

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Fraccionamiento de *Desmodium molliculum* (Hierba del Infante) para la determinación de la actividad antioxidante en extractos enriquecidos**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico


**Autores:**

Gisela Alexandra Merchán Muñoz

Milena Mishel Samaniego Carrión

**Director:**

Nancy Mirian Cuzco Quizhpi

ORCID:  0000-0003-0356-61920

**Cuenca, Ecuador**

2023-10-20

## Resumen

*Desmodium spp.* ha destacado frente a otros géneros de la familia Fabaceae por su variedad de usos en medicina tradicional que derivan de los metabolitos secundarios responsables de la actividad farmacológica. A pesar de que la especie *Desmodium molliculum*, conocida como Hierba del Infante, forma parte de la flora nativa de América Latina y de otros continentes la información disponible es limitada. El enfoque del estudio se dirige al uso de la técnica de fraccionamiento líquido-líquido como herramienta para obtener extractos enriquecidos usando solventes de alto poder extractivo de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides. Mediante cromatografía de capa fina (TLC) se evidenció el contenido de metabolitos de naturaleza flavonoidea. El contenido fenólico se evaluó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, y la actividad antioxidante a través de los ensayos de; poder antioxidante/reductor férrico (FRAP), reacción del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) y captación de radicales libres (DPPH). Al ser un estudio analítico transversal, se aplicó estadística descriptiva, test de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de Tukey en el análisis de las variables con nivel de significancia  $P < 0.05$ . Los resultados muestran la eficiencia del fraccionamiento líquido-líquido en la obtención de extractos enriquecidos, especialmente en la fracción metanólica (F2) y acuosa (F4) los mismos que reflejaron los más altos contenidos fenólicos y mayor capacidad antioxidante.

**Palabras clave:** partición líquido-líquido, flavonoides, compuestos fenólicos



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

**Repositorio Institucional:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

*Desmodium spp.* has stood out from other genera of the Fabaceae family for its variety of uses in traditional medicine that derive from the secondary metabolites responsible for pharmacological activity. Despite the species *Desmodium molliculum*, known as Hierba del Infante, is part of the native flora of Latin America and other continents, its available information is limited. The focus of the study is directed to the use of the liquid-liquid fractionation technique as a tool for obtaining enriched extracts, using solvents with high extractive power of phenolic compounds, mainly flavonoids. The extracts were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and it was possible to demonstrate the content of metabolites of a flavonoid nature. The phenolic content was evaluated using the Folin-Ciocalteu test, and the antioxidant activity using the tests of; antioxidant/iron reducing power (FRAP), 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid reaction (ABTS) and free radical scavenging (DPPH). This is an analytical cross-sectional study, in which descriptive statistics, one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were applied for the analysis of the variables, obtaining a significance level of  $P < 0.05$ . The results show the efficiency of the liquid-liquid fractionation in obtaining enriched extracts, especially in the methanolic (F2) and aqueous (F4) fraction, which reflected the highest phenolic contents and the highest antioxidant capacity.

**Keywords:** partition liquid-liquid, flavonoids, phenolic compounds



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

**Institutional Repository:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenidos

Introducción.....	10
Capítulo I.....	12
1. Marco teórico.....	12
1.1. Ruta metabólica.....	12
1.1.1. Metabolitos primarios.....	12
1.1.2. Metabolitos secundarios.....	12
1.2. <i>Desmodium molliculum</i> .....	18
1.2.1. Taxonomía.....	18
1.2.2. Usos tradicionales.....	19
1.2.3. Actividad farmacológica.....	20
1.3. Métodos extractivos.....	20
1.3.1. Extracción por percolación.....	21
1.3.2. Maceración.....	22
1.3.3. Proporción de la droga a base de hierbas con respecto a la preparación de droga a base de hierbas nativas (DERNATIVE: Extracto nativo).....	23
1.4. Métodos de fraccionamiento.....	23
1.4.1. Método líquido-líquido.....	23
1.5. Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	24
1.6. Actividad antioxidante.....	26
1.6.1. Generalidades.....	26
1.6.2. Métodos que evalúan la actividad antioxidante.....	26
Capítulo II.....	32
2. Materiales y métodos.....	32
2.1. Tipo de estudio y análisis estadístico.....	32
2.2. Materiales.....	32
2.2.1. Reactivos.....	32
2.2.2. Equipos.....	32
2.3. Métodos.....	33
2.3.1. Recolección, lavado y secado.....	33
2.3.2. Proceso extractivo.....	34
2.3.3. Proceso de fraccionamiento.....	34
2.3.4. Cromatografía de Capa Fina.....	37
2.3.5. Actividad antioxidante.....	37
Capítulo III.....	40
3. Resultados y discusiones.....	40
3.1. Recolección, lavado y secado.....	40
3.2. Proceso extractivo por percolación.....	40
3.2.1. Agotamiento de la droga.....	40
3.2.2. Rendimiento de la droga.....	41

<b>3.3. Fraccionamiento líquido-líquido.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4. Cromatografía en capa fina.....</b>	<b>42</b>
3.4.1. Placa cromatográfica de flavonoides en fracciones polares.....	43
3.4.2. Placa cromatográfica de flavonoides en fracciones apolares .....	46
<b>3.5. Actividad antioxidante .....</b>	<b>48</b>
3.5.1. Capacidad reductora de Folin-Ciocalteu (ensayo FCR) para cuantificación de Polifenoles Totales.....	48
3.5.2. Método de captura del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).....	51
3.5.3. Ensayo de poder reductor/antioxidante férrico (FRAP).....	53
3.5.4. Ensayo de captación de radicales libres (DPPH) (2,2-di(4-terc-octilfenil)-1-picrilhidrazilo).....	55
<b>Capítulo IV .....</b>	<b>58</b>
<b>4. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1. Conclusiones .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2. Recomendaciones .....</b>	<b>58</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>59</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo A. Muestra botánica .....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo B. Lista de materiales utilizados en la metodología .....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo C. Pruebas estadísticas aplicadas al contenido fenólico total (Técnica Folin-Ciocalteu) en función de las fracciones .....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo D. Pruebas estadísticas aplicadas a la técnica ABTS en función de las fracciones .....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo E. Pruebas estadísticas aplicadas a la técnica FRAP en función de las fracciones .....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo F. Pruebas estadísticas aplicadas a la técnica DPPH en función de las fracciones .....</b>	<b>68</b>

**Índice de figuras**

Figura 1 Estructura química del isopentano .....	13
Figura 2 Estructura química del isopreno .....	13
Figura 3 Ruta del Ácido Mevalónico y ruta del Fosfato de Metileritritol en la síntesis de terpenos .....	14
Figura 4 Estructura química de las cumarinas .....	17
Figura 5 Estructura química de los taninos .....	17
Figura 6 Estructura química de los alcaloides.....	18
Figura 7 Mecanismo de ensayo antioxidante FRAP .....	28
Figura 8 Esquema del fraccionamiento líquido-líquido .....	35
Figura 9 Agotamiento de la droga a luz visible .....	40
Figura 10 Agotamiento de la droga bajo luz ultravioleta a 366 nm.....	41
Figura 11 Cromatografía en Capa Fina de flavonoides en fracciones polares .....	43
Figura 12 Cromatografía en Capa Fina de flavonoides en fracciones apolares.....	46
Figura 13 Curva de calibración de Polifenoles Totales utilizando Ácido Gálico como patrón a 765 nm.....	49
Figura 14 Curva de calibración de técnica ABTS utilizando Trolox como patrón a 734 nm .	51
Figura 15 Curva de calibración de técnica FRAP utilizando Trolox como patrón a 593 nm .	53
Figura 16 Curva de calibración de técnica DPPH utilizando Trolox como patrón a 517 nm.	55

**Índice de tablas**

Tabla 1 Estructura de las subclases de bioflavonoides y actividad farmacológica .....	16
Tabla 2 Esquema de Cromatografía en Capa Fina con especificaciones de patrones, fases móviles y reveladores.....	37
Tabla 3 Esquema de pipeteo de la prueba Folin-Ciocalteu.....	38
Tabla 4 Esquema de pipeteo de la prueba ABTS.....	38
Tabla 5 Esquema de pipeteo de la prueba FRAP .....	39
Tabla 6 Esquema de pipeteo de la prueba DPPH.....	39
Tabla 7 Peso y rendimiento obtenido en cada partición .....	42
Tabla 8 Características de las bandas de los patrones en la placa cromatográfica de flavonoides en fracciones polares.....	44
Tabla 9 Resultados de las fracciones F1, F2, F4 y F6 en la placa cromatográfica de flavonoides en fracciones polares.....	45
Tabla 10 Características de las bandas de los patrones en la placa cromatográfica de flavonoides en fracciones apolares .....	47
Tabla 11 Resultados de las fracciones F3 y F5 en la placa cromatográfica de flavonoides en fracciones apolares.....	47
Tabla 12 Media aritmética y desviación estándar de las fracciones F1, F2, F3 y F4 en la cuantificación de Polifenoles Totales .....	49
Tabla 13 Prueba de Tukey en la cuantificación de Polifenoles Totales en función de las fracciones.....	49
Tabla 14 Media aritmética y desviación estándar de las fracciones F1, F2, F3 y F4 en método ABTS .....	52
Tabla 15 Prueba de Tukey en la técnica ABTS en función de las fracciones.....	52
Tabla 16 Media aritmética y desviación estándar de las fracciones F1, F2, F3 y F4 en método FRAP .....	54
Tabla 17 Prueba de Tukey en la técnica FRAP en función de las fracciones .....	54
Tabla 18 Media aritmética y desviación estándar de las fracciones F1, F2, F3 y F4 en método DPPH.....	55
Tabla 19 Prueba de Tukey en la técnica DPPH en función de las fracciones .....	56

## Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a mi familia que me ha apoyado en todo momento durante la elaboración de este trabajo. Con especial cariño y amor a mis padres Rosa y Oswaldo; a mis hermanos María, Gabriela, Oswaldo, Christian y Jennifer. A Andrés por brindarme todo su apoyo en la culminación de este trabajo de investigación.

Gisela

Me gustaría dedicar el presente documento de titulación a toda mi familia de manera especial a mis padres, tías y primos, que hicieron esto posible desde las cosas más pequeñas. Un profundo gracias, por la paciencia, tiempo y sobre todo esfuerzo, al saber que sin su apoyo esto no hubiera sido posible y permitiendo así concluir con esta etapa. Finalmente quiero dedicarlo a mis amigos, por apoyarme, el ánimo brindado y por el tiempo compartido cada día durante toda la carrera y ejecución del trabajo.

Milena



### **Agradecimiento**

Al concluir la presente investigación queremos expresar un sincero agradecimiento a quienes hicieron posible su realización, a las autoridades y personal de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas. En especial a los que conforman el Proyecto de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, que gracias a sus conocimientos compartidos fue posible culminar de manera satisfactoria.

Gracias especialmente a la Dra. Nancy Cuzco, tutora de tesis, por su compromiso durante el desarrollo de este trabajo de investigación. Agradecemos a la Dra. Eugenia Peñaherrera que también nos ha guiado y brindado su apoyo en el desarrollo de este proyecto. De la misma manera agradecemos a la Dra Jessica Calle, por su ayuda durante todo el proceso y ejecución de la parte práctica, por guiarnos y solventar cualquier inquietud generada. Extendemos nuestro agradecimiento al Dr. Fabián León por siempre estar a disposición durante toda la investigación y facilitarnos lograr los objetivos planteados; y sobre todo a cada uno de los docentes por los conocimientos impartidos a lo largo de toda la formación universitaria.

Milena y Gisela

## Introducción

En la actualidad, se han incrementado el número de estudios acerca del uso de flora nativa con propiedades medicinales en zonas de la región andina en América Latina. Diversos estudios han descrito acerca de las propiedades fitoquímicas de la familia Fabaceae, caracterizada por altos contenidos de polifenoles especialmente flavonoides, taninos y otros como saponinas, alcaloides, terpenos y triterpenos (Heinrich, Barnes, Gibbons & Williamson, 2012). Alara, Abdurahman y Ukaegbu (2021) mencionan que ciertos componentes fenólicos se les puede atribuir otras actividades biológicas (cicatrizante y antiséptica) diferentes a la actividad antioxidante. La actividad biológica implicada en muchos de los usos medicinales en regiones andinas radica precisamente en los altos niveles de flavonoides.

*Desmodium molliculum* es conocida comúnmente como hierba del infante, pero es llamada también amor seco, pega pega, manayupa o muña. Esta especie perteneciente a la familia Fabaceae, crece a los 1500 y 3000 metros sobre el nivel del mar (msnm) y se distribuye en diversas provincias del Ecuador como Loja, Azuay, Bolívar, Cañar, Tungurahua, Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha y Napo. Ansaloni et al. (2010) mencionan el uso etnomedicinal de *Desmodium sp.* descrito por personas expertas de comunidades de Ecuador e indican el empleo del tallo, hojas, raíz y flores en afecciones gastrointestinales, especialmente dolor estomacal e infecciones. Por otro lado, Bussmann y Sharon en 2015 en su libro de Plantas Medicinales de los Andes y la Amazonía, la mencionan como una maleza utilizada para inflamaciones externas e internas, inflamaciones de los riñones, diarrea, inflamación de los ovarios, gastritis, además de aplicaciones en heridas por su propiedad cicatrizante. Asimismo, Aguirre, Yaguana & Merino (2014) manifiestan el uso medicinal de la hierba del infante en la provincia de Loja como regulador del sangrado excesivo en la menstruación, dolor abdominal e inflamaciones.

Aunque se han reportado muchas especies de la familia Fabaceae con altos niveles de flavonoides con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, otros metabolitos secundarios como triterpenos y carotenoides pueden evidenciar las mismas actividades farmacológicas. Del mismo modo, el desarrollo de este proyecto se orienta a relacionar los usos tradicionales con su riqueza en compuestos fenólicos. Para obtener extractos enriquecidos en compuestos bioactivos se usan métodos de pretratamiento como extracción líquido-líquido, líquido-sólido y cromatografía preparativa. En este contexto, el análisis se enfocó en la técnica líquido-líquido como herramienta de fraccionamiento de la especie *Desmodium molliculum*, para lo cual se establecieron los solventes de mayor eficiencia en la extracción de compuestos

fenólicos y flavonoides, favoreciendo la obtención de extractos enriquecidos en metabolitos responsables de su acción farmacológica. Artículos demuestran los vastos estudios realizados en especies como *Desmodium gangeticum*, *Desmodium adscendens* y *Desmodium styracifolium*, sin embargo, la información acerca de *Desmodium molliculum* es limitada; por lo tanto, este estudio pretende ser la base para contribuir al desarrollo del conocimiento de esta especie (Bustamante & Cueva, 2021).

En el presente trabajo de investigación, teniendo presente lo anteriormente mencionado, se han planteado los siguientes objetivos:

## **Objetivo General**

- Obtener fracciones enriquecidas de metabolitos farmacológicamente activos

## **Objetivos específicos**

- Evaluar los solventes que ofrezcan un mayor rendimiento de flavonoides
- Determinar la actividad antioxidante de fracciones enriquecidas de flavonoides

## Capítulo I

### 1. Marco teórico

#### 1.1. Ruta metabólica

##### 1.1.1. Metabolitos primarios

Los metabolitos primarios son aquellos compuestos indispensables para el adecuado crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas; puesto que están involucrados en diversas funciones fisiológicas de las mismas. Dentro de este grupo se encuentran los lípidos, proteínas y carbohidratos, estos últimos son obtenidos como resultado de la fotosíntesis. Por otro lado, se le ha atribuido al metabolismo primario propiedades de regulación de las defensas de la planta contra patógenos, siendo las proteínas y polisacáridos los compuestos con características antivirales y, por ende, importantes en el desarrollo del sistema de defensa de las plantas (Verdecía et al., 2021; Madiha et al., 2019). Gordillo et al. en 2019 determina la composición encontrada en hojas y tallos por pruebas físico-químicas, hallándose en mayor proporción fibra (56.81%), proteínas (11.5%), cenizas (9.17%), humedad (7.71%), carbohidratos (6.78%) y grasas (4.03%).

##### 1.1.2. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios no intervienen directamente en el metabolismo de la planta y cumplen con una función enfocada hacia el mecanismo de defensa. Caracterizándose como compuestos de bajo peso molecular con gran importancia ecológica ya que participan en procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, así como en otros procesos como la simbiosis y la atracción de insectos polinizadores, entre otros. Se induce su producción en las siguientes situaciones:

- Consumo por herbívoros
- Ataque por microorganismos como virus, bacterias y hongos
- Competencia por espacio de suelo, luz y nutrientes entre diferentes especies de plantas
- Exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico

Estos metabolitos están divididos en: terpenos, compuestos fenólicos y sus derivados, y alcaloides. La biosíntesis y el almacenamiento ocurre en diferentes lugares de la célula

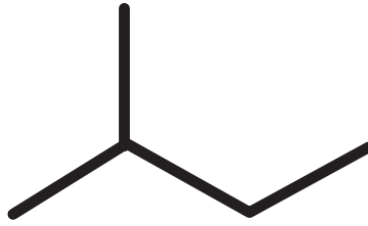
vegetal, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realizan en los plástidos; los esteroides, dolícoles y sesquiterpenos se sintetizan en el retículo endoplásmico, mientras que algunas aminas y alcaloides tienen lugar en la mitocondria. Por otro lado, los compuestos solubles en agua se almacenan en las vacuolas, en tanto que los compuestos solubles en lípidos son atrapados en estructuras especializadas como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, etc.

De igual manera hay que tener en cuenta que el crecimiento y desarrollo de las plantas son fenómenos biológicos complejos que dependen de variables genéticas y ambientales y al ser las plantas y su entorno forman un sistema complejo con la multiplicidad de interacciones factoriales. La magnitud de los factores externos de interacción rápida afecta la vida de la planta. Donde se estipula que un déficit moderado de agua estimula la síntesis de estos, dado que variaciones extremas de temperatura, así como de escasas precipitaciones, pueden arrastrar los metabolitos secundarios y la interacción de estos factores afecta la adaptabilidad de la planta a su entorno. La edad y la etapa de crecimiento de la planta generalmente tienen un impacto en el contenido, siendo la variación estacional y la desaparición en ciertas etapas sugieren una degradación de los metabolitos en la planta (Puodziunene et al., 2009).

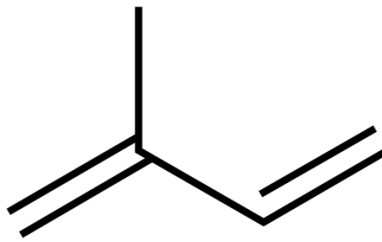
#### 1.1.2.1. Terpenos

Son llamados terpenoides o isoprenoides, este grupo está constituido por aproximadamente 40 000 moléculas diferentes, poseen gran variabilidad en su estructura; sin embargo, tienen el mismo origen biosintético. Son derivados de la unión de unidades de cinco carbonos de isopentano (figura 1) formando la unidad básica llamada isopreno (figura 2), se trata de lípidos no saponificables, ya que en su formación no intervienen los ácidos grasos. Su clasificación se basa según el número de unidades de carbono presente en su estructura. Se denomina hemiterpeno al terpenoide de 5 carbonos, monoterpeno al terpenoide de 10 carbonos, sesquiterpeno al terpenoide de 15 carbonos, diterpeno al terpenoide de 20 carbonos y, finalmente, es llamado triterpeno al terpenoide constituido por 30 carbonos. Son sintetizados a partir de metabolitos primarios por dos vías (figura 3):

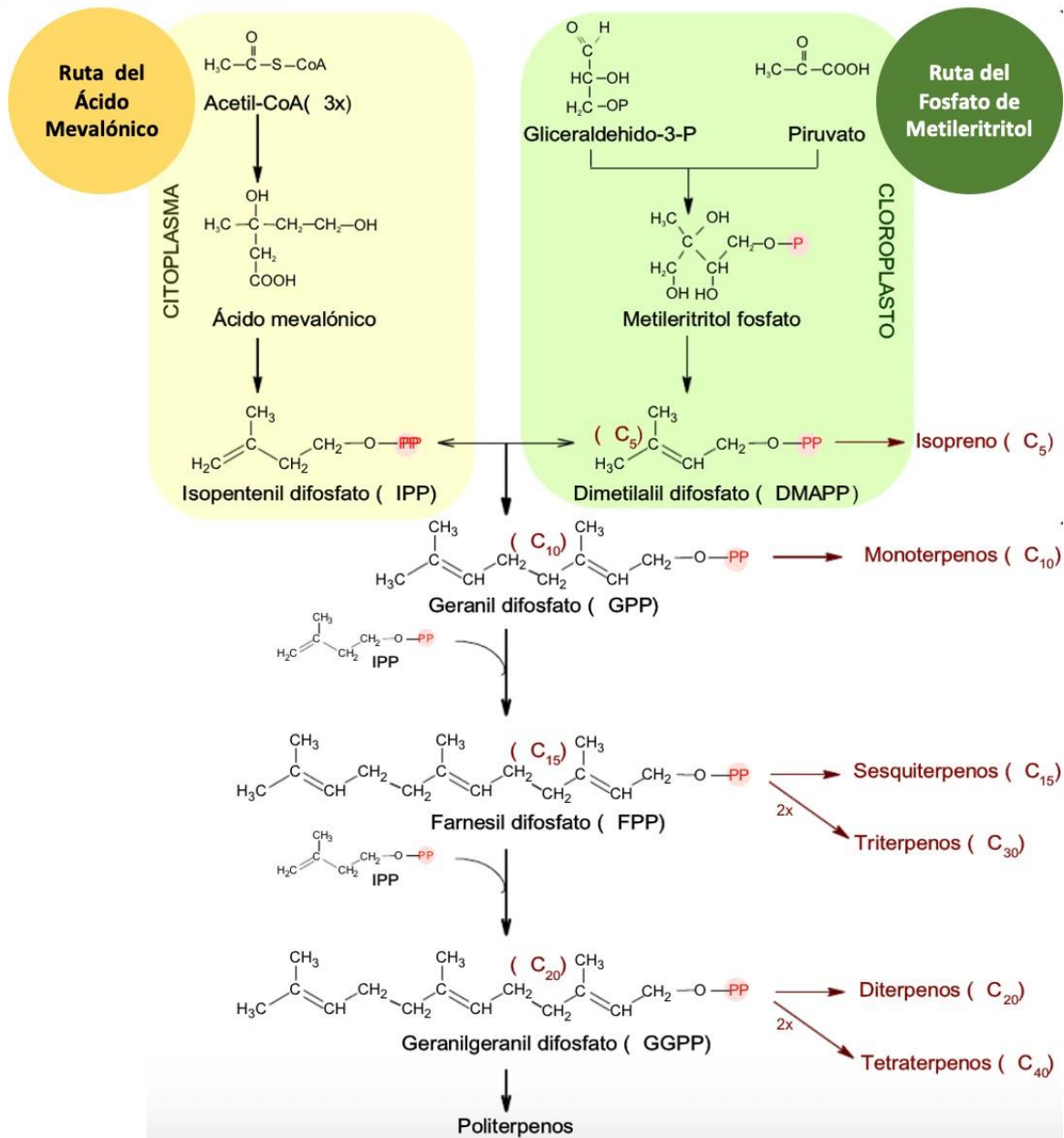
- A. Vía del ácido mevalónico: activo en el citosol donde tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona para formar difosfato de isopentenilo
- B. Vía del fosfato de metileritritol: funciones en los cloroplastos y también genera difosfato de isopentenilo



**Fuente:** Shah y Seth, 2010  
Figura 1 Estructura química del isopentano



**Fuente:** Shah y Seth, 2010  
Figura 2 Estructura química del isopreno



Fuente: Ávalos y Pérez, 2009

Figura 3 Ruta del Ácido Mevalónico y ruta del Fosfato de Metileritritol en la síntesis de terpenos

### 1.1.2.1.1. Funciones

Caracterizadas por poseer funciones biológicas y participar en el metabolismo primario y secundario de las plantas. En el metabolismo central son pigmentos fotosintéticos, transportadores de electrones, reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal, forman parte de las membranas celulares y participan en la glicosilación de proteínas. En el metabolismo secundario participan como moléculas de defensa, compuestos tóxicos y alimento disuasorio para insectos. Son capaces de atraer polinizadores en ciertas plantas (González, González & Morera, 2019).

