



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“Comparación de la aplicabilidad de las técnicas DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y Peróxidos para extractos resinosos y no resinosos en metanol y diclorometano”

**Tesis previa a la obtención del título de
Bioquímica Farmacéutica**

AUTORAS:

Karla Esther Espinoza Castro

María Belén López Domínguez

DIRECTORA:

Dra. Isabel Wilches Arizábala Ms.C.

CO-DIRECTORA:

Dra. Elisabeth Vila Calsina PhD.

CUENCA - ECUADOR

2015

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la capacidad antioxidante en extractos de hojas de *Jungia rugosa* Less y *Desmodium molliculum*, mediante las técnicas de DPPH y Peróxidos.

La especie botánica, conocida tradicionalmente con el nombre de hierba del infante fue colectada en la provincia del Azuay y caracterizada taxonómicamente en el herbario UDA como "*Desmodium molliculum*".

Los extractos se obtuvieron por percolación, utilizando metanol y diclorometano como solventes de extracción. Una fracción de los mismos se utilizó para la caracterización fitoquímica empleando un método general de screening basado en cromatografía de capa fina (TLC). Los resultados mostraron la presencia de compuestos fenólicos (flavonoles y flavonas), así como compuestos terpenoides como los más importantes.

Para evaluar la actividad antioxidante se aplicaron dos técnicas: la decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y la capacidad de barrido del peróxido de hidrógeno, empleándose como estándar ácido ascórbico cuyo valor de IC₅₀ fue de 2.68 y 58.63 µg/ml respectivamente.

En el ensayo de DPPH el valor de IC₅₀ de los extractos metanólicos de *Jungia rugosa* Less se encontró en un rango de 40 – 129 µg/ml y en diclorometano entre 74 – 340 µg/ml. Para *Desmodium molliculum* fue 48 µg/ml y 80 µg/ml respectivamente.

Al desarrollar el ensayo de barrido del peróxido de hidrógeno, el IC₅₀ del extracto metanólico de *Desmodium molliculum* fue 61 µg/ml, y en *Jungia rugosa* Less se encontró en un rango entre 177 – 349 µg/ml. La actividad antioxidante de los extractos en diclorometano no pudo ser evaluada por esta técnica debido a una incompatibilidad con los reactivos empleados.

Los hallazgos sugieren que los extractos evaluados de "*Jungia*" y "*Desmodium*" tienen actividad antioxidante, lo cual podría atribuirse a la presencia de polifenoles y compuestos terpenoides.

Palabras claves: *Jungia rugosa* Less, *Desmodium molliculum*, antioxidante, radical libre, DPPH, Peróxido de hidrógeno.



ABSTRACT

In the present research, the antioxidant capacity present in methanol and di-chloro methane extracts obtained from leaves of *Jungia rugosa* Less and *Desmodium molliculum* was evaluated.

Desmodium molliculum, a plant traditionally named “hierba del infante” was collected into the Azuay province and was botanically characterized at Herbarium Azuay (HA) into the Universidad del Azuay.

Dried extracts were obtained by means of percolation, using methanol and dichloromethane as solvents for extraction. A fraction of those extracts was used for their phytochemical characterization using a general screening method based on Thin Layer Chromatography (TLC). Results show the presence of phenolic compounds (flavonols and flavone) and terpenoids as the more important compounds.

To evaluate antioxidant activity, two different techniques were applied: discoloration of radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazilo (DPPH) and the hydrogen peroxide scavenging assay, ascorbic acid was used as a standard, IC₅₀ value for standard was determined as 2.68 ug/ml by the first method and 58.63 ug/ml by the second method.

In the DPPH assay, IC₅₀ value for methanolic extracts of *Jungia rugosa* Less was between 40 – 129 µg/ml and for dichloromethane extracts was between 74 – 340 µg/ml. IC₅₀ of *Desmodium molliculum* was 48 µg/ml in methanolic extract and 80 ug/ml in dichloromethane extract.

When hydrogen peroxide assay was developed, the IC₅₀ value of *Desmodium molliculum* methanolic extract was 61 µg/ml, and between 177 – 349 µg/ml for *Jungia rugosa* Less. Antioxidant activity of dichloromethane extracts was not evaluated by this technique due to incompatibility with the reagents used.

The findings suggest that “*Jungia*” and “*Desmodium*” have antioxidant activity, which could be related to the presence of phenolic compounds.

Keywords: *Jungia rugosa* Less, *Desmodium molliculum*, antioxidant, free radical, DPPH, hydrogen peroxide.



ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I	21
1. MARCO TEÓRICO.....	21
1.1 PLANTAS A ESTUDIAR.....	21
1.1.1 <i>Jungia rugosa</i> Less	21
1.1.2 <i>Desmodium molliculum</i>	23
1.2 METABOLISMO VEGETAL	24
1.2.1 Generalidades	24
1.2.2 Rutas Biosintéticas	25
1.2.3 División de los metabolitos secundarios.....	26
1.3 OXIDACIÓN	32
1.3.1 Radicales libres.....	32
1.3.2 Especies Reactivas de Oxígeno (EROS).....	33
1.3.3 Estrés Oxidativo	34
1.4 ANTIOXIDANTES.....	34
1.4.1 Clasificación.....	34
1.5 ENSAYOS EMPLEADOS PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	35
1.5.1 Ensayo de captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•).....	36
1.5.2 Ensayo de barrido del peróxido de hidrógeno.	37
CAPÍTULO II	38
2. MATERIALES	38
2.1 RECOLECCIÓN, LAVADO Y SECADO DE LA PLANTA	38
2.1.1 Recolección	38
2.1.2 Lavado.....	38
2.1.3 Secado	38
2.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	39
2.2.1 Percolación	39
2.2.2 Concentración de extractos.....	40
2.3 ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY- TLC).....	40
2.4 LIOFILIZACIÓN DE EXTRACTOS PARA ELIMINAR EL SOLVENTE	41



2.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE42

 2.5.1 Evaluación de la actividad antioxidante por el método del DPPH42

 2.5.2 Evaluación de la actividad antioxidante por el método de barrido del peróxido de hidrógeno44

CAPÍTULO III46

3. MÉTODOS46

 3.1 RECOLECCIÓN, LAVADO Y SECADO DE LA PLANTA46

 3.1.1 Recolección46

 3.2 CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA.....48

 3.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS48

 3.3.1 Trituración de las drogas48

 3.3.2 Extracción continua por percolación según U.S.P. (United States Pharmacopea).....48

 3.3.3 Concentración de extractos.....49

 3.4 ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC - TLC)53

 3.4.1 Preparación de placas para TLC55

 3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE58

 3.5.1 Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica del DPPH58

 3.5.2 Evaluación de la actividad antioxidante según el ensayo de barrido del peróxido de hidrógeno.61

 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS66

 3.7 CALCULO DEL IC₅₀66

CAPÍTULO IV.....67

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN67

 4.1 CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA.....67

 4.2 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS68

 4.3 AGOTAMIENTO DE LA DROGA68

 4.4 RENDIMIENTO DE LA DROGA69

 4.5 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)70

 4.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE74

 4.6.1 Evaluación de la actividad antioxidante por la técnica del DPPH74



4.6.2	Evaluación de la actividad antioxidante por el método de barrido del peróxido de hidrógeno	77
5.	CONCLUSIONES.....	84
6.	RECOMENDACIONES.....	85
7.	ANEXOS.....	92



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Jungia rugosa</i> Less	22
Figura 2. <i>Desmodium molliculum</i>	24
Figura 3. Esquema del metabolismo primario y secundario.	25
Figura 4. Origen de los metabolitos secundarios	26
Figura 5. Estructura molecular del isopreno.	27
Figura 6. Estructuras presentes en los aceites esenciales	28
Figura 7. Estructura de las saponinas	28
Figura 8. Lignanós	29
Figura 9. Clasificación de los flavonoides	30
Figura 10. Estructura de las quinonas	31
Figura 11. Alcaloides	31
Figura 12. Mecanismo de acción antioxidante.....	34
Figura 13. Principio de ensayo DPPH capacidad de captación de radicales	36
Figura 14. Transformación del peróxido de hidrógeno en agua por el ácido ascórbico	37
Figura 15. Rotavapor	50
Figura 16. Cromatogramas del agotamiento de la droga en la extracción metanólica.....	69
Figura 17. Cromatograma en UV 366 de flavonoides y cumarinas: revelador Productos naturales (PEG 4000).....	72
Figura 18. Cromatogramas en filtro visible de Triterpenos: revelador vainillina 1% en H ₂ SO ₄	73
Figura 19. Curva de calibración de ácido ascórbico por el método DPPH.	75
Figura 20. Representación gráfica la curva de calibración del ácido ascórbico por el método de barrido del peróxido de hidrógeno.....	79

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno.	33
Tabla 2. Clasificación y cofactores de los antioxidantes.	35
Tabla 3. Origen y mecanismo de acción de los antioxidantes.	35
Tabla 4. Especificaciones de diclorometano.....	39
Tabla 5. Especificaciones del metanol.....	39
Tabla 6. Referencias del nitrógeno gaseoso.	40
Tabla 7. Especificaciones del DPPH.	42
Tabla 8. Especificaciones del etanol analítico.	42
Tabla 9. Especificaciones del ácido ascórbico.	43
Tabla 10. Especificaciones del agua ultra pura- Calidad HPLC.....	43
Tabla 11. Especificaciones de di-sodio hidrógeno fosfato.	44
Tabla 12. Especificaciones de sodio hidrógeno fosfato monohidratado.	44
Tabla 13. Especificaciones del peróxido de hidrógeno.....	45
Tabla 14. Adsorbentes utilizados en TLC.....	55
Tabla 15. Detección de metabolitos en el revelado postcromatográfico.	57
Tabla 16. Preparación de los patrones de ácido ascórbico.	60
Tabla 17. Preparación de los patrones de extracto.	61
Tabla 18. Preparación de los patrones de ácido ascórbico -Técnica de barrido del peróxido de hidrógeno.....	64
Tabla 19. Preparación de los patrones de extracto de <i>Jungia rugosa</i> Less.....	65
Tabla 20. Preparación de los patrones de extracto de <i>Desmodium molliculum</i>	65
Tabla 21. Preparación de los blancos, test y control-Técnica de barrido del peróxido de hidrógeno.	66
Tabla 22. Extractos obtenidos por percolación de <i>Desmodium molliculum</i>	68
Tabla 23. Tiempo de agotamiento de principios activos.	68
Tabla 24. Rendimiento de <i>Desmodium molliculum</i>	70
Tabla 25. Resultados del análisis de cromatografía de capa fina (TLC) de <i>Jungia rugosa</i> Less y <i>Desmodium molliculum</i>	74
Tabla 26. Actividad antioxidante del ácido ascórbico por el método DPPH.....	75
Tabla 27. ANOVA inter-día e intra-día de las curvas de calibración de ácido ascórbico por el método de DPPH.....	75
Tabla 28. Valores de IC50 de los extractos por el método DPPH.	77



Tabla 29. Actividad antioxidante del ácido ascórbico por el método de barrido del peróxido de hidrógeno..... 78

Tabla 30. ANOVA inter-día e intra-día de las curvas de calibración de ácido ascórbico por el método de barrido del peróxido de hidrógeno..... 79

Tabla 31. Valores de IC₅₀ de los extractos por el método del peróxido de hidrógeno..... 82



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Datos de recolección de la muestra botánica.....	92
Anexo B. Caracterización botánica de <i>Desmodium molliculum</i>	93
Anexo C. Certificado de caracterización de la especie botánica.	94
Anexo D. Marcha Fitoquímica para cromatografía de capa fina.	97
Anexo E. Resultados de las curvas de calibración del ácido ascórbico por la técnica del DPPH.	101
Anexo F. Resultados de las curvas de calibración del ácido ascórbico por la técnica de barrido del peróxido de hidrógeno.	106
Anexo G. Resultados de los extractos metanólicos de <i>Jungia rugosa</i> Less y <i>Desmodium molliculum</i> - DPPH.	122
Anexo H. Resultados de los extractos en diclorometano de <i>Jungia rugosa</i> Less y <i>Desmodium molliculum</i> -DPPH.	133
Anexo I. Resultados de los extractos metanólicos de <i>Jungia rugosa</i> Less y <i>Desmodium molliculum</i> - Peróxidos.	150



ABREVIATURAS

DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
µg	Microgramos
ml	Mililitros
TLC	Thin layer chromatography (Cromatografía en capa fina)
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
M	Metros
µl	Microlitros
g	Gramos
mmHg	Milímetros de mercurio
l	Litros
% w/v	Porcentaje peso/volumen
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milímetros
UV	Ultravioleta
A	Absorbancia
nm	Nanómetros
DCM	Diclorometano
MET	Metanol



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Yo, *Karla Esther Espinoza Castro*, autora de la tesis “**Comparación de la aplicabilidad de las técnicas DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y Peróxidos para extractos resinosos y no resinosos en metanol y diclorometano**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 2 de junio del 2015


Karla Esther Espinoza Castro

0104611561



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Yo, Karla Esther Espinoza Castro, autora de la tesis "**Comparación de la aplicabilidad de las técnicas DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y Peróxidos para extractos resinosos y no resinosos en metanol y diclorometano**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 2 de junio del 2015

Karla Esther Espinoza Castro

0104611561



Universidad de Cuenca
Cláusula de derechos de autor

Yo, María Belén López Domínguez, autora de la tesis “**Comparación de la aplicabilidad de las técnicas DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y Peróxidos para extractos resinosos y no resinosos en metanol y diclorometano**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 2 de junio del 2015

Belén López D

María Belén López Domínguez

0103781134



Universidad de Cuenca
Cláusula de propiedad intelectual

Yo, María Belén López Domínguez, autora de la tesis "**Comparación de la aplicabilidad de las técnicas DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y Peróxidos para extractos resinosos y no resinosos en metanol y diclorometano**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 2 de junio del 2015

Belén López D.

María Belén López Domínguez

0103781134



AGRADECIMIENTOS

Este nuestro primer peldaño profesional que estamos a punto de alcanzar, genera sentimientos de agradecimiento y gratitud para todos quienes han sido parte importante en este caminar, en primer lugar elevamos nuestra mirada al cielo para decirte gracias Padre Dios por la vida y la mente que nos otorgas, gracias a nuestros familiares por el respaldo incondicional y el apoyo permanente para nuestro crecimiento personal y profesional y a nuestros queridos profesores por su valioso aporte científico y humano en la formación académica. De manera muy especial a la Dra. Isabel Wilches, un ser humano excepcional, de quien aprendimos no solo ciencia sino recibimos su generosa amistad. Nuestro agradecimiento también está dirigido a nuestra co- directora Elisabeth Vila, quien contribuyó a este trabajo con sus conocimientos y experiencia. Al Dr. Fabián León, a la Dra. Nancy Cusco, al Ing. Vladimiro Tobar, a la Dra. Marian Saá, a la Dra. Jhoana Ortiz, brillantes docentes e investigadores que nos alentaron a incursionar en este trabajo complejo de investigación y nos brindaron apoyo académico.

Al proyecto Vllir de la Universidad de Cuenca, que nos permitió hacer uso de sus laboratorios, perfectamente equipados, lo cual motivó nuestro compromiso en un trabajo responsable, serio y de aporte científico, en el campo de la investigación.

Karla Esther

María Belén



DEDICATORIA

El presente trabajo quiero dedicar principalmente a Dios y a la Virgen María, mis guías espirituales y mi fortaleza en todo momento para alcanzar mis metas.

Al ser que llena de luz y de alegría mi existencia, mi pequeña hija María Gabriela, quien ha sido siempre mi inspiración para culminar este peldaño tan anhelado.

A mi esposo Darío, por ser mi compañero de vida, el que me ha alentado para culminar esta meta y con su apoyo incondicional hizo más ligero el duro caminar estudiantil.

A mis padres, Severo y Julia, que con sus consejos y apoyo constante fueron mis pilares fundamentales en los momentos difíciles enseñándome con su ejemplo de superación, el valor del esfuerzo y del trabajo.

A mi angelito en la tierra, mi abuelita Esther que con sus oraciones ha velado por mí, de quien recibí cariño y cuidado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Juan y Paola por apoyarme siempre y confiar en mi a pesar de mis derrotas.

Con amor

Karla Esther



DEDICATORIA

A Dios, pilar primordial de mi vida, por ser mi guía y fortaleza al caminar.

A mis abuelitos, Lolita, Gonzalo y Fanny, de quienes he aprendido el verdadero valor de la familia, el esfuerzo y trabajo y con quienes he compartido los mejores momentos de mi vida.

A mis padres, Estuardo y Lucía, porque siempre han sido mi apoyo incondicional en cada paso que he dado, alentándome a seguir adelante, día a día. Además de ser mi fuente de inspiración para crecer como ser humano y proyectarme como una profesional ética y humana.

A mi hermano, por estar siempre dispuesto a ayudarme, convirtiéndose en mi compañero de estudio y llenando de alegría todos mis momentos difíciles.

Con profundo amor.

María Belén



INTRODUCCIÓN

El uso de antioxidantes en farmacología para el tratamiento de una serie de patologías asociadas al estrés oxidativo, es una posible estrategia a implementarse en el futuro. Productos de origen natural podrían ser la clave para alcanzar este propósito.

Diversos estudios han comprobado la presencia de metabolitos secundarios como polifenoles, betacarotenos, α -tocoferol en extractos de plantas, a los cuales se les ha atribuido la capacidad de actuar como antioxidantes en sistemas biológicos.

La caracterización fitoquímica de los géneros *Jungia* y *Desmodium* es de gran interés. Varias publicaciones han referido la presencia de los metabolitos antes mencionados, por lo que su confirmación estaría directamente relacionada con la actividad antioxidante que presenten las mismas.

Un punto de interés para la ciencia, es la búsqueda de ensayos capaces de guiar al investigador en el desarrollo sistemas in vitro para analizar la actividad farmacológica de los extractos vegetales.

Por lo expuesto anteriormente, el presente estudio tuvo como finalidad establecer las metodías de los ensayos de captura del radical libre estable 1,1,-difeníl-2-picríl-hidrazilo (DPPH) y la capacidad de barrido del prooxidante peróxido de hidrógeno.

Para desarrollar la siguiente investigación se plantearon la siguiente hipótesis y objetivos:

Hipótesis

Existen diferencias en la aplicabilidad de las técnicas de captura del radical libre estable 1,1,-difeníl-2-picríl-hidrazilo (DPPH) y la capacidad de barrido del peróxido de hidrógeno cuando se usan extractos resinosos y no resinosos.

