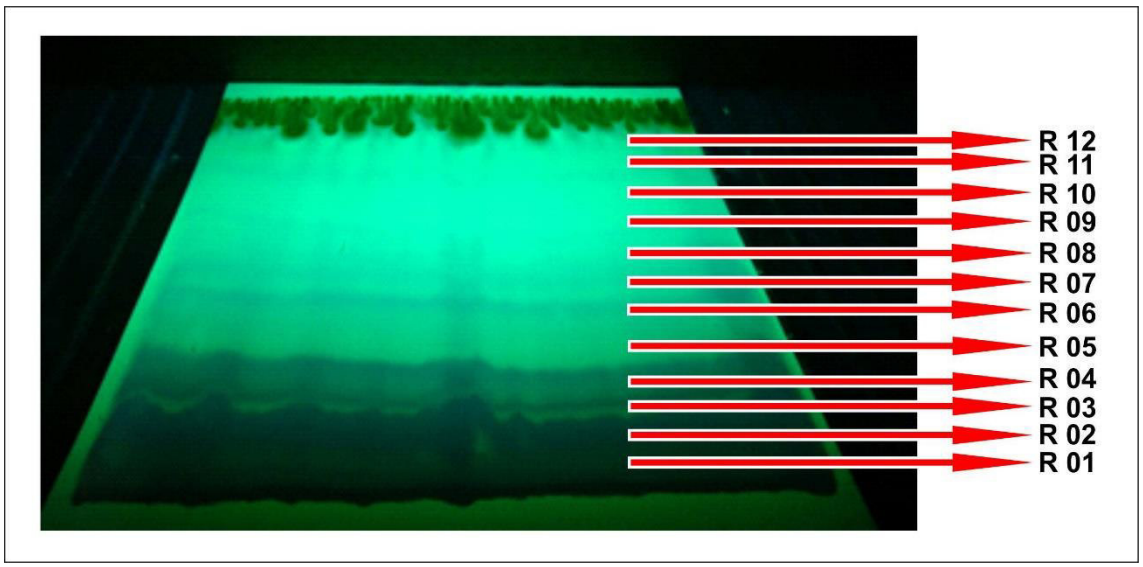
Anexo 8

Revelado con luz UV 365 nm.