### 1.1.2.2. Compuestos fenólicos

Son compuestos que contienen un grupo hidroxilo unido directamente a un hidrocarburo aromático, tratándose un grupo muy diverso. Los compuestos fenólicos se sintetizan en las células vegetales por la vía del ácido shikímico o la vía del malonato/acetato. La primera vía proporciona la síntesis de fenilalanina y ácido cinámico y sus derivados como fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano. La vía del poliacetato proporciona quinonas y xantonas. Las vías mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido shikímico como de la vía del poliacetato, como es el caso de los flavonoides (González, González & Morera, 2019).

#### 1.1.2.2.1. Flavonoides

Se presentan como un grupo biológico de productos naturales activos, que pertenecen a una clase importante de metabolitos secundarios de plantas de bajo peso molecular con estructura polifenólica. Dependiendo de la especie, las enzimas (isomerazas, reductasas, hidroxilasas) modifican el esqueleto básico, dando lugar a las diferentes clases de flavonoides que son bioflavonoides, isoflavonoides y neoflavonoides, donde las variaciones de clases y subclases son consecuencia del grado de insaturación, hidroxilación, oxidación, patrón de glicosilación y otras sustituciones (Santos et al., 2017). Presentan una naturaleza moderadamente polar y se encuentran naturalmente como compuestos ligados con la glucosa conjugada (glucósidos) y sin ésta, adheridos como agliconas. Otros factores de su naturaleza química enfatizan que algunos de estos grupos hidroxilo frecuentemente están metilados, acetilados, sulfatados y prenilados (Colegate & Molyneux, 2007). Cuando se forman glucósidos, el enlace glucosídico se ubica en la posición 3 o 7, (L-ramnosa, D-glucosa, glucosa ramnosa, galactosa, arabinosa). Estos cambios a menudo alteran su solubilidad, reactividad y estabilidad (Symonowicz & Kolanek, 2012).

#### Iso-Flavonoides

Combaten enfermedades como osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, prevención y tratamiento del cáncer relacionado con las hormonas. Algunos son la genisteína, daidzeína, gliciteína, biocanina A y formononetina (Kumar & Pandey, 2013).

#### Neo-Flavonoides

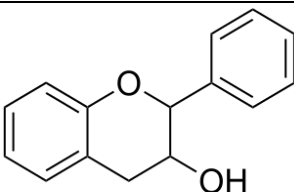
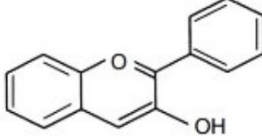
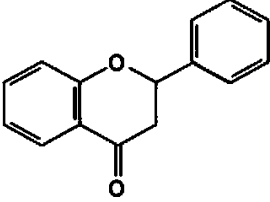
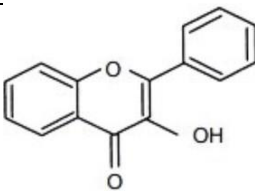
Se subdividen en dos grupos, 4-fenilcumarinas (grupo dalbergina) y compuestos de difenilalilo (grupo latifolina). La neoflavona más abundante es la Dalbergina, exhiben propiedades terapéuticas como antialérgicas, antiinflamatorias, antiosteoporóticas, antimicrobianas y antioxidantes (Brodowska, 2017).

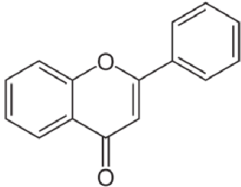
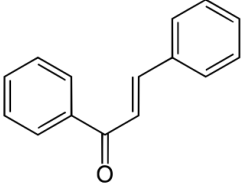
#### Bioflavonoides

---



Se pueden subdividir en 6 diferentes subclases según las características estructurales del anillo en C. (Brodowska, 2017). Los flavanoles actúan a través de sus productos metabólicos y previenen la oxidación de proteínas al captar radicales libres, poseen propiedades antiateroscleróticas, frenan la proliferación celular e inducen la apoptosis. Las antocianidinas son inestables con propiedades antioxidantes exógenos o intrínsecos debido a los hidroxilos libres alrededor del anillo. Las flavanonas son antioxidantes al aumentar la actividad de enzimas antioxidantes, mejora el sistema inmunitario y evitan enfermedades en tejidos causados por la oxidación e inhiben la producción de macrófagos. Los flavonoles mantienen las funciones hepáticas involucradas en la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos e inhiben la hepatocarcinogénesis mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS), y disminuyen el riesgo de cáncer gástrico. Las flavonas reducen la inflamación contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares, neuroinflamación y beneficios relacionados con la transcripción de genes, expresión de proteínas y niveles de actividad enzimática. Las chalconas poseen efectos antioxidantes, antibacterianos, antiulcerosos, antivirales, y anticancerígenos, son precursores de flavonoides e isoflavonoides (Shen et al., 2022; Ramesh et al., 2021; Kumar & Pandey, 2013; Symonowicz, & Kolanek, 2012; Hassan et al., 2014).

Subclase	Estructura química	Función
Flavanoles		Propiedades antiateroscleróticas, frenan proliferación celular e inducen apoptosis
Antocianidinas		Propiedades antioxidantes
Flavanonas		Capacidad antioxidante y mejoran el sistema inmunitario.
Flavonoles		Funciones hepáticas e inhiben la hepatocarcinogénesis por ROS y disminuyen el riesgo de cáncer gástrico.

Flavonas		Reducen la inflamación contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neuroinflamación
Chalconas		Efectos antioxidantes, antibacteriano, antiulcerosos, antivirales y anticancerígenos.

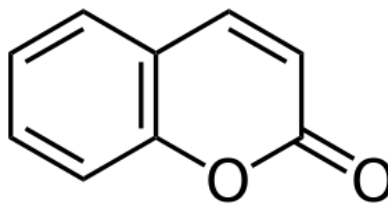
**ROS:** Especies reactivas del oxígeno

**Fuente:** Ávalos y Pérez, 2009

Tabla 1 Estructura de las subclases de bioflavonoides y actividad farmacológica

#### 1.1.2.2.2. Cumarinas

Se trata de compuestos solubles en alcoholes y solventes orgánicos, en medio alcalino sufren hidrólisis generando la formación de sales y solubilización de la misma. Frente a la luz ultravioleta presenta fluorescencia característica, presenta coloraciones entre azul, amarillo o morado. Dentro de la actividad biológica, las cumarinas han sido estudiadas por sus propiedades cardioprotectoras, así como propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Carvalho, 2013).

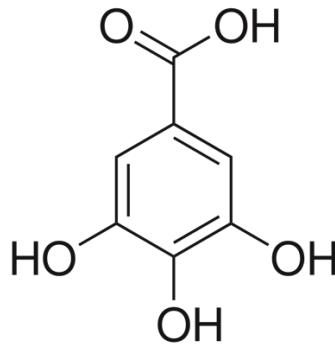


**Fuente:** Shah y Seth, 2010

Figura 4 Estructura química de las cumarinas

#### 1.1.2.2.3. Taninos

Los taninos producidos de forma natural pueden ser encontrados en la corteza, hojas, duramen y raíces de los árboles, se dividen en dos grupos, los hidrolizables y los condensables. Los primeros son aquellos de menor peso molecular y susceptibles a ser hidrolizados, mientras que los segundos son de alto peso molecular e incapaces de ser hidrolizados. La característica positiva de los taninos hidrolizables es que permiten una liberación gradual de los componentes activos que cumplen con actividades biológicas, tales como antibiótica, antioxidante, antimutagénico, y cicatrizante (Gomes et al., 2021).



Fuente: Shah y Seth, 2010

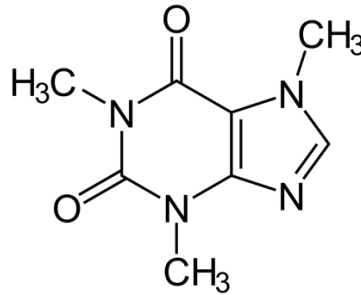
Figura 5 Estructura química de los taninos

#### 1.1.2.2.4. Funciones

La principal función es actuar como antioxidante, ya que tienen una gran capacidad para oxidarse. Actúan como inhibidores del crecimiento vegetal, las semillas acumulan gran cantidad de fenoles que actúan como filtro para que el oxígeno no llegue al embrión e inhiben su germinación. Los fenoles pueden también acumularse en la superficie de las hojas, capturando hasta el 90% de radiación ultravioleta. Los fenoles confieren aromas y colores a los frutos otorgándoles una apariencia apetecible a los herbívoros, favoreciendo a la dispersión de semillas. Los fenoles protegen a las plantas al generar sabores amargos o texturas desagradables para los depredadores (González, González & Morera, 2019).

#### 1.1.2.3. Alcaloides

Son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides, e inclusive pueden derivarse de purinas y acetato de los policétidos. La síntesis de los alcaloides responde a la herida producida por insectos depredadores, por lo tanto, son compuestos de carácter tóxico. Los alcaloides se pueden dividir en: isoquinolólicos, quinolizidínicos, pirrolizidínicos, tropánicos e indólicos. La concentración de alcaloides varía considerablemente de una parte a otra de la misma planta, e incluso ser nulo en algunas partes de la misma. Se clasifican en alcaloides puros, protoalcaloides y pseudoalcaloides. La mayoría de alcaloides entran dentro de los alcaloides puros, contienen un nitrógeno intracíclico, carácter básico y de alta reactividad. Los protoalcaloides constituyen un grupo más reducido, el átomo de nitrógeno no forma parte del heterociclo y derivan de L-tirosina, L-triptófano y L-ornitina. Los pseudoalcaloides contienen anillos heterocíclicos con nitrógeno, pero no se derivan de aminoácidos, se forman por incorporación posterior de nitrógeno a compuestos originalmente libre de este elemento (González, González & Morera, 2019).



**Fuente:** Shah y Seth, 2010

Figura 6 Estructura química de los alcaloides

#### 1.1.2.3.1. Funciones

Poseen un efecto tóxico al bloquear neuroreceptores, intermediarios de la transducción de la señal neuronal y canales iónicos de vertebrados e insectos. Los efectos inhibitorios del crecimiento del microorganismo patógeno se generan por su capacidad de intercalarse con el ADN, detener la síntesis de proteínas, inducir apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (González, González & Morera, 2019).

### 1.2. *Desmodium molliculum*

#### 1.2.1. Taxonomía

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Rosidae

**Orden:** Fabales

**Familia:** Fabaceae

**Género:** *Desmodium*

**Especie:** *Desmodium molliculum*

**Nombre Común:** Manayupa/Hierba del infante

El género *Desmodium* perteneciente a Papilionaceae (Familia Fabaceae), con la mayoría de sus plantas expresadas como hierbas, arbustos (Leguminosas discretas) o subarbustos, rara vez árboles, siendo muy escasas flores brillantes o grandes. Fabaceae es la tercera familia más grande en lo que respecta en número de especies con flores, detrás de Orchidaceae y Asteraceae (Jayaram, & Srivastava, 2016), comúnmente se conoce como familia de leguminosas, familia de los guisantes, de los frijoles o autoestopistas. Se encuentra que los miembros de la familia crecen en una variedad de condiciones climáticas y zonas como templadas, húmedas, áridas, tierras altas y sabanas (Asfaw, & Abebe, 2021).

### 1.2.2. Usos tradicionales

*Desmodium spp.* fue frecuentemente reportada en la literatura como parte del grupo de plantas etnomedicinales, con usos para tratamientos de la gonorrea, diarreas, dolores corporales, micción excesiva, infecciones hepáticas e inflamaciones de los ovarios. También según encuestas etnobotánicas para este género con propiedades sedativas, para aliviar inflamaciones respiratorias, infecciones persistentes de la piel, micosis y acné, antiséptico, dolor de estómago y gastritis, antiinflamatorio, cicatrizante, depurativo, antimicrobiano y anticonceptivo, empleada tanto interna como externamente en la medicina tradicional de América durante un largo período de tiempo (Ma et al., 2011; Joshi, Hakim, & Patel, 2023).

Se ha reportado el uso de *Desmodium molliculum* como diurética y antiinflamatoria para mejorar la función de los riñones e inflamación renal, dolores musculares, desinflamante del tracto digestivo e inflamación de ovarios, contra enfermedades hepáticas, en vías biliares y urinarias, por lo que estos efectos podrían explicarse debido a la acción de los flavonoides que inhiben la coagulación, formación de trombos y/o agregación plaquetaria, reduciendo así el riesgo de aterosclerosis, presión arterial y consecuentemente el riesgo de hipertensión. Reducen de igual manera el estrés oxidativo al eliminar los radicales libres, inhiben las actividades proinflamatorias de las enzimas involucradas en la producción de radicales libres, como la ciclooxigenasa, lipoxigenasa y óxido nítrico sintasa inducible y resultan en la reducción de las vías de señalización en las células de los vasos sanguíneos. Modifican mecanismos inflamatorios vasculares, mejoran la función endotelial y capilar, modifican los niveles de lípidos en la sangre, regulan el metabolismo de carbohidratos y glucosa. Por otro lado, en el tracto digestivo las saponinas presentes, producen una emulsión de moléculas solubles en grasa, específicamente con los ácidos biliares y ayudan a su eliminación, evitando

la reabsorción del colesterol, por lo que podrían describirse como un depurativo al contrarrestar varias toxinas del cuerpo (Olascuaga-Castillo et al., 2020; Manzione et al., 2022).

Exhibe así un amplio espectro de actividades farmacológicas documentadas como actividades cicatrizantes, antiasmáticas, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, antibacterianas, anticonceptivas, antipirética y analgésica, efecto sobre el sistema cardiovascular e inmunomodulador, actividad antimicrobiana y antiparasitaria, citotóxica, antinefrolítica, antidiabética, hipotensora, antinefrolítica, antianafiláctica, antiulcerogénica, antifibrótica y antioxidante. En general, el modo habitual de la preparación son las partes aéreas de la planta (hojas), seguida de las raíces, generalmente por decocción, se extrae con agua para administrarse por vía oral, mientras que la hoja fresca se muele directamente para obtener jugo y se usa por vía tópica para aliviar dolores musculares (Manzione et al., 2022).

En China, *Desmodium spp.* es utilizada con fines etnomedicinales manifestando su uso del género para aliviar el calor interno o fiebre, neutralizar toxinas, inhibir el dolor, restablecer la circulación sanguínea, aliviar la tos y disnea. En India, estudios etnofarmacológicos mostraron espectros de actividades antileishmania, antiviral, antioxidante, inmunomodulador, antiulceroso, cardioprotector, antidiabético y hepatoprotector. Actualmente, en la medicina China e India, las especies de *Desmodium* se utilizan para el abordaje de fiebre, abscesos, resfriado común, heridas, tos, desnutrición infantil, disentería, enfermedades urinarias, parotiditis, colecistitis, paludismo y encefalitis epidémica. Basado en el sistema medicinal de la China y de la India, la mayoría de las especies se pueden usar además para tratar enfermedades como pirexia, reumatismo, hemoptisis, hepatitis icterica, faringitis, etc. En la agricultura inclusive se ha encontrado que las especies de *Desmodium* que forman una simbiosis fijadora de nitrógeno desempeñan un papel importante, ya que son muy eficaces para suprimir las malas hierbas y mejorar la fertilidad del suelo. Además, proporciona forraje de alto valor para los animales, lo que induce la producción de leche y amplía las fuentes de ingresos para este sector (Manzione et al., 2022; Acero-Carrión et al., 2012).

### 1.2.3. Actividad farmacológica

Diferentes partes de esta especie se caracterizan por diferentes agrupaciones de compuestos bioactivos. Las investigaciones fitoquímicas evidenciaron que los flavonoides y alcaloides son los principales metabolitos presentes en este género, siendo principalmente rico en flavonoides hasta el momento 81 como flavonas, en especial flavonoides, 8-prenil-lactona, flavonoles, flavan-3-oles y flavanonoles principalmente, y con mayor énfasis en isoflavonoides del tipo isoflavonas, isoflavanonas, pterocarpanos y cumaronocromonas (Usman et al., 2022).

Asimismo 40 alcaloides (indol, feniletilamina, pirrolidina, amida y alquilamina simple), siendo los principales encontrados en *Desmodium*. Conjuntamente se han aislado y también caracterizado terpenoides, esteroides, fenoles, fenilpropanoides, glucósidos y aceites volátiles que representan un amplio espectro de clases de metabolitos secundarios de sus especies (Manzione et al., 2022). Además, diversas investigaciones han observado y apuntado que los tipos de metabolitos vegetales y las cantidades pueden variar de una especie a otra y dependen de factores ambientales como el estrés por el que han sido sometidas debido a sequía, efecto de la temperatura y luz en el proceso de la biosíntesis, así como el desarrollo de compuestos bioactivos que apoyen su actividad biológica. Los grupos alcaloides y fenólicos, que comprenden la mayoría de dichos compuestos en las especies de *Desmodium*, pueden ser la razón de varias actividades farmacológicas, donde destacan antidiabéticos, antimicrobianos, antiinflamatorios, anticancerígenos y antioxidantes (Joshi, Hakim, & Patel, 2023).

### 1.3. Métodos extractivos

En el proceso de extracción hay que distinguir fundamentalmente:

**Fase de lavado o humectación:** Inicia con el material vegetal seco, donde las células liberadas por las operaciones de trituración entran en contacto directo con el disolvente. Los componentes celulares son arrastrados por el disolvente. Una parte de las sustancias activas pasa casi instantáneamente al disolvente, cuanto más fino sea el polvo de la droga más fácilmente cursa este proceso. Para disolver los componentes de las células intactas, el disolvente tiene que primero penetrar las membranas celulares arrugadas y secas en la droga, deben pasar a un estado que permita el paso del disolvente al interior mediante el esponjamiento, que produce un aumento del volumen de la membrana. La capacidad que tienen las sustancias que constituyen el esqueleto de la estructura celulósica para ligar moléculas de líquido, dan lugar a que esponje, produciendo espacios intermicelares que permiten el paso del líquido extractivo hasta el interior (Voigt, & Bornschein, 1982; Swami et al., 2008).

**Fase de extracción:** Las sustancias endocelulares se liberan y se presentan en forma cristalina o amorfa, debido al disolvente que penetra puede producir que pierdan su solubilidad, pero en cuanto sean disueltas molecularmente, se desplazan por difusión por los espacios intermicelares al líquido extractivo a través de la membrana. Dicho proceso hasta alcanzar el equilibrio de concentración entre el interior y exterior; y los coloides podrán ser transportados a través de la membrana celular dependiendo de la amplitud de los poros.

La fuerza motriz es el gradiente de concentración entre la solución del interior celular y el líquido extractivo del exterior, todavía libre de sustancias activas. Dichos fenómenos descritos

tienen lugar, generalmente en los procedimientos de extracción tanto maceración como para percolación (Voigt, & Bornschein, 1982; Swami et al., 2008).

### 1.3.1. Extracción por percolación

Es un procedimiento empleado para la separación de compuestos activos del extracto líquido, es un método eficiente de extracción, adecuado para tamaños de muestra medianos a grandes. El aparato utilizado es el percolador, recipiente de vidrio en forma de cono estrecho con abertura en ambos extremos, para así acomodar la adición y extracción de material vegetal, y una válvula en la base para regular el flujo de solvente.

Mediante la acción disolvente de un líquido apropiado, el cual atraviesa la columna de polvo (droga) en sentido descendente y fluye por la parte inferior, con esto se produce un desequilibrio entre las concentraciones de la droga y del disolvente, que facilita la total salida de los principios activos. Renovando constantemente el líquido, se consigue prácticamente una maceración progresiva, consiguiendo el total agotamiento de la droga, ya que no se logra un equilibrio de contracciones entre la solución endocelular (droga) y el líquido extracelular (disolvente) y se obtiene teóricamente una extracción total, resultado del aporte constante de disolvente nuevo y al continuo descenso de concentración que el proceso implica (Voigt, & Bornschein, 1982; Fauli, 1993).