Objetivo general

Comparar la aplicabilidad de las técnicas DPPH y Peróxidos para extractos resinosos y no resinosos en metanol y diclorometano.



Objetivos específicos

- Preparar los extractos metanólico y diclorometano de la hierba del Infante y evaluar su actividad antioxidante.
- Caracterizar fitoquímicamente los extractos mediante cromatografía de capa fina (TLC).
- Establecer las metodías de las técnicas para la determinación de la actividad antioxidante.
- Validar la curva de calibración de los métodos.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y en diclorometano en *Jungia rugosa* Less y hierba del infante través del método de captura del radical libre estable 1,1,-difeníl-2-picril-hidrazilo (DPPH) y la capacidad de barrido del peróxido de hidrógeno.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 PLANTAS A ESTUDIAR

1.1.1 *Jungia rugosa* Less

1.1.1.1 *Taxonomía*

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Jungia</i>
Especie	<i>rugosa</i> (1)

1.1.1.2 *Características y propiedades*

Jungia rugosa Less es el nombre aceptado de una especie dentro del género *Jungia* desde 1830, su expediente figura en los datos TICA (The International Compositae Alliance), cuyo registro es 436A8FFB-1316-47E0-9E5A-1CDF1024CDCF (2).

Gracias a la situación geográfica de nuestro país contamos con una variada flora, razón por la cual hay plantas nativas muy utilizadas en la medicina tradicional, y como consecuencia de esta extensa diversidad muchas de ellas son poco conocidas a pesar de poseer propiedades beneficiosas para la salud, tal es el caso de *Jungia rugosa* Less “carne humana”, llamada así porque ayuda principalmente a la cicatrización (3), conocida también como “matico de puna”.

Por tradición las hojas de esta planta se han utilizado tradicionalmente en la provincia del Cañar en el caso de heridas infectadas, como desinflamante y cicatrizante (4).

1.1.1.3 Descripción botánica

Jungia rugosa Less es un arbusto trepador de 2-3 m de altura, cuyo hábitat es el bosque con neblina (5). Es considerada una hierba anual o perenne (6)

Sus hojas son simples y pecioladas, peciolo de 4-5 cm, lámina coriácea, orbicular, marginalmente lobulada, algo escabrosa, base cordada, ápice con lóbulo agudo. Capítulos cortamente pedicelados, involucro campanulado, filarias 2-seriadas. Flores homógamas, numerosas, bilabiadas, blanco-moradas (6).

Los tallos son leñosos, duros, verdes sin estrías longitudinales, trepadoras y largas. La longitud del tallo puede alcanzar hasta 5 metros, siendo delgados y lisos (Figura 1) (4).

1.1.1.4 Distribución

Jungia rugosa Less se encuentra a lo largo de la Cordillera de los Andes de Ecuador hasta el sur de Perú, a una altura de 2900-3800 metros sobre el nivel del mar (6).



Figura 1. *Jungia rugosa* Less (5)

1.1.2 *Desmodium molliculum*

1.1.2.1 Taxonomía

Reino	Plantae
Filo	Spermatophyta
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Leguminosae
Familia	Fabaceae
Género	<i>Desmodium</i>
Especie	<i>molliculum</i> (7)

1.1.2.2 Características y propiedades

Desmodium molliculum es una planta conocida con el nombre de manayupa, pega-pega, margarita o hierba del infante (8). Es una medicina tradicional peruana, utilizada principalmente para hacer limpias del cuerpo. El uso médico de la hierba también se relaciona con su efecto sedativo y la utilidad de sus infusiones en condiciones inflamatorias, incluyendo inflamaciones de la zona respiratoria, las infecciones persistentes de la piel, micosis y acné, debido a su acción metabólica que realiza. Mejora la función de los riñones, estimula la excreción de la orina. Además, esta especie tiene una acción antiasmática y antialérgica (7).

Por tradición esta planta se ha utilizado en el Ecuador para curar heridas infectadas, como desinflamante y cicatrizante; así también se administra a mujeres luego del parto con la finalidad de suscitar a una pronta recuperación.

1.1.2.3 Descripción botánica

Desmodium molliculum es una planta perenne, mide aproximadamente 50 centímetros de altura (6). Sus flores tienen forma de mariposa, de son de color púrpura, pequeñas, dispuestas en racimos. Sus hojas son trifoliadas, estipuladas (Figura 2) (8).

1.1.2.4 Distribución

Esta planta se encuentra en América del Sur, crece silvestremente en las áreas pequeñas de los Andes a una altura de 1000 a 3000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) (7).



Figura 2. *Desmodium molliculum* (9).

1.2 METABOLISMO VEGETAL

1.2.1 Generalidades

Se conoce como metabolismo al conjunto de reacciones bioquímicas que permiten el funcionamiento de la estructura básica de todo ser vivo, la célula.

Los compuestos orgánicos que se hallan presentes en el vegetal pueden proceder del metabolismo primario o del metabolismo secundario del vegetal (10). Los compuestos primarios son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, desarrollo y reproducción. Comprende: glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (11).

Un aspecto metabólico que distingue el reino animal del vegetal es la capacidad de las plantas para producir sustancias que no son esenciales para su supervivencia, a las cuales se les denomina metabolitos secundarios, (12) los mismos son de gran interés desde el punto de vista farmacológico. Los compuestos secundarios cumplen preferentemente funciones ecológicas (11).

1.2.2 Rutas Biosintéticas

Como se mencionó previamente en el apartado 1.2.1 de este capítulo, existen dos tipos de metabolismo: primario y secundario, los cuales se esquematizan en la figura 3.

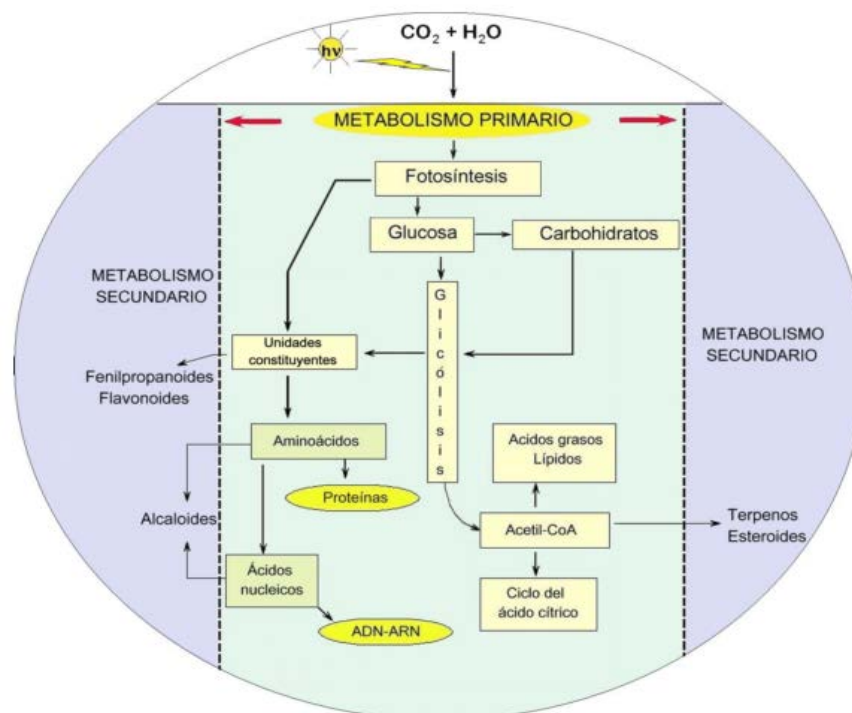


Figura 3. Esquema del metabolismo primario y secundario (13).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (14). Se pueden diferenciar tres rutas biosintéticas que dan lugar a los metabolitos secundarios:

- Ruta del ácido shikímico
- Ruta del acetato-malonato (policétidos)
- Ruta del acetato-mevalonato (ruta de la condensación isoprénica) (10).

La base en las vías metabólicas secundarias la constituyen los compuestos químicos que se producen al final de la glicólisis: el fosfoenol piruvato, el piruvato, y la Acetil Co-A (Figura 4) (15).

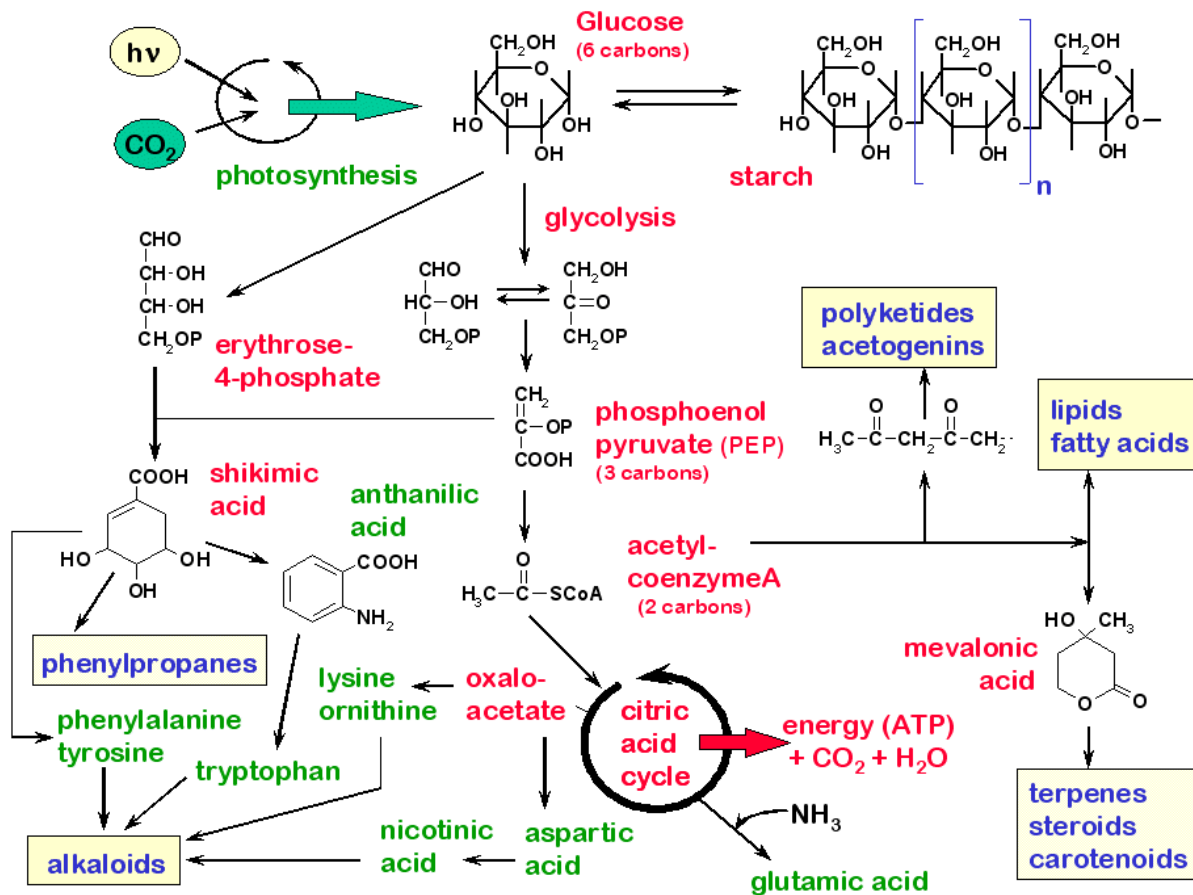


Figura 4. Origen de los metabolitos secundarios (16).

1.2.3 División de los metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios en función de su estructura química pueden clasificarse en tres grupos:

- **Terpenoides** (Isoprenoides): terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos.
- **Fenilpropanoides** (Derivados fenólicos)
 1. **Shikimatos:** fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos.

2. **Acetatos:** quinonas, antracenósidos.
- **Alcaloides** (12).

1.2.3.1 *Terpenoides*

Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (11). Los diferentes compuestos de esta clase son generalmente insolubles en agua. Son biosintetizados a partir de acetil CoA o de intermediarios glicolíticos (17).

Los terpenoides son compuestos formados por repeticiones de una molécula de cinco átomos de carbono llamada isopreno (12).

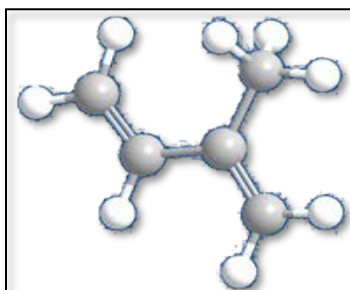


Figura 5. Estructura molecular del isopreno (18).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética. Otros tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc (11).

1.2.3.1.1 **Aceites esenciales**

Se trata de productos volátiles de naturaleza compleja, confieren un aroma agradable. Son generalmente líquidos a temperatura ambiente, tienen carácter lipofílico y son solubles en disolventes orgánicos apolares. Se oxidan con facilidad (10).

Las acciones farmacológicas que tienen son muy diversas, las más frecuentes son: antiséptica, desodorante, analgésica, antiinflamatoria, cicatrizante, repelente, expectorante, antiespasmódica, sedante, estimulante circulatorio, entre otras (19).

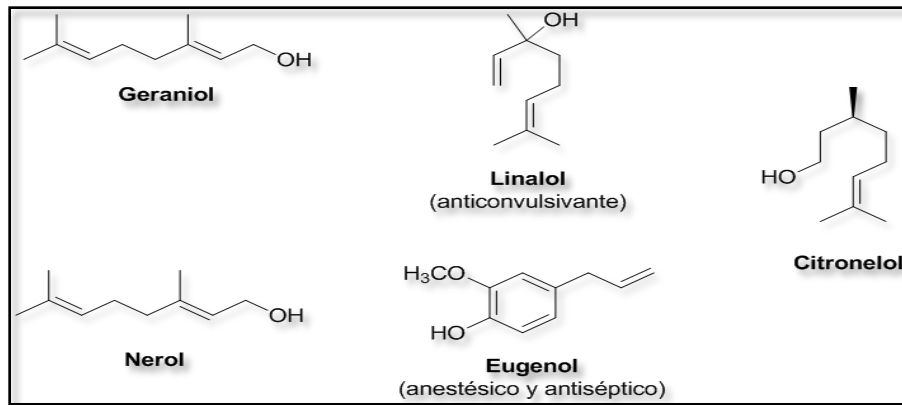


Figura 6. Estructuras presentes en los aceites esenciales (20).

1.2.3.1.2 Saponinas

Son heterósidos, de naturaleza oleosa, los cuales son solubles en agua y producen espuma cuando se agitan (21).

Las saponinas tienen un efecto mucolítico, diurético, antiinflamatorio, anti edematoso, cicatrizante, antimicrobiano y hemolítico (22).

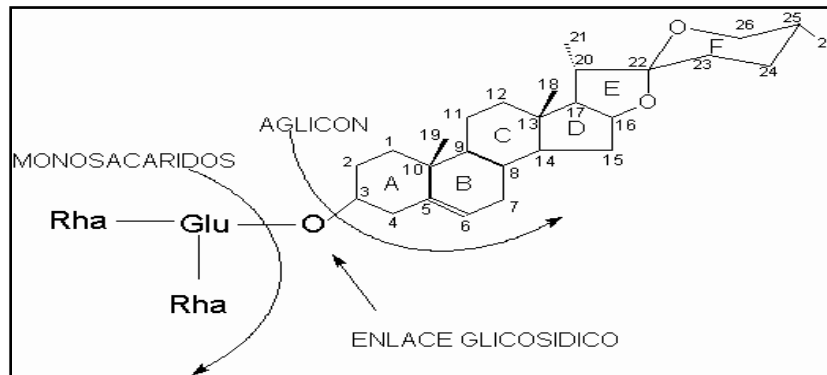


Figura 7. Estructura de las saponinas (23).

1.2.3.1.3 Heterósidos cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de γ -lactona (24), actúan directamente sobre la contractibilidad del músculo cardíaco (miocardio) y sobre la circulación aurícula-ventrículo, como consecuencia de este efecto tiene una acción diurética (10).

1.2.3.2 Fenilpropanoides

1.2.3.2.1 Fenoles

Son metabolitos secundarios que pueden originarse a partir de la ruta del ácido shikímico o de la ruta del acetato. Entre sus propiedades se destaca: el efecto colagogo, hepatoprotector, diurético, antiinflamatorio, analgésico, astringente (10).

1.2.3.2.2 Cumarinas y lignanos

Las cumarinas se derivan de benzo- α -pirona, muchas son fenólicas (10). Las cumarinas tienen estructuras muy variadas, por lo que sus propiedades farmacodinámicas abarcan una amplia gama terapéutica. Se pueden destacar: la disminución de la permeabilidad capilar, efecto venotónico, actividad fotosensibilizante, antiinflamatoria; antiespasmódica, vasodilatadora coronaria, sedante e hipnótica suave, anticoagulante, antihelmíntica, antibacteriana, etc (25).

Los lignanos son compuestos que tienen una estructura constituida por dos unidades de fenilpropano (Figura 8). Estos metabolitos se destacan por su actividad antimitótica y por su efecto antihipertensivo (10).

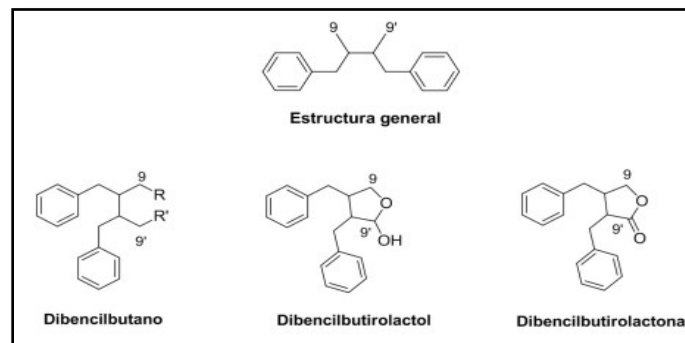


Figura 8. Lignanos (20).

1.2.3.2.3 Flavonoides

Son compuestos polifenólicos que ocurren ubicuamente en las plantas (26). Son estructuras del tipo $C_6-C_3-C_6$, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Se considera que su estructura deriva de la γ -cromona (o benzo- γ -pirona).