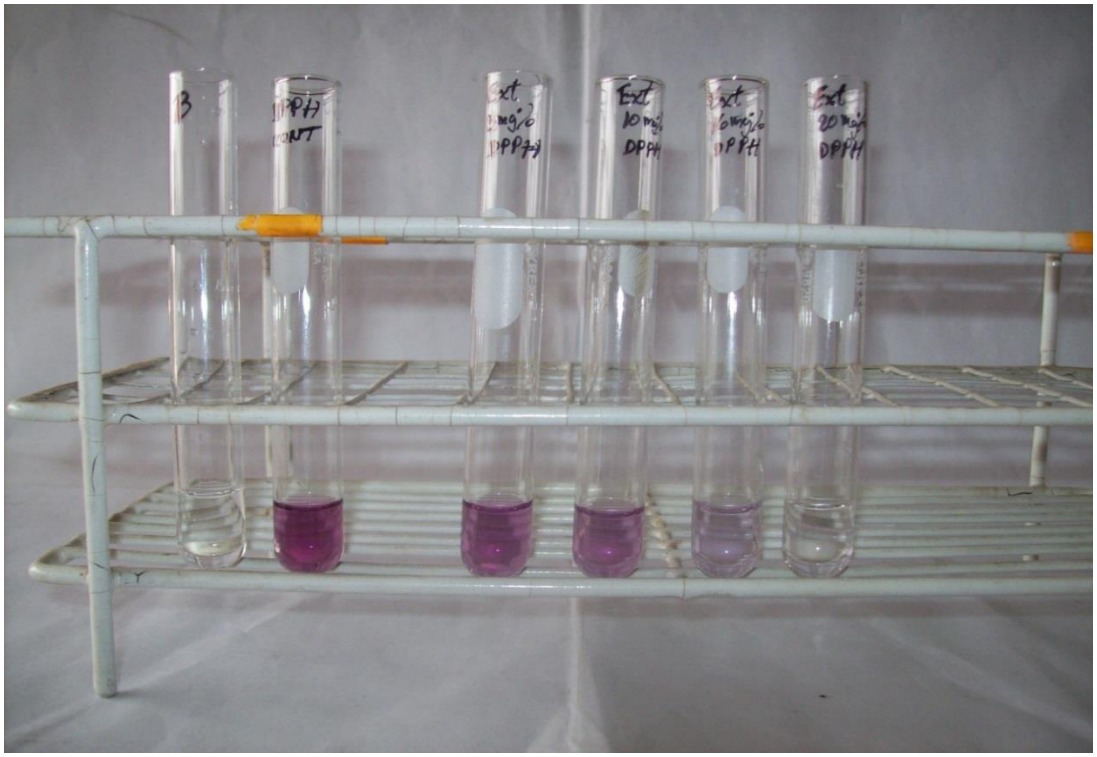


Anexo 9

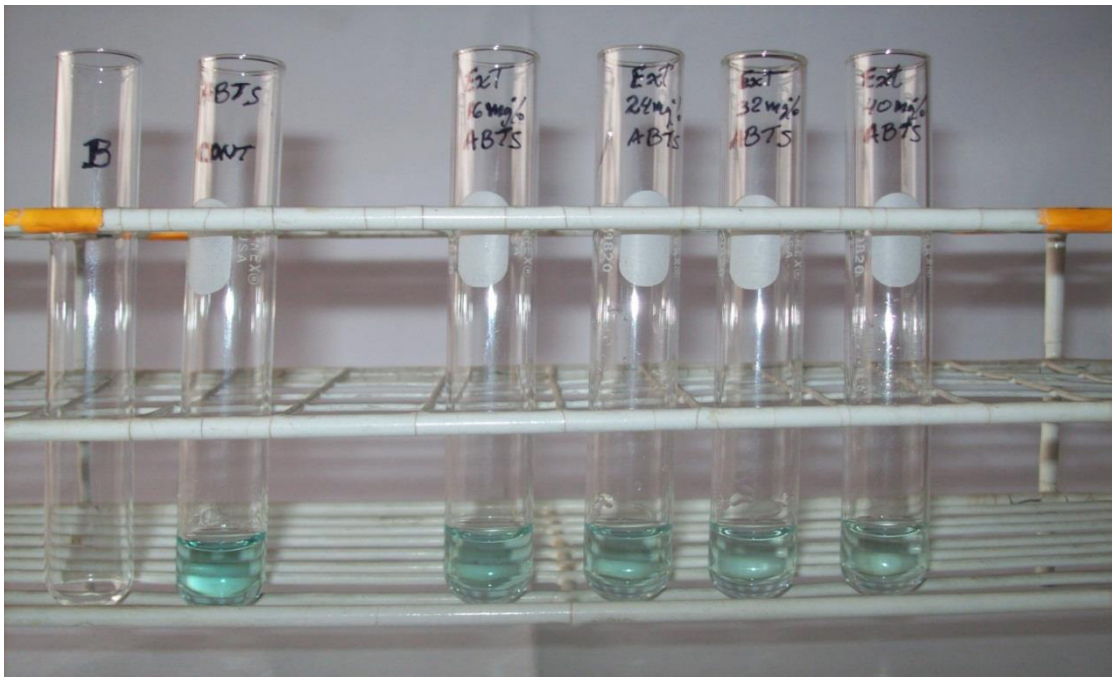
Revelado con luz UV 254 nm.