Las ventajas de este tipo de extracción frente a los demás, es que este destaca por requerir menor tiempo para la extracción si se le compara con la maceración, de igual manera permite la extracción de componentes termolábiles, al no necesitar temperatura elevadas, por lo que es adecuado para drogas vegetales que presentan principios activos de tales características. Además de una extracción más completa, ya que se consigue un agotamiento del material vegetal, evitando pérdidas y maximizando los resultados del proceso (Rasul, 2018).

### 1.3.2. Maceración

La maceración es un método extractivo sólido-líquido que se caracteriza por su simplicidad y que es utilizado debido a su configuración menos experimental, dado que no exige de operador cualificado, presenta un bajo costo, además de ser un proceso de ahorro de energía. A su vez, para ciertas sustancias que son menos solubles en solventes y requieren solo de un contacto prolongado con el solvente adecuado, siendo un método idóneo tanto para la extracción inicial como a granel. Por otro lado, como la extracción se realiza a temperatura ambiente es menos probable que provoque la degradación de metabolitos termolábiles (Sridhar et al., 2021).

La velocidad de agitación y el tiempo son los dos factores importantes a considerar en esta



técnica, puesto que la velocidad al variar puede causar la formación de un vórtice que conduce a una turbulencia. Debido a esto, es posible un aumento en la tasa de transferencia de masa y por tanto, la velocidad del agitador debe mantenerse entre 180 y 240 rpm para evitar grandes variaciones en la concentración de equilibrio y en el coeficiente de difusión. Durante el proceso de la maceración agitada ocasionalmente facilita la extracción por aumentar la difusión y eliminar la solución concentrada de la superficie de la muestra para traer nuevo solvente al menstuo y obtener un mayor rendimiento de extracción (Rasul, 2018).

Implica el uso disolvente de un líquido idóneo, que traspasa la droga triturada, produciendo una disolución de las sustancias endocelulares liberadas por la destrucción de células y son extraídas por difusión de las sustancias que permanecen aún en el interior de las células y las que han pasado al líquido exterior. El estado de reposo durante este proceso implica una disminución de la difusión de las sustancias activas por lo que teóricamente no es posible el agotamiento de la droga, ya que se llega a un equilibrio de contracciones entre la solución endocelular (droga) y el líquido extracelular (disolvente) a consecuencia de no ir renovando constantemente el líquido, se consigue un método de maceración simple (Voigt, & Bornschein, 1982; Fauli, 1993).

Este método destaca por no requerir el uso de algún equipo y/o instrumentación sofisticada, sino que al contrato requiere utensilios fácilmente accesibles, con lo que correspondientemente no se requiere de un operador que presente experticia en dicha área. Asimismo, no involucra el gasto de energía y en cuanto a la extracción de ciertas sustancias que son menos solubles en solventes y requieren solo un contacto prolongado con el solvente (Rasul, 2018).

Extracción con disolvente asistida por ultrasonidos es un método de maceración modificado en el que la extracción se facilita mediante el uso de ultrasonidos (20 kHz). El baño ultrasónico induce una tensión mecánica en las células a través de la producción de cavitaciones en la muestra. La descomposición celular aumenta la solubilización de metabolitos en el solvente y mejora los rendimientos de extracción (Visht, & Chaturvedi, 2012; Azmir et al., 2013). Se aplica comúnmente para facilitar la extracción de metabolitos intracelulares de cultivos de las células vegetales, ya que proporcionan una mayor penetración del solvente en los materiales celulares, mejoran la transferencia de masa por los efectos de la micro-transmisión, y se produce la ruptura de las paredes celulares biológicas que facilitan la liberación del contenido celular. En general, se reconoce como una técnica de extracción eficiente que reduce notoriamente los tiempos, aumenta los rendimientos y la calidad del extracto, donde rara vez se aplica a la extracción a gran escala, puesto que se utiliza comúnmente para la extracción inicial de una pequeña cantidad de material (Bankova, VTrusheva, & Popova, 2021).

### 1.3.3. Proporción de la droga a base de hierbas con respecto a la preparación de droga a base de hierbas nativas (DERNATIVE: Extracto nativo)

La proporción de extracto de fármaco o  $DER_{native}$  es un criterio importante para la caracterización de una preparación a base de hierbas, siendo la relación entre la masa de la droga a base de hierbas o material de partida (sustancia herbal) y la masa de la preparación de la droga a base de hierbas nativas resultante o extracto nativo (preparación herbal), donde resalta el interés de la sustancia vegetal en la preparación del extracto. Empleando para esto la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Droga herbaria (Kg)}}{\text{Preparación a base de hierbas de drogas nativas (Kg)}} = \frac{X}{1}$$

En la fórmula la masa de la preparación de la droga a base de hierbas nativas se iguala a uno, es decir, frente a un  $DER_{\text{native}}$  de 2:1 se necesitan dos partes de la droga a base de hierbas y así obtener una parte de la preparación de la droga a base de hierbas nativas. En consecuencia, es el valor recíproco de la cantidad de materia extraíble que se obtiene con un solvente de extracción definido y un procedimiento de extracción validado. Caracterizándose por una relación inversamente proporcional, a valores altos para el  $DER_{\text{native}}$  se obtienen cantidades bajas de materia extraíble y a valores bajos se logra una medida de materia extraíble (Gaedcke, & Steinhoff, 2003).

Además, la determinación del contenido de residuo seco (sustancia seca) realizada según la monografía de las farmacopeas para "Extractos" no es lo suficientemente precisa, por lo que la cantidad de extracto resultante y el valor del  $DER_{\text{native}}$  resultante puede estar erróneo. Cuanto más pequeño es el lote, mayores son las pérdidas de producción, razón por la cual puede cambiar durante el aumento de escala, ya que las pérdidas son mucho menores a gran escala en comparación a la fase de desarrollo. Sin embargo, este cambio no significa una variación de la composición cualitativa y cuantitativa del extracto, porque se produce después de la finalización de la extracción. Por lo tanto, no puede interpretarse como un cambio en la sustancia activa (Gaedcke, & Steinhoff, 2003).

El  $DER_{\text{native}}$  se expresa correctamente en números enteros y los decimales calculados exactamente sugieren una precisión no realista a gran escala en la práctica. Deben redondearse hacia arriba o hacia abajo, puesto que el origen natural del material de partida a base de hierbas varía de un lote a otro, especialmente en casos de bajos contenidos de materia extraíble, el rango del  $DER_{\text{native}}$  parece ser extremadamente amplio. Dichos rangos son inevitables, incluso en el caso de un cultivo controlado del material de partida a base de hierbas, la cantidad y composición del extracto nativo y el  $DER_{\text{native}}$  están influenciadas principalmente por los siguientes parámetros: sustancia herbal inicial, solvente de extracción, procedimiento de fabricación y aparato de fabricación (Vlietinck, Pieters, & Apers, 2009).

#### 1.4. Métodos de fraccionamiento

##### 1.4.1. Método líquido-líquido

Un producto crudo natural presenta una concentración de un gran número de analitos, con propiedades físicas y químicas diversas. La técnica líquido-líquido obtiene fracciones groseras, separando los analitos según la polaridad, el uso de diversos solventes se basa en la estructura y características del grupo de metabolitos secundarios de interés. La inmiscibilidad de los dos solventes a utilizar junto con el extracto seco permite establecer un coeficiente de partición, que indica la cantidad constante del analito en las fases. Al mismo

tiempo, el contenido de metabolitos se separa hacia los distintos solventes según su afinidad (Otsuka, 2006).

Esta extracción sigue siendo una de las técnicas más utilizadas, principalmente por su facilidad de uso, eficiencia y amplia aplicabilidad. La selección de los solventes dependerá de la naturaleza del compuesto químico a extraer a partir de una primera extracción cruda. Los disolventes de extracción comúnmente utilizados son alcoholes (metanol, etanol), acetona, éter dietílico y acetato de etilo. Sin embargo, en casos donde no se pueden extraer completamente con disolventes orgánicos puros, se recomiendan mezclas de alcohol-agua o acetona-agua. Los solventes menos polares (diclorometano, cloroformo, hexano, benceno) son adecuados para la extracción de compuestos de baja polaridad (ceras, aceites, esteroides, clorofila) de la matriz vegetal. En el caso de que los compuestos sean de polaridad media se emplea acetato de etilo, y en los de polaridad elevada se utiliza etanol y n-butanol. Para extraer polifenoles de bajo peso molecular el solvente de elección es metanol y en polifenoles de alto peso molecular la acetona (Brglez et al., 2016; Hernández et al., 2019).

- **Partición entre disolventes inmiscibles:** Un extracto de producto natural crudo es generalmente una mezcla extremadamente complicada de varios compuestos que poseen propiedades químicas y físicas variables. La estrategia para separar se basa en dichas propiedades para separar inicialmente en varios grupos químicos. Sin embargo, en algunos casos, a partir de la búsqueda bibliográfica, es posible predecir los tipos de compuestos que podrían estar presentes en un extracto en particular y solventes adecuados para extraer clases específicas de compuestos (Otsuka, 2006; Colegate, & Molyneux, 2007).

Otros factores, como el pH, temperatura, relación de volumen de muestra a disolvente y el número y los intervalos de tiempo de los pasos de extracción individuales influyen en el procedimiento de extracción. Las extracciones se repiten, casi invariablemente, dos o tres veces y los extractos se combinan (Stalikas, 2007).

### 1.5. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La cromatografía plana utiliza la separación de mezclas de compuestos orgánicos en capas delgadas de Silica gel y Alúmina, recubiertas de láminas de vidrio, plástico o aluminio. La forma más utilizada es la cromatografía en capa fina (TLC), donde la separación se efectúa mediante la aplicación de una mezcla o extracto en forma de mancha o una línea delgada sobre una placa con un espesor de 0.2 mm, la placa se coloca en la cámara cromatográfica con suficiente solvente para humedecer el borde inferior de la placa, pero no suficiente para humedecer la parte donde se aplicaron las manchas (origen) (Kumar, Jyotirmayee, & Sarangi,

2013). El principio es la distribución de un compuesto entre una fase fija sólida (capa delgada) aplicada a una placa y una fase móvil líquida (disolvente de elución) que se mueve sobre la fase sólida. La separación de los componentes de la muestra se genera por el fenómeno de adsorción, donde el analito de la fase móvil entra en contacto con la fase estacionaria y mediante fuerza física se adhiere al mismo.

El solvente eluye a través de las partículas en la placa por acción capilar y a medida que este eluye, cada compuesto permanecerá con la fase sólida o se disolverá en el solvente y subirá por la placa, la acción producida resultará de las propiedades físicas del compuesto individual y dependerá de su estructura molecular (grupos funcionales). Basándose en la regla de solubilidad "lo similar disuelve a lo similar". Cuanto más similares sean las propiedades del compuesto a la fase móvil, más tiempo permanecerá en esta, por lo que transportará los compuestos más solubles más arriba en la placa y los compuestos menos solubles de dicha fase y con mayor afinidad con las partículas en la placa se quedarán atrás sin ser arrastrados (Bele, & Khale, 2011).

Las ventajas en la cromatografía en capa fina es la utilización de pequeñas cantidades de muestras, patrones y reactivos; identificar diversos analitos en una misma corrida, análisis de la muestra y el patrón al mismo tiempo, ofrece facilidad para ajustar y acondicionar los parámetros operativos; por último, es una herramienta de bajo costo (Vallejo, Barros & Anaya, 2021).

Generalmente se utiliza una fase estacionaria de sílica gel y como fase móvil una mezcla de solventes de distinta polaridad que permitirá la elución de los metabolitos investigados. Un factor en la cuantificación de la migración de un compuesto en un sistema solvente y solvente particular es el valor  $R_f$ , definido como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia compuesta desde el punto medio del origen}}{\text{Distancia del frente del solvente desde el origen}}$$

Los valores  $R_f$  son siempre proporciones, nunca mayores a 1, y varían según el sistema solvente. Como consecuencia de la elución, los compuestos de una mezcla se separan según sus polaridades relativas según la afinidad con el solvente (Colegate, & Molyneux, 2007).

### **Proceso de detección**

En la etapa analítica y preparativa, la detección efectiva es crucial para obtener compuestos puros, caso contrario resultará en una baja recuperación del producto proveniente del adsorbente. La detección suele ser de dos tipos: no destructiva, en la que los compuestos se pueden recuperar del sorbente (ultravioleta), y destructiva, donde los compuestos están contaminados por el reactivo de detección y no se pueden recuperar del sorbente (por

pulverización).

- **Detección ultravioleta:** Implica el uso de compuestos activos UV (indicadores) que se incorporan al adsorbente de las placas, con un indicador UV de 254 nm, que generalmente es un silicato de zinc activado con manganeso, y emitirá una luz verde pálido, mientras que bajo una onda larga a 366 nm, un indicador distinto emitirá una luz violeta pálida. Siendo así, que los compuestos que absorben la luz a 254 o 366 nm aparecerán como manchas oscuras contra un fondo claro al momento en que la luz ultravioleta incide sobre la placa. La principal desventaja de este tipo de visualización es que los compuestos que no absorben a 254 o 366 nm serán invisibles y requerirán detección por pulverización; sin embargo este método no es destructivo, y la detección de compuestos se puede observar fácilmente a través de un proceso de separación (Colegate, & Molyneux, 2007).
- **Detección de pulverización:** Se basa en una reacción de color entre el compuesto en la placa de TLC y un reactivo de pulverización (tinción) introducido en la placa como una fina niebla de un bote de pulverización. La mayoría son reactivos universales y reaccionan con muchas clases de productos naturales, como es el caso del reactivo de Dragendorff, útil para la detección de alcaloides, en el caso de flavonoides con el reactivo de productos naturales y el reactivo de Berlín para polifenoles y taninos. En algunos casos, se requiere calor para ayudar a la reacción del color. Además, la mayor parte de la placa debe estar cubierta y solo una proporción del borde (2 cm) rociada con reactivo, marcada con una línea de 2 cm desde el borde de la placa, para así evitar que el reactivo rociado corrosivo no migre al sorbente y dañe los compuestos (Colegate, & Molyneux, 2007).

## 1.6. Actividad antioxidante

### 1.6.1. Generalidades

Los radicales libres son especies químicas que se caracterizan por poseer un electrón desapareado en su última orbita, razón por la cual se vuelven altamente reactivos a moléculas vecinas. Causan alteraciones celulares al interactuar químicamente con otras moléculas como lípidos, carbohidratos, proteínas o ácido nucleicos, expresándose como patologías o enfermedades crónicas no transmisibles (Granados, Tejada & León, 2021). Los compuestos antioxidantes a bajas concentraciones tienen la capacidad de evitar o retrasar la oxidación del sustrato oxidable, es decir, neutralizan dichos radicales libres protegiendo así la integridad del sustrato. Los principales mecanismos de las sustancias antioxidantes consisten en la donación de átomos de hidrógenos, transferir o ceder electrones individuales y la quelación

de metales de transición (Arias et al., 2022).

Los extractos botánicos representan una fuente rica en compuestos antioxidantes, siendo los metabolitos secundarios sus principales constituyentes, tales como polifenoles, flavonoides, esteroides, esteroides y terpenos. Estos compuestos cumplen con un papel protector frente a un amplio número de enfermedades. Asimismo, son capaces de proteger la integridad de la planta, participando como un mecanismo de defensa, contra agentes ambientales bióticos y abióticos, favoreciendo su supervivencia dentro del entorno (Hernández et al., 2022).

### 1.6.2. Métodos que evalúan la actividad antioxidante

#### 1.6.2.1. Capacidad reductora de Folin-Ciocalteu (ensayo FCR) para cuantificación de Polifenoles Totales

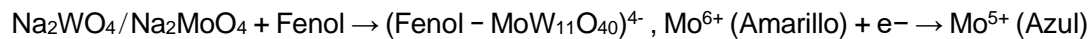
La prueba de Folin-Ciocalteu es un método conocido destinado a determinar el contenido fenólico total (TPC). En la actualidad, la prueba se usa para cuantificar polifenoles en extractos derivados de plantas. El TPC en realidad no es un método antioxidante, puesto que a veces se expresan como equivalentes de ácido cafeico, catequina, ácido clorogénico o ácido ferúlico, siendo el ácido gálico el estándar de referencia comúnmente utilizado, y donde los resultados se expresan como equivalente de ácido gálico (Munteanu, & Apetrei, 2021). Sin embargo, la alta cantidad de contenido fenólico se asocia con una alta capacidad antioxidante. Por lo tanto, este ensayo es un parámetro importante para la determinación de la capacidad antioxidante total en diversos extractos de hierbas, especias, frutas, cereales y legumbres, entre otros (Sánchez-Rangel et al., 2013).

FCR es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato que se utiliza para el ensayo colorimétrico de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Funciona midiendo la cantidad de sustancia que se está analizando necesaria para inhibir la oxidación del reactivo. El FCR se puede preparar disolviendo tungstato de sodio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) con molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en agua destilada ultrapura seguido de acidificación con HCl concentrado y ácido ortofosfórico al 85 %. La solución se hierve durante 10 h y se le añade sulfato de litio ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) para una solución de color amarillo intenso resultante denominada FCR (Munteanu, & Apetrei, 2021; Gülcin, 2020).

El sistema de prueba es la mezcla de tungstato y molibdato en un medio altamente básico (5-10 % de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  acuoso). Los fenólicos se oxidan energéticamente en medio básico dando como resultado la formación de  $\text{O}_2$ , que a su vez reacciona con molibdato con formación de óxido de molibdeno,  $\text{MoO}_4^+$  que tiene una absorbancia muy intensa cerca de 750 nm. El centro de molibdeno en los complejos generalmente se acepta como el sitio de reducción, donde el ion Molibdeno al aceptar un electrón donado por el antioxidante fenólico (Gülcin,



2020).



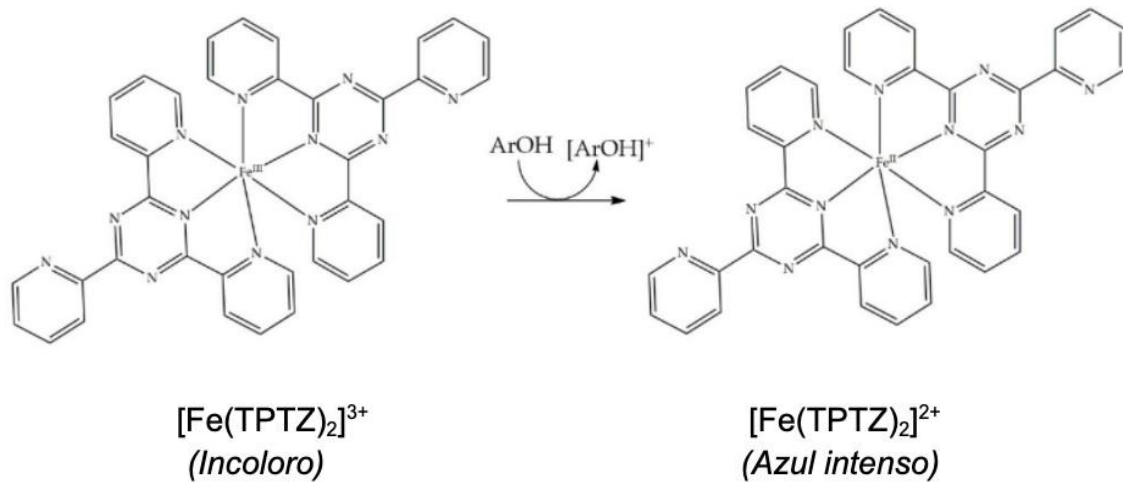
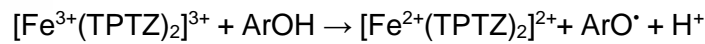
Se cree que puede contener un complejo de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico que se reduce para obtener un cromóforo azul con la máxima absorción a 765 nm. El ion central de molibdeno en el complejo se acepta como un sitio reductor, donde el ion  $\text{Mo}^{6+}$  se reduce a  $\text{Mo}^{5+}$  al aceptar un electrón donado por el antioxidante fenólico. Durante el ensayo, la reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo FCR tiene lugar a un pH de 10, que se alcanza mediante la adición de carbonato de sodio, bajo esas condiciones básicas, la disociación de un protón fenólico conduce a la formación de un ion fenolato, que es capaz de reducir el reactivo FCR (Sánchez-Rangel et al., 2013).

#### 1.6.2.2. Ensayo de poder reductor/antioxidante férrico (FRAP)

Es un método directo y rápido que permite medir la actividad antioxidante combinada (total) de los antioxidantes reductores en una muestra. Se utiliza la reducción de iones férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a iones ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) como indicador de reacción, que se relaciona con un cambio de color. Donde un oxidante clave (en forma de sal férrica en solución acuosa) es reducido por los antioxidantes (reductores) donantes de electrones en la mezcla de reacción que tienen un potencial redox, bajo las condiciones de reacción empleadas, inferior al de la mitad de la reacción: **Sal- $\text{Fe}^{3+}$  + Electrón**  $\rightarrow$  **Sal- $\text{Fe}^{2+}$**  (Apak, Capanoglu, & Shahidi, 2018; Munteanu, & Apetrei, 2021).

Es decir, la reacción mide la reducción del complejo de iones férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ )-ligando al complejo de iones ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por medio de antioxidantes, que reducen el complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina [ $\text{Fe}^{3+}$ -(TPTZ) $_2$ ] $^{3+}$  al producto coloreado, en este caso el complejo ferroso de color azul intenso [ $\text{Fe}^{2+}$ -(TPTZ) $_2$ ] $^{2+}$  en medio ácido (Gulcin, 2020). Es importante destacar que, al preparar el reactivo FRAP, es esencial agregar los reactivos en un orden específico, primero el tampón de acetato, luego se agrega  $\text{FeCl}_3$ , mientras que TPTZ se agrega al final, esta orden es vital para evitar la reducción de  $\text{FeCl}_3$ , por TPTZ. El cambio de color y el mecanismo de reacción se presentan en la figura 7 (Bibi et al., 2020).