Los flavonoides se clasifican en: flavonas, flavonoles, flavanololes, chalconas e Isoflavonoides (Figura 9). Las diferentes especies que contienen flavonoides poseen

acciones farmacológicas: antiarrítmicas, antihemorrágicas, antiinflamatorias, antirradicales libres, antihepatotóxicas, diuréticas, antiurémicas, antiespasmódicas (10).

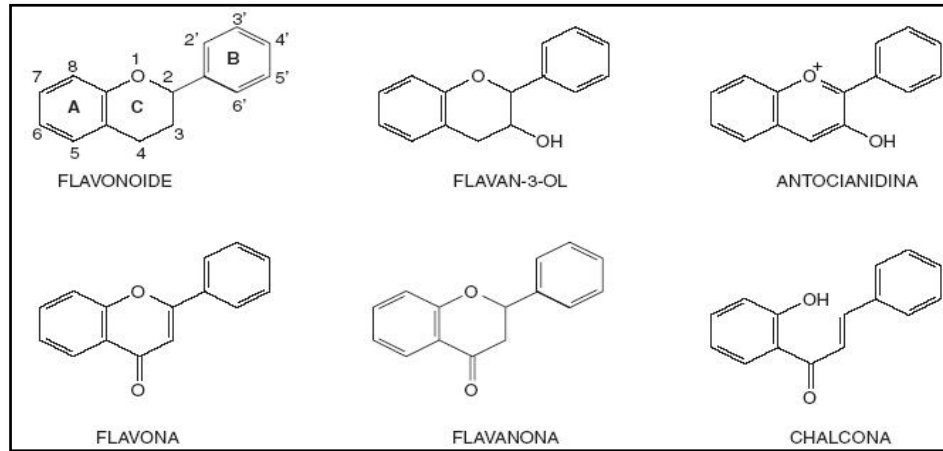


Figura.9. Clasificación de los flavonoides (27).

1.2.3.2.4 Taninos

Están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas como proteínas, alcaloides, celulosa. De esta propiedad deriva la capacidad de los taninos para curtir la piel y su poder astringente (8).

Los taninos poseen propiedades astringentes y antiinflamatorias, por lo tanto, son útiles ante diarrea o gastroenteritis (28). Además, tienen acción antioxidante, cicatrizante, antihemorrágica y reducen los niveles de colesterol (8).

1.2.3.2.5 Quinonas

Son compuestos aromáticos con dos grupos cetona (Figura 10). De todos los compuestos que tienen estructura quinónica, se distinguen los siguientes grupos:

- Benzoquinonas: derivadas del benceno, de poco interés farmacológico.
- Naftoquinonas: derivadas del naftaleno. Tienen poder antiséptico.
- Antraquinonas: derivadas del antraceno. Poseen propiedades laxantes.
- Fenantraquinonas: derivadas del fenantreno
- Antracilinas: derivadas del naftaceno. A este grupo pertenecen las tetraciclinas (8).

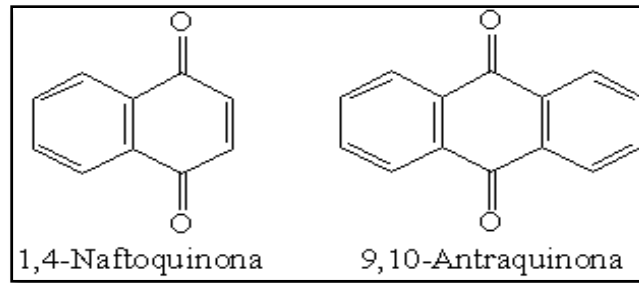


Figura 10. Estructura de las quinonas (29).

1.2.3.3 Alcaloides

Son sustancias de carácter básico que poseen nitrógeno en su composición, se forman a partir de aminoácidos (Figura 11). Son capaces de precipitar con ciertos reactivos característicos (8)(12).

Los alcaloides son de carácter tóxico, con acción fisiológica definida según el alcaloide; pequeñas dosis de algunos son suficientes para causar la muerte. Los alcaloides considerados como estupefacientes (por ejemplo los derivados del opio como la heroína, la morfina) son sustancias narcóticas, analgésicas y soporíferas que tomadas sin control, llevan al hábito, a la consecuente degeneración del organismo y finalmente a la muerte.

Sin embargo los alcaloides aplicados en una dosis farmacológica controlada, tienen aplicaciones terapéuticas valiosas: la cocaína se usa como anestésico local; la atropina en análisis ópticos para dilatar la pupila; la quinina tiene acción definitiva en el tratamiento del paludismo (30).

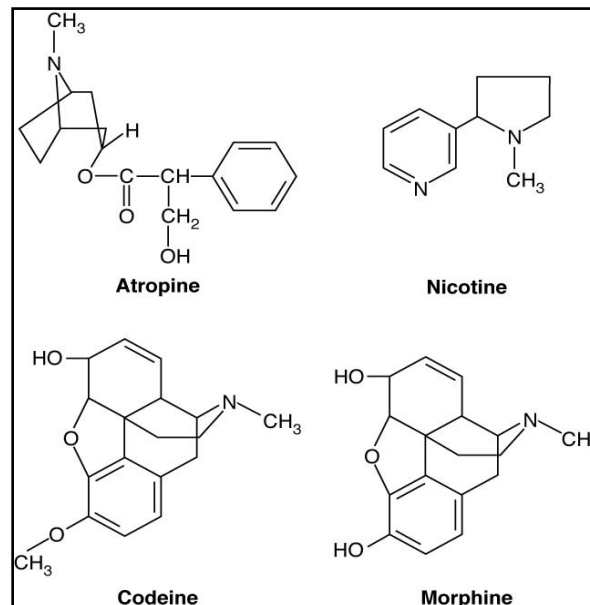


Figura 11. Alcaloides (31).

1.3 OXIDACIÓN

La oxidación es el mecanismo mediante el cual un compuesto gana electrones por medio de una transferencia desde un dador electrónico (reductor) hasta un aceptor electrónico (oxidante). Paralelamente a la oxidación ocurre la reducción de compuestos (mecanismo redox).

También son consideradas oxidaciones biológicas aquellas en las cuales ocurre la pérdida de átomos de hidrógeno o la ganancia de oxígeno existiendo siempre, paralelamente, sus correspondientes reacciones de reducción (32).

La oxidación de moléculas biológicas, membranas y tejidos, es inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, siendo la causa del aumento de la incidencia de enfermedades degenerativas en los seres humanos.

El metabolismo oxidativo, proceso biológico normal, es capaz de generar radicales libres oxigenados, altamente reactivos.

En nuestro organismo, cada célula padece unos 10.000 impactos de radicales libres al día (33) la producción de estos se da constantemente “in vivo”, lo que ha permitido desarrollar diversos mecanismos de defensa antioxidante, como medios de protección (34).

1.3.1 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son especies químicas que poseen uno o varios electrones desapareados en su orbital externo, los mismos que les confieren alta inestabilidad atómica y reactividad, por lo que colisionan con otras moléculas sustrayéndoles un electrón, para de esta manera alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón se reduce y la molécula estable que lo pierde se oxida y se convierte de esta manera en un radical por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Se les representa mediante un punto que simboliza el electrón desapareado (35).

Los radicales libres se producen en el cuerpo de manera natural como subproductos del metabolismo celular, cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplasmática y del retículo endoplásmico.

Por otra parte también son generados por factores como la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos y xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas (36).

1.3.1.1 Clasificación

Los radicales libres de oxígeno se clasifican en:

1. Radicales libres inorgánicos o primarios. Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, se caracterizan por tener vida media corta y son el anión superóxido (O_2^\bullet), el radical hidroxilo (OH^\bullet) y el óxido nítrico (NO^\bullet).

2. Radicales libres orgánicos o secundarios. Se pueden originar por transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios. En este grupo se encuentran el radical peroxilo (ROO^\bullet), acoxilo (RO^\bullet), alquilo (R^\bullet), hidroperoxilo (HOO^\bullet), y tiol (RS^\bullet).

3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres de oxígeno: especies químicas que no son consideradas radicales libres pero son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete (1O_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HClO$), el peroxinitrito ($ONOO$), e hidroperóxidos orgánicos ($ROOH$) (37).

1.3.2 Especies Reactivas de Oxígeno (EROS)

El término EROS incluye a los radicales libres y otras especies no radicálicas, que participan en la formación de agentes prooxidantes, que se generan como consecuencia de la reducción parcial del oxígeno (Tabla 1) (38).

Radicales		No radicales	
Superóxido	O_2^\bullet	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Hidroxilo	OH^\bullet	Acido hipocloroso	$HClO$
Peroxil	RO_2^\bullet	Ozono	O_3
Alkosil	RO^\bullet	Oxígeno singulete	$^1\Delta_g$
Hidroperoxil	HO_2^\bullet	Peroxinitrito	$ONOO^-$

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (39).

En condiciones fisiológicas normales, el organismo neutraliza las ERO a través de varios mecanismos de defensa antioxidante.

1.3.3 Estrés Oxidativo

Ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante, ya sea por un incremento excesivo en la génesis de los primeros o por un déficit de los segundos, lo que genera alteraciones tanto estructurales como funcionales de los órganos (40).

1.4 ANTIOXIDANTES

Sustancia que presente en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo (41). Los antioxidantes presentan alta afinidad por los radicales, colisionan con ellos y les ceden un electrón oxidándose y transformándose a su vez en un radical libre derivado del antioxidante no tóxico, y de carácter inerte.

Sin embargo el mecanismo de acción de la gran variedad de antioxidantes no siempre es el mismo, los llamados antioxidantes enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los RL y de esta manera los neutralizan (Fig. 12) (42).

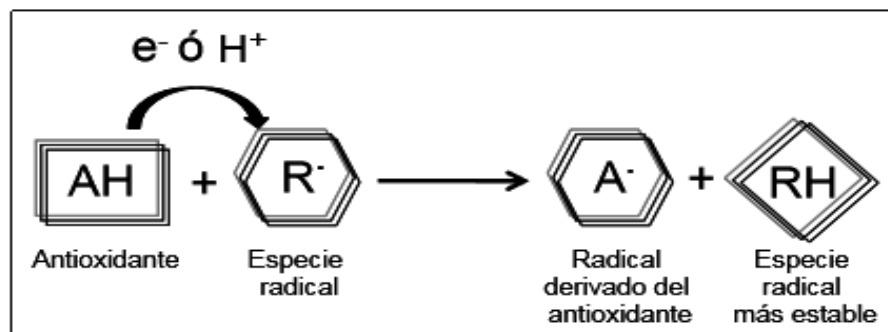


Figura 12. Mecanismo de acción antioxidante (43).

1.4.1 Clasificación

- Antioxidantes endógenos: aquellos que se encuentran en el organismo y son sintetizados por las células.

- Antioxidantes exógenos: son introducidos por la dieta y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación (33).

Exógenos	Endógenos	Cofactores
<i>Vitamina E</i>	<i>Glutación</i>	<i>Cobre</i>
<i>Vitamina C</i>	<i>Coenzima Q</i>	<i>Zinc</i>
<i>Betacaroteno</i>	<i>Ácido fólico</i>	<i>Manganeso</i>
<i>Flavonoides</i>	<i>Enzimas: Superóxidodismutasa(SOD) Catalasa Glutación peroxidasa</i>	<i>Hierro</i>
<i>Licopeno</i>		<i>Selenio</i>

Tabla 2. Clasificación y cofactores de los antioxidantes (44).

Origen	Mecanismo de Acción
Exógeno	
Vitamina E	Neutraliza oxígeno singlete Captura radicales hidroxilo Captura O ₂ [·] . Neutraliza peróxidos
Vitamina C	Neutraliza oxígeno singlete Captura radicales hidroxilo Captura O ₂ [·] . Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Beta carotenos	Neutraliza oxígeno singlete
Licopenos	Neutraliza oxígeno singlete
Polifenoles	Neutraliza oxígeno singlete
Endógenos	
Superóxido dismutasa (SOD)	Captura O ₂ [·] .
Catalasa (CAT)	Bloquea el H ₂ O ₂
Glutación peroxidasa (GPx)	Bloquea el H ₂ O ₂

Tabla 3. Origen y mecanismo de acción de los antioxidantes (28).

1.5 ENSAYOS EMPLEADOS PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La medida de la actividad antioxidante se puede realizar mediante diferentes técnicas basadas en dos estrategias distintas:

- **Determinación directa:** en donde el radical se emplea como un factor de cuantificación que produce una señal analítica. La adición del antioxidante,

provoca una disminución de la señal debido a la disminución de la concentración del radical como sucede en los métodos de atrapamiento de radicales libres: ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico), DPPH (1,1,-difeníl-2-picril-hidrazilo), y el ensayo de barrido del prooxidante peróxido de hidrógeno.

- Determinación indirecta: en donde la presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de un reactivo, y por tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal como ocurre en los métodos: ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), FRAP (poder antioxidante reductor del hierro) (26).

1.5.1 Ensayo de captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•).

Fundamento

Brand-Williams y colaboradores evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•). En este ensayo, se evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 520 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica en la Figura 13 (45).

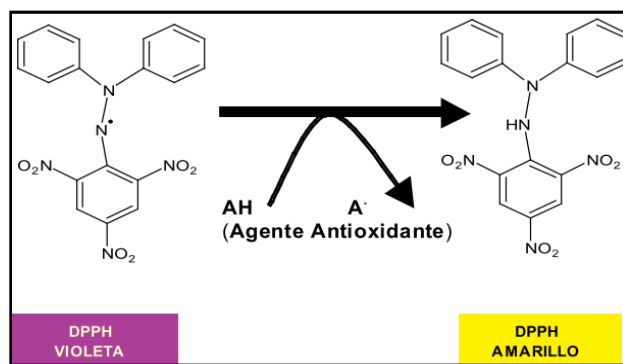


Figura 13. Principio de ensayo DPPH capacidad de captación de radicales (46).

1.5.2 Ensayo de barrido del peróxido de hidrógeno.

Fundamento

El método desarrollado por Ruch y colaboradores se basa en capacidad que presenta un agente antioxidante (reductor) para ceder hidrógeno al peróxido de hidrógeno (oxidante) transformándolo en agua (47).

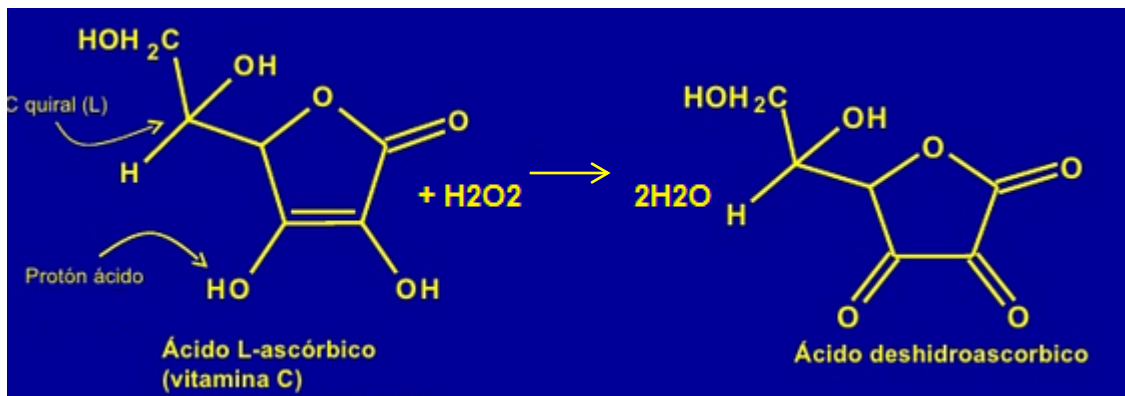


Figura 14. Transformación del peróxido de hidrógeno en agua por el ácido ascórbico (48)

El espectro de absorción del peróxido de hidrógeno es medido entre 200 y 400 nm, en cualquier longitud de onda en este rango, es posible utilizar la absorbancia del compuesto como medida de su concentración, ya que estos dos valores son directamente proporcionales de acuerdo con la ley de Beer-Lambert. El subproducto de transformación del peróxido, el agua, no absorbe la luz en esta región espectral, y por tanto no representa interferencia para su cuantificación (49).

El peróxido de hidrógeno tiene la capacidad de cruzar las membranas celulares rápidamente, una vez dentro de la célula, reacciona con iones Fe^{2+} y Cu^{2+} para formar el radical hidroxilo y este es el origen de muchos de sus efectos tóxicos. Por lo tanto, es biológicamente ventajoso para las células controlar la cantidad de peróxido de hidrógeno existente (50)

CAPÍTULO II

2. MATERIALES

2.1 RECOLECCIÓN, LAVADO Y SECADO DE LA PLANTA

A continuación se detalla los materiales empleados en la recolección, lavado y secado de la planta objeto de nuestro estudio.

2.1.1 Recolección

Para la recolección de la hierba Infante fueron necesarios los siguientes materiales:

- Bolsas de papel: para conservar las muestras durante su transporte.
- Bolsas de plástico: para la recolección de las muestras botánicas.
- Tijeras podadoras: para la obtención de la planta.
- Etiquetas y bolígrafos.
- G.P.S. Garmin nüvi 205W: para ubicar las coordenadas de la zona de recolección.

2.1.2 Lavado

Una vez recolectadas las muestras de la planta en estudio se procedió a lavarlas, para lo cual se precisó:

- Etanol al 70% y gasa.
- Recipientes plásticos.
- Cernidores.
- Papel periódico blanco.
- Agua potable de la red pública.
- Agua destilada.

2.1.3 Secado

Para el secado se emplearon:

- Bandejas de acero inoxidable.
- Papel periódico blanco.
- Bolsas de papel periódico.
- Etanol al 70%:
- Gasa.

2.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

2.2.1 Percolación

El método utilizado fue una extracción continua por percolación, empleándose:

- Diclorometano

Marca Merck Nro. de lote: L5K45064950 411						
Fórmula Química	T° ignición	Solubilidad en agua	Punto de fusión	Masa molar	Densidad	Punto de ebullición
CH ₂ Cl ₂	605 °C	20 g/L	-95 °C	84.93 g/mol	1,33 g/cm ³	40 °C

Tabla 4. Especificaciones de diclorometano (51).

- Metanol

Marca Merck Nro. de lote: I761335 450						
Fórmula Química	T° ignición	Solubilidad en agua	Punto de fusión	Masa Molar	Densidad	Punto de ebullición
CH ₃ OH	300 °C	1000 g/L	18.4 °C	78.13 g/mol	1,10 g/cm ³	189 °C

Tabla 5. Especificaciones del metanol (51).