Anexo 10
Capacidad antioxidante del extracto de muña expresado como CI50% frente al DPPH

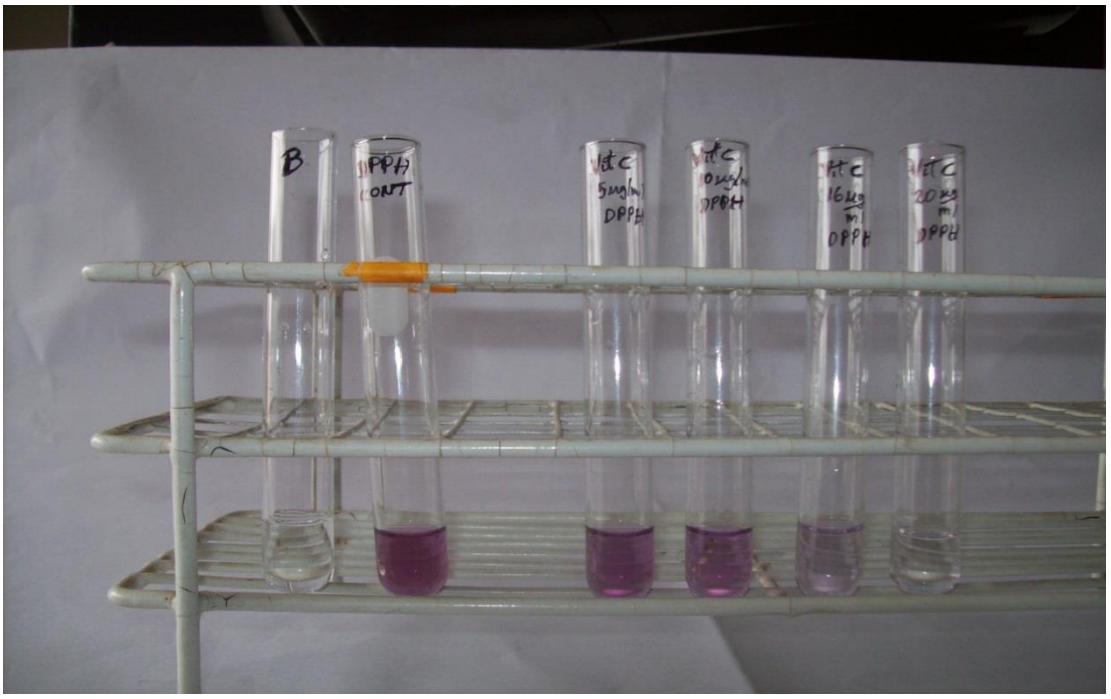


Anexo 11
Capacidad antioxidante del extracto de muña expresado como CI50% frente al ABTS