**Fuente:** Bibi et al., 2020

Figura 7 Mecanismo de ensayo antioxidante FRAP

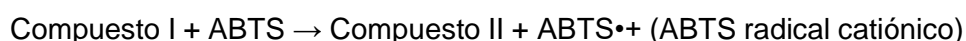
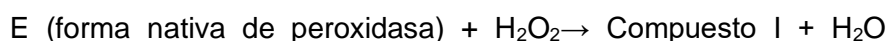
#### 1.6.2.3. Método de captura del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)

Se cataloga como una prueba de modo mixto (HAT/SET), estas pruebas se basan en la eliminación de un cromóforo estable (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)). Los mecanismos pueden desempeñar diferentes funciones, dependiendo de las condiciones de reacción correspondientes (como el pH y el disolvente). Según los mecanismos de reacción, los ensayos de capacidad antioxidante se pueden dividir en dos grupos principales: los basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y los que involucran reacciones de transferencia de un solo electrón (SET). HAT es un movimiento concertado de un protón y un electrón en un solo paso cinético de un grupo a otro, mientras que SET es la capacidad de un antioxidante potencial para transferir un solo electrón para participar en la reducción de un compuesto (Munteanu, & Apetrei, 2021; Gulcin, 2020).

**ABTS como sensor de actividad antioxidante (ensayo TEAC):** Trolox/TEAC (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) es un análogo hidrosoluble estructural de la vitamina E y es el compuesto comúnmente utilizado como antioxidante estándar. El ensayo se basa en la generación de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  usando metamioglobina, mientras que la inhibición de la producción de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  debido a compuestos antioxidantes en la muestra se mide en un tiempo fijo, dado que los resultados obtenidos para las muestras están relacionados con un compuesto estándar antioxidante que muestra un comportamiento cinético diferente, los resultados proporcionados por este ensayo dependen del tiempo de análisis. Se han

adoptado tiempos de reacción que oscilan entre 1 y 30 min en todos los protocolos descritos en la bibliografía. Existen muchas variaciones de este ensayo, mejorando la generación de  $ABTS^{\bullet+}$ , mediante peroxidasa, dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP (2,2-azobis(2-amidopropano)) o dióxido de plomo. La reacción se puede seguir a través de varios parámetros, como el tiempo de retraso, disminución de la absorbancia, porcentaje de inhibición, ajuste de la curva o titulación redox (Apak, Capanoglu, & Shahidi, 2018; Gülcin, 2012).

La prueba fue desarrollada como un método simple y conveniente para medir la capacidad antioxidante total, la cual mide la capacidad de los antioxidantes para neutralizar el catión radical estable 2,20-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ( $ABTS^{\bullet+}$ ), que se presenta como un cromóforo azul-verde de máxima absorción a 734 nm, cuya intensidad disminuye en la presencia de antioxidantes, este puede generarse a partir de ABTS en presencia de agentes antioxidantes. El grado de decoloración del color, es cuantificado como una caída repentina de la absorbancia a 734 nm, y depende de la duración de la reacción, actividad antioxidante intrínseca, así como de la concentración de la muestra. En la prueba TEAC original, se utilizan metamioglobina y peróxido de hidrógeno, para que el agente oxidante sea luego reemplazado por peróxido o persulfato. El persulfato de potasio es el oxidante más común para la generación de  $ABTS^{\bullet+}$ . Como se puede observar en las reacciones, en el sistema formado por  $ABTS/H_2O_2$ /peroxidasa, el ABTS se comporta como agente reductor, sustituyendo la forma habilitada de la enzima (Compuesto I) en el compuesto II, que vuelve a la forma inicial de la enzima (E) (Munteanu, & Apetrei, 2021; Gulcin, 2020; Moharram, & Youssef, 2014).



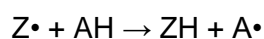
La prueba TEAC, al igual que otros métodos de neutralización de radicales, puede automatizarse y adaptarse a microplacas y técnicas de inyección de flujo. También se puede combinar con HPLC al incluir una reacción posterior a la columna con el catión radical ABTS para facilitar la identificación de antioxidantes en una mezcla compleja. El método de eliminación de radicales ABTS se puede evaluar en un amplio rango de pH, lo que es útil para estudiar el efecto del pH en los mecanismos antioxidantes de los componentes de la muestra. El radical ABTS es soluble en agua y disolventes orgánicos, lo que permite determinar la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos como lipofílicos (Munteanu, & Apetrei, 2021).

#### 1.6.2.4. Ensayo de captación de radicales libres (DPPH) (2,2-di(4-terc-octilfenil)-1-picrilhidrazilo)

**Características del Radical DPPH•** : Es un radical presente en su forma de monómero en estado sólido y en solución, es soluble en diferentes disolventes orgánicos, pero no en agua. Generalmente se disuelve en sus mezclas acuosas como también en etanol y metanol. Siendo en el caso acuoso mayor al 60% para que el radical sea más soluble. Además, este radical DPPH es uno de los pocos radicales nitrogenados orgánicos estables, con un color púrpura intenso y es un reactivo útil para investigar las propiedades secuestrantes de fenoles, cateoles y anilinas. Varios factores como el período de reacción (tiempo fijo o estudio cinético), temperatura (ambiente o alta) y la expresión del resultado se encuentran entre las variables analíticas que se continúan estudiando ampliamente (Gülcin, 2012). La prueba de neutralización se basa en la donación de electrones presentes en los antioxidantes para lograr la neutralización del radical DPPH. La reacción va acompañada del cambio de color del DPPH medido a 517 nm, y la decoloración actúa como indicador de la actividad antioxidante. Esta a menudo se informa como EC50, que se define como la concentración eficiente del antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50 % (Munteanu, & Apetrei, 2021).

**Ensayo de eliminación de DPPH:** El DPPH se usa frecuentemente como reactivo para valorar la actividad de eliminación de radicales libres de los antioxidantes. Cuando los radicales DPPH se encuentran con un sustrato donador de protones, como un antioxidante, los radicales serían eliminados y la absorbancia se reduciría. Este método fue desarrollado para determinar la actividad antioxidante usando un radical libre estable,  $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazilo ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ). Este ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes frente a DPPH mediante una reacción de transferencia de electrones y en la abstracción de átomos de hidrógeno que se encuentre reflejado en el cambio de coloración antes mencionado y la absorbancia medida (Gülcin, 2012; Apak, Capanoglu & Shahidi, 2018).

El electrón impar del átomo de nitrógeno que forma parte del reactivo (DPPH) se reduce al recibir un átomo de hidrógeno de los antioxidantes a la hidracina correspondiente y no se dimeriza como los demás radicales libres. La deslocalización es responsable también del color profundo violeta, con absorción en solución (etanol) a 517 nm. Al mezclar la solución de DPPH con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, resultando en la forma reducida con pérdida del color violeta. Representando el radical DPPH por  $Z\bullet$  y la molécula donadora por AH, la reacción primaria es:



Donde (ZH), es la forma reducida y (A•) es el radical libre producido en el primer paso. El último radical sufrirá reacciones adicionales que controlan la estequiometría general. Por lo tanto, la reacción proporciona el vínculo con las reacciones que tienen lugar en un sistema oxidante, como la autooxidación de un lípido u otra sustancia insaturada; la molécula de DPPH, (Z•) está por tanto destinada a representar los radicales libres formados en el sistema, en la cual dicha actividad debe ser suprimida por la sustancia (AH) (Kedare, & Singh, 2011).

Las moléculas antioxidantes pueden apagar los radicales libres de DPPH al proporcionar átomos de hidrógeno o mediante la donación de electrones, a través de un ataque de radicales libres en la molécula de DPPH y convertirlos en producto incoloro o blanqueado. La reducción de la absorbancia es una medida del DPPH libre debido a la acción del antioxidante. La capacidad de captación de DPPH se evalúa en etanol o metanol mediante el control de la disminución de la absorbancia a 515-528 nm hasta que la absorbancia permanece constante o mediante espectrómetro de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Cabe resaltar que DPPH muestra una intensa banda de absorción a 517 nm a consecuencia de su impar electrón y evidenciándose de un color violeta intenso, la absorción desaparece cuando el electrón se aparea. La decoloración resultante es estequiométrica con respecto al número de electrones absorbidos (Kedare, & Singh, 2011; Gülcin, 2012; Moharram & Youssef, 2014).

El método es único en la realización de la reacción de la muestra con DPPH en metanol/agua, lo que facilita la extracción de compuestos antioxidantes de la muestra. La eficacia antirradical frente a DPPH, presenta ventajas frente a otros métodos. Los resultados son altamente reproducibles y comparables a otros métodos de eliminación de radicales libres, la eficacia antioxidante se mide a temperatura ambiente para eliminar el riesgo de degradación térmica de las moléculas ensayadas y el método también puede ser empleada para la evaluación de la eficacia antioxidante de los compuestos que forman una solución opaca (Kedare, & Singh, 2011; Apak, Capanoglu & Shahidi, 2018).

Se puede usar en solventes orgánicos acuosos y no polares para examinar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, se considera un método válido, preciso y económico para evaluar la actividad de eliminación de radicales, ya que el compuesto radical es estable. La prueba es una técnica simple y rápida que requiere solo un espectrofotómetro Vis o EPR, y es ampliamente utilizado para medir la capacidad de los compuestos para actuar como captadores de radicales libres o donantes de hidrógeno y evaluar la actividad antioxidante. (Ortiz et al., 2012; Apak, 2019; Kedare, & Singh, 2011).

## Capítulo II

### 2. Materiales y métodos

#### 2.1. Tipo de estudio y análisis estadístico

Este trabajo de investigación es de tipo experimental corte transversal. Las herramientas estadísticas utilizadas incluyen estadística descriptiva, test de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Tukey. El análisis se realizó con el programa Microsoft Office Excel.

#### 2.2. Materiales

##### 2.2.1. Reactivos

- Acetato de etilo
- Acetato de sodio
- Ácido acético
- Ácido 2,20-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)
- Ácido clorhídrico 0.1M
- Ácido fórmico
- Agua destilada
- Agua destilada ultrapura
- Carbonato de sodio
- Cloruro férrico
- Cloroformo
- Cloruro de sodio (NaCl) 1 %
- Etanol absoluto
- Difetil-boryil- oxietil-amina al 1% en metanol
- Dioxano
- Metanol análisis
- N-hexano
- Nitrógeno gaseoso inerte
- Tolueno
- Persulfato de potasio
- Productos naturales PEG 5% Etanol
- Radical 2,2-difenil1-picrilhidrazilo (DPPH).
- 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio (reactivo de folin)
- 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 96% (Trolox)

##### **Estándares**

- Apigenina
- Apigenina-7-Glucósido
- Kaempferol
- Kaempferol-3-Glucósido
- Quercetina
- Quercetina-3-Glucurónido
- Rutina

##### 2.2.2. Equipos

Los equipos utilizados se describen a continuación

- Balanza analítica PL6001E (Mettler Toledo, Suiza)
- Balanza analítica BBL – 31 (Boeco, Alemania)
- Refrigeradora RI-480 (Indurama, Estados Unidos)
- Biofreezer R134A (Fisher Scientific, Estados Unidos)
- Cabina de extracción de gases 0216-21-Volts (Quimis, Brasil)
- Rotavapor Laborota 4000 efficient (Heidolph, Alemania)
- Concentrador al vacío RapidVap (Labconco, Estados Unidos)
- Baño ultrasónico 3510 (Branson Ultrasonics, Estados Unidos)
- Liofilizador FreeZone 2.5L (Labconco, Estados Unidos)
- Congelador dairei freezeer -45/-85°C ULTF80, USA, 2009
- Equipo de purificación de agua Autwomatic Plus (Wasserlab, Alemania)
- Lector de microelisa Synergy H1m Microplate (Biotek, Alemania)
- Equipo de fotodocumentación 0229780 (Camag TLC Visualizer, Suiza)
- Destilador de agua modelo 724 (Fanem, Brasil)
- Estufa de secado (PRO-3, Ecuador).

### 2.3. Métodos

#### 2.3.1. Recolección, lavado y secado

##### 2.3.1.1. Recolección

Se utilizaron hojas, flores y brotes de la planta *Desmodium molliculum* que fueron recolectados en la provincia del Azuay vía Barabón detrás de la Iglesia La Inmaculada. La muestra se tomó mediante tijeras podadoras y recolectó en bolsas grandes de papel en horas de la mañana. Dos muestras botánicas se almacenaron en bolsas individuales para su caracterización, las cuales fueron transportadas hacia el laboratorio de plantas de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad de Cuenca.

Las coordenadas del lugar de recolección se obtuvieron mediante la aplicación GPS Tracks, el cual señaló latitud -2.92072973 ft, longitud -79.09075823 ft y altitud 9147.5 ft. La muestra botánica se procesó en una prensa, conjuntamente con papel periódico que ayudaron a su desecamiento. Finalmente, se armó la muestra botánica sobre una cartulina con la respectiva información de la planta recolectada (ANEXO 1). Se empleó la codificación Merchán01 para la identificación de la muestra botánica y para los extractos obtenidos durante cada fraccionamiento.

##### 2.3.1.2. Lavado

El proceso de lavado se realizó el mismo día de la recolección, en horas de la tarde. Se registró el peso del material en fresco. Las partes de la planta a utilizar se seleccionaron e incluyeron hojas, flores y brotes; las mismas que fueron lavadas tres veces con agua potable de la red pública. La materia vegetal se retuvo en cernidores tras cada lavado, y reposó en

agua destilada durante 10 minutos. Finalmente, se tendió en soportes metálicos cubiertos con papel periódico durante 15 horas.

### 2.3.1.3. Secado

El material se colocó en la estufa durante 24 horas a una temperatura de 37 °C y fue pesado para registrar su peso final. Se colocó nuevamente en la estufa en períodos de 2 horas hasta obtener una variación del peso de  $\pm 0.4$  gramos considerándose como constante. Se trituró el material vegetal seco mediante el uso de la licuadora, y se tamizó hasta obtener partículas pequeñas de tamaño homogéneo.

### 2.3.2. Proceso extractivo

#### 2.3.2.1. Humectación

La droga secada y pesada previamente (20 g) se colocó en 4 frascos de vidrio con tapa hermética, estos se humectaron con metanol y permanecieron en un lugar seco y oscuro durante 15 horas.

#### 2.3.2.2. Extracción por percolación

Trascurridas las 15 horas se armó cuatro percoladores, en cada uno se colocó una capa delgada de algodón y se trasvasó el material vegetal a su respectivo percolador. Se agregó el metanol lavando continuamente cada frasco para obtener la totalidad de la droga en cada percolador. A continuación, el papel filtro se colocó sobre la droga y sobre éste canicas de vidrio. Se agregó metanol hasta un nivel correspondiente a 1 cm sobre la superficie de la droga, dejando en maceración y protegiendo de la luz durante 24 horas.

El proceso extractivo se inició abriendo la llave a una velocidad de 20 gotas por minuto para coleccionar la fracción 1 (F1), correspondiente al 75% del peso de la droga y se almacenó en refrigeración. La percolación continuó en cuatro matraces de fondo redondo fracción 2 (F2), hasta llegar a reacción negativa mediante TLC.

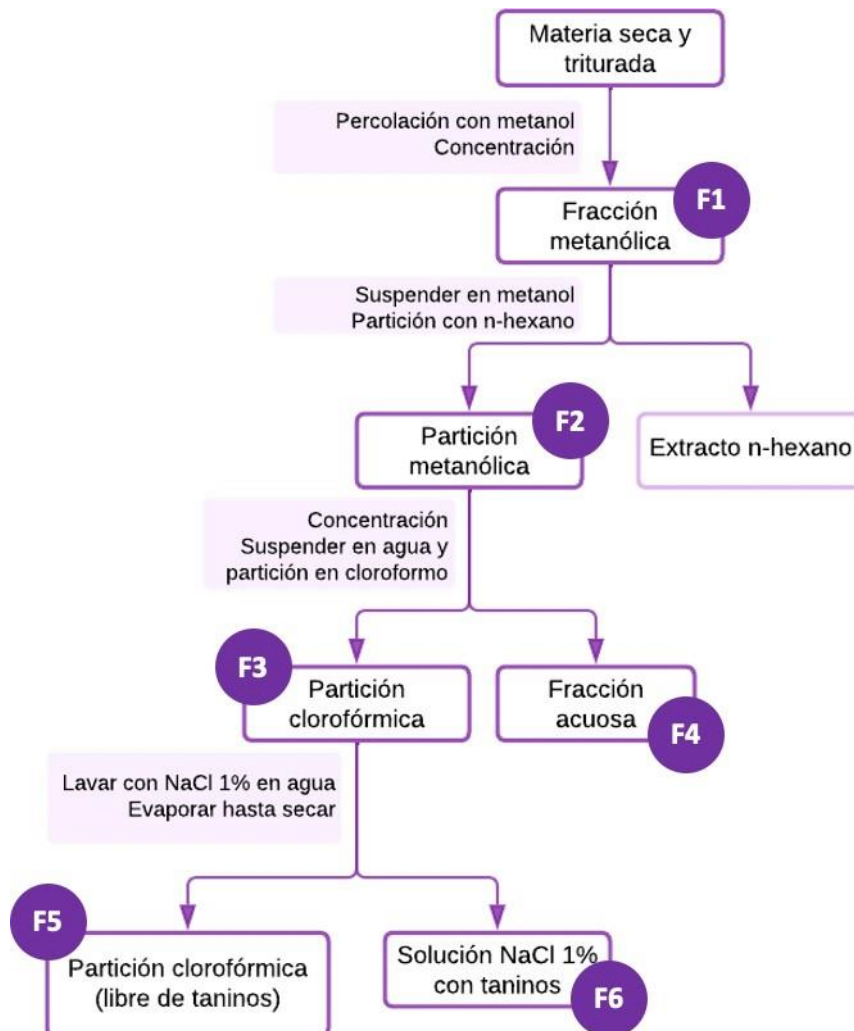
#### 2.3.2.3. Cromatografía en capa fina

Las muestras se aplicaron en una placa cromatográfica de 5 cm x 10 cm, la cual se desarrolló en una fase móvil con acetato de etilo-metanol-agua en proporción 100:13.5:10 respectivamente, en la cámara cromatográfica. El volumen sembrado en la base de la placa cromatográfica fue de 10  $\mu$ l de la F1 y 10  $\mu$ l de la F2. La placa se reveló usando el revelador de productos naturales y observó bajo la longitud de onda de 254 nm y 360nm verificando el agotamiento de la droga.

### 2.3.3. Proceso de fraccionamiento



En la figura 8 se observa el esquema utilizado en el fraccionamiento líquido-líquido de *Desmodium molliculum*, el cual es una adaptación del esquema propuesto por Jones y Kinghorn en el año 2006.



**Fuente:** Jones y Kinghorn, 2006

Figura 8 Esquema del fraccionamiento líquido-líquido

#### - Fracción 1: Extracto Crudo

##### Concentración de extractos

El solvente se eliminó del extracto usando el rotavapor, el residuo seco se disolvió con la fracción 1 correspondiente, y con una mínima cantidad de metanol, trasvasándose a dos tubos tapa rosca identificados. Dicho contenido se concentró usando nitrógeno para eliminar el solvente hasta obtener un volumen aproximado de 4 ml en cada tubo.



## **Liofilización**

Se trasvasó el material vegetal concentrado a tubos liofilizadores, donde los recipientes de origen se lavaron con agua destilada hasta una proporción 80:20 de agua y extracto metanólico, luego los tubos liofilizadores fueron cubiertos con un tapón de caucho y un filtro. Se congelaron a -80 °C hasta la formación de una película por un periodo de 2 horas y, posteriormente ser cargados en el equipo de liofilización durante 24 horas (condición de vacío de 0.080 mBar, temperatura de - 50 °C). Luego el extracto seco obtenido se pesó para calcular su rendimiento, y se almacenó alícuotas en viales a -20 °C hasta su uso.

### **- Fracción 2: Metanólica**

#### **Desengrasado de extractos**

Se preparó una disolución de extracto liofilizado de 20 mg/ml en metanol, la cual se mantuvo en el agitador por 15 horas. Luego, se utilizó el baño maría con sonicador a 37° C por 30 minutos hasta disolución completa. Se añadió agua destilada hasta la concentración de metanol-agua 80:20, se trasvasó a un embudo de separación y se duplicó el volumen con n-hexano, se agitó por 5 minutos verticalmente y se dejó en reposo hasta observar dos fases. Se descartó el n-hexano (fase inferior) en un matraz de fondo redondo y se conservó la fase acuosa (fase superior) en el embudo. Se repitió el procedimiento agregando 50% de n-hexano del volumen inicial utilizado. Realizándose en total cuatro lavados con n-hexano, se concentró con rotavapor y posterior liofilización.

### **- Fracción 3: Clorofórmica**

#### **Fraccionamiento líquido-líquido**

Se resolvió la muestra a 20 mg/ml en agua destilada, la cual se mantuvo en el agitador por 2 horas. Luego, se utilizó el baño maría con sonicador a 37° C hasta disolución completa. Se colocó la redisolución a un embudo de separación y se duplicó el volumen con cloroformo, correspondiente al primer lavado agitando durante 5 minutos verticalmente. Se separó el cloroformo (fase inferior) en un matraz de fondo redondo. En el segundo lavado se agregó el 50% correspondiente al volumen anterior de cloroformo, se agitó y lavó una última vez. Esta fase fue repartida en viales, se colocó aproximadamente 20 gotas en cada vial. El extracto se concentró mediante el concentrador al vacío. Con la cantidad sobrante se utiliza para obtener la fracción 5 y 6.

### **- Fracción 4: Acuosa**

#### **Liofilización**

La fase acuosa obtenida del fraccionamiento en la fracción 3 se liofilizó, el mismo fue distribuido en varias viales de 5 mg en cada una.

- **Fracción 5: Clorofórmica libre de taninos**

**Fraccionamiento**

Se preparó una disolución de 40 mg/ml en cloroformo. Donde se duplicó el volumen agregando NaCl 1% en agua. Se agitó la mezcla en un vortex durante 2 minutos, hasta la formación de dos fases. La fase superior contiene los taninos y la parte inferior es la libre de taninos. Se separaron las dos fases con ayuda de una pipeta pasteur de vidrio. En la fase inferior se colocó una pisco de sulfato de sodio, se agitó y centrifugó, la fase acuosa se colocó en el tubo con la fase superior previamente separada.

- **Fracción 6: Contenido de taninos**

La fase superior separada anteriormente se somete a liofilización, obteniendo la última fracción.