- Frascos de vidrio ámbar.
- Embudos de separación.
- Canicas.
- Equipos de venoclísis.
- Algodón.
- Papel filtro.
- Papel aluminio.
- Tubos de ensayo pequeños.

- Soporte de hierro.
- Pinzas.
- Cámara de extracción de gases.
- Cronómetro.
- Etiquetas y bolígrafos.

2.2.2 Concentración de extractos

- Nitrógeno

Marca Indura						
Fórmula Química	Estado físico	Densidad del vapor	Punto de ebullición	Punto de congelamiento	Solubilidad en agua	Olor y apariencia
N ₂	Gas	0.97	-195.8 °C	-209.9 °C	Levemente soluble	Incoloro, sin olor

Tabla 6. Referencias del nitrógeno gaseoso (52).

- Matraces fondo redondo.
- Tubos de ensayos grandes.
- Pipetas Pasteur.
- Manguera.
- Soporte de hierro y pinza.
- Viales ámbar.

2.3 ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY- TLC)

Para asegurar el agotamiento de la droga se utilizaron los siguientes materiales:

- Fase estacionaria: placas de sílica gel 60 F₂₅₄ con medidas de 4 x 10 centímetros.
- Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10)
- Capilares.
- Frascos de vidrio.
- Cámara de revelado uv.

Para la identificación de metabolitos presentes en los extractos obtenidos se empleó:

- **Fase estacionaria:** placas de sílica gel 60 F₂₅₄
- **Fase móvil:**
 - Acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10)
 - Acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8)
 - Tolueno-éter(1:1)
 - Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10)
 - Tolueno-cloroformo-etanol (40:40:10)
 - Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26)
 - Cloroformo-ácido acético glacial-metanol-agua (64:32:12:8)
 - Tolueno-acetato de etilo (97:7)
 - Tolueno-dioxano-á. acético glacial (90:25:4)
- **Pipetas automáticas Thermo scientific (0.2-10 µl)**
- **Reveladores:**
 - Hidróxido de potasio 10% en etanol absoluto
 - Azul de Berlín
 - Cloruro de antimonio al 20% en etanol
 - Anisaldehído-ácido sulfúrico
 - Reactivo de Dragendorff
 - Productos naturales (Polietilenglicol 4000)
 - Reactivo de Kedde
 - Vainillina 1% en ácido sulfúrico.

2.4 LIOFILIZACIÓN DE EXTRACTOS PARA ELIMINAR EL SOLVENTE

- Agua purificada.
- Extracto seco de la planta.
- Tubos para liofilización
- Papel filtro
- Papel aluminio

2.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.5.1 Evaluación de la actividad antioxidante por el método del DPPH

Para la evaluación de la actividad antioxidante por el método del DPPH se emplearon los siguientes materiales:

2.5.1.1 Preparación de la solución de DPPH

- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

Marca Sigma-Aldrich Nro. de lote: 1898-66-4				
Fórmula Química	Estado físico	Masa Molar	Densidad aparente	Solubilidad (20 °C)
$C_{18}H_{12}N_5O_6$	Sólido cristalino	394.32 g/mol	1.4 kg / m ³	Insoluble en agua

Tabla 7. Especificaciones del DPPH (53).

- Etanol analítico

Marca Merck Nro. de lote: K45905783 435						
Fórmula Química	T° ignición	Solubilidad en agua	Punto de fusión	Masa molar	Densidad	Punto de ebullición
C_2H_6O	425 °C	Totalmente miscible	-114.5 °C	46.07 g/mol	0.790 g/cm ³	78.3 °C

Tabla 8. Especificaciones del etanol analítico (51).

- Vasos de precipitación de 25 ml.
- Balones de aforo de 100 ml.
- Papel aluminio.
- Espátula.
- Varillas.

2.5.1.2 Preparación de la solución madre y patrones de ácido ascórbico

- Ácido Ascórbico

Marca Sigma-Aldrich Nro. de lote: MKBH					
Fórmula Química	Masa Molar	Actividad Óptica	% Pureza	Punto de Fusión	Solubilidad (20 °C)
C ₆ H ₈ O ₆	176.12 g/mol	[α] 25 / D 19,0 a 23,0 °, c = 10% en H ₂ O	99	190-194 ° C	850 g/l

Tabla 9. Especificaciones del ácido ascórbico (53).

- Agua ultrapura calidad HPLC

Fórmula Química	Conductividad	Carbono orgánico total	Sodio	Cloro	Sílice total
H ₂ O	0.056 μS/cm	10 ppb	1 ppb	1 ppb	3 ppb

Tabla 10. Especificaciones del agua ultra pura- calidad HPLC (54).

- Balón de aforo de 100 ml.
- Espátula.
- Vaso de precipitación de 10 ml.
- Tubos Falcon de 10 ml.
- Varilla.
- Pipetas automáticas Thermo scientific (10-1000 μl).
- Tubos de ensayo.
- Gradilla.
- Papel Aluminio.

2.5.1.3 Preparación de la solución madre y patrones de extracto

- Etanol absoluto
- Solución de DPPH
- Tubos de ensayo
- Tubo Falcon de 10 ml
- Pipetas automáticas Thermo scientific (10-1000 μl).
- Gradilla.
- Papel aluminio.

2.5.2 Evaluación de la actividad antioxidante por el método de barrido del peróxido de hidrógeno

Para la evaluación de la actividad antioxidante por el método de barrido del peróxido de hidrógeno se emplearon los siguientes materiales:

2.5.2.1 Preparación del buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4.

- Di-sodio hidrógenofosfato

Marca Merck Nro. de lote: F1726986 232					
Fórmula Química	Masa Molar	Punto de fusión	Valor de PH (5% H ₂ O, 25°C)	Densidad aparente	Solubilidad (20 °C)
Na ₂ HPO ₄	141.96 g/mol	250 °C	8.7 a 9.3	880 kg / m ³	77 g / l

Tabla 11. Especificaciones del di-sodio hidrógeno fosfato (51).

- Sodio dihidrógeno fosfato monohidratado

Marca Merck Nro. de lote: A0214049 130					
Fórmula Química	Masa Molar	Densidad	Valor de PH (5% H ₂ O, 25°C)	Densidad aparente	Solubilidad (20 °C)
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	137.99 g/mol	2.04 g/cm ³ (20 °C)	4.1 - 4.5	880 kg / m ³	850 g/l

Tabla 12. Especificaciones del sodio hidrógeno fosfato monohidratado (51).

- Agua ultrapura calidad HPLC.
- Vasos de precipitación de 50 ml.
- Balones de aforo de 500ml.
- Frasco ámbar 250 ml.
- Varillas.

2.5.2.2 Preparación del peróxido de hidrógeno 4 mM.

- Peróxido de hidrógeno

Marca Sigma-Aldrich Nro. de lote: MKBQ6981V					
Fórmula Química	Masa Molar	Concentración	% Pureza (Titulación)	Presión de vapor (30 ° C)	Solubilidad (20 °C)
H ₂ O ₂	34.01 g/mol	30%30 % (w/w) in H ₂ O	29.0- 32.0	23.3 mmHg	850 g/l

Tabla 13. Especificaciones del peróxido de hidrógeno (53).

- Buffer de fosfatos 0.1 M – pH 7.5.
- Balón de aforo de 100ml.
- Frasco ámbar 250 ml.
- Varilla.
- Pipetas automáticas Thermo scientific (0.5-100ul).
- Cubetas de cuarzo 10.00 mm QS HELLMA.

2.5.2.3 Preparación de la solución madre y patrones de ácido ascórbico.

- Ácido Ascórbico
- Agua ultrapura calidad HPLC.
- Balón de aforo de 100 ml.
- Espátula.
- Vaso de precipitación de 10 ml.
- Tubos Falcon de 10 ml.
- Varilla.
- Pipetas automáticas Thermo scientific (10-1000 µl).
- Gradilla.
- Papel Aluminio.

2.5.2.4 Preparación de la solución madre y patrones de extracto

- Agua ultrapura calidad HPLC: indicada para la disolución de los extractos metanólicos ya que presenta solubilidad en solventes polares y no produce

precipitación del buffer de fosfatos (0.1 M, PH 7.4) empleado para la técnica (Tabla 10).

- Tubos Falcon de 50 ml.
- Tubos Falcon de 10 ml.
- Pipetas automáticas Thermo scientific (10-1000 μ l).
- Pipeta volumétrica de 10 ml.
- Tubos de ensayo.
- Gradilla.
- Papel aluminio.
- Cronómetro.

CAPÍTULO III

3. MÉTODOS

3.1 RECOLECCIÓN, LAVADO Y SECADO DE LA PLANTA

3.1.1 Recolección

Se recolectaron hojas y tallos de *Desmodium molliculum*, popularmente conocida como hierba del infante, en la vía a Azogues, sector perteneciente a la provincia del Azuay.

Las muestras botánicas recolectadas se obtuvieron en horas de la mañana con la ayuda de tijeras podadoras, luego se guardaron en bolsas de papel previamente etiquetadas; dos muestras se almacenaron en bolsas plásticas para su posterior caracterización botánica.

Las coordenadas de la zona en la que se recolectaron las muestras vegetales fueron tomadas con la ayuda de un GPS. Finalmente se procedió a tomar fotos de las muestras botánicas y del sector en el que se recolectaron y se designó un código a la muestra para permitir su fácil identificación.

3.1.1.1 Lavado

Con el empleo de los materiales descritos en la sección 2.1.2, se procedió de la siguiente manera:

1. Se examinaron tanto hojas como tallos con la finalidad de eliminar las partes que se encontraban marchitas y en malas condiciones, seleccionando de esta manera las que se encontraban en óptimas condiciones físicas.
2. Se prosiguió con la separación de las partes de la planta recolectadas, es decir, por un lado hojas y por otro los tallos.
3. Posteriormente se lavaron las muestras vegetales con agua potable a chorro continuo y de manera individual, hoja a hoja y tallo a tallo.
4. Luego los tallos y hojas, por separado, se dejaron en reposo en un recipiente plástico con agua destilada durante 10 minutos.
5. Las hojas y tallos lavados se escurrieron en un cernidor.
6. Finalmente la droga se colocó por un tiempo de 24 horas sobre una malla de acero inoxidable con papel periódico como base para eliminar el exceso de agua.

3.1.1.2 Secado

1. En esta etapa se utilizó el horno Pro 3. Inicialmente se estableció una temperatura de 44 °C y el horno se precalentó por un tiempo de 12 horas.
2. Una vez listo el horno se colocó sobre las bandejas papel periódico y sobre éste la droga y se procedió a la desecación hasta obtener un peso constante, propósito que se consiguió transcurridas 24 horas.
3. Las drogas secas se almacenaron en bolsas de papel previamente etiquetadas y en un ambiente fresco.

3.2 CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA

Dos ejemplares de la planta se prensaron, para lo cual se colocó la muestra en medio de varias capas de papel periódico y luego éstas se dispusieron entre dos prensas de madera, a manera de pila y se aseguró con correas, permaneciendo así las muestras botánicas durante 1 semana.

Posteriormente se realizó el montaje en una cartulina y se llevó al herbario de la Universidad del Azuay para su caracterización, incluyéndose también la ficha con los datos de recolección (anexo A).

3.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

3.3.1 Trituración de las drogas

- Se colocó en el vaso de la licuadora la droga seca (hojas o tallos).
- Se procedió a triturar, mediante ciclos cortos de encendido y apagado, obteniéndose fragmentos pequeños de las hojas entre 1-3 mm y grandes de los tallos entre 2-5 mm.
- Luego se tamizó la droga con el propósito de asegurar que los fragmentos tengan un tamaño homogéneo.
- La droga pulverizada se transfirió a un recipiente estéril de tapa hermética y se procedió a pesar.
- Para realizar la extracción de principios activos se requieren aproximadamente 10 g de la droga seca triturada.

3.3.2 Extracción continua por percolación según U.S.P. (United States Pharmacopea)

Método mediante el cual se extraen aproximadamente el 95 % de principios activos de la droga seca y pulverizada, mediante el menstuo (solvente) que atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en sentido descendente y fluye por la parte inferior, con ello siempre existe un desequilibrio entre las concentraciones de la droga y del solvente lo que facilita la salida total de los principios activos. Este tipo de extracción se realiza en percoladores que son recipientes cónicos provistos de llave de salida inferior.

Procedimiento

Se realizó mediante el uso de los materiales descritos en el apartado 2.2.1, de la siguiente manera:

- La droga pulverizada, previamente pesada se humectó con suficiente cantidad de disolvente hasta obtener una humedad uniforme y se dejó en reposo por 14 horas.
- Se colocó algodón en el fondo del percolador, luego la droga humectada, sobre esta, papel filtro y sobre el mismo canicas.
- Se adicionó el solvente hasta que se encuentre de 2 a 3 cm sobre las canicas.
- Se cubrió con papel aluminio el percolador y se maceró durante 24 horas cuidando que el volumen de disolvente se mantenga en un nivel constante.
- Trascorrido el tiempo, se abrió la llave del percolador y se recolectó la primera fracción en un tubo (Volumen 1). Posteriormente se recolectó un volumen correspondiente al 75% del peso de la droga a una velocidad de XX/minuto en un tubo
- Se continuó con la extracción a la misma velocidad de goteo recolectándose en un matraz fondo redondo (volumen 2), añadiendo solvente al percolador para mantener su nivel por lo menos 1 cm sobre las canicas.
- El agotamiento total de principios activos se comprobó mediante análisis de cromatografía en capa fina TLC (ver apartado 3.3.) para ello se tomaron muestras del volumen 2 trascurridas dos, tres y media y cinco horas de iniciado el agotamiento.
- Con las muestras se realizó un corrido cromatográfico y posterior revelado hasta constatar que ya no existía principio activo por extraer.

3.3.3 Concentración de extractos

Los extractos obtenidos mediante el proceso descrito en el apartado anterior se concentraron en tres etapas, siendo las dos primeras comunes tanto para los extractos metanólicos como para los de diclorometano, en tanto que en la tercera etapa se aplicó liofilización en el caso de los extractos metanólicos y evaporación-centrifugación en el caso de los extractos en diclorometano.

Extractos metanólicos:

- Concentración a presión reducida.
- Concentración con nitrógeno.
- Liofilización.

Extractos en diclorometano:

- Concentración a presión reducida.
- Concentración con nitrógeno.
- Concentración por evaporación.

3.3.3.1 Concentración a presión reducida

Método que consiste en evaporar el solvente mediante la combinación de temperatura que proviene de un baño calefactor y la generación de vacío. Se produce rotación del líquido lo que disminuye el peligro de ebullición.

Equipo: Rota-vapor

Marca: Laborota 4000 efficient Heidolph

Serie: 120718287



Figura15. Rotavapor (55).

Procedimiento

- El extracto obtenido por percolación, descrito en el apartado 3.2.2 se sujetó en la boca del equipo con una pinza.
- Se ajustó la temperatura a 37 °C y la velocidad de rotación a 150 revoluciones por minuto (rpm).
- El balón fue sumergido en el baño y se cerró la llave de presión.
- Luego de un tiempo el disolvente fue removido completamente.
- La primera fracción, correspondiente al volumen 1 obtenido según procedimiento descrito en el apartado 3.2.2, se añadió sobre el extracto concentrado; fue necesario agregar una pequeña alícuota del solvente para lavar las paredes con la finalidad de recuperar todo el extracto.
- Finalmente todo el concentrado se recolectó en un tubo.

3.3.3.2 Concentración con nitrógeno

Método tiene como finalidad eliminar el solvente en exceso, con lo que se consigue concentrar el extracto.

Procedimiento

- El extracto obtenido en el apartado 3.2.3.1 se instaló en la pinza colocada en el soporte, el tubo se introdujo en un baño ultrasónico modelo 8892- marca Cole-Parmer a 37 °C, de modo que el extracto quede completamente sumergido en el agua.
- Luego se suministró nitrógeno gaseoso a través de una pipeta Pasteur inmersa en una manguera, hasta obtener un volumen de extracto entre 1.5 y 2 ml.
- El procedimiento se realizó en una cámara de extracción de gases.

3.3.3.3 Liofilización

La liofilización es una técnica de desecación basada en la sublimación del agua con la finalidad de obtener polvo liofilizado. Para llevar a cabo este proceso se requiere previamente congelar el extracto a – 80 °C, y consecuentemente el agua que pueda llevar para luego aplicar vacío que posibilite que a bajas temperaturas se dé el paso del agua en estado sólido a estado gaseoso directamente, es decir que se produzca el fenómeno de

la sublimación del hielo. Este hecho es posible debido a que a determinadas concentraciones de presión 4.5 mmHg y temperatura 0.008 °C, el agua coexiste en sus tres estados físicos en el denominado Punto Triple (56).

Equipos

a) Liofilizador

- *Marca: Labconco*
- *Serie: 080587321*

b) Biofreezer

- *Marca: Labconco*
- *Serie: 080587321*

Procedimiento

1. Preparación de la Muestra

- A las muestras obtenidas según metodología descrita en el apartado 3.2.3.2 se adiciona aproximadamente 15 mililitros de agua destilada-calidad HPLC.
- Se somete a la acción del baño ultrasónico modelo 8892- marca Cole-Parmer a 37 °C, para conseguir disolución completa.
- Se trasfiere este volumen a los tubos del liofilizador, se tapan los tubos y se colocan dentro del biofreezer (ver apartado 3.2.3.3. b) a una temperatura de - 80 °C.
- Trascurridos cinco minutos se rotan los tubos y trascurridos tres minutos más, se vuelven a rotar para garantizar la congelación homogénea, se repite este procedimiento hasta que la muestra esté totalmente congelada.
- Se retiran los tapones de los tubos, se cubre con papel aluminio y se congela durante 3 horas más.

2. Liofilización (Temperatura: - 4°C; Presión: 0.180 mBar)

- Se retiran los tubos del biofreezer, se colocan sus respectivos tapones y se adaptan al liofilizador, teniendo cuidado de que la llave que regula la presión de cada tubo este abierta.
- Cuando el tubo este adaptado al liofilizador se cierra la llave.

- Se liofiliza el extracto de 20 a 24 horas.

3.3.3.4 Concentración por evaporación

Se empleó el equipo RapidVap 64132 de marca Labconco, cuyo sistema emplea el vacío junto con el calor, adicionalmente trabaja con un vórtice de movimiento para ayudar a acelerar la evaporación (57), de esta manera se elimina cualquier sobrante del solvente.