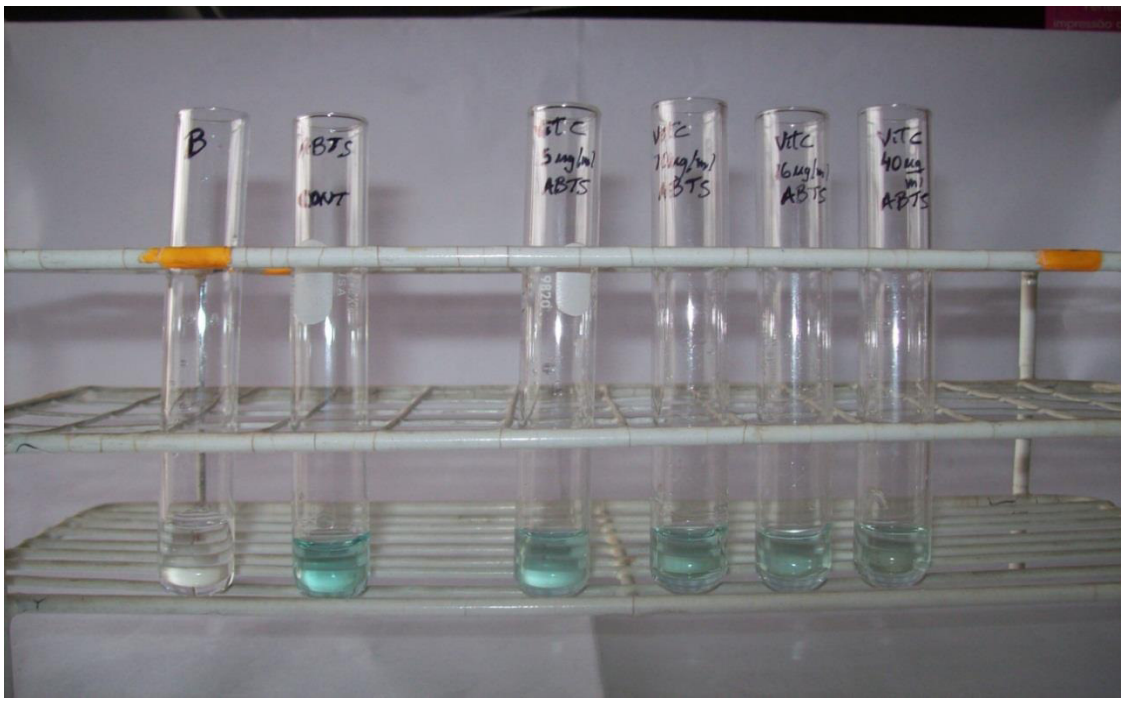
Anexo 12

Capacidad antioxidante de la vitamina C expresado como CI50% frente al DPPH



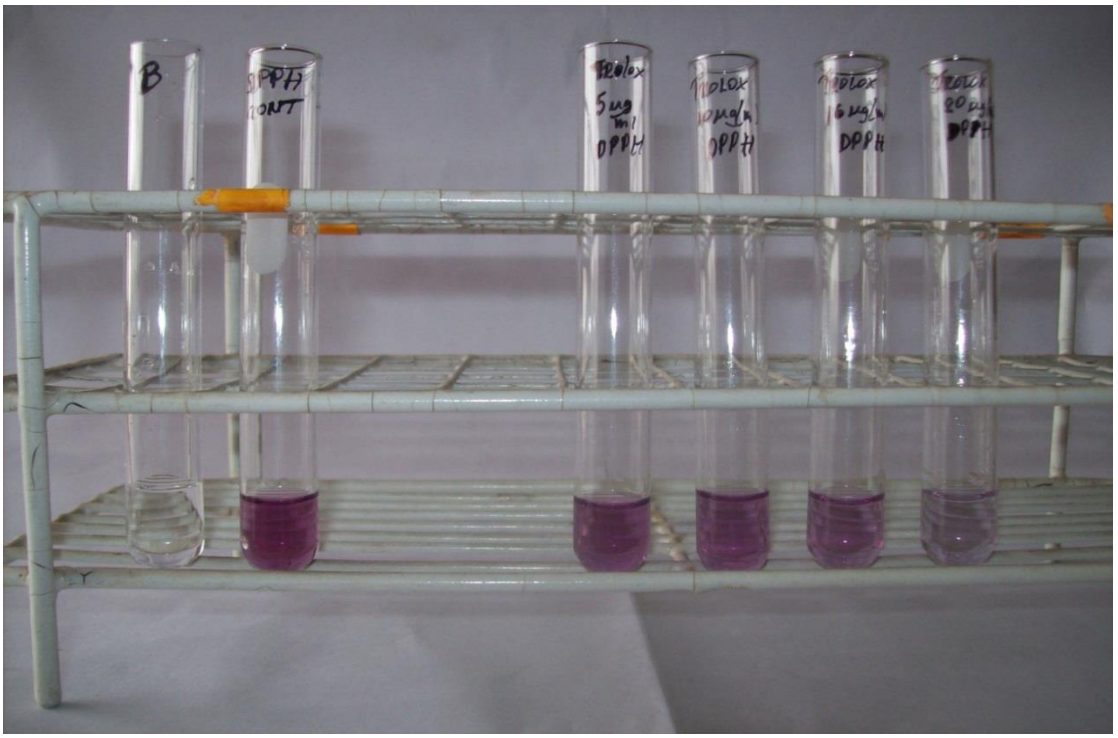
Anexo 13

Capacidad antioxidante de la vitamina C expresado como CI50% frente al ABTS



Anexo 14

Capacidad antioxidante del Trolox expresado como CI50% frente al DPPH



Anexo 15

Capacidad antioxidante del Trolox expresado como CI50% frente al ABTS