2.3.4. Cromatografía de Capa Fina

De cada fracción se prepararon concentraciones a 5 mg/ml en metanol para F1, F2, F4 y F6 y en cloroformo para F3 y F5. Se utilizó cámaras cromatográficas, y placas TLC analíticas (placas con sílica gel F254) que fueron activadas previamente a 100 °C durante 1 hora. Cada una de las placas fue marcada con la línea de siembra o de partida, línea de frente e información de identificación de la placa en la parte superior incluyendo la fecha, fase móvil, revelador y el metabolito secundario.

En la línea de partida se sembró 10 µl de las muestras y patrones, separadas con una distancia de 1 cm entre cada siembra. Se preparó las fases móviles y se colocó en la cámara cromatográfica a una altura de 0.5 cm y se cerró la cámara por 30 min para saturar la misma con los vapores de la fase móvil. Se colocó la placa en la cámara cromatográfica y se protegió de la luz solar para empezar la elución la fase móvil. Posteriormente, se retiró la placa se reveló con reactivo de productos naturales. La tabla 2 indica las condiciones utilizadas en este procedimiento.

La aplicación de cromatografía en capa fina siguió el siguiente esquema:

Metabolito	Patrones	Dimensiones de la placa	Muestra	Solvente	Fase móvil	Lectura
<b>Flavonoides</b>	-Quercetina - Quercetina-3-glucoronido -Kaempferol - Kaempferol-	12 x 10 cm	Fracción 1 Fracción 2 Fracción 4 Fracción 6	Metanol	Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26)	365 nm intensa fluorescencia amarilla,

3-Glucósido -Apigenina -Apigenina-7-gucósido -Rutina	10 x 10 cm	Fracción 3 Fracción 5	Cloroformo	Tolueno-dioxano-Ácido acético glacial (90:25:4)	anaranjada o verdosa
---	------------	--------------------------	------------	---	----------------------

Fuente: Wagner & Blandt, 2001

Tabla 2 Esquema de Cromatografía en Capa Fina con especificaciones de patrones, fases móviles y reveladores

### 2.3.5. Actividad antioxidante

Se partió de una solución madre de 5 mg/ml hasta obtener una concentración de 1 mg/ml, 0.5 mg/ml y 0.25 mg/ml. Las muestras fueron diluidas en metanol, a excepción de la fracción F3 y F5 que se diluyeron en metanol-cloroformo en proporción 90:10. De cada prueba se realizó triplicado y réplica de cada concentración en cada una de las fracciones.

#### 2.3.5.1. Capacidad reductora de Folin-Ciocalteu (ensayo FCR) para la cuantificación de Polifenoles Totales

La prueba requirió de 25 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% y 100 ml de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 700 mM. Se realizó la prueba para las cuatro fracciones a sus tres concentraciones y réplicas, se colocó el extracto y los reactivos correspondientes por triplicado, conforme el esquema de la tabla 3. Las mezclas de reacción en cada eppendorf se homogeneizaron en el vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad, se centrifugó durante 2 minutos y se colocó 200 µl por triplicado en cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos para luego medir la absorbancia a 765 nm mediante el espectrofotómetro lector de microplacas. Se realizó la curva de calibración, para lo cual se preparó Ácido Gálico a una concentración de 1 mg/ml en agua ultrapura, luego se realizó las respectivas diluciones para obtener a 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.03125 mg/ml y 0.015625 mg/ml, se colocó por triplicado en cada pocillo de la microplaca para luego medir la absorbancia a 765 nm mediante el espectrofotómetro lector de microplacas.

	BLANCO	CONTROL	MUESTRA
Agua destilada	100 µL	-	-
Folin al 10%	200 µL	200 µL	200 µL
Extracto	-	-	100 µL
Patrón	-	100 µL	-
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> a 700 mM	800 µL	800 µL	800 µL

Tabla 3 Esquema de pipeteo de la prueba Folin-Ciocalteu

#### 2.3.5.2. Método de captura del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)

Se preparó los reactivos para la prueba, para la solución ABTS a 7 mM se pesó 0.0384 g de reactivo aforado a 10 mL de agua destilada ultrapura y para el persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)

0.0066 g de reactivo aforado a 10 mL con agua destilada ultrapura, luego de tomó 5 mL del reactivo ABTS preparado y 5mL persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) en un frasco ámbar y se dejó reposar en la oscuridad durante 15 horas antes de su uso. Posteriormente, se ajustó la absorbancia a  $0.7 \pm 0.02$  con etanol absoluto. Se realizó la prueba para las cuatro fracciones (F1, F2, F3 y F4) y sus respectivas réplicas, se colocó el extracto y los reactivos correspondientes por triplicado, conforme el esquema de la tabla 4. Las mezclas de reacción en cada eppendorf se homogeneizaron en el vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad, se colocó 200  $\mu$ l por triplicado en cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos para luego medir la absorbancia a 734 nm mediante el espectrofotómetro. Se realizó la curva de calibración, para lo cual se preparó Trolox a una concentración de 1 mg/ml en agua ultrapura, luego se realizó las respectivas diluciones para obtener a 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.03125 mg/ml y 0.015625 mg/ml, se colocó por triplicado en cada pocillo de la microplaca para luego medir la absorbancia a 734 nm mediante el espectrofotómetro lector de microplacas.

	BLANCO	CONTROL	MUESTRA
Etanol	40 $\mu$ L	-	-
Extracto	-	-	40 $\mu$ L
Patrón	-	40 $\mu$ L	-
ABTS	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L

Tabla 4 Esquema de pipeteo de la prueba ABTS

### 2.3.5.3. Ensayo de poder reductor/antioxidante férrico (FRAP)

Se preparó los reactivos para la prueba, (A) solución buffer ácido acético - acetato de sodio a 300mM con pH de 3.6 a 4, por lo que se pesó 2.4610 g de reactivo aforado a 100 ml de agua destilada ultrapura y ajustado con 6.4 ml de ácido acético, (B) Solución de cloruro férrico a 20 mM, pesándose 0.0324 g aforado a 10 ml de agua ultrapura y (C) Solución de TPTZ, por lo que se diluyó 0.0312 g en 4 ml de HCl 0.1 M. Cada reactivo preparado fue almacenado en un frasco ámbar respectivamente, para finalmente mezclar en una proporción de 10:1:1 y calentado a baño maría a 40°C en un frasco ámbar por 10 minutos. Se realizó la prueba para las cuatro fracciones (F1, F2, F3 y F4) y sus respectivas réplicas, se colocó el extracto y los reactivos por triplicado conforme el esquema de la tabla 5. Las mezclas de reacción en cada eppendorf se homogeneizaron en el vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad, se colocó 100  $\mu$ l por triplicado en cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos para luego medir la absorbancia a 593 nm mediante el espectrofotómetro lector de placas. Se realizó la curva de calibración, para lo cual se preparó Trolox a una concentración de 1 mg/ml en agua ultrapura, luego se realizó las respectivas diluciones para obtener a 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.03125 mg/ml y 0.015625 mg/ml, se colocó por triplicado en cada pocillo de la microplaca para luego medir la absorbancia a 593 nm mediante el espectrofotómetro lector de microplacas.

	BLANCO	CONTROL	MUESTRA
Extracto	-	-	20 $\mu$ L
Patrón	-	20 $\mu$ L	-
Mezcla A+B+C	600 $\mu$ L	600 $\mu$ L	600 $\mu$ L

Tabla 5 Esquema de pipeteo de la prueba FRAP

#### 2.3.5.4. Ensayo de captación de radicales libres (DPPH) (2,2-di(4-terc-octilfenil)-1-picrilhidrazilo)

Se preparó los reactivos para la prueba radical 2,2 Difenil-1-picilhidrazilo (DPPH), pesando 0.0078 g de reactivo, aforado con metanol en un balón de 100 ml, y luego almacenado en un frasco ámbar para su posterior uso. Se realizó la prueba para las cuatro fracciones para las 6 fracciones y sus respectivas réplicas. Se colocó el extracto y los reactivos por triplicado, conforme el esquema de la tabla 6. Las mezclas de reacción en cada eppendorf se homogeneizaron en el vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad, se colocó 100  $\mu$ l por triplicado en cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos para luego medir la absorbancia a 517 nm mediante el espectrofotómetro lector de microplacas. Se realizó la curva de calibración, para lo cual se preparó Trolox a una concentración de 1 mg/ml en agua ultrapura, luego se realizó las respectivas diluciones para obtener a 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.03125 mg/ml y 0.015625 mg/ml, se colocó por triplicado en cada pocillo de la microplaca para luego medir la absorbancia a 517 nm mediante el espectrofotómetro lector de microplacas.

	BLANCO	CONTROL	MUESTRA
DPPH	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Extracto	-	-	50 $\mu$ L
Patrón	-	50 $\mu$ L	-
Metanol análisis	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L

Tabla 6 Esquema de pipeteo de la prueba DPPH

## Capítulo III

## 3. Resultados y discusiones

## 3.1. Recolección, lavado y secado

La eliminación de la humedad es primordial durante el proceso de secado, puesto que permite conservar la muestra y evitar reacciones químicas que inestabilizan los metabolitos. El peso en fresco fue de 422.03 gramos y el peso seco final fue de 175.96 gramos, por lo tanto, la humedad eliminada representa aproximadamente el 58.31%. Se observa que la pérdida de humedad supera el 50% del peso en fresco, favoreciendo a la conservación de los metabolitos al minimizar las posibles reacciones enzimáticas que podrían llevarse a cabo en presencia de contenido residual de agua (Seidel, 2003).

## 3.2. Proceso extractivo por percolación

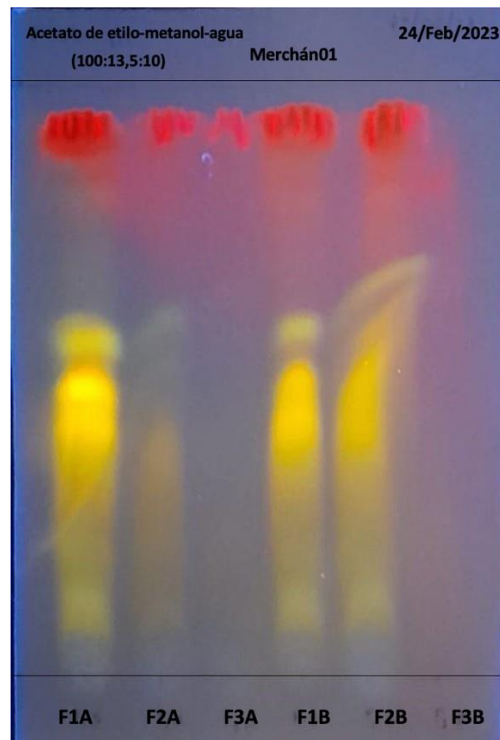
## 3.2.1. Agotamiento de la droga

El agotamiento de la droga se determina por la ausencia de metabolitos representados como bandas en el cromatograma en capa fina tras varias horas de haber empezado la percolación, es decir, llega a la reacción negativa. En las siguientes figuras se observa la fracción 1 que corresponde al 75% del peso de la droga recogida a los 10 minutos de haber empezado la percolación, la fracción 2 pertenece al extracto recogido a las 2 horas y la fracción 3 a las 5 horas, realizado por duplicado en percoladores diferentes A y B. La figura 9 muestra el cromatograma observado a la luz visible, mientras que la figura 10 representa el mismo cromatograma observado a la luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm. Es importante mencionar que en la fracción 3 ya no se observan metabolitos eluidos en la placa, lo cual se identifica como reacción negativa.



**Fuente:** Las autoras

Figura 9 Agotamiento de la droga a luz visible



**Fuente:** Las autoras

Figura 10 Agotamiento de la droga bajo luz ultravioleta a 366 nm

### 3.2.2. Rendimiento de la droga

El rendimiento de la droga es expresado en términos DERnative según Gaedcke, Steinhoff y Blasius (2003), la cual indica la relación o proporción existente entre la masa de la droga vegetal seca y la masa de la droga vegetal obtenida al finalizar los procesos de extracción y liofilización. A partir de 20 gramos de droga seca de *Desmodium molliculum* se obtuvo 3.0604 gramos de extracto liofilizado. El DERnative calculado es de 7:1 usando metanol como solvente e indica que la materia extraíble de la droga vegetal es de 14.28%.

Rojas et al. (2003) en su estudio por evaluar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales peruanas seleccionadas, determinan al rendimiento extractivo de diversas plantas, entre ellas *Desmodium molliculum*. El proceso extractivo fue percolación a temperatura ambiente con etanol 95%, el rendimiento plasmado es de 9,8%. Al ser una planta de hábitat en América Latina evidenciamos que el rendimiento varía según la zona geográfica, tipo de solvente y época del año. Otro factor que influye en el rendimiento de la especie vegetal es el estrés inducido por diferentes componentes en el medio, siendo crucial la intensidad y duración del estrés al que se expone. Dichos componentes pueden ser bióticos (insectos) y abióticos como la temperatura, salinidad y sequía. Se ha evidenciado que esta última es responsable de disminuir hasta el 50% del rendimiento obtenido en condiciones favorables normales. Del mismo modo, se ha reportado que el contenido de metales pesados (cadmio, plomo, cromo, zinc y cobre) acumulados contribuyen a la formación de especies



reactivas de oxígeno causando oxidación y disfunción de moléculas biológicas (Salam et al., 2023).

Nkawocha et al., en su estudio publicado en el año 2022, identifican y caracterizan los compuestos fitoquímicos hallados en los tallos de *Desmodium velutinum*, que fueron recolectados la muestra en el estado de Enugu en Nigeria, fue secada a temperatura ambiente durante tres días donde los tallos fueron pulverizados. Se usó la maceración como método extractivo utilizando metanol (80% v/v) durante tres días. El rendimiento obtenido fue de 3.02% considerándose una quinta parte de lo obtenido en esta investigación. Metanol es el solvente usado en ambas extracciones; sin embargo, las diferencias plasmadas en el rendimiento porcentual pueden atribuirse a la aplicación de un método extractivo distinto.

### 3.3. Fraccionamiento líquido-líquido

Es un método cuyo objetivo consiste en el aislamiento del analito de interés de aquellos compuestos que pueden interferir en su análisis, de manera que aumenta la selectividad del mismo, así como su concentración en un solvente de afinidad (Silvestre et al., 2009). Pretenden obtener extractos enriquecidos en función de múltiples particiones, por la afinidad de los analitos a los diferentes solventes consiguiendo fracciones enriquecidas del analito de interés.

En la tabla 7 se visualiza el peso expresado en gramos de cada fracción obtenida después del liofilizado al finalizar cada partición. Las fracciones cruda, metanólica y acuosa han evidenciado obtener mayor extracción con resultado de 3060.4 mg, 523.3 mg y 446.7 mg, respectivamente. Las fracciones con menor obtención de extracto seco fueron la fracción clorofórmica (sin taninos) y fracción con taninos, con pesos de 1.9 mg y 1.2 mg respectivamente. Recomendamos partir de una mayor cantidad para obtener mayores cantidades en las últimas fracciones.

Fracción	Peso obtenido (gramos)	Rendimiento
Fracción cruda (F1)	3.0604 g	15.3%
Fracción metanólica (F2)	0.5233 g	52.33%*
Fracción clorofórmica (F3)	0.3151 g	31.51%*
Fracción acuosa (F4)	0.4467 g	44.67%*
Fracción clorofórmica (sin taninos) (F5)	0.0019 g	0.19%*
Fracción con taninos (F6)	0.0012 g	0.12%*

\*Parte de 1g de extracto crudo considerándose el 100%

**Fuente:** Las autoras

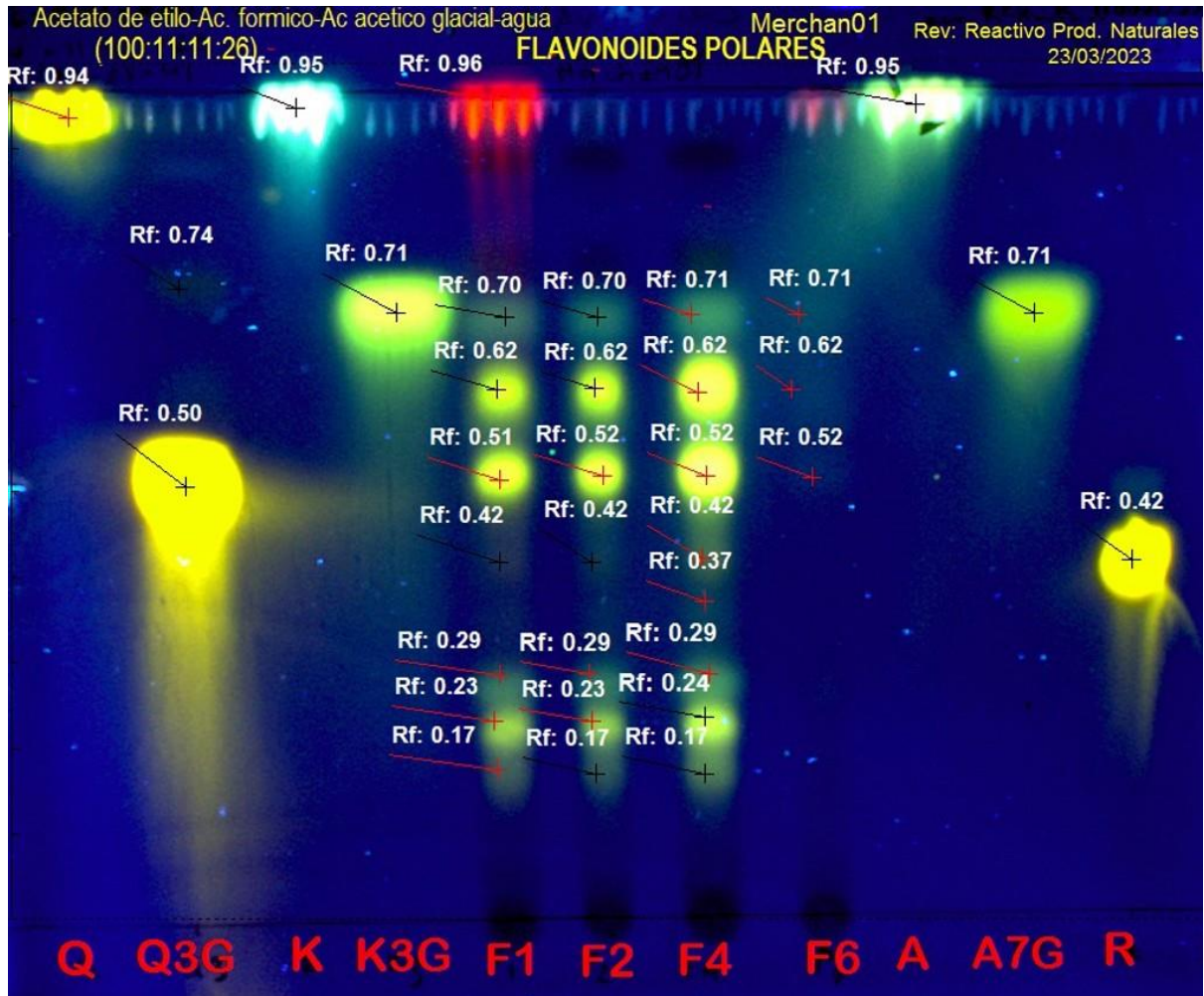
Tabla 7 Peso y rendimiento obtenido en cada partición

### 3.4. Cromatografía en capa fina



La cromatografía en capa fina facilita la identificación y separación de metabolitos secundarios contenidos en la droga vegetal. A continuación, se describen las placas cromatográficas de flavonoides polares y apolares.

### 3.4.1. Placa cromatográfica de flavonoides en fracciones polares



En la línea base se encuentran de izquierda a derecha quercetina (**Q**), quercetina-3-glucorónido (**Q3G**), kaempferol (**K**), kaempferol-3-glucósido (**K3G**), fracción cruda (**F1**), fracción metanólica (**F2**), fracción acuosa (**F4**), fracción con taninos (**F6**), apigenina (**A**), apigenina-7-glucósido (**A7G**) y rutina (**R**). **Fuente:** Las autoras

Figura 11 Cromatografía en Capa Fina de flavonoides en fracciones polares

PATRÓN	Rf	Característica de la banda
Quercetina	0.94	Coloración amarilla de gran intensidad
Quercetina 3 glucorónido	0.50	Coloración amarilla e intensidad elevada
Kaempferol	0.95	Coloración celeste brillante de gran intensidad
Kaempferol-3-glucósido	0.71	Coloración central amarilla con borde verde, intensidad moderada
Apigenina	0.95	Coloración verde brillante en el centro, intensidad elevada
Apigenina-7-glucósido	0.71	Coloración verde de intensidad moderada

Rutina	0.42	Coloración amarilla y gran intensidad
--------	------	---------------------------------------

**Fuente:** Las autoras

Tabla 8 Características de las bandas de los patrones en la placa cromatográfica de flavonoides en fracciones polares

FRACCION	Rf	Características de la banda	Posibles metabolitos
F1	0.17	Coloración verdosa opaca, baja intensidad.	Flavonoides
	0.23	Coloración verdosa levemente brillante, intensidad media.	Flavonoides
	0.29	Coloración verdosa opaca, baja intensidad.	Flavonoides
	0.42	Coloración verdosa, muy baja intensidad.	Rutina
	0.51	Coloración amarilla en el centro con tenue halo verde, intensidad alta	Quercetina-3-glucoronido
	0.62	Coloración verdosa/amarilla, mayor intensidad en el anillo verde en la periferia.	Flavonoides
	0.70	Coloración verde opaco, intensidad baja y mayor tamaño de la banda	Kaempferol-3-glucósido Apigenina-7-glucósido
	0.96	Coloración roja y de gran intensidad.	Clorofila
F2	0.17	Coloración verdosa opaca, baja intensidad.	Flavonoides
	0.23	Coloración verdosa levemente brillante, intensidad media.	Flavonoides
	0.29	Coloración verdosa opaca, baja intensidad.	Flavonoides
	0.37	Coloración verde opaca	Apigenina-7-glucósido
	0.42	Coloración verdosa, muy baja intensidad.	Quercetina-3-glucoronido Rutina
	0.52	Coloración amarilla en el centro con tenue halo verde, intensidad alta	Kaempferol-3-glucósido
	0.62	Coloración verdosa/amarilla, mayor intensidad en el anillo verde en la periferia.	Flavonoides
	0.70	Coloración verde opaco, intensidad baja y mayor tamaño de la banda	Kaempferol-3-glucósido Apigenina-7-glucósido
F4	0.17	Coloración verdosa opaca, baja intensidad.	Flavonoides
	0.24	Coloración verdosa levemente brillante, intensidad media.	Flavonoides
	0.29	Coloración verdosa opaca, baja intensidad.	Flavonoides
	0.42	Coloración verdosa, muy baja intensidad.	Quercetina-3-glucoronido Rutina

	0.52	Coloración amarilla en el centro con tenue halo verde, intensidad alta	Quercetina-3-glucorónido
	0.62	Coloración verdosa/amarilla, mayor intensidad en el anillo verde en la periferia.	Flavonoides
	0.71	Coloración verde opaco, intensidad baja y mayor tamaño de la banda	Kaempferol-3-glucósido Apigenina-7-glucósido
F6	0.52	Coloración verdosa y muy baja intensidad	Quercetina-3-glucorónido
	0.62	Coloración verdosa y muy baja intensidad	Flavonoides
	0.71	Coloración verdosa y muy baja intensidad	Apigenina-7-glucósido

**Fuente:** Las autoras

Tabla 9 Resultados de las fracciones F1, F2, F4 y F6 en la placa cromatográfica de flavonoides en fracciones polares

La figura 11 muestra la placa cromatográfica obtenida para la identificación de flavonoides en fracciones polares de *Desmodium molliculum*. La tabla 8 indica los patrones utilizados con su respectivo Rf, en donde se observa como los patrones glicosilados (quercetina-3-glucorónido, kaempferol-3-glucósido y apigenina-7-glucósido) presentan un Rf mucho menor de aquellos no glicosilados, lo cual se debe a la polaridad. La presencia de grupos funcionales polares aumenta la polaridad del metabolito, elevando la afinidad por la fase estacionaria; por lo tanto, conseguir Rf menores en comparación a componentes menos polares o de naturaleza apolar (Gibbons, 2005).