Es un método de utilidad en la concentración de extractos obtenidos con solventes apolares.

Procedimiento

1. Los extractos obtenidos en el apartado 3.2.3.2 fueron concentrados en el equipo antes mencionado durante un tiempo de 3 horas.
2. Las condiciones durante el proceso fueron: temperatura a 37 °C y velocidad 150 rpm.
3. Finalmente se pesaron los tubos con el extracto concentrado.

3.4 ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC - TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica que permite separar los componentes de una mezcla por distribución entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, con el fin de identificarlos y/o cuantificarlos (58). TLC se basa en el mismo principio de todos los tipos de cromatografía: un compuesto tendrá diferentes afinidades para la fase móvil y estacionaria, y de esto dependerá su velocidad de migración (59).

La fase estacionaria es una capa delgada, de material adsorbente, usualmente de entre 0.10 a 0.25 mm de grosor para fines analíticos y en los casos en los que se desee aislar un compuesto puede variar entre 0.5-2.0 mm. El adsorbente debe ser inerte, poroso e insoluble en los solventes usados como fase móvil, los más comunes son la sílica gel (SiO_2) y el óxido de aluminio (Al_2O_3), ambos de carácter polar. Esta fina capa es fijada a una placa o lámina firme de vidrio, aluminio o plástico de máximo 20 x 20 cm, que actúa como soporte (60).

A través de la fase estacionaria transita un líquido o solvente (fase móvil o eluyente). Existe un gran número de sistemas eluyentes utilizados para TLC. Mayoritariamente son combinaciones de disolventes de diferentes polaridades, con presencia ocasional de ácidos o bases. El único requisito que se exige a estos reactivos químicos, es que su grado de riqueza sea elevado (61).

Es una técnica que consiste en tres pasos: manchado, desarrollo, y visualización (62). Cuando se “siembra” una gota de una disolución cerca del extremo de una placa cromatográfica, y acto seguido, se sumerge en un determinado sistema eluyente, éste empieza a ascender por capilaridad por encima de la placa (fase estacionaria) arrastrando la muestra.

Lo que sucede, transcurridos unos minutos, es que cada componente diferente, se queda a una distancia concreta del origen, según presente más o menos afinidad por los disolventes de la fase móvil, “dibujando” un *spot* o mancha (63).

TLC se puede utilizar para determinar el número de componentes en una mezcla, la identidad de los compuestos, y la pureza de un compuesto. Mediante la observación de la aparición de un producto o la desaparición de un reactivo, también se pueden utilizar para monitorear el progreso de una reacción (59).

Sorbente	Compuestos a separar
Silica gel	Toda clase de compuestos.
Óxido de aluminio	Compuestos básicos (alcaloides, aminas, etc.), esteroides, terpenos, hidrocarburos aromáticos y alifáticos.
Celulosa	Aminoácidos y derivados, aditivos alimenticios (ácidos y básicos), carbohidratos.
Kieselguhr	Carbohidratos, aflatoxinas, herbicidas, tetraciclinas.
Poliamida	Fenoles, flavonoides, nitro-compuestos.
Silica gel con amino enlazado	Particularmente óptimo para carbohidratos, fenoles, ácidos sulfónicos, fenoles, ácidos carboxílicos, nucleótidos, nucleósidos.
Silica gel con ciano enlazado	Muchas clases de compuestos, y particularmente bueno para pesticidas, esteroides y preservantes.
Silicagel con diol enlazado	Muchas clases de compuestos, bueno en la separación de esteroides y hormonas.
Silica gel de Fase Reversa (RP)	Mejora la separación de compuestos apolares como esteroides, tetraciclinas, ftalatos, antioxidantes, lípidos, barbitúricos, capsaicinas, aminofenoles, ácidos grasos.
Silica gel con modificación quiral	Separación de enantiómeros de aminoácidos, halogenados, péptidos simples, α -hidroxiácidos.
Silica gel impregnada con nitrato de plata	Lípidos, saturados e insaturados con sus isómeros geométricos.
Silica gel impregnada con cafeína	Particularmente selectiva en la separación de hidrocarburos poliaromáticos.
Silica gel impregnada con ácido bórico/fosfato	Selectivo para carbohidratos.

Tabla 14. Adsorbentes utilizados en TLC (42).

Factor de retención (Rf)

La relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen se conoce como Rf (rate factor). Cada compuesto tiene un Rf característico que depende tanto de la fase móvil como de la fase estacionaria utilizada. De esta manera se puede identificar un compuesto en una mezcla al comparar su Rf con el de un compuesto conocido o patrón cuando se hacen eluir en la misma placa (64) .

3.4.1 Preparación de placas para TLC

Para la preparación de las placas de TLC se utilizaron los materiales descritos en el apartado 2.3, luego se trazó la línea de siembra a 1 cm del borde inferior y a una distancia de 8 cm de ésta se trazó la línea de frente del solvente.

3.4.1.1 Aplicación de la muestra

1. En el borde superior de la placa se identificó el metabolito a investigar, así como la fase móvil; en la parte inferior se identificaron los códigos de los extractos a analizar.
2. Cada extracto se colocó a un centímetro de distancia entre sí, y a una distancia de un centímetro desde el borde inferior de la placa.
3. Cantidad de muestra:
 - Para verificar agotamiento de la droga se colocó una gota de la muestra de extracto usando un capilar.
 - Para identificación de metabolitos previo a su revelado se usó 4 μ L de extracto.

3.4.1.2 Elución sobre la placa

1. Con la ayuda de una pinza se colocó la placa en una cámara de vidrio provista de la fase móvil, de acuerdo al metabolito a investigarse (anexo D).

2. El corrimiento se detiene en el momento en el que la fase móvil se encuentra a un centímetro del borde superior de la placa (línea de frente del solvente).
3. Se retira la placa de la cámara y se deja secar a la temperatura ambiente bajo campana de extracción de vapores.

3.4.1.3 Revelado postcromatográfico

La identificación de compuestos incoloros exige que estos sean revelados, para facilitar su visualización se usan distintos tipos de reveladores (65) según los metabolitos a ser identificados en la droga se rociaron diferentes reveladores (anexo D).

Una vez reveladas las placas se dejan secar para proceder a visualizarlas posteriormente en el equipo de lectura de placas de TLC (Camag TLC visualizer).

Por medio de este equipo se pueden visualizar las placas de TLC a 254nm, 365nm y luz visible, de esta manera se revelan las fluorescencias que presenten las bandas de los compuestos a analizar. Si se obtienen los resultados indicados en la tabla 15 en la revelación de las placas cromatográficas, se puede tratar de:

METABOLITO	REVELADOR	DETECCIÓN	
		VISIBLE	UV-365 nm
Derivados antracénicos y antraglicósidos	Hidróxido de potasio al 10% en etanol	Antraquinonas: rojo	Antraquinonas: fluorescencia roja
		Antrones y antranoles: amarillo	Antrones y antranoles: ligera fluorescencia amarilla
Derivados de hidroquinona	Azul de Berlín	Azul	-
Glucósidos cardiotónicos	Cloruro de antimonio al 20%	Gris/violeta/café	Fluorescencia: naranja/café/amarillo-verde/azul/café
	Kedde	Rosa/azul-violeta	-

	Ácido sulfúrico	Azul/café	Fluorescencia: Azul/café/verde/amarillo
Principios amargos	Anisaldehído-ácido sulfúrico	Rojo/amarillo/café/azul-verde	Fluorescencia
	Vainillina- ácido sulfúrico	Rojo-violeta/café-rojo/azul-verde/azul/fri	-
	Lieberman	Absintina: café Cnicina: gris	Absintina: arena-café Cnicina: Gris claro
Alcaloides	Dragendorff	Naranja-café	-
	Ninhidrina	Naranja-café	-
Flavonoides	Productos naturales (Polietilenglicol 4000)	Flavonoles: naranja-amarillo/amarillo-verde	Fluorescencia intensa
		Flavonas: naranja/amarillo-verde	
Cumarinas	Hidróxido de potasio al 10% en etanol	-	Fluorescencia: amarillo-verde
	Productos naturales (Polietilenglicol 4000)	-	Fluorescencia: azul/azul-verde
Saponinas	Vainillina 1% en ácido sulfúrico	Azul/azul-violeta/rojo/amarillo-café/rojo/amarillo-café	-
	Anisaldehído-ácido sulfúrico		Fluorescencia: azul/verde/violeta
	Vainillina-ácido fosfórico	Rojo-violeta	Fluorescencia: roja/ azul
Triterpenos, bálsamos, resinas, a. esenciales	Vainillina 1% en ácido sulfúrico	Azul/verde/rojo/ café	Sin fluorescencia
	Anisaldehído-ácido sulfúrico		Fluorescencia

Tabla 15. Detección de metabolitos en el revelado postcromatográfico (66).

3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En la presente investigación se probaron dos técnicas:

1. Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica del DPPH.
2. Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica de barrido del peróxido de hidrógeno.

3.5.1 Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica del DPPH

La actividad antioxidante de los extractos fue medida, usando el método DPPH propuesto por Brand-Williams y colaboradores. Una solución de DPPH 0.06 mM en etanol fue preparada y 0.7 ml de esta solución fueron añadidos a 0.7 ml de diferentes extractos en etanol a diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50, 100, 150 µg/ml). Después de 30 minutos, la absorbancia fue medida a 520 nm frente a un blanco de etanol. El estándar de referencia usado fue el ácido ascórbico. Todos los test se hicieron por triplicado.

La actividad de barrido del DPPH fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibition} = [(AB - A) / A] \times 100$$

Dónde:

AB = Absorbancia del control.

A = Absorbancia del estándar o test.(67).

3.5.1.1 Preparación de la solución de DPPH 0.06 mM

1. En un vaso de precipitación de 25 ml cubierto con papel aluminio se pesó 0.0024g del reactivo de DPPH, para lo que se utilizó una balanza analítica modelo BBK-31, marca Boeco.
2. Se disolvió con una pequeña cantidad de etanol analítico y transfirió a un balón de aforo de 100 ml realizando lavados sucesivos del vaso.
3. Posteriormente se aforó a 100ml con la cantidad necesaria de etanol.
4. Finalmente se homogenizó la solución con movimientos de inversión.

3.5.1.2 Preparación de la solución madre y patrones de ácido ascórbico

Con los materiales descritos en el apartado 2.5.2.2 se procedió a preparar la solución madre y patrones de ácido ascórbico, el mismo que fue utilizado como control positivo de la actividad antioxidante, en la presente técnica.

3.5.1.3 Preparación de la solución madre de ácido ascórbico de concentración 100µg/ml

1. En un vaso de 25ml cubierto con papel aluminio se pesó 0.0100g de ácido ascórbico.
2. Con la ayuda de una varilla se procedió a disolver mediante la adición de alícuotas de agua destilada de calidad HPLC
3. Se transfirió a un balón de aforo de 100 ml cubierto con papel aluminio realizando lavados sucesivos del vaso.
4. Se aforó hasta la marca indicada y se homogenizó con movimientos de inversión.

3.5.1.4 Preparación de los patrones de ácido ascórbico

1. Se cubrió la gradilla con papel aluminio para proteger los tubos de la luz.
2. Fueron medidas las cantidades indicadas de solución madre y agua destilada en cada patrón según tabla 16.

PATRÓN	1	2	3	4	5	6	7	Blanco	Control
Concentración (µg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	-	-
Solución madre A. Ascórbico (µl)	20	40	60	80	100	120	140	-	-
Agua destilada (µl)	1980	1960	1940	1920	1900	1880	1860	-	-
Homogenizar en el vortex									
Patrones (ml)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-	-
Solución DPPH (ml)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-	0.7

Etanol (ml)	-	-	-	-	-	-	-	1.4	0.7
Homogenizar en el vortex y dejar en reposo 30 minutos									
Leer a 520 nm contra un blanco de etanol									

Tabla 16. Preparación de los patrones de ácido ascórbico.

3.5.1.5 Preparación de la solución madre de extracto de concentración 200µg/ml

1. Se procedió a medir 50 µl del extracto y se colocó en un tubo Falcon cubierto con papel aluminio.
2. Se adicionó etanol hasta completar un volumen final de 5 ml.
3. Se mezcló en el vortex hasta homogenización completa.

3.5.1.6 Preparación de los patrones de extracto

- Se midieron las cantidades indicadas de solución madre y agua destilada en cada patrón según tabla 17.
- Se homogenizaron los tubos después de cada adición en el vortex.

PATRÓN	1	2	3	4	5	6	Blanco	Control
Concentración (µg/ml)	5	10	25	50	100	150	-	-
Vol. extracto (µl)	75	150	375	750	1500	2250	-	-
Etanol (µl)	2925	2850	2625	2250	1500	750	-	-
Homogenizar en el vortex Leer absorbancia de la clorofila a 520 nm								
Patrones (ml)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-	-
Solución DPPH (ml)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-	0.7
Etanol (ml)	-	-	-	-	-	-	1.4	0.7
Homogenizar en el vortex y dejar en reposo 30 minutos								

Leer a 520 nm contra un blanco de etanol

Tabla 17. Preparación de los patrones de extracto.

3.5.2 Evaluación de la actividad antioxidante según el ensayo de barrido del peróxido de hidrógeno.

La capacidad de los extractos para neutralizar el peróxido de hidrógeno fue determinada de acuerdo al método sugerido por Ruch y colaboradores. A una solución 4 mM de peróxido de hidrógeno, preparada en buffer de fosfato (0.1M-pH 7.4).

A 2 ml de los extractos de la planta, preparadas a diferentes concentraciones en agua destilada, se adicionó 0.3 ml de la solución tamponada de peróxido de hidrógeno. La absorbancia del peróxido de hidrógeno remanente, se determinó trascurridos 10 minutos frente a un blanco de extracto preparado a diferentes concentraciones en agua destilada con buffer de fosfatos sin H₂O₂. El ácido ascórbico fue utilizado como control positivo de la actividad debido a su gran poder antioxidante demostrado in vitro (68).

El porcentaje de inhibición del peróxido de hidrógeno fue estimado utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{A_C - (A_T - A_B)}{A_C}$$

En donde:

- A_C: Absorbancia del control negativo.
- A_T: Absorbancia de los test.
- A_B: Absorbancia de los blancos de estándar o extracto (50).

3.5.2.1 Preparación del buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4

Con los materiales descritos en el apartado 2.5.2.1 se procedió a preparar el buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 de la siguiente manera:



3.5.2.1.1 Preparación de la solución 0.1 M de sodio di hidrógeno fosfato monohidratado (Solución A - pH 4.4)

1. En un vaso de precipitado de 50 ml, se pesó en la balanza Boeco (Serie: 19509555) 6.9 g de sodio di hidrógeno fosfato monohidratado.
2. Con la ayuda de una varilla se procedió a disolver mediante la adición de pequeñas alícuotas de agua ultrapura calidad HPLC y se transfirió a un balón de aforo de 500 ml.
3. Se aforó hasta la marca indicada y se homogenizó con movimientos de inversión (20-30 veces).
4. Se transfirió a un frasco previamente rotulado.
5. Se midió el pH inicial de la solución utilizando el potenciómetro modelo Orion Star A221, marca Thermo scientific y se registró en el frasco.

3.5.2.1.2 Preparación de la solución 0.1 M de di-sodio hidrógeno fosfato (Solución B - pH 9.3).

1. En un vaso de precipitado de 50 ml, se pesó 7.1 g de di-sodio hidrogeno fosfato.
2. Con la ayuda de una varilla se procedió a disolver mediante la adición de pequeñas alícuotas de agua ultrapura calidad HPLC y se transfirió a un balón de aforo de 500 ml.
3. Se aforó hasta la marca indicada y se homogenizó con movimientos de inversión (20-30 veces).
4. Se transfirió a un frasco previamente rotulado.
5. Se midió el pH inicial de la solución utilizando el potenciómetro modelo Orion Star A221, marca Thermo scientific y se registró en el frasco.

3.5.2.1.3 Preparación de la mezcla - buffer pH 7.4

1. Se mezcló 80 ml de la solución A y 150 ml de la solución B.
2. Se homogenizó con movimientos de inversión (20-30 veces).
3. Se midió el pH de la solución utilizando el potenciómetro modelo Orion Star A221, marca Thermo scientific.
4. En ocasiones fue necesario ajustar el pH de la mezcla mediante la adición de solución A o B dependiendo el caso.

3.5.2.2 Preparación de la solución 4 mM de peróxido de hidrógeno

Con los materiales descritos en el apartado 2.5.2.2 se procedió a preparar el peróxido de hidrógeno 4 mM de la siguiente manera:

1. En un balón de aforo de 100ml se midió 45.3 μ l de peróxido de hidrogeno al 30 %w/v.
2. Se aforó con buffer de fosfatos preparado en el apartado anterior hasta la marca indicada.
3. Se homogenizó con movimientos de inversión (20-30 veces).
4. Se midió la absorbancia de la solución preparada frente a un blanco de buffer a 230nm (esta debe ser lo más próxima a 0.324nm).

3.5.2.3 Preparación de la solución madre y patrones de ácido ascórbico

Con los materiales descritos en el apartado 2.5.2.3 se procedió a preparar la solución madre y patrones de ácido ascórbico.

3.5.2.3.1 Preparación de la solución madre de ácido ascórbico de concentración 100 μ g/ml

1. En un vaso de precipitado de 10 ml cubierto con papel aluminio, se pesó 0.010 g de ácido ascórbico.
2. Con la ayuda de una varilla se procedió a disolver mediante la adición de pequeñas alícuotas de agua ultrapura calidad HPLC.
3. Se transfirió a un balón de aforo de 100 ml completamente cubierto con papel aluminio.
4. Se realizaron lavados sucesivos tanto del vaso en donde se pesó el ácido como de la varilla con pequeñas alícuotas de agua ultrapura calidad HPLC.
5. Se aforó hasta la marca indicada.
6. Se homogenizó con movimientos de inversión (20-30 veces).

3.5.2.3.2 Preparación de los patrones de ácido ascórbico

1. Se colocaron los tubos Falcon de 10 ml previamente rotulados en una gradilla cubierta de papel aluminio.

2. Se midieron las cantidades indicadas de solución madre y agua ultrapura calidad HPLC en cada patrón según tabla 18.
3. Se homogenizó los tubos en cada adición en el vortex.

PATRÓN	1	2	3	4
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	12.5	25	50	100
Solución madre de ácido ascórbico (μl)	625	2250	4500	9000
Agua ultrapura HPLC (μl)	8375	6750	4500	-----

Tabla 18. Preparación de los patrones de ácido ascórbico -Técnica de barrido del peróxido de hidrógeno.

3.5.2.4 Preparación de la solución madre y patrones de extracto

Con los materiales descritos en el apartado 2.5.2.4 se procedió a preparar la solución madre y patrones de los extractos en los que se determinó la actividad antioxidante, en la presente técnica.

3.5.2.4.1 Preparación de la solución madre de extracto de concentración 500 $\mu\text{g/ml}$

- Se midió 18525 μl de agua ultrapura calidad HPLC y se colocó en el tubo Falcon de 50 ml cubierto con papel aluminio.
- Se adicionó 475 μl de extracto.
- Se mezcló en el vortex hasta homogenización completa.

3.5.2.4.2 Preparación de los patrones de extracto

- Se colocaron los tubos Falcon de 10 ml previamente rotulados en una gradilla cubierta de papel aluminio.
- Se midieron las cantidades indicadas de solución madre y agua destilada en cada patrón según tablas 19 y 20.
- Se homogenizó los tubos en cada adición en el vortex.

PATRÓN	1	2	3	4	5
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	100	150	200	250	300

Solución madre de extracto (µl)	1800	2700	3600	4500	5400
Agua ultrapura HPLC (µl)	7200	6300	5400	4500	3600

 Tabla 19. Preparación de los patrones de extracto de *Jungia rugosa* Less.

PATRÓN	1	2	3	4
Concentración (µg/ml)	25	50	100	150
Solución madre de extracto (µl)	1125	2250	4500	6750
Agua ultrapura HPLC (µl)	7875	6750	4500	2250

 Tabla 20. Preparación de los patrones de extracto de *Desmodium molliculum*.

3.5.2.5 Preparación de los blancos, test y control

- Se colocó una serie de tubos en una gradilla previamente cubierta en su totalidad con papel aluminio.
- Se prepararon los blancos, test y control midiendo las cantidades indicadas en la tabla 21 de los reactivos respectivos.
- Se homogenizó los tubos en cada adición en el vortex.
- Se incubó exactamente 10 minutos medidos con cronómetro, a temperatura ambiente en un lugar al resguardo de la luz y cubriendo los tubos con papel aluminio en la parte superior.
- Se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 230 nm, utilizando cubetas de cuarzo y encerrando el equipo con el blanco de buffer de fosfato/agua destilada indicado en la tabla 21.

REACTIVOS	BLANCOS estándar/extracto	TEST estándar/extracto	BLANCO	CONTROL
Estándar/Extracto (µl)	2000	2000	-----	-----
Solución 4mM de H₂O₂ (µl)	-----	300	-----	300

Buffer de fosfatos 0.1 M- pH 7.4 (µl)	300	-----	300	-----
Agua ultrapura HPLC (µl)	-----	-----	2000	2000

Tabla 21. Preparación de los blancos, test y control-Técnica de barrido del peróxido de hidrógeno.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Dentro del estudio de validación, se evaluaron los siguientes parámetros: precisión intra-día e inter-día y linealidad de los dos métodos.

La evaluación de la precisión o repetibilidad se realizó mediante el análisis de ANOVA, expresando los resultados en porcentaje de coeficiente de variación (%CV).

La linealidad se realizó mediante la construcción de cinco curvas de calibración de 7 niveles de concentración en un rango de 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6,7) µg/ml para el método de DPPH; y de 4 niveles de concentración en un rango de 12.5-100 (12.5, 25, 50, 100) µg/ml para el método de peróxidos.

3.7 CALCULO DEL IC₅₀

El IC₅₀ corresponde a la concentración necesaria de antioxidante para inhibir el 50 % de la concentración del radical. A partir de la ecuación de la recta se calculó el valor de IC₅₀ tanto para el ácido ascórbico como para cada uno de los extractos objeto de estudio, utilizando la siguiente ecuación:

$$IC_{50} (\mu\text{g/ml}) = \frac{50 - b}{m}$$

Dónde:

- 50= 50% de inhibición (eje de las ordenadas).
- b= punto de intercepción en eje de las ordenadas.
- m= pendiente de la recta.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA

Con el propósito de asegurar que la muestra botánica recolectada fuese *la* Hierba del Infante (anexo B) ya que existen algunas especies de características morfológicas muy parecidas; las muestras objeto de estudio luego de su montaje fueron enviadas al herbario de la Universidad del Azuay, obteniéndose como resultado la identificación taxonómica, en la cual se determinó que las muestras corresponden a *Desmodium molliculum*, familia Fabaceae (anexo C).

Este resultado nos permite concluir que las especies colectadas en octubre del 2014, a 2590 metros de altitud en la vía a Azogues, sector perteneciente a la provincia del Azuay corresponden a *Desmodium molliculum*, la época de recolección fue en verano, siendo característico de esta especie la floración entre agosto y noviembre (69), por lo que la muestra botánica presentaba florecimiento con una coloración que variaba entre blanco y morado, y sus hojas trifoliadas, características que son propias del género *Desmodium* como lo describe Vanni (70).

Según Torres y Delgado, *Desmodium molliculum* puede confundirse con la especie *sericoph-llum*, sin embargo, su hábito postrado, los folíolos orbiculares, el indumento piloso en la mayor parte de la planta y los pedicelos largos y rectos, lo distinguen de esta última especie (69).

Las muestras botánicas de *Jungia rugosa* Less fueron también caracterizadas en el Herbario de la Universidad del Azuay.

4.2 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Se obtuvieron extractos de *Desmodium molliculum* a partir de una muestra caracterizada botánicamente, para la extracción se usaron como solventes de extracción metanol y diclorometano.

Código de recolección: EC-1		
Parte empleada	Solvente	Código de extracción
Hojas	Metanol	EC1-H MET
	Diclorometano	EC1-H DCM
Tallos	Metanol	EC1-T MET

Tabla 22. Extractos obtenidos por percolación de *Desmodium molliculum*.

4.3 AGOTAMIENTO DE LA DROGA

En la tabla 23 se detalla el tiempo de agotamiento de los principios activos durante obtención de los extractos por percolación:

Tiempo de agotamiento		
Extracto	Hojas	Tallos
EC1 MET	Menor a 5 horas	Menor a 4 horas
EC1 DCM	6 horas	No aplica

Tabla 23. Tiempo de agotamiento de principios activos.

El agotamiento de la droga se evidenció por la ausencia de bandas en los cromatogramas realizados luego de transcurridas algunas horas de percolación.

El tiempo requerido para agotar las drogas y extraer los principios activos en su totalidad durante la percolación de los extractos, fue variable; se pudo establecer que el

agotamiento de los tallos se dio en el menor tiempo (<4horas), lo cual podría estar relacionado a una menor concentración de principios activos en esta parte de la planta o a una mayor afinidad y solubilidad de los metabolitos en el solvente empleado, metanol.

En los cromatogramas se puede observar que el extracto de hojas obtenido por percolación en metanol (figura 16) se agotó en un tiempo menor a 5 horas, lo que indica que en este tiempo se consiguió extraer la totalidad de los principios activos de la droga, a diferencia del extracto obtenido en diclorometano cuyo tiempo de agotamiento fue de 6 horas.

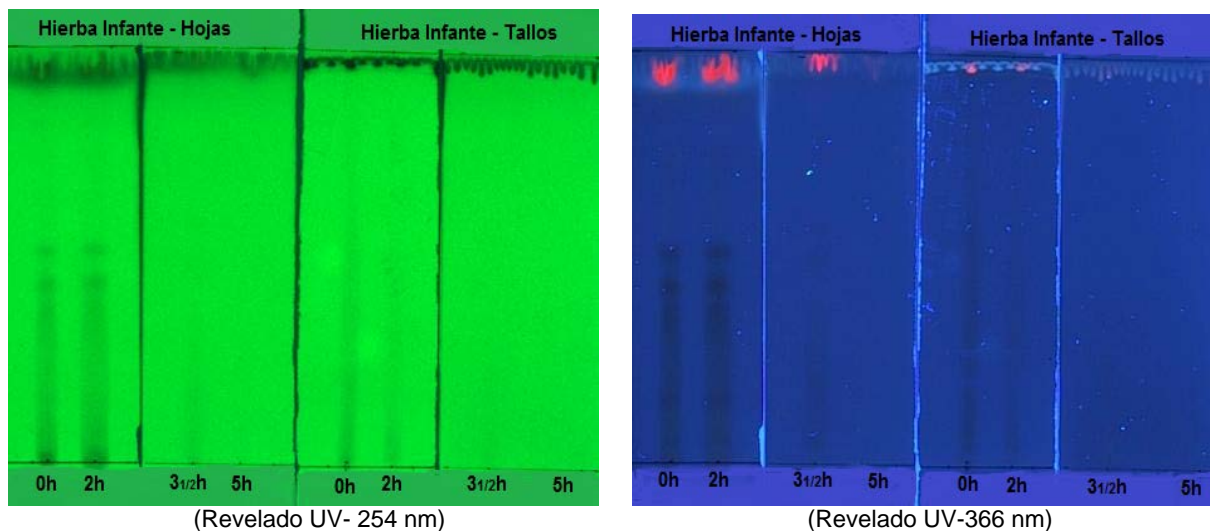


Figura 16. Cromatogramas del agotamiento de la droga en la extracción metanólica.

4.4 RENDIMIENTO DE LA DROGA

Se obtuvieron extractos en diclorometano y metanol según lo señalado en el apartado 4.2.

En la tabla 24 se indica el rendimiento de la droga (tallos y hojas) en los diferentes solventes utilizados en la extracción. Se puede observar que el rendimiento más alto se obtuvo del extracto de diclorometano ya que el rendimiento fue 0.3526 g, equivalente al 3.37 %, a partir de 10.45 g de la droga seca (hojas).

Extracto	Color	Peso de la droga seca (g)	Rendimiento Peso (g)	Rendimiento%

EC1-H MET	Verde oscuro	10.18	0.1940	1.91
EC1-H DCM	Verde oscuro	10.45	0.3526	3.37
EC1-T MET	Verde amarillento	10.74	0.1571	1.46

Tabla 24. Rendimiento de *Desmodium molliculum*.

En tanto que en los extractos obtenidos en metanol presentaron un menor rendimiento, siendo muy próximo tanto en hojas como en tallos, sin embargo, el rendimiento más bajo fue 1.46 % correspondiente a la extracción metanólica de tallos; estas variaciones pueden deberse a ciertas condiciones, como el hábitat de las plantas recolectadas, tipo de suelo, lluvia, exposición a la luz, la altitud, orientación, época del año, edad de la planta.

Al correlacionar los resultados de tiempo de agotamiento y el rendimiento de la droga se puede apreciar que al ser mayor el tiempo de agotamiento de la droga hay un mayor rendimiento de la misma.

De igual manera hay variaciones de rendimiento entre las diferentes partes de la planta; las variaciones en el tiempo de agotamiento de principios activos podrían deberse a la solubilidad de éstos en los solventes que se emplearon en la extracción.

4.5 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Para la identificación de metabolitos secundarios presentes en las plantas en estudio, se efectuaron corrimientos de cromatografía en capa fina (TLC) siguiendo la metodología del apartado 3.4.1 descrita por Wagner y Bladt, para lo cual se trabajó con extractos en metanol y diclorometano como solventes de extracción (66).

Se investigaron los siguientes metabolitos: derivados antracénicos y antraglicósidos, derivados de hidroquinona, glucósidos cardiotónicos, principios amargos, alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas y terpenos para los cuales se utilizaron fases móviles y reveladores específicos detallados en el anexo D. Una vez obtenidas las placas

cromatográficas se observaron bajo UV 250, 366 nm y espectro visible, para determinar coloraciones características que nos pudieran orientar en su identificación.

Según los resultados obtenidos en la presente investigación se corroboró la presencia de polifenoles del tipo de flavonas y flavonoles. En la figura 17 se pueden observar fluorescencias amarillas de Rf 0.56 correspondiente al aglicón quercetina 3 glucorónido presente en todos los extractos de *Jungia rugosa* Less analizados. En los mismos extractos es posible observar manchas cromatográficas similares a las anteriores de Rf 0.67 que por su coloración característica (amarilla) podrían indicar la presencia de flavonoles glicosilados del tipo de la quercetina. Por otra parte se evidencian también fluorescencias de color azul correspondientes a derivados de ácidos fenólicos.

En el caso de *Desmodium molliculum*, en la figura 17 se observan manchas cromatográficas de coloración amarillo verdosas características de flavonoles del tipo de Kaempferol o flavonas del tipo de Apigenina.

Según Lozano y colaboradores en un estudio realizado mediante TLC sobre metabolitos secundarios presentes en extractos de *Desmodium molliculum*, se revela la presencia de compuestos fenólicos destacando como principales flavonoles y flavonas (71).

De igual manera, Enciso y Arroyo revelan la presencia de compuestos fenólicos en *Jungia rugosa* Less principalmente se citan: 3",5-dihidroxi-4",7-di metoxi flavona, 4",5,6,8-tetrametoxi-7-O-azúcar flavona y 3"-hidroxi-5,6,7-tri metoxiflavona que se encuentran presentes en las hojas de la planta (3).

Por otra parte mediante la presente investigación se corroboró también la presencia de compuestos terpenoides. En la figura 18 es posible observar manchas cromatográficas de color azul intenso de RF 0.54 correspondiente a esclareol, presente en todos los extractos analizados. Además es posible observar coloraciones azuladas de Rf 0.67 y verdosas de Rf entre 0.72 y 0.82 que indican la presencia de otro tipo de compuestos terpenoides. En el extracto metanólico de *Desmodium molliculum* se pudo confirmar también la presencia de saponinas metabolitos que están incluidos dentro del grupo de los terpenoides. Botanical online refiere la presencia de terpenos y saponinas en los extractos de *Desmodium molliculum* (72).

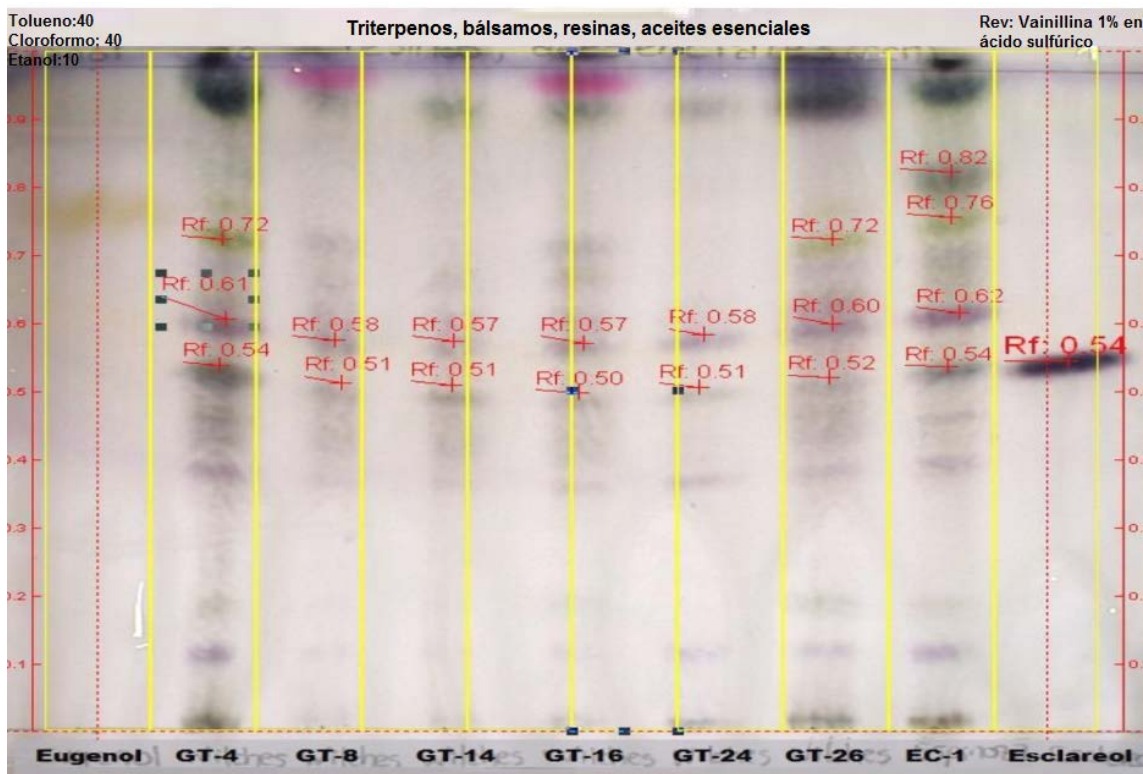


Figura 18. Cromatogramas en filtro visible de Triterpenos: revelador vainillina 1% en H₂SO₄.

En la tabla 25 se observa un resumen de los metabolitos confirmados en el análisis cromatográfico en capa fina en los extractos de *Jungia rugosa* Less y *Desmodium molliculum*.

EXTRACTOS	FLAVONAS / FLAVONOLES	ÁCIDOS FENÓLICOS	TERPENOIDES
		Revelador Productos naturales/PEG 4000	Revelador Productos naturales/PEG 4000
GT-4	+	+	+
GT-8	+	+	+
GT-14	+	+	+

GT-16	+	+	+
GT-24	+	+	+
GT-26	+	+	+
EC-1	+	-	+

Tabla 25. Resultados del análisis de cromatografía de capa fina (TLC) de *Jungia rugosa* Less (GT) y *Desmodium molliculum* (EC): + (presencia), - (ausencia).

4.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para la evaluación de la actividad antioxidante en extractos de *Jungia rugosa* Less y *Desmodium molliculum* se emplearon las técnicas descritas en el apartado 3.5.

4.6.1 Evaluación de la actividad antioxidante por la técnica del DPPH

4.6.1.1 Curva de calibración

Mediante la aplicación de la metodología descrita en el apartado 3.5.1 se construyeron cinco curvas de calibración (anexo E) con 7 niveles de concentración en un rango de concentración de 1–7 $\mu\text{g/ml}$ por triplicado, utilizando ácido ascórbico como sustancia de referencia (figura 19).

A partir de los valores de control y de los valores promedio de la curva de calibración, se calculó el % de inhibición o captación de radicales libres.

Los valores de absorbancia de la curva de calibración de los replicados, los valores de tendencia central, el IC_{50} y el % de inhibición se detallan en la tabla 26.