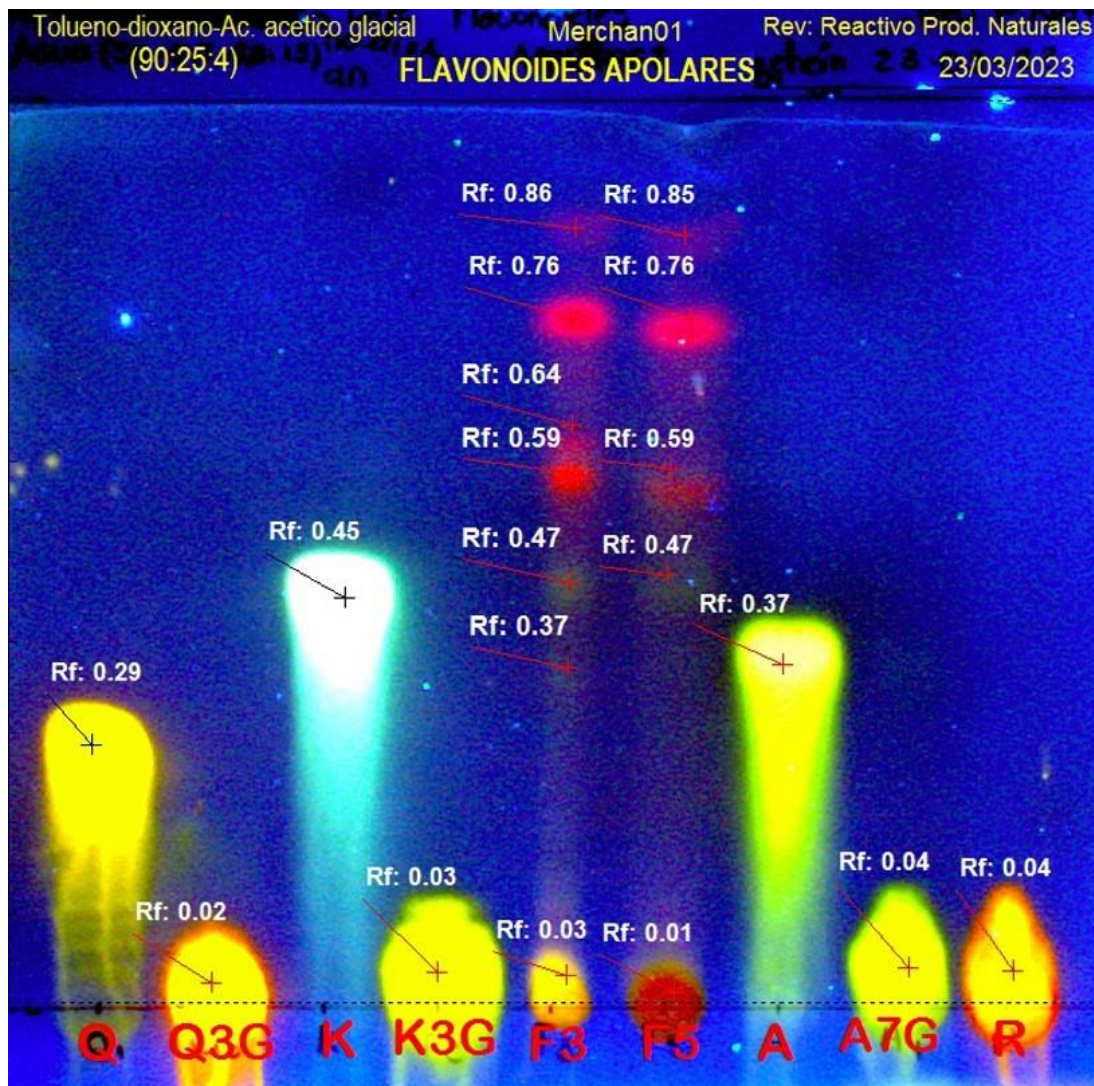
La tabla 9 muestra los Rf y la coloración de cada una de las bandas visualizadas para cada fracción. Las fracciones F2, F4 y F6 no presentan la banda roja anaranjada visualizada en la F1 ya que la clorofila fue eliminada previamente. El contenido de flavonoides es similar en todas las fracciones analizadas (F1, F2, F4 y F6), pudiéndose determinar probablemente de manera cualitativa la presencia de quercetina-3-glucorónido, kaempferol-3-glucósido, apigenina-7-glucósido y rutina, todas ellas en concentraciones diferentes. Para poder diferenciar los metabolitos visualizados con idénticos Rf en TLC se debe hacer un análisis en fase reversa usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Li et al. (2022), en su estudio por determinar los mecanismos antioxidantes y el potencial anticólitico en *Desmodium styracifolium* en colitis ulcerosa en ratones, establecen que algunos de los principales flavonoides fueron crisoeriol (3-metoxiapigenina), quercetina, apigenina, luteolina y kaempferol, glucósidos de la apigenina o sus derivados, los cuales fueron schaftoside, vicenin y vitexin. La presencia de estos flavonoides favoreció a la reducción del estrés oxidativo y mejoró la colitis ulcerosa, disminuyó significativamente la reducción de peso corporal en los ratones y el índice de actividad de la enfermedad.



En otro estudio identifican y caracterizan los fitoquímicos y constituyentes en tallos de *Desmodium velutinum* extraído por maceración frío con metanol 80%. El análisis cualitativo mostró el contenido de taninos, flavonoides, fenoles y alcaloides; los flavonoides identificados en la fracción acuosa metanólica incluyen ácido gálico, ácido clorogénico, rutina, ácido cafeico y apigenina (Nkwocha et al., 2022). Mahnashia et al. (2023) identificaron alrededor de 16 compuestos en *Desmodium elegans* mediante la técnica HPLC en un extracto metanólico, entre estos se puede mencionar ácido gálico, quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-glucorónido, kaempferol-7-glucorónido, kaempferol-7-rutinósido y otros. Así como también Maryani y Wira (2022) encontraron la presencia de kaempferol-3-rutinósido, quercetina, kaempferol y quercimetrina en hojas de *Desmodium triquetrum* DC mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LCMS-MS). Por lo que podemos deducir que el contenido de flavonoides difiere según la especie de *Desmodium* y de la parte de la planta usada en el análisis.

### 3.4.2. Placa cromatográfica de flavonoides en fracciones apolares



En la línea base de izquierda a derecha quercetina (Q), quercetina-3-glucorónido (Q3G), kaempferol (K), kaempferol-3-glucósido (K3G), fracción clorofórmica (F3), fracción clorofórmica sin taninos (F5), apigenina (A), apigenina-7-glucósido (A7G) y rutina (R).

**Fuente:** Las autoras

Figura 12 Cromatografía en Capa Fina de flavonoides en fracciones apolares

PATRÓN	Rf	Característica de la banda
Quercetina	0.29	Coloración amarilla de gran intensidad
Quercetina-3-glucorónido	0.02	Coloración amarilla e intensidad elevada
Kaempferol	0.45	Coloración celeste brillante de gran intensidad
Kaempferol-3-glucósido	0.03	Coloración central amarilla con borde verde, intensidad moderada
Apigenina	0.37	Coloración verde brillante en el centro, intensidad elevada
Apigenina-7-glucósido	0.04	Coloración verde de intensidad moderada
Rutina	0.04	Coloración amarilla y gran intensidad

**Fuente:** Las autoras

Tabla 10 Características de las bandas de los patrones en la placa cromatográfica de flavonoides en fracciones apolares

FRACCIÓN	Rf	Características de la banda	Posibles metabolitos
F3	0.03	Coloración amarilla con bordes rojizos	Quercetina-3-glucorónido Rutina
	0.37	Coloración ligeramente amarilla y de baja intensidad	Apigenina
	0.47	Coloración amarilla e intensidad moderada	Flavonoides
	0.59	Coloración roja y alta intensidad	Otros constituyentes
	0.64	Coloración roja e intensidad moderada	Otros constituyentes
	0.76	Coloración roja opaca e intensidad moderada	Otros constituyentes
	0.86	Coloración roja opaca de intensidad baja	Otros constituyentes
F5	0.01	Coloración roja brillante	Otros constituyentes
	0.47	Coloración amarilla/verde de muy baja intensidad	Flavonoides
	0.59	Coloración roja brillante e intensidad moderada	Otros constituyentes
	0.76	Coloración roja opaca e intensidad moderada	Otros constituyentes
	0.85	Coloración amarillo ligero y baja intensidad	Otros constituyentes

**Fuente:** Las autoras

Tabla 11 Resultados de las fracciones F3 y F5 en la placa cromatográfica de flavonoides en fracciones apolares

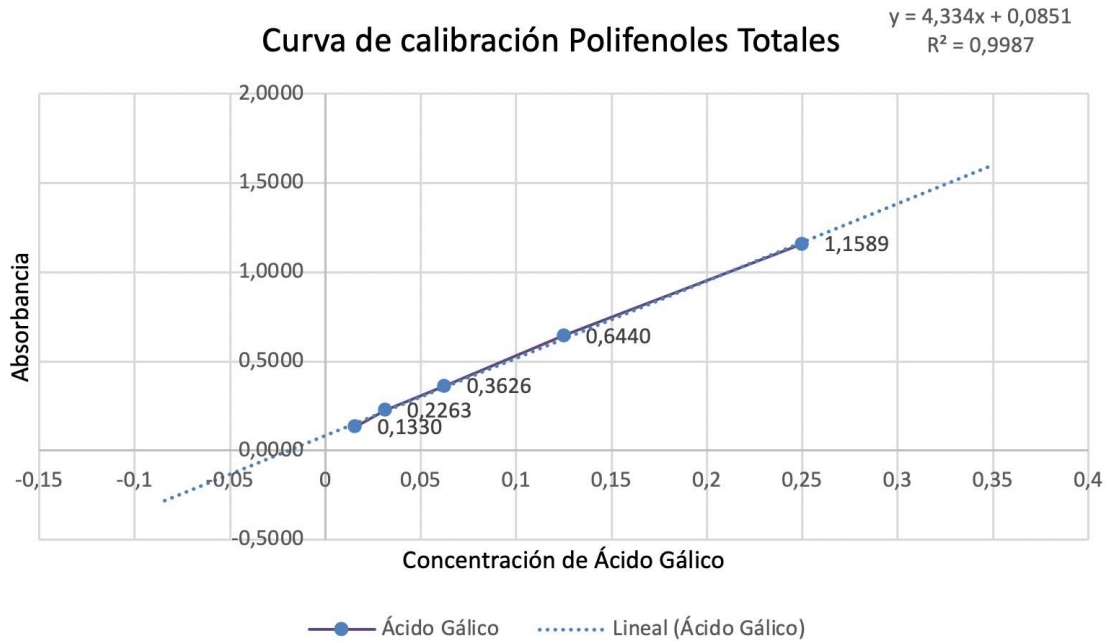
La tabla 10 muestra los patrones utilizados con sus respectivos Rf y características de la banda, mientras que la tabla 11 muestra los Rf de las bandas de la fracción F3 y F5. El contenido cualitativo de flavonoides según la placa cromatográfica podría estar constituido por quercetina-3-glucorónido, rutina, apigenina-7-glucósido, apigenina y kaempferol-3-glucósido, en diferentes concentraciones. Mientras que las bandas rojas corresponden a metabolitos apolares entre ellos carotenoides, triterpenoides y tetraterpenoides, que se visualizan en esta placa debido a su apolaridad (Zhang et al., 2020). Es evidente la menor cantidad y concentración de componentes flavonoides en la placa apolar lo cual se puede atribuir a la estructura de estos compuestos. La propiedad de solubilidad es afectada por la estructura química del compuesto y esto a su vez influir en la polaridad, por lo que es recomendable probar con otras fases de diferente apolaridad para obtener una elución adecuada de los patrones (Alara, Abdurahman & Ukaegbu, 2021).

Según Xu, et al. (2021) evaluaron la actividad antioxidante de glicósidos fenólicos y flavonoides con acción antioxidante de *Desmodium caudatum*, la fraccionó mediante cromatografía HPLC reportando la presencia de apigenina en dichas fracciones. De igual manera Puodziuniene et al. (2011) en el cual se realizó una estimación cuantitativa por HPLC de flavonoides en *Desmodium canadense* donde la particularidad se presentó en que recolectó la materia prima vegetal durante el inicio de la floración para una mayor cantidad de flavonoides, obtuvo en su mayoría apigenina 7 glucósido (Fung-Boix, & Fonseca-Turruella, 2021; Wagner, & Blandt, 2001). También un estudio realizado en Brasil, de acuerdo a Da Costa et al., (2019), en la Universidad Federal de Uberlândia, en el género de *Cassia bakeriana*, perteneciente a la familia Fabaceae, donde a partir de sus hojas en maceración se obtuvieron extractos con n-hexano y con etanol. Y que mediante un fraccionamiento por extracción líquido-líquido mediante HPLC-DAD se condujo a un aislamiento de flavonoides: kaempferol-3-O-rhamnósido (I) y kaempferol (II).

### 3.5. Actividad antioxidante

#### 3.5.1. Capacidad reductora de Folin-Ciocalteu (ensayo FCR) para cuantificación de Polifenoles Totales

A partir de los datos de absorbancia obtuvimos la siguiente curva de calibración utilizando Ácido Gálico como patrón. La línea de tendencia fue hallada con ayuda de Microsoft Office Excel, la cual se indica un coeficiente de determinación  $R^2=0.9987$  y es representada con la ecuación de la recta  $y=4.334x+0.0851$ .



**Fuente:** Las autoras

Figura 13 Curva de calibración de Polifenoles Totales utilizando Ácido Gálico como patrón a 765 nm

La media aritmética de los datos obtenido tras la interpolación de las muestras (F1, F2, F3 y F4) junto con su desviación estándar se muestran en la tabla 12. Todas las fracciones presentan una distribución simétrica al coincidir el promedio con la mediana y por este motivo se determina la media conjuntamente con la desviación estándar.

Fracción	Número de muestras (n)	Promedio + Desviación estándar DE (mg/ml)	mg de Ácido Gálico/g de extracto seco
F1	18	0.1998 ± 0.004	199.8 ± 4
F2	18	0.2115 ± 0.015	211.5 ± 15
F3	18	0.0777 ± 0.005	77.7 ± 5
F4	18	0.2082 ± 0.004	208.2 ± 4

**Fuente:** Las autoras

Tabla 12 Media aritmética y desviación estándar de las fracciones F1, F2, F3 y F4 en la cuantificación de Polifenoles Totales

Grupo vs grupo	Media de los grupos		Probabilidad (P)
F1 VS F2	0.1998	0.2115	0.0009
F1 VS F3	0.1998	0.0777	2.55 E-14
F1 VS F4	0.1998	0.2082	0.0288
F2 VS F3	0.2115	0.0777	2.55 E-14
F2 VS F4	0.2115	0.2082	0.6647*
F3 VS F4	0.0777	0.2082	2.55 E-14

Nivel de significancia: 0.05

ANOVA

con  $p < 0.05$

\*No presentan diferencia estadística ( $p > 5$ )

**Fuente:** Las autoras

Tabla 13 Prueba de Tukey en la cuantificación de Polifenoles Totales en función de las fracciones



Entre las diferentes fracciones analizadas, la F1, F2 y F4 mostraron mayor contenido fenólico con 199.8, 211.5 y 208.2 mg de ácido gálico/g de extracto seco. La fracción F3 en comparación de las demás muestras, posee el menor contenido fenólico de 77.7 mg de ácido gálico/g de extracto seco. El mayor contenido fenólico presenta la fracción F2 (fracción metanólica), correspondiendo una equivalencia de 211.5 mg de ácido gálico/g de extracto. El aumento del contenido fenólico en la F2 (metanólica) en comparación de la F1 (extracto crudo), puede deberse a la fase de desengrasado y retirado de clorofila que sufre el extracto crudo para obtenerse la fracción F2.

El análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un nivel de significancia de 0.05, busca comparar las medias aritméticas del contenido fenólico presentes en las diferentes fracciones a partir del método Folin-Ciocalteu. Al evaluar todas las fracciones, ANOVA muestra el valor de  $P < 0.05$  determinando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Por lo tanto, aplicamos la prueba de Tukey que nos permite comparar las medias aritméticas tomadas de dos en dos, estableciendo si existe diferencias significativas o no y especificando las fracciones implicadas en la comparación. En todas las comparaciones realizadas se obtiene  $P < 0.05$ , que se traduce a diferencia significativa, a excepción del análisis F2 vs F4 con  $P > 0.05$  que indica que no existe diferencia significativa. La fracción F2 y F4 han evidenciado los valores más altos de contenido fenólico, al no existir diferencias significativas establecemos la similitud de dicho contenido fenólico en ambas fracciones.

En un estudio realizado en el año 2022, determinan el efecto anticolítico de *Desmodium styracifolium* en ratones con colitis ulcerosa. La muestra vegetal fue adquirida en un mercado en la ciudad Gulin en China. Determinan el contenido fenólico en las partes aéreas en extracto etanólico mediante la reacción de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como patrón. Los resultados mostraron un contenido fenólico total de 73.3 mg de ácido gálico/g de extracto, representando un valor disminuido a comparación con este trabajo. Mencionan que los ácidos orgánicos encontrados presentaban baja solubilidad en etanol y por ende pueden afectar al contenido fenólico extraído (Li et al., 2022). Según Nsemi et al. (2010) el contenido fenólico total de las hojas de *Desmodium adscendens* obtenidas extraídas con metanol 50% en Nigeria es equivalente a 11.15 mg de ácido gálico/g de extracto seco. Asimismo, Venkatachalam y Muthukrishnan (2012) señalan que el contenido fenólico total en el extracto etanólico de *Desmodium gangeticum* (recolectada en India) fue de  $16.2 \pm 0.7$  mg de ácido gálico/g de extracto seco. Los resultados obtenidos en la presente investigación superan por mucho a los reportados en estos estudios, observando gran variación aun siendo especies del mismo género. Por lo que se confirma nuevamente que el contenido fenólico también depende de la procedencia de la planta, método extractivo y solvente de extracción.

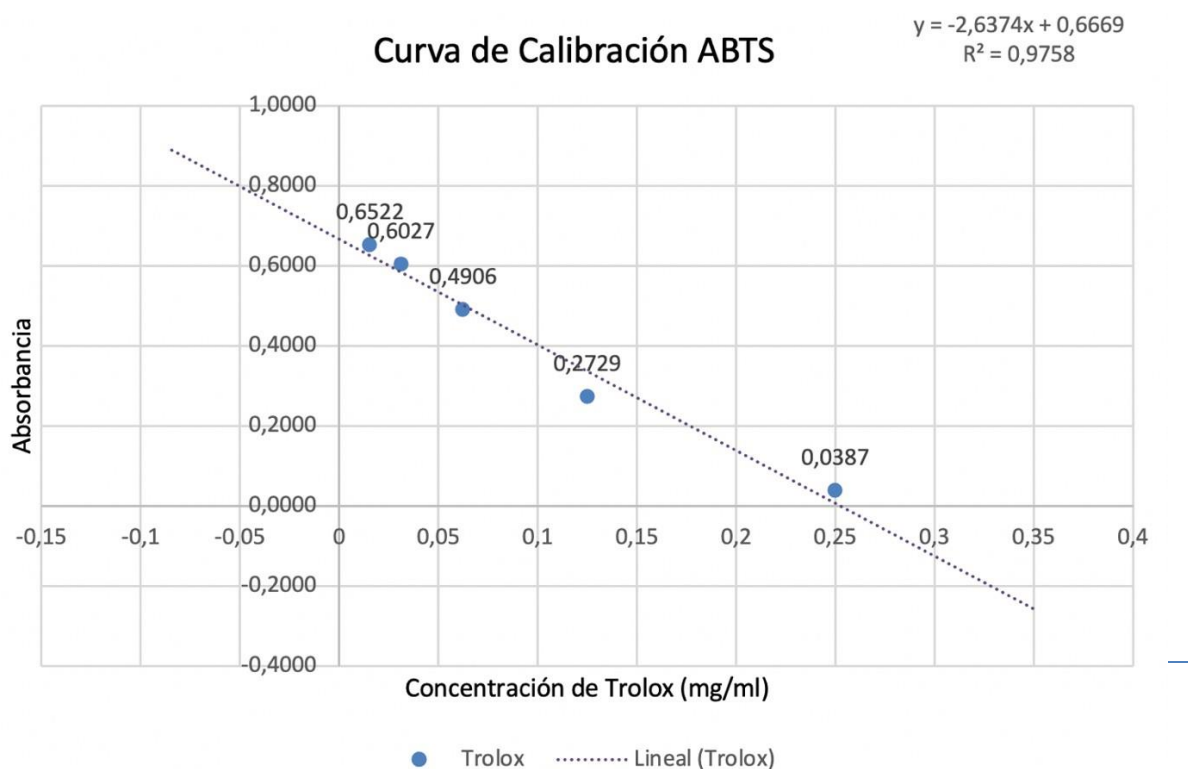


Por otro lado, Ayoola et al. (2018), en su estudio por determinar el tamizaje fitoquímico actividad antioxidante, antiulceroso y toxicidad en *Desmodium adscendens*, realizan una comparación entre el contenido fenólico presente en las hojas de la planta como en el tallo mediante el método de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como patrón, las muestras fueron diluidas previamente en etanol. El contenido fenólico de las hojas y tallos es de 10 y 24 mg de ácido gálico/gramos de extracto respectivamente, aunque en las hojas se observaron el más alto contenido de flavonoides; por tanto, se atribuye a estos últimos la actividad antioxidante ya que las hojas presentaron mayor actividad antioxidante. Por otro lado, en la presente investigación se utilizó las partes aéreas en donde probablemente los metabolitos extraídos potencializaron el contenido fenólico, siendo importante analizar dicho contenido por separado para determinar con exactitud en que parte de la planta se encuentra los metabolitos farmacológicamente activos.