Concentración (ug/ml)	1	2	3	4	5	6	7	A_{control} (nm)	IC_{50} (ug/ml)
Réplica 1 (nm)	0.281	0.224	0.155	0.097	0.027	0.022	0.019	0.360	2.68
Réplica 2 (nm)	0.289	0.223	0.164	0.090	0.035	0.019	0.016		
Réplica 3 (nm)	0.291	0.231	0.159	0.092	0.031	0.023	0.020		
Media	0.287	0.226	0.159	0.093	0.031	0.021	0.018		

Desv. estándar	0.005	0.004	0.005	0.004	0.004	0.002	0.002		
% Coef. de Variación	1.8	1.9	2.8	3.9	12.9	9.8	11.4		
%inhibición	20.3	37.2	55.7	74.2	91.4	94.1	94.9		

Tabla 26. Actividad antioxidante del ácido ascórbico por el método DPPH.

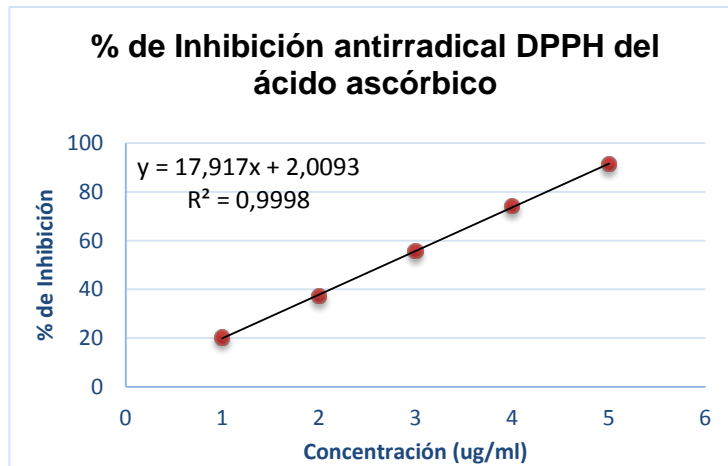


Figura 19. Curva de calibración de ácido ascórbico por el método DPPH.

4.6.1.2 Parámetros de validación

Respecto a la tendencia lineal de las diferentes curvas de calibración trabajadas se observan coeficientes de determinación $R^2 > 0,9904$ (ver anexo E).

La relación lineal entre la concentración de ácido ascórbico y el porcentaje de inhibición está en el rango de 1 – 5 ug/ml.

Para la validación estadística de la curva de calibración se realizó un test de ANOVA, se trabajó con curvas de calibración en un mismo día (variación intra-día) y en días diferentes consecutivos (variación inter-día), obteniéndose los siguientes resultados:

ANÁLISIS DE VARIANZA			
# de patrón	Concentración (ug/ml)	Inter CV (%)	Intra CV (%)
P1	1	1.46	5.13
P2	2	1.82	5.83
P3	3	2.22	7.23
P4	4	3.84	7.24
P5	5	14.53	15.24

Tabla 27. ANOVA inter-día e intra-día de las curvas de calibración de ácido ascórbico por el método de DPPH.

En el ANOVA realizado para la validación de las curvas de calibración (tabla 27), se puede observar que en el análisis inter-día del coeficiente de variación de los patrones cuyas concentraciones son de 1-4 ug/ml es bajo, siendo menores al 7%, lo que indica precisión; el coeficiente de variación en el patrón de 5 ug/ml es 14.53 %, siendo un indicativo de precisión aceptable como lo descrito por el Departamento administrativo Nacional de Estadística (DANE) (73).

De los resultados del análisis intra-día sucede algo semejante al análisis anterior, los cuatro primeros patrones tienen un coeficiente de variación bajo, por lo que su estimación es precisa, a diferencia del quinto patrón en el que el este valor es 15.24%, siendo un estimativo de una precisión regular.

4.6.1.1 Cuantificación de la actividad antioxidante en los extractos

Todos los extractos analizados demostraron actividad antioxidante como se observa en la tabla 28, sin embargo, se evidencia que hay mayor actividad para atrapar al radical DPPH en los extractos metanólicos.

El comportamiento de la inhibición del DPPH por parte de los extractos alcanzó su estabilidad a concentraciones superiores a 150 ug/ml, motivo por el cual se tomaron concentraciones más bajas.

IC₅₀ de los extractos de <i>Jungia rugosa</i> Less y <i>Desmodium molliculum</i> por la técnica de DPPH		
Código del Extracto	IC₅₀ en metanol (ug/ml)	IC₅₀ en diclorometano (ug/ml)
GT-1	129.36	-
GT-2	46.97	-
GT-3	50.28	-
GT-4	74.59	118.45
GT-5	38.37	-
GT-6	49.27	-
GT-7	45.53	-
GT-8	58.58	205.3
GT-9	91.9	196.96
GT-10	53.05	116.78

GT-11	49.94	168.2
GT-12	40.89	167.45
GT-13	46.4	-
GT-14	51.32	340.15
GT-15	41.12	-
GT-16	54.94	74.59
GT-17	50.43	280.32
GT-18	53.87	269.77
GT-19	50.22	128.13
GT-20	54.96	-
GT-22	-	103.56
GT-23	-	114.1
GT-24	52.43	-
GT-25	116.99	89.55
GT-26	71.38	145.88
EC-1	48.96	80.04

Tabla 28. Valores de IC50 de los extractos por el método DPPH.

Existe una diferencia considerable en la capacidad antioxidante entre los extractos analizados, lo que podría deberse a la mención que Lérica Acosta hace en su investigación “el complejo ambiental donde crecen las plantas, esencialmente el clima ejerce gran influencia en lo que respecta a los principios activos. La luz, temperatura y precipitaciones fundamentalmente tienen un efecto marcado sobre su presencia en las plantas. La luz es posiblemente el factor de mayor significación, está estrechamente relacionada con la temperatura y varía con la estación del año y la hora del día. La luz favorece el crecimiento de los tejidos jóvenes etapa en la cual se sustenta la teoría ocurre la acumulación de los principios activos” (74).

4.6.2 Evaluación de la actividad antioxidante por el método de barrido del peróxido de hidrógeno

4.6.2.1 Curva de calibración

Para la cuantificación espectrofotométrica de la actividad antioxidante mediante la técnica de barrido del peróxido de hidrógeno se aplicó la metodología descrita en el apartado 3.5.2.

Se construyeron cinco curvas de calibración (anexo F) con cuatro niveles de concentración en un rango de 12.5-100 µg/ml, y se trabajó por triplicado, utilizando ácido ascórbico como estándar de referencia (figura 20).

A partir de los valores del control y de los valores promedio de la curva de calibración, se calculó el % de inhibición.

Los valores de absorbancia de los replicados, los valores de tendencia central, el IC₅₀ y el % de inhibición se detallan en la tabla 29.

Concentración (µg/ml)	12,5	25	50	100	A _{control} (nm)	A _{H2O2 4Mm} (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,129	0,249	0,502	1,025	0,05	0,337
Réplica 1 (nm)	0,167	0,283	0,529	1,04		
Réplica 2 (nm)	0,165	0,281	0,528	1,041		
Réplica 3 (nm)	0,166	0,282	0,529	1,039		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,038	0,034	0,027	0,015		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,036	0,032	0,026	0,016		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,037	0,033	0,027	0,014		
Media	0,037	0,033	0,027	0,015		
Des. Estándar	0,001	0,001	0,001	0,001		
% Coeficiente de Variación	2,70	3,03	2,17	6,67		
%Inhibición	26	34	47	70		
IC ₅₀	58,63					

Tabla 29. Actividad antioxidante del ácido ascórbico por el método de barrido del peróxido de hidrógeno.

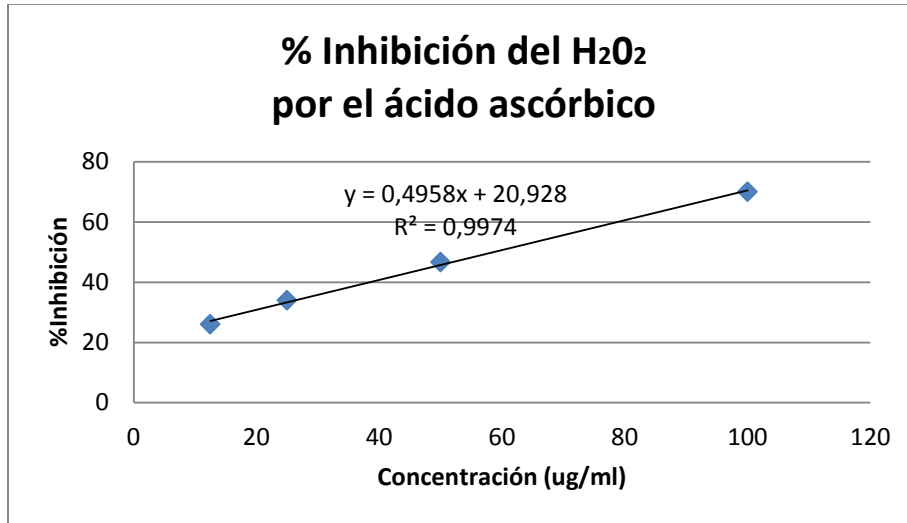


Figura 20. Representación gráfica la curva de calibración del ácido ascórbico por el método de barrido del peróxido de hidrógeno.

Parámetros de validación

Respecto a la tendencia lineal de las diferentes curvas de calibración trabajadas se observan coeficientes de determinación $R^2 > 0,9898$ (ver anexo F).

Para el estudio de precisión o repetibilidad mediante el análisis de ANOVA, se trabajó con los datos de las curvas construidas tanto en un mismo día (variación intra-día) como en días diferentes y consecutivos (variación inter-día), obteniéndose los siguientes resultados:

ANÁLISIS DE VARIANZA			
# de patrón	Concentración (ug/ml)	Intra CV (%)	Inter CV (%)
P1	12.5	0.4	3.23
P2	25	3.19	4.42
P3	50	3.51	6.20
P4	100	8.96	10.91

Tabla 30. ANOVA inter-día e intra-día de las curvas de calibración de ácido ascórbico por el método de barrido del peróxido de hidrógeno.

Al aplicar el test de ANOVA para el análisis inter-día (tabla 30) se observa que el coeficiente de variación de los patrones de concentración menor de ácido ascórbico entre

de 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$ es menor al 7%, lo que refleja alta precisión y repetitividad de los datos obtenidos; Sin embargo el coeficiente de variación en el patrón de concentración más alta 100 $\mu\text{g/ml}$ es de 8.96 %, siendo un indicativo de precisión aceptable según lo descrito por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) (73), esto se puede atribuir a que el ácido ascórbico es un compuesto altamente inestable por lo que mayor concentración del mismo en el patrón más alta es la susceptibilidad a su oxidación, hidratación o desnaturalización, lo que influye en su actividad y por tanto en la precisión de los datos obtenidos.

En el test de ANOVA aplicado para el análisis inter-día se puede observar que sucede algo semejante al análisis intra-día, los cuatro primeros patrones tienen un coeficiente de variación menor a 7%, por lo que su estimación estadística es precisa, a diferencia del quinto patrón en el que el este valor es 10.91%, siendo un estimativo de precisión regular.

4.6.2.2 Cuantificación de la actividad antioxidante en los extractos

4.6.2.2.1 Disolución de los extractos

La investigación de la actividad antioxidante por medio de la técnica de barrido del prooxidante peróxido de hidrógeno, se llevó a cabo únicamente en los extractos metanólicos de *Jungia rugosa* Less y *Desmodium molliculum*, debido a que los extractos en diclorometano no son solubles en agua destilada y el uso de otros solventes para su disolución como etanol, metanol, PEG 200, ocasionaron precipitación del buffer de fosfatos utilizado en la técnica. Se probó además solubilidad en DMSO al 0.1%, obteniéndose como resultado una suspensión del extracto que imposibilita la cuantificación espectrofotométrica. Se tomó como referencia esta concentración del solvente debido a que varios estudios in vitro han demostrado que el DMSO a concentraciones superiores presenta actividad antioxidante per se, lo que representaría interferencia en la ejecución de la técnica (75).

4.6.2.2.2 Cuantificación

Según la técnica descrita en el apartado 3.5.2 se realizó la cuantificación de la capacidad de barrido del peróxido de hidrógeno por los extractos. En el caso de *Jungia rugosa* Less se trabajó con cuatro o cinco niveles de concentración, por triplicado, en un rango entre 100 a 300 $\mu\text{g/ml}$, dependiendo del extracto, ya que en algunos casos en el quinto patrón

(300 $\mu\text{g/ml}$), el valor de absorbancia de la clorofila se encontraba fuera del rango de lectura (230 nm). En el caso de *Desmodium molliculum* se trabajó con cuatro niveles de concentración, por triplicado, en un rango entre 25 y 150 $\mu\text{g/ml}$. Los valores de absorbancia de los replicados, los valores de tendencia central, el IC_{50} y el % de inhibición, para cada extracto evaluado, se detallan en el Anexo I. A continuación se muestra una tabla resumen con los valores de IC_{50} obtenidos:

IC_{50} de los extractos de <i>Jungia rugosa</i> Less y <i>Desmodium molliculum</i> por la técnica de barrido del peróxido de hidrógeno	
Código del extracto	IC_{50} en metanol ($\mu\text{g/ml}$)
GT-1	273,21
GT-2	241
GT-3	274,18
GT-4	192,72
GT-5	256,41
GT-6	254,61
GT-7	197,06
GT-8	266,11
GT-9	276,33
GT-10	231,63
GT-11	214,84
GT-12	248,11
GT-13	272,13
GT-14	264,60
GT-15	177,10
GT-16	251,27
GT-17	241,82
GT-18	242,29
GT-198	349,20
GT-20	224,72
GT-24	238,06
GT-25	291,28



GT-26	280,45
EC-1	61.29

Tabla 31. Valores de IC₅₀ de los extractos por el método de barrido del peróxido de hidrógeno.

Todos los extractos analizados de las plantas en estudio demostraron actividad antioxidante, como se observa en la tabla 31, lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante el análisis cromatográfico en capa fina en donde se demostró la presencia de polifenoles como flavonas y flavonoles a los cuales se les atribuye poder antioxidante. Sin embargo, se evidencia claramente que hay mayor actividad para descomponer el peróxido de hidrógeno por el extracto de *Desmodium molliculum* que por los de *Jungia rugosa* Less, siendo este valor comparable con el de la vitamina C.

Por otra parte es posible observar que ocurre un fenómeno similar al antes mencionado en el ensayo del DPPH, ya existe diferencia significativa de la capacidad antioxidante entre los extractos de *Jungia rugosa* Less analizados, lo que podría deberse a la diferencia del entorno ambiental de donde fueron colectadas las plantas, esencialmente el clima, que ejerce gran influencia en lo que respecta a los principios activos debido a que las colecciones pertenecieron a diferentes épocas del año, además de la luz, temperatura y precipitaciones que tienen un efecto marcado sobre la presencia de los metabolitos secundarios en las plantas (74).



Todos los extractos analizados de *Jungia rugosa* Lees evaluados por los dos métodos descritos en el apartado 3.5, presentaron actividad antioxidante. Los valores de IC_{50} obtenidos por el método de DPPH están en un rango de 38 – 129 $\mu\text{g/ml}$ en extractos metanólicos y de 74 – 340 $\mu\text{g/ml}$ en extractos de diclorometano; en tanto que el rango de IC_{50} de los extractos metanólicos por la técnica de barrido del peróxido de hidrógeno varía de 177 – 349 $\mu\text{g/ml}$. Según Enciso y Arroyo, en una publicación realizada por acerca del efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less llegaron a la conclusión de que las hojas de esta planta tienen actividad antioxidante (3), lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación.

De igual manera los extractos metanólicos y en diclorometano de *Desmodium molliculum* presentaron actividad antioxidante, la misma que fue evaluada por las técnicas descritas en el apartado 3.5, obteniéndose un IC_{50} de 49 y 80 $\mu\text{g/ml}$ en extractos metanólicos y en diclorometano respectivamente por la técnica del DPPH; y de 61 $\mu\text{g/ml}$ por la técnica de barrido del peróxido de hidrógeno.

No se han reportado estudios relacionados a la actividad antioxidante de *Desmodium molliculum*, pero los resultados obtenidos en la presente investigación pueden atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos del tipo de las flavonas y flavonoles así como compuestos terpenoides cuya presencia se confirmó mediante el análisis cromatográfico en capa fina.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

- Al evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *Jungia rugosa* Less y *Desmodium molliculum* por los métodos de DPPH y Peróxidos se puede establecer que no existen diferencias en la aplicabilidad de las técnicas para extractos con diferente cantidad de resina, por lo tanto, se rechaza la hipótesis planteada, y se concluye que los dos ensayos pueden ser empleados en extractos resinosos o no resinosos.
- En cuanto a la obtención de los extractos por percolación, no es viable generalizar diferencias en el rendimiento de los extractos en función del solvente empleado para la extracción. El menor rendimiento se obtuvo en la extracción metanólica de los tallos y el mayor rendimiento fue el de hojas al emplear diclorometano como solvente.
- Los resultados del análisis por cromatografía de capa fina (TLC) nos permiten concluir que todos los extractos analizados presentan metabolitos a los cuales se les atribuye propiedades antioxidantes principalmente compuestos fenólicos del tipo de flavonas y flavonoles y compuestos terpenoides.
- La presente investigación ha permitido la estandarización de dos metodías: DPPH y Peróxidos para la evaluación de la actividad antioxidante, excepto para los extractos de diclorometano en la técnica de barrido del peróxido de hidrógeno por la incompatibilidad de los reactivos utilizados. Sin embargo, se consiguió desarrollar los métodos propuestos sin mayor dificultad.
- Los resultados obtenidos al aplicar el test de ANOVA reflejan que hubo gran precisión al trabajar las curvas de calibración con lo que se pudo validar las metodías aplicadas.
- Todos los extractos analizados de las especies botánicas estudiadas en la presente investigación, presentaron actividad antioxidante.