Madrid et al. (2018) evaluó la capacidad antioxidante en extractos de *Psoralea glandulosa L.* (familia Fabaceae) en diferentes partes de la planta (corteza, hojas, tallos y raíces) recolectadas en el borde de la carretera. El mayor contenido fenólico total se encontraba en las hojas con 1.65 mg de ácido gálico/g de extracto seco. Lo que se asocia a que estos metabolitos cumplen una función protectora frente a estrés ecológico como contaminación y radiación solar, por lo que se encuentra disminuida su concentración en esta especie.

### 3.5.2. Método de captura del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)

A partir de los datos obtenidos se elaboró la curva de calibración, donde el patrón o estándar es Trolox. La línea de tendencia indica un coeficiente de determinación de  $R^2=0.9758$  y está representada por la siguiente ecuación de la recta  $y= -2.6374x+0.6669$ .



**Fuente:** Las autoras

Figura 14 Curva de calibración de técnica ABTS utilizando Trolox como patrón a 734 nm

La media aritmética de las fracciones F1, F2, F3 y F4 se indican en la siguiente tabla junto con la desviación estándar y coeficiente de variación, las variables presentan distribución simétrica.

Fracción	Número de muestras (n)	Promedio + Desviación estándar (DE) (mg/ml)	mg de Trolox/g de extracto seco
F1	18	0.2375 ± 0.0002	237.5 ± 0.2
F2	18	0.2378 ± 0.0003	237.8 ± 0.3
F3	18	0.2096 ± 0.012	209.6 ± 12
F4	18	0.2378 ± 0.0002	237.8 ± 0.2

**Fuente:** Las autoras

Tabla 14 Media aritmética y desviación estándar de las fracciones F1, F2, F3 y F4 en método ABTS

Grupo vs grupo	Media de los grupos		Probabilidad (P)
F1 VS F2	0.2375	0.2378	0.9988*
F1 VS F3	0.2375	0.2096	2.55 E-14
F1 VS F4	0.2375	0.2378	0.9990*
F2 VS F3	0.2378	0.2096	2.55 E-14
F2 VS F4	0.2378	0.2378	1*
F3 VS F4	0.2096	0.2378	2.55 E-14

Nivel de significancia: 0.05

ANOVA

con  $p < 0.05$

\* No presentan diferencia estadística ( $p > 5$ )

**Fuente:** Las autoras

Tabla 15 Prueba de Tukey en la técnica ABTS en función de las fracciones

Los resultados obtenidos de la prueba antioxidante ABTS muestran que la fracción 3 (fracción clorofórmica) presenta la menor actividad antioxidante de todas las muestras analizadas, corresponde a 209.6 mg de Trolox/gramo de extracto seco. Al igual que las anteriores pruebas, la fracción F2 (fracción etanólica) y fracción F4 (fracción acuosa) presentan la actividad más alta y en esta ocasión, ambas indican ser equivalentes a 237.8 mg de Trolox/gramo de extracto. Como se menciona anteriormente, la actividad reflejada en la fracción F1 (extracto crudo), es levemente inferior a la fracción F2 ya que no presenta un desengrasado previo de la muestra como es el caso de la fracción F2.

La prueba Tukey mostró que no hay diferencias significativas en F1 vs F2, F1 vs F4 y F2 vs F4 con  $P > 0.05$ . Todas las fracciones comparadas con F3 presentan diferencias significativas con  $P < 0.05$ . La capacidad del compuesto antioxidante por neutralizar el catión radical ABTS\*, es mayor en la fracción cruda, metanólica y acuosa de *Desmodium molliculum*, en comparación con la fracción clorofórmica.

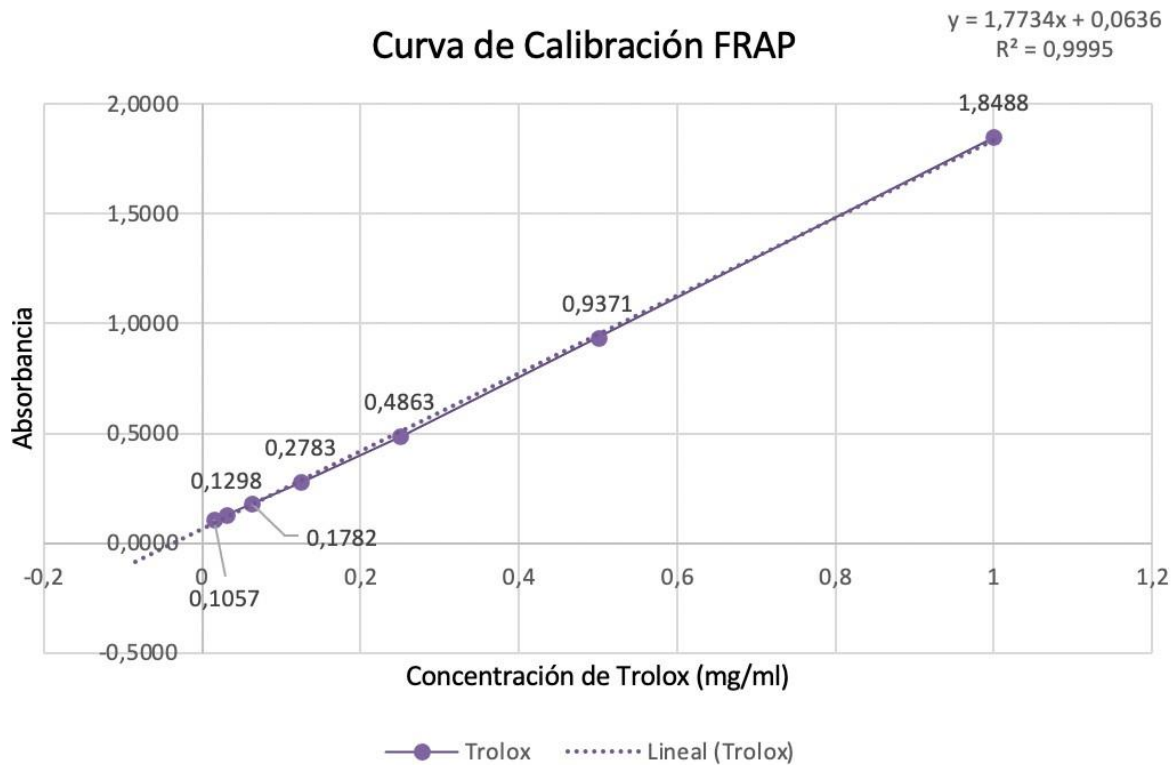
En China, se realizó el estudio de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en

varias especies de *Desmodium*. Las especies involucradas en el estudio son *D. gangeticum*, *D. sequax*, *D. triflorum*, *D. heterocarpon*, *D. intortum*, *D. microphyllum*, *D. renifolium*, *D. scorpiurus*, *D. tortuosum* y *D. uncinatum*; y fueron recolectadas en diferentes lugares en Taiwan. Los resultados mostraron que la especie con mayor actividad antioxidante es *D. sequax* equivalente a 1.5  $\mu$ moles de Trolox/mg de extracto seco, y la de menor actividad antioxidante es *D. renifolium* equivalente a 0.1  $\mu$ moles de Trolox/mg de extracto seco (Tsai et al., 2011), que equivalen a 375.46 y 25.029 mg de Trolox/g de extracto seco, respectivamente. Por lo tanto, de las especies revisadas, incluida *Desmodium molliculum* analizada en la presente investigación, se ha demostrado la capacidad antioxidante importante asociado a compuesto fenólicos.

Según Ouerfelli, Ben y Almajano (2018) la capacidad por neutralizar el catión ABTS\* es mayor en las flores que en las hojas de la especie *Anthyllis vulneraria* (familia Fabaceae), lográndose obtener 1.42 y 0.82 mM Trolox/g extracto seco, respectivamente. En el presente estudio la combinación de hojas, brotes y flores ha evidenciado una sinergia de la capacidad antioxidante en las fracciones, siendo mayor comparado con los resultados de Ouerfelli, Ben y Almajano. Asimismo, Ahmed et al. (2022) determinan la actividad antioxidante mediante ABTS en *Acacia jacquemontii* en extracto metanólico frente a extracto en n-hexano. Los resultados del extracto metanólico ( $122.36 \pm 0.8$  mg Trolox/g extracto seco) superan a los encontrados en el extracto n-hexano ( $74.37 \pm 0.49$  mg Trolox/g extracto seco). Presenta un comportamiento similar a nuestros resultados, ya que en la fracción apolar (F3) la capacidad antioxidante es levemente reducida y es atribuible a la afinidad del metabolito por solventes polares.

### 3.5.3. Ensayo de poder reductor/antioxidante férrico (FRAP)

A partir de los datos obtenidos se elaboró la curva de calibración, donde el patrón o estándar es Trolox. La línea de tendencia indica un coeficiente de determinación de  $R^2=0.9995$  y está representada por la siguiente ecuación de la recta  $y=1.7734x+0.0636$ .



**Fuente:** Las autoras

Figura 15 Curva de calibración de técnica FRAP utilizando Trolox como patrón a 593 nm

La tabla 16 indica el promedio conjuntamente con la desviación estándar, los datos obtenidos de las fracciones F1, F2, F3 y F4 muestran una distribución simétrica de los datos.

Fracción	Número de muestras (n)	Promedio + Desviación Estándar (DE) (mg/ml)	mg de Trolox/g de extracto seco
F1	18	0.2306 ± 0.0069	230.6 ± 6.9
F2	18	0.2770 ± 0.0248	277.0 ± 24.8
F3	18	0.1096 ± 0.0068	109.6 ± 6.8
F4	18	0.2619 ± 0.0267	261.39 ± 26.7

Fuente: Las autoras

Tabla 16 Media aritmética y desviación estándar de las fracciones F1, F2, F3 y F4 en método FRAP

Grupo vs grupo	Media de los grupos		Probabilidad (P)
F1 VS F2	0.2306	0.2770	1.7677 E-09
F1 VS F3	0.2306	0.1096	2.55 E-14
F1 VS F4	0.2306	0.2619	2.7368 E-05
F2 VS F3	0.2770	0.1096	2.55 E-14
F2 VS F4	0.2770	0.2619	0.0865*
F3 VS F4	0.1096	0.2619	2.55 E-14

Nivel de significancia: 0.05

ANOVA

con  $p < 0.05$

\* No presentan diferencia estadística ( $p > 5$ )

Fuente: Las autoras

Tabla 17 Prueba de Tukey en la técnica FRAP en función de las fracciones

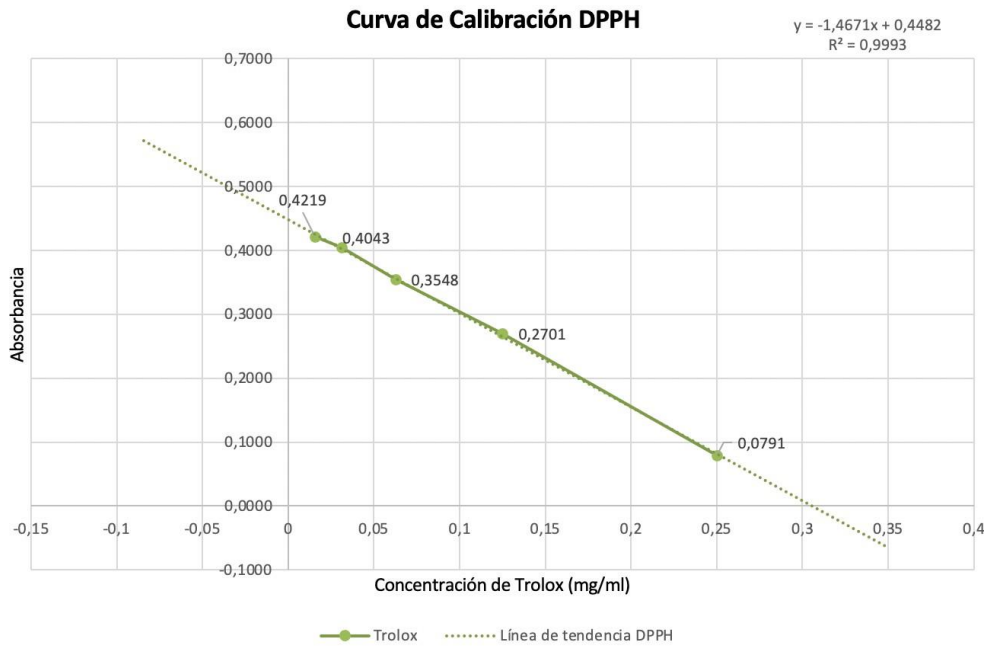
FRAP es una técnica que evalúa la capacidad del antioxidante para reducir iones férricos a ferrosos, observándose mayor capacidad antioxidante en la fracción F2 como se muestra en la tabla 16. Al aplicar análisis de varianza de una vía (ANOVA) se muestra un comportamiento similar a las anteriores pruebas, ya que se evidencia diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos analizados (fracciones). Tras emplear la prueba Tukey se encontraron diferencias significativas en todas las comparaciones, excepto en F2 vs F4; por lo tanto, la fracción metanólica y acuosa presentan similar actividad reductora de iones férricos a ferrosos.

*Acacia jacquemontii*, pertenece familia Fabaceae, está distribuida principalmente en regiones semiáridas del mundo. Se ha demostrado actividades farmacológicas analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Ahmed et al. (2022) utilizaron las hojas de la planta secadas a la sombra y trituradas, con las cuales se obtuvieron un extracto metanólico a partir del cual se obtuvo una fracción en n-hexano. Para el ensayo de poder reductor usaron Trolox como estándar, y los resultados indican que el extracto metanólico y n-hexano son equivalentes a 453.18 y 217.80 mg Trolox/g de extracto seco, respectivamente. Es evidente la disminución del poder reductor en la fase apolar (n-hexano) en comparación a la fase polar. Algo similar sucede en la fracción clorofórmica y metanólica del presente estudio, lo cual puede deberse mayor contenido fenólico en la fracción metanólica, incrementado la capacidad reductora. Por otro lado, se reporta mayor capacidad reductora en las flores de *Anthyllis vulneraria* que en sus hojas, hallaron equivalencias de 3.30 y 1.90 mM de Trolox/g de extracto seco (Oerfelli & Ben, 2018). Aunque todas especies pertenecen a la familia Fabaceae, los resultados obtenidos en el presente estudio en las fracciones (F1, F2, F3 y F4) muestran poder reductor reducido en comparación con ambos estudios. Madrid et al., (2012) reporta mayor poder reductor en el extracto diclorometano de las hojas de *Psoralea glandulosa* con 2.71 mM/g de extracto seco, seguido del extracto n-hexano (0.93 mM/g de extracto seco), acetato de etilo (0.58 mM/g de extracto seco) y finalmente metanol (0.36 mM/g de extracto seco). Los

resultados más bajos fueron encontrados en los extractos de las raíces de la misma especie, comprobando que el contenido de metabolitos difiere en la misma planta de una parte a otra.

3.5.4. Ensayo de captación de radicales libres (DPPH) (2,2-di(4-terc-octilfenil)-1-picrilhidrazilo)

La curva de calibración se elaboró a partir de los datos obtenidos, donde el patrón o estándar es Trolox. La línea de tendencia indica un coeficiente de determinación de  $R^2=0.9993$  y está representada por la siguiente ecuación de la recta  $y=-1.4671x+0.4482$ .



Fuente: Las autoras

Figura 16 Curva de calibración de técnica DPPH utilizando Trolox como patrón a 517 nm

La siguiente tabla muestra la media junto con la desviación estándar de las fracciones F1, F2, F3, F4, F5 y F6, las cuales presentan distribución simétrica de los datos.

Fracción	Número de muestras (n)	Promedio + Desviación estándar (DE) (mg/ml)	mg de Trolox/g de extracto seco
F1	18	0.2455 ± 0.0003	245.5 ± 0.3
F2	18	0.2583 ± 0.0002	258.3 ± 0.2
F3	18	0.1530 ± 0.0004	153.0 ± 0.4
F4	18	0.2600 ± 0.000009	260.0 ± 0.009
F5	18	0.0383 ± 0.00003	38.3 ± 0.03
F6	18	0.0529 ± 0.000001	52.9 ± 0.001

Fuente: Las autoras

Tabla 18 Media aritmética y desviación estándar de las fracciones F1, F2, F3 y F4 en método DPPH

Grupo vs grupo	Media de los grupos		Probabilidad (P valor)
F1 VS F2	0.2455	0.2583	1.8096 E-14
F1 VS F3	0.2455	0.1530	1.4543 E-14
F1 VS F4	0.2455	0.2600	1.4766 E-14

F1 VS F5	0.2455	0.0383	1.3766 E-14
F1 VS F6	0.2455	0.0529	1.3988 E-14
F2 VS F3	0.2583	0.1530	1.4543 E-14
F2 VS F4	0.2583	0.2600	0.7802*
F2 VS F5	0.2583	0.0383	1.3433 E-14
F2 VS F6	0.2583	0.0529	1.3877 E-14
F3 VS F4	0.1530	0.2600	1.4543 E-14
F3 VS F5	0.1530	0.0383	1.4543 E-14
F3 VS F6	0.1530	0.0529	1.4543 E-14
F4 VS F5	0.2600	0.0383	1.3433 E-14
F4 VS F6	0.2600	0.0529	1.3766 E-14
F5 VS F6	0.0383	0.0529	1.4766 E-14

Nivel de significancia: 0.05

ANOVA

con  $p < 0.05$

\* No presentan diferencia estadística ( $p > 5$ )

**Fuente:** Las autoras

Tabla 19 Prueba de Tukey en la técnica DPPH en función de las fracciones

De acuerdo a la tabla 18, en cuanto a la relación existente entre las fracciones estudiadas mediante el método DPPH, se puede expresar que la fracción 2 (fracción metanólica) destaca en conjunto con la fracción 4, las fracciones con menos actividad antioxidante se visualizaron fueron 5 y 6, observándose el mismo comportamiento en los otros métodos de capacidad antioxidante.

Es importante mencionar que esta técnica mide la capacidad eliminadora de radicales libres, como es el DPPH\*. Con fines estadísticos, se aplicó análisis de varianza de una vía (ANOVA), con nivel de significancia de 0.05 para establecer si existe diferencias significativas entre las 6 fracciones obtenidas a partir de *Desmodium molliculum*. Apreciamos según el test de ANOVA que existen diferencias significativas entre los grupos (F1, F2, F3, F4, F5 y F6) con valor de  $P < 0.05$ , justificando la variación notable de la media aritmética en cada fracción. Se utilizó la prueba de Tukey para comparar las fracciones tomadas en pares; con valor de  $P < 0.05$  existen diferencias significativas en todas las fracciones. Aun así, presenta el mismo comportamiento donde la F2 vs F4 presentan un valor de  $P > 0.05$  indicando que no existen diferencias significativas. La capacidad de eliminar radicales libres se relaciona fuertemente con el contenido fenólico en cada una de las fracciones, aunque no fue posible evaluar el contenido fenólico de las fracciones 5 y 6, ya que la cantidad de extracto representó un factor limitante.

De acuerdo con Vergun et al. (2019), en Ucrania, donde se evaluó el potencial antioxidante de extractos en etanol al 80% por maceración de hojas de cuatro plantas de familias diferentes: *Brassica campestris*, *Desmodium canadensis*, *Rhaponticum carthamoides* *Sinapis alba*. Se determinó la actividad antioxidante de las muestras utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y en la que los resultados de este parámetro fueron expresados en mg



de Trolox equivalente por gramo de materia seca. Obteniéndose de esa manera resultados de 7.15 a 9.00 mg Trolox/g extracto seco, lo que caracteriza notoriamente en el presente trabajo al obtener valores de casi 22 veces más alto, destacando así que *D. molliculum* representa una valiosa fuente de compuestos biológicamente activos frente a *Desmodium canadensis*. A partir de este artículo y de esta investigación es notorio que el método extractivo tiene especial interés al obtener una cantidad significativa de metabolitos.

Asimismo, otro estudio en India que evaluó las actividades antioxidantes de *Desmodium triflorum* Linn. y *Pogostemon heyneanus* Benth, utilizaron el ensayo de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), cuantificaron la actividad depuradora de radicales DPPH y exhibida por *D. triflorum* obteniéndose un valor de 0,54 mg Trolox/g extracto seco y que fue superior a la de *P. heyneanus* con 0,53 mg Trolox/g extracto seco. Concluyendo que ambas plantas han exhibido actividad antioxidante dependiente de la concentración (Prabodha et al., 2022). Por otra parte, otro estudio basado en la investigación de la actividad antioxidante de un grupo perteneciente a la familia Fabaceae, donde se usó la parte aérea de las mismas, la evaluaron mediante el ensayo DPPH utilizando Trolox como estándar. A partir de los extractos etanólicos se presentaron valores de 6,97 a 8,14 mg Trolox/g extracto seco al inicio de la etapa de crecimiento de la vegetación, frente a 4,6 a 6,69 mg Trolox/g extracto seco obtenido en la etapa de floración (Vergun et al., 2022). Señalamos la diferencia que existe entre el inicio de la etapa de vegetación y la floración, lo cual indica que el contenido fenólico varía según la etapa en la que se encuentre la especie vegetal, siendo mayor al inicio de la etapa de vegetación, según el señalado estudio. Rescatamos también que al emplear partes aéreas (hojas) se obtiene una mayor actividad antioxidante como en el presente estudio.



## Capítulo IV

### 4. Conclusiones y recomendaciones

#### 4.1. Conclusiones

El método extractivo de percolación ha permitido la obtención de un alto rendimiento de extracto seco de *Desmodium molliculum*, que comparados con otros estudios resulta ser elevado.

En el presente trabajo, se ha obtenido exitosamente seis fracciones enriquecidas con potencial actividad antioxidante como el resultado de un fraccionamiento líquido-líquido.

La cromatografía en capa fina ha logrado plasmar cualitativamente el contenido de metabolitos secundarios con interés en los compuestos fenólicos, responsables de la capacidad antioxidante de la especie estudiada. Las placas cromatográficas de flavonoides polares y apolares de *Desmodium molliculum* indican cualitativamente la presencia de compuestos fenólicos como rutina, quercetina-3-glucorónico, apigenina, apigenina-7-glucósido y kaempferol-3-glucósido, siendo las fracciones polares con bandas más definidas y separadas.

Las fracciones con mayor contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante son el extracto metanólico (F2) y el extracto acuoso (F4). Por lo tanto, al ser el contenido fenólico total proporcional a la actividad antioxidante demostrada, se logró concluir que el metanol y el medio acuoso son solventes con gran poder extractivo de metabolitos en esta especie. Y por lo tanto, el método de partición líquido-líquido ha demostrado ser confiable en el aislamiento de metabolitos de interés.

#### 4.2. Recomendaciones

Al evidenciar el gran contenido fenólico en las fracciones enriquecidas, recomendamos el estudio fitoquímico cuantitativo de la especie, considerando la información limitada acerca de *Desmodium molliculum*.

Recomendamos realizar más estudios experimentales de *Desmodium molliculum* para poder comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante el mismo método de extracción, y comparar con estudios de diferentes métodos de extracción e identificar el método con mayor rendimiento.

Análisis del fraccionamiento líquido-líquido usando solventes de menor polaridad, que establecerá la afinidad de los metabolitos por uno u otro solvente. Evaluar también la posibilidad de usar fracciones enriquecidas de *Desmodium molliculum*, en la preformulación

de fitoterápicos de manera que se aprovechan al máximo su acción farmacológica.

Partir de una mayor cantidad de extracto crudo que permitirá obtener mayor rendimiento de cada fracción, haciendo posible el análisis completo.

Evaluar por separada las partes aéreas de la especie, con el fin de conocer cuál es la parte de la planta con mayor actividad farmacológica.

## Referencias

- Acero-Carrión, B., Millones-Sánchez, E., Ticona-Rebagliati, D. I., & Torres-Bravo, L. (2012). Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* en el modelo murino de asma. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 17(2), 62-67
- Aguirre Z., Yaguana C., Merino B., (2014). Plantas medicinales de la zona andina de la provincia de Loja. Primera Edición. Loja, Ecuador. 193 p.
- Ahmed M., Rehman K., Ahmad S., Aati H., Sherif A., Ashkan M., Alrahimi J., Abdullah E., Imran M., Abbas M., Hussain M., Umair M., Ahmad B., Korma S., (2022). Phytochemical, antioxidant, enzyme inhibitory, thrombolytic, antibacterial, antiviral and *in silico* studies of *Acacia jacquemontii* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, Vol 15 (12).
- Alara O., Abdurahman N., Ukaegbu C., (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*. Vol 4, pp. 200 – 214.
- Ansaloni R., Wilches I., León F., Orellana A., Peñaherrera E., Tobar V., de Witte P., (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, Vol 23 (1), 89-97.
- Apak, R., Capanoglu, E., & Shahidi, F. (Eds.). (2018). Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent trends and applications. First Edition: John Wiley & Sons Ltd. Oxford, UK Ed.
- Apak, R. (2019). *Current issues in antioxidant measurement*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Doi:10.1021/acs.jafc.9b03657
- Arias Q., Hermosilla R., Valdés L., Castillo H., Eichler B., (2022). Caracterización fitoquímica y actividad antioxidante in vitro de extractos polares de frutos de *Coccoloba uvifera* L. *Revista Cubana de Química*. Vol 34 (2). Pp. 211 – 226.
- Asfaw, M. M., & Abebe, F. B. (2021). Traditional medicinal plant species belonging to Fabaceae family in Ethiopia: A systematic review. *International Journal of Plant Biology*, 12(1), 8473.
- Ávalos A., Pérez E., (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*. Vol 3 (2), pp. 119-145.
- Ayoola G., Eze S., Johnson O., Adeyemi D., (2018). [Phytochemical screening, antioxidant,](#)
- Gisela Alexandra Merchán Muñoz - Milena Mishel Samaniego Carrión

- antiulcer and toxicity studies on *Desmodium adscendens* (Sw) DC Fabaceae leaf and stem. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 17 (7), pp. 1301-1307.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
- Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: a review. *Journal of Apicultural Research*, 1–10. Doi:10.1080/00218839.2021.1901426
- Bele, A. A., & Khale, A. (2011). An overview on thin layer chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2), 256.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- Brodowska, K. M. (2017). Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*, 7(2), 108-123.
- Bursal, E., & Gülçin, İ. (2011). Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of 60 yophilized aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food research international*, 44(5), 1482-1489.
- Bussmann R., Sharon D., (2015). Plantas medicinales de los Andes y la Amazonia. La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú. Biblioteca Nacional del Perú. DOI: 10.13140/RG.2.1.3485.0962
- Bustamante F., Cueva A., (2021). Relación entre los usos medicinales tradicionales y la actividad biológica de las especies del género *Desmodium*. *Universidad de Cuenca*.
- Carvalho M., (2013). Cumarinas: Versatilidad estructural y aplicaciones en Química Farmacéutica.
- Colegate, S.M., & Molyneux, R.J. (Eds.). (2007). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*, Second Edition (2<sup>nd</sup> ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420006889>
- Da Costa T., Benatti A., Godina D., Arantes G., Machado M., Souza P., Lemos S., Goulart L., Scalón L., Ferreira R., Espindola F., Oliveira A., (2019). Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, *in vitro*, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. *Industrial Crops and Products*, Vol 140 (15)

- Enciso E., Arroyo J., (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(4), 231-237. Recuperado en 03 de noviembre de 2022, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-55832011000400002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832011000400002&lng=es&tlng=es).
- Fauli, C. (1993). *Tratado de Farmacia Galénica*. Luzán, 5. Madrid: SA de Ediciones
- Fung-Boix, Y., & Fonseca-Turruella, Y. (2021). Análisis fitoquímico de partes aéreas de *Sida pyramidata* Cav. Yerba de aura. *Revista Cubana de Química*, 33(3), 401-414
- Gaedcke. F., & Steinhoff, B. (2003). *Herbal medicinal products*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, CRC Press: 37–65
- Gomes F., Silvia I., Vargas M., Soares A., Soares E., Martinez Y., Goncalvez R., (2021). Extracción de taninos de la corteza de *Pinus* spp tratada térmicamente – aplicación como adhesivo.
- Gülcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391. Doi: 10.1007/s00204-011-0774-2
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. 94(3), 651-715. Doi:10.1007/s00204-020-02689-3
- Hassan, L. E. A., Ahamed, M. B. K., Majid, A. S. A., Baharetha, H. M., Muslim, N. S., Nassar, Z. D., ... & Abdul, M. S. (2014). Correlation of antiangiogenic, antioxidant and cytotoxic activities of some Sudanese medicinal plants with phenolic and flavonoid contents. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 1-14
- Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E., (2012). Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy.
- Hernández-Moreno L.V., Salazar, J.R., Pabón, L.C., Hernández-Rodríguez, P., (2022). Actividad antioxidante y cuantificación de fenoles y flavonoides de plantas colombianas empleadas en infecciones urinarias. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 25(1):e1690. <http://doi.org/10.31910/rudca.v25.n1.2022.1690>
- Jones W., Kinghorn A., (2006). Extraction of Plant Secondary Metabolites. *Natural Products Isolation* (pp. 323- 351). Humana Press
- Joshi, B. R., Hakim, M. M., Patel, I. C. (2023). The biological active compounds and biological activities of *Desmodium* species from Indian region: a review. *Beni-Suef University*

*Journal of Basic and Applied Sciences*, 12(1), 1-12.

- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48, 412-422.
- Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P. H., Groot, A. de, & Evstatieva, L. N. (2002). *Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. Phytochemical Analysis*, 13(1), 8–17. Doi:10.1002/pca.611
- Kumar S, & Pandey AK. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J* (2013) 2013:162750. Doi: 10.1155/2013/162750
- Kumar, S., Jyotirmayee, K., & Sarangi, M. (2013). Thin layer chromatography: a tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 18(1), 126-132.
- Ma, X., Zheng, C., Hu, C., Rahman, K., & Qin, L. (2011). The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, 138(2), 314-332
- Madiha Z., Mahpara F., Yasir S., Habib A., Khalid A., (2019). Role of primary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*. Vol 137
- Madrid A., Espinoza L., Mellado M., Osorio M., Montenegro I., Jara C., (2012). EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF *Psoralea glandulosa* L. (Fabaceae) EXTRACTS. *Journal of the Chilean Chemical Society*. Vol 57 (3) pp. 1328 – 1332.
- Mahnashi M., Ashraf M., Hassan A., Ullah H., Zeb A., Ghufran M., Fahad S., Ayaz M., Daglia M., (2023). Polyphenol-enriched *Desmodium elegans* DC. ameliorate scopolamine-induced amnesia in animal model of Alzheimer's disease: *In Vitro*, *In Vivo* and *In Silico* approaches. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Vol 165
- Manzione, M. G., Herrera-Bravo, J., Sharifi-Rad, J., Kregiel, D., Sevindik, M., Sevindik, E., ... & Pezzani, R. (2022). *Desmodium adscendens* (Sw.) DC.: A magnificent plant with biological and pharmacological properties. *Food Frontiers*, 3(4), 677-688
- Maryani F., Wira A., (2022). Microwave-assisted green synthesis of *Desmodium triquetrum*-mediated silver nanoparticles: enhanced antibacterial, antibiofilm, and cytotoxicity activities against human breast cancer cell lines. *Royal Society of Chemistry: materials advances*. Vol 3, pp. 8267 – 8275.

- Moharram, H. A., & Youssef, M. M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nsemi F., Bouayed J., Djilani A., Yao C., Soulimani R., Dicko A., (2011). Chemical Composition and, Cellular Evaluation of the Antioxidant Activity of *Desmodium adscendens* Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Olascuaga-Castillo, K., Rubio-Guevara, S., Valdiviezo-Campos, J. E., & Blanco-Olano, C. (2020). *Desmodium molliculum* (Kunth) DC (Fabaceae); Perfil etnobotánico, fitoquímico y farmacológico de una planta andina peruana. *Ethnobotany Research and Applications*, 19, 1-13
- Ortiz, R., Antilén, M., Speisky, H., Aliaga, M. E., López-Alarcón, C., & Baugh, S. (2012). Application of a microplate-based ORAC-pyrogallol red assay for the estimation of antioxidant capacity: first action 2012.03. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1558-1561.
- Ouerfelli M., Ben L., Almajano M., (2018). Radical Scavenging and Antioxidant Activity of *Anthyllis Vulneraria* Leaves and Flowers. *Molecules*. Vol 23 (7).
- Prabodha, K., Jayasuriya, W., Arawwawala, L., Liyanaarachchi, G., & Suresh, T. (2022). Individual and Combined Antioxidant Activities of *Desmodium triflorum* Linn. And *Pogostemon heyneanus* Benth. *Allied Health Sciences*. General Sir John Kotelawala Defence University, Sri Lanka
- Puodziunene, G., Janulis, V., Ivanauskas, L., Lukosius, A., Barsteigene, Z., & Ribokaite, V. (2009). Quantitative estimation of flavonoids in the vegetative and reproductive organs of showy tick trefoil (*Desmodium canadense*). *Pharmaceutical chemistry journal*, 43, 324-327.
- Puodziuniene, G., Kairyte, V., Janulis, V., Razukas, A., Barsteigiene, Z., & Ragazinskiene, O. (2011). *Quantitative hplc estimation of flavonoids in showy tick trefoil (Desmodium canadense) herbs*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 45(2), 88–90. Doi:10.1007/s11094-011-0566-2
- Ramesh, P., Jagadeesan, R., Sekaran, S., Dhanasekaran, A., & Vimalraj, S. (2021). Flavonoids: Classification, Function, and Molecular Mechanisms Involved in Bone



- Remodelling. *Frontiers in endocrinology*, 12, 779638.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.779638>
- Rasul, M. G. (2018). Conventional extraction methods use in medicinal plants, their advantages and disadvantages. *Int. J. Basic Sci. Appl. Comput*, 2, 10-14.
- Salam, U.; Ullah, S.; Tang, Z.-H.; Elateeq, A.A.; Khan, Y.; Khan, J.; Khan, A.; Ali, S., (2023). Plant Metabolomics: An Overview of the Role of Primary and Secondary Metabolites against Different Environmental Stress Factors. *Life* , 13, 706.  
<https://doi.org/10.3390/life13030706>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999
- Santos, E. L., Maia, B. H. L. N. S., Ferriani, A. P., & Teixeira, S. D. (2017). Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. *Flavonoids – From Biosynthesis to Human Health*. Doi:10.5772/67861
- Seidel V., (2006). Initial and Bulk Isolation. *Natural Products Isolation* (pp. 27- 46). Humana Press
- Shah B., Seth A., (2010). *Pharmacognosy & Phytochemistry*. First Edition: Haryana, India
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 132531.
- Silvestre C., Santos J., Lima J., Zagatto E., (2009). Liquid–liquid extraction in flow analysis: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, Vol 652 (1) pp. 54 – 65.
- Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., Kapoor, A., Vo, D.-V. N., & Prabhakar, S. (2021). Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3409–3443. Doi:10.1007/s10311-021-01217-8
- Stalikas, C. D. (2007). *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids*. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268–3295. Doi:10.1002/jssc.200700261
- Swami, H. S., Singh, K. S. P., Gennaro, L., & Dutt, R. D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *Trieste: United Nations Industrial Development*



- Organization and the International Centre for Science and High Technology, 200, 266*
- Symonowicz M, & Kolanek M. (2012) Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnol Food Sci*; 76(1): 35-41
- Tsai J., Huang G., Chiu T., Huang S., Huang S., Huang T., Lai S., Lee C., (2011). Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Vol 5 (4), pp. 468 – 476.
- Usman, M., Khan, W. R., Yousaf, N., Akram, S., Murtaza, G., Kudus, K. A., ... & Nazre, M. (2022). Exploring the phytochemicals and anti-cancer potential of the members of fabaceae family: A comprehensive review. *Molecules*, 27(12), 3863.
- Vallejo Y., Barros L., Anaya J., (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de Química*. Vol 35 (2)
- Venkatachalam U., Muthukrishnan S., (2012). Free radical scavenging activity of ethanolic extract of *Desmodium gangeticum*. *Journal of Acute Medicine*. Vol 2 (2), pp 36 – 42.
- Verdecía, D.M., Herrera-Herrera, R. del Carmen., Torres, E., Sánchez, A.R., Hernández-Montiel, L.G., Herrera, R.S., Ramírez, J.L., Bodas, R., Giráldez, F.J., Guillaume, J., Uvidia H., & López S., (2021). Metabolitos primarios y secundario de seis especies de árboles, arbustos y leguminosas herbáceas. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 55(1), 77-93. Epub 01 de marzo de 2021. Recuperado en 18 de mayo de 2023, de
- Vergun, O. M., Rakhmetov, D. B., Shymanska, O. V., Fishchenko, V. V., Ivanišová, E., & Brindza, J. (2019). Leaves extracts of selected crops as potential source of antioxidants. *Plant Introduction*, 84, 82-88
- Vergun, O., Bondarchuk, O., Rakhmetov, D., Rakhmetova, S., & Shymanska, O. (2022). Assessment of antioxidant activity of ethanol extracts of *Vigna* spp. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, 6(2).
- Visht, S., & Chaturvedi, S. (2012). Isolation of natural products. *Journal of Current Pharma Research*, 2(3), 584

- Vlietinck, A., Pieters, L., & Apers, S. (2009). Legal requirements for the quality of herbal substances and herbal preparations for the manufacturing of herbal medicinal products in the European Union. *Planta Medica*, 75(07), 683-688.
- Voigt, R., & Bornschein, M. (1982). *Tratado de tecnología farmacéutica* (No. RS403 V871). Zaragoza ed: España
- Wagner, H., & Bladt, S., (2001). *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2<sup>nd</sup> edition. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag. 2001. ISBN 978-3- 540-78102-8.
- Li X., Liu C., Liang J., Zhou L., Li J., Chen H., Jiang T., Guan Y., Khoo H., (2022). Antioxidative mechanisms and anticolic potential of *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. in DSS-induced colitic mice. *Journal of Functional Foods*. Vol 93
- Xu, Q. N., Zhu, D., Wang, G. H., Lin, T., Sun, C. L., Ding, R., ... & Chen, H. F. (2021). Phenolic glycosides and flavonoids with antioxidant and anticancer activities from *Desmodium caudatum*. *Natural Product Research*, 35(22), 4534-4541.
- Zhang Z., Peng H., Wai M., Zeng X., Brennan M., Brennan C., (2020). Preparation and characterization of whey protein isolate-chlorophyll microcapsules by spray drying: Effect of WPI ratios on the physicochemical and antioxidant properties. *Journal of Food Engineering* 267

## Anexos

### Anexo A. Muestra botánica



## Anexo B. Lista de materiales utilizados en la metodología

<b>Materiales</b>
Bolsas grandes de papel
Tijeras podadoras
Recipientes plásticos
Planchas metálicas
Soportes universales
Equipo de venoclisis
Botellas de vidrios con fondo recortado
Tapones de goma
Base para matraces de fondo redondo
Material de vidrio
Papel aluminio
Pinzas metálicas
Nuez metálica
Tapones de caucho
Viales ámbar
Placas de sílica gel de diferentes tamaños
Pipetas automáticas
Cucharillas metálicas (espátulas)

## Anexo C. Pruebas estadísticas aplicadas al contenido fenólico total (Técnica Folin-Ciocalteu) en función de las fracciones

ANOVA con nivel de significancia 0.05 con valor de  $P < 0.05$

Prueba de Tukey

Grupo vs grupo	Media de los grupos		Probabilidad (Valor P)
F1 VS F2	0.1998	0.2115	0.0009
F1 VS F3	0.1998	0.0777	2.55 E-14
F1 VS F4	0.1998	0.2082	0.0288
F2 VS F3	0.2115	0.0777	2.55 E-14
F2 VS F4	0.2115	0.2082	0.6647*
F3 VS F4	0.0777	0.2082	2.55 E-14

\* No presentan diferencia estadística ( $p > 5$ )

## Anexo D. Pruebas estadísticas aplicadas a la técnica ABTS en función de las fracciones

ANOVA con nivel de significancia 0.05 con valor de  $P < 0.05$

Prueba de Tukey

Grupo vs grupo	Media de los grupos		Probabilidad (Valor P)
F1 VS F2	0.2375	0.2378	0.9988*
F1 VS F3	0.2375	0.2096	2.55 E-14
F1 VS F4	0.2375	0.2378	0.9990*
F2 VS F3	0.2378	0.2096	2.55 E-14
F2 VS F4	0.2378	0.2378	1*
F3 VS F4	0.2096	0.2378	2.55 E-14

\* No presentan diferencia estadística ( $p > 5$ )

## Anexo E. Pruebas estadísticas aplicadas a la técnica FRAP en función de las fracciones

ANOVA con nivel de significancia 0.05 con valor de  $P < 0.05$

Prueba de Tukey

Grupo vs grupo	Media de los grupos		Probabilidad (Valor P)
F1 VS F2	0.2304	0.2768	1.7677 E-09
F1 VS F3	0.2304	0.1094	2.55 E-14
F1 VS F4	0.2304	0.2613	2.7368 E-05
F2 VS F3	0.2768	0.1094	2.55 E-14
F2 VS F4	0.2768	0.2613	0.0865*
F3 VS F4	0.1094	0.2613	2.55 E-14

\* No presentan diferencia estadística ( $p > 5$ )

## Anexo F. Pruebas estadísticas aplicadas a la técnica DPPH en función de las fracciones

ANOVA con nivel de significancia 0.05 con valor de  $P < 0.05$

Prueba de Tukey

Grupo vs grupo	Media de los grupos		Probabilidad (P valor)
F1 VS F2	0.2455	0.2583	1.8096 E-14
F1 VS F3	0.2455	0.1530	1.4543 E-14
F1 VS F4	0.2455	0.2600	1.4766 E-14
F1 VS F5	0.2455	0.0383	1.3766 E-14
F1 VS F6	0.2455	0.0529	1.3988 E-14
F2 VS F3	0.2583	0.1530	1.4543 E-14
F2 VS F4	0.2583	0.2600	0.7802*
F2 VS F5	0.2583	0.0383	1.3433 E-14
F2 VS F6	0.2583	0.0529	1.3877 E-14
F3 VS F4	0.1530	0.2600	1.4543 E-14
F3 VS F5	0.1530	0.0383	1.4543 E-14
F3 VS F6	0.1530	0.0529	1.4543 E-14
F4 VS F5	0.2600	0.0383	1.3433 E-14
F4 VS F6	0.2600	0.0529	1.3766 E-14
F5 VS F6	0.0383	0.0529	1.4766 E-14

\* No presentan diferencia estadística ( $p > 5$ )