CAPÍTULO VI

6. RECOMENDACIONES

Este trabajo es un estudio preliminar de la actividad antioxidante de *Desmodium molliculum* y *Jungia rugosa* Less, por lo que sería recomendable continuar con estudios posteriores, principalmente en la caracterización e identificación de los compuestos químicos presentes en estas especies botánicas que podrían tener capacidad antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jungiarugosa Less [Internet]. GBIF.org. [citado 4 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.gbif.org/species/5402228>
2. The Plant List. Jungia rugosa Less. [Internet]. 2013 [citado 4 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-15596>
3. Enciso E, Arroyo J. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de Jungia rugosa Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. An Fac Med. diciembre de 2011;72(4):231-7.
4. Janneth Campoverde, Marcela Verdugo. Determinación del efecto cicatrizante de las hojas de Carne Humana (Jungia cf. rugosa) [Internet]. [Cuenca, Ecuador]: Universidad de Cuenca; 2008. Recuperado a partir de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/20266/1/TESIS.pdf>
5. FAMILIA ASTERACEAE TRIBU Mutisieae | Plantas de Pulan [Internet]. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://plantasdepulan.blogspot.com/2012/08/familia-asteraceae-tribu-mutisieae.html>
6. Santa Cruz Cervera L. Flora de espermatofitas del distrito de Pulán, Santa Cruz- Cajamarca [Internet]. [Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011 [citado 4 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1583>
7. Julio Oscanoa. Estudio Fármaco-Botánico de Desmodium molliculum [Internet]. Botanical. 2005 [citado 4 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.botanical-online.com/col/manapuya1.htm>
8. Laboratorios Fitofarma. Product Sheet. Manayupa (Desmodium molliculum) [Internet]. [citado 2 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.laboratoriosfitofarma.com/doc/manayupa.pdf>
9. HOMEOPATIA CONDE - FITOTERAPIA [Internet]. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://homeopatiaarequipa.es.tl/FITOTERAPIA.htm>
10. Kuklinski C. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega; 1999. 528 p.
11. Jorge Ringuelet, Sonia Viña. Productos naturales vegetales. 1 ed. La Plata: edulp; 2013. 258 p.
12. Psicostasia » 7. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS [Internet]. [citado 6 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.psicostasia.com/nueva/psicostasia/?page_id=13
13. METABOLITOS SECUNDARIOS EN ANGIOSPERMAS [Internet]. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.academia.edu/9358644/METABOLITOS_SECUNDARIOS_EN_ANGIOSPERMAS



14. Adolfo Ávalos García, Elena Pérez. Reduca (Biología). Metabolismo secundario de plantas. RE. 2009;2(3):119-45.
15. METABOLITOS SECUNDARIOS EN ANGIOSPERMAS [Internet]. [citado 6 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.academia.edu/9358644/METABOLITOS_SECUNDARIOS_EN_ANGIOSPERMAS
16. Apuntes de Fisiología Vegetal: noviembre 2012 [Internet]. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012_11_01_archive.html
17. Taiz L, Zeiger E. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I; 2006. 646 p.
18. Aceites esenciales - Monografias.com [Internet]. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.monografias.com/trabajos97/aceites-esenciales/aceites-esenciales.shtml>
19. Propiedades y Beneficios del Aceite Esencial de Lavanda, | VidaNaturalia [Internet]. [citado 4 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.vidanaturalia.com/propiedades-del-aceite-esencial-de-lavanda/>
20. Rosas | Yo para ser feliz quiero un cupcake [Internet]. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://paraserfelizuncupcake.com/tag/rosas/>
21. Temas de Farmacognosia-Plantas medicinales. Saponinas [Internet]. Recuperado a partir de: <http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/>
22. Que son las Saponinas y para que se utilizan. Plantas [Internet]. RDNATURAL. [citado 4 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.rdnatural.es/blog/saponinas/>
23. Las saponinas y sapogeninas esteroidales - Monografias.com [Internet]. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.monografias.com/trabajos55/saponinas-sapogeninas/saponinas-sapogeninas.shtml>
24. Alejandro Martínez. Esteroides cardiotónicos [Internet]. Universidad de Antioquia. 2002. Recuperado a partir de: <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFJA A&url=http%3A%2F%2Ffarmacia.udea.edu.co%2F~ff%2Fcardiotonicos.pdf&ei=YxpIVb2GFcOf gwTvroCIDw&usg=AFQjCNHWRmJYJblpcT6R2y1iqS49ve-0Pg&bvm=bv.92291466,d.eXY>
25. UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA TEXTO DIGITAL DE FARMACOGNOSIA Y FITOQUÍMICA [Internet]. [citado 5 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.academia.edu/5271729/UNIVERSIDAD_CAT%3%93LICA_LOS_ANGELES_DE_CHIMBOTE_FACULTAD_DE_Ciencias_DE_LA_SALUD_ESCUELA_PROFESIONAL_DE_FARMACIA_Y_BIOQU%3%8DMICA_TEXTO_DIGITAL_DE_FARMACOGNOSIA_Y_FITOQU%3%8DMICA
26. Flavonoide [Internet]. Wiki Herbolaria. [citado 5 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://herbolaria.wikia.com/wiki/Flavonoide>



27. López T, Alejandro F, del Valle Mondragón L, Pastelín Hernández G. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? Arch Cardiol México. diciembre de 2006;76:33-45.
28. ¿Qué son y qué propiedades tienen los taninos? [Internet]. [citado 5 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.vitonica.com/alimentos/que-son-y-que-propiedades-tienen-los-taninos>
29. Cetonas | Química y algo más [Internet]. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.quimicayalomas.com/quimica-organica/alcoholes-aldehidos-cetonas/cetonas/>
30. Alcaloides [Internet]. organicaudla2. Recuperado a partir de: <https://organicaudla2.wikispaces.com/Alcaloides>
31. Tema 19/Alcaloides [Internet]. [citado 23 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: http://www2.uah.es/mapa/seminarios/activos/Bioquimica%20Medica/Tema%2019/varios/pages/alcaloides_jpg.htm
32. Bioquímica Oxidaciones biológicas [Internet]. [citado 17 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <https://ricarducatse.files.wordpress.com/2012/01/folleto-2-bioquimica-oxidaciones-biologicas.pdf>).
33. Luz Zapata, Liliana Gerard, Cristina Davies, María Schvab. Revista Scielo. Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. noviembre de 2007; Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162007000200008&lng=pt&nrm=iso&tlng=es
34. Castañeda, Ramos, Ibáñez. Revista Horizonte Médico. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. julio de 2008;8. Recuperado a partir de: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_1/Art4_Vol8_N1.pdf
35. Laura Argudo. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. 2010;27-34.
36. Octavio Maldonado, Colaboradores. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev Med UV. 2010;32-9.
37. Valoración de la actividad antioxidante en sopas deshidratadas, mediante los ensayos de la desoxirribosa y de la peroxidación lipídica [Internet]. calameo.com. [citado 16 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.calameo.com/books/0010240023bea47b725c3>
38. Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cuba Med Mil. marzo de 2001;30(1):15-20.
39. Antonio Díaz Cruz. Radical Libre de oxígeno, Especies Reactivas de Oxígeno, Estrés Oxidativo [Internet]. [citado 17 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: www.fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_bioquimica/Unidad_12.pdf



40. Justo Venereo Guíérrez. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 2002;31(2):126-33.
41. José Viña Ribes. *Fisiología Básica de los Radicales Libres de Oxígeno.* [Internet]. 2010 [citado 18 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.se-neonatal.es/Portals/0/fisiorad.pdf>.
42. Rosa Mayor Oxilia. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev Inst Med Trop.* 2010;5(2):23-9.
43. Ugartondo Casadevall V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. [Internet]. Universitat de Barcelona; 2009 [citado 17 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/41765>
44. Federación café. Radicales libres y mecanismos antioxidantes [Internet]. [citado 17 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.federacioncafe.com/Documentos/CafeYSalud/CafeYAntioxidantes/Radicales%20libres.pdf>.
45. Jésica Martínez. «EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE SEMILLAS DE HELIOCARPUS TEREBINTHINACEUS» [Internet]. [Oaxaca]: Universidad Tecnológica de la Mixteca; 2007 [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCUQFjAB&url=http%3A%2F%2Fjupiter.utm.mx%2F~tesis_dig%2F10150.pdf&ei=wBFaVfuON4ucgwTTsYDACA&usg=AFQjCNE_rEw-sd8oR1f94VobRsT4HzZZ5w&bvm=bv.93564037,d.eXY
46. J Teixeira, A Gaspar, E Garrido. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International* [Internet]. 2013 [citado 18 de mayo de 2015]; Recuperado a partir de: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3730368_BMRI2013-251754.sch.001&req=4
47. S Nabavi, M Ebrahimzadeh, S Nabavi, M Jafari. FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF ERYNGIUM CAUCASICUM TRAUTV AND FRORIPIA SUBPINNATA. 2008;3:19-25.
48. Paulina Olivares. Estrés Oxidativo [Internet]. 11:53:16 UTC [citado 3 de junio de 2015]. Recuperado a partir de: <http://es.slideshare.net/Pauli.olivares/estrs-oxidativo>
49. Roland Beers. A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR MEASURING THE BREAKDOWN OF HYDROGEN PEROXID [Internet]. 2012 [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: citeseerx.ist.psu.edu/.../download?doi=10...pd
50. B Priyanka, K Anitha, K Shirisha. EVALUATION OF ANTI OXIDANT ACTIVITY OF ETHANOLIC ROOT EXTRACT OF ALBIZIA LEBBECK (L.) BENTH. *Int Res J Pharm App Sci.* 2013;3(2):93-101.



51. Merck Millipore Corporation. 2015. Recuperado a partir de: http://www.merckmillipore.com/INTL/es/products/reagents-chemicals-labware/jEyB.qB.xZ4AAAE_X_x3.Lxi,nav
52. INDURA GroupAir products. 2009. Recuperado a partir de: http://www.indura.com.ec/lista_productos.asp?idq=3444&pag=2&sub_cat=&a=GASES&ai=3424&b=INDUSTRIALES&fl1=&fl2=&fl3=&ord=NombreProducto
53. SIGMA-ALDRICH. 2015. Recuperado a partir de: <https://www.sigmaaldrich.com/us-export.html>
54. Wasserlab. Recuperado a partir de: <http://www.wasserlab.com/>
55. Heidolph. Rotavapor Laborota 4000 Eco [Internet]. [citado 23 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.heidolphinstruments.com/fileadmin/media/3._Support/Betriebsanleitungen/Verdampfer/Laborot.
56. Trillo CF i. Tratado de farmacia galénica. Barcelona: Luzán 5; 2000. 904 p.
57. RapidVap N2 Dry Evaporation Systems [Internet]. [citado 23 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.labconco.com/product/rapidvap-vacuum-evaporation-systems/6.>
58. Rafael Uribe Acevedo. Cromatografía [Internet]. 2013. Recuperado a partir de: <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=11&ved=0CE0QFjAK&url=http%3A%2F%2Fwww.udea.edu.co%2Fportal%2Fpage%2Fportal%2FbibliotecaSedesDdependencias%2FUnidadesAcademicas%2FFacultadMedicina%2FBibliotecaDiseno%2FArchivos%2FDepartamentos%2FCromatografia-farmacologia-toxicologia-medicina-udea.pdf&ei=CFIIVYmqLoelgwTfnYCQCA&usg=AFQjCNFOSoyK-58Ixl7BI5sBzm1u7Sb0dg>
59. University of Colorado at Boulder. Thin Layer Chromatography (TLC) [Internet]. orgchem.colorado.edu. Recuperado a partir de: <http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/TLC/TLC.html>
60. Yepes AGF, Pedro Nel Martínez. Experimentos de Química Orgánica [Internet]. Armenia, Colombia: ELIZCOM S.A.S; 223 p. Recuperado a partir de: https://books.google.com.ec/books?id=Otm5wsEeKYEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
61. Cromatografía en Capa Fina (TLC). Una herramienta útil para el Conservador-Restaurador | Unicum [Internet]. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://unicum.cat/es/2011/06/cromatografia-en-capa-prima-tlc-una-eina-util-per-al-conservador-restaurador/>
62. Thin Layer Chromatography [Internet]. Recuperado a partir de: <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=11&ved=0CF4QFjAK&url=http%3A%2F%2Fwww.chem.umass.edu%2F~samil%2F269%2Ftlc.pdf&ei=h1N1Vcz7JlZgwTN2YDwBA&usg=AFQjCNFZ9sZ-iKTIho3yo-rdfigRcJu3IA&bvm=bv.92291466,d.eXY>

63. Cromatografía en Capa Fina (TLC). Una herramienta útil para el Conservador-Restaurador | Unicum [Internet]. [citado 5 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://unicum.cat/es/2011/06/cromatografia-en-capa-prima-tlc-una-eina-util-per-al-conservador-restaurador/>
64. Cromatografía en capa fina y columna [Internet]. Quimica de Hidrocarburos. [citado 18 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <https://qhlab2im43eq6.wordpress.com/2013/09/18/cromatografia-en-capa-fina-y-columna/>
65. karenvanegas. Cromatografía en Placa Fina [Internet]. quimicahidrocarburos. [citado 19 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <https://quimicahidrocarburos.wordpress.com/2013/09/18/cromatografia-en-placa-fina/>
66. Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996 [citado 17 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-00574-9>
67. P Padmanabhan, S Jangle. Evaluation of DPPH Radical Scavenging Activity and Reducing Power of Four Selected Medicinal Plants and Their Combinations v. IJPSDR. 2012;4(2):143-6.
68. M. Raghavendra, A. Madhsudhana, Pulala Raghuv eer. COMPARATIVE STUDIES ON THE IN VITRO ANTIOXIDANT PROPERTIES OF METHANOLIC LEAFY EXTRACTS FROM SIX EDIBLE LEAFY VEGETABLES OF INDIA. 2013;6(3):96-9.
69. Leticia Torres, Alfonso Delgado. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán [Internet]. 1a. ed. Coyoacán; 2008. 1-52 p. Recuperado a partir de: http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras_tehuacan/F59_Faba.pdf
70. Ricardo Vanni. EL GÉNERO DESMODIUM (LEGUMINOSAE, DESMODIEAE) EN ARGENTINA. 2001;39(3-4):255-85.
71. Nancy Lozano, et al. Evaluación fitoquímica y actividad biológica de *Desmodium molliculum* (H.B.K.) D.C. (Manayupa). Cienc E Investig. 14 de mayo de 2014;4(2):37-44.
72. Plantas medicinales y para qué sirven [Internet]. Recuperado a partir de: <http://www.botanical-online.com/col/manapuya7.htm>
73. DANE. ESTIMACIÓN E INTERPRETACIÓN DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LA ENCUESTA COCENSAL [Internet]. 2005. Recuperado a partir de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/censo/est_interp_coefvariacion.pdf
74. Acosta de la Luz L. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. Rev Cuba Plantas Med. abril de 2003;8(1):0-0.
75. Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis. junio de 1989;10(6):1003-8.

7. ANEXOS

FICHA DE RECOLECCIÓN "HIERBA INFANTE"

CÓDIGO	FECHA	HORA	ALTITUD	COORDENADA X	COORDENADA Y	COLECTOR
Espinoza 1	15/Oct/2014	10:00am	2590m	S 02°47.138°	W 078°52.100°	Karla Espinoza
PROVINCIA	ZONA	REFERENCIA DEL LUGAR				
Azuay		Vía a Azogues				
PARTE RECOLECTADA DE LA PLANTA						
HOJAS	FLORES	TALLOS	RAÍCES	BROTOS	FRUTOS	
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HÁBITAT						
ACEQUIA	AL CAMINO	ENREDADA EN OTRAS PLANTAS	SIN TREPAN EN EL SUELO	JUNTO AL RÍO	JUNTO A POTRERO	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
CARACTERÍSTICAS DEL SUELO			CLIMA			TEMPERATURA
COLOR	TIPO	HUMEDAD	LLUVIOSO	SOLEADO	NUBLADO	16 °C
Café	Rocoso	Abundante	X			
No. De bolsas de planta colectadas: <input checked="" type="checkbox"/> 3						

Anexo A. Datos de recolección de la muestra botánica.



Anexo B. Caracterización botánica de *Desmodium mollicum*.



Oficio N. 014-15-HA-UDA
Cuenca, 13 de mayo de 2015

La suscrita, Dra. Raffaella Ansaloni, directora del Herbario Azuay (HA)

CERTIFICA

Que las siguientes muestras botánicas:

1. Código "López 1", colectada por María Belén López el 12 de octubre de 2014 en la vía a Azogues
2. Código "Espinoza 1", colectada por Karla Espinoza el 15 de octubre de 2014 en la vía a Azogues

Fueron identificadas taxonómicamente por el Biólogo Danilo Minga, curador del Herbario Azuay de la Universidad del Azuay.

Ambas muestras botánicas fueron determinadas como:

Desmodium molliculum (Kunth) DC.

Familia FABACEAE

Atentamente,


Raffaella Ansaloni



Anexo C. Certificado de caracterización de la especie botánica.

Marcha Fitoquímica por TLC- <i>Jungia rugosa</i> Less y <i>Desmodium molliculum</i>					
Extracto	Fase móvil	Metabolito a investigar	Patrones 1mg/ml	Revelador	Dimensión
Metanólico	A. etilo-metanol-agua (100:13,5:10)	Derivados antracénicos y antraglicósidos: antraquinonas, antrones, antranoles	ácido cafeico ácido gálico ácido tánico ácido ferúlico	KOH al 10% en etanol absoluto	12 x 10 cm
Metanólico	A. etilo-metanol-agua (100:13,5:10)	Derivados de hidroquinona: Arbutina	ácido cafeico ácido gálico ácido tánico ácido ferúlico	Azul de Berlín	12 x 10 cm
Metanólico	A. etilo-metanol-agua (100:13,5:10)	Glucósidos cardiotónicos	No disponible	Cloruro de antimonio al 20% en etanol	8 x 10 cm
	Opcional: A. etilo-metanol-etanol (81:11:4:8)			Kedde	
Metanólico	A. etilo-metanol-agua (77:15:8)	Principios amargos	No disponible	Á. Sulfúrico anisaldehído	8 x 10 cm
				Lieberman Bouchard	
Metanólico	Tolueno-a. etilo-dietilamina (70:20:10)	Alcaloides	Cloruro de berberine	Dragendorff-intensifica con nitrito de Na en etanol 10%	9 x 10 cm
	A. etilo-metanol-agua (100:13,5:10)			Opcional: Iodoplatino	
Metanólico	Tolueno-á. fórmico-á. acético glacial-agua	Flavonoides y Cumarinas	Quercetin	Productos naturales	14 x 10 cm
			Isorhamnetin		
			Apigenin		
			Quercetin 3		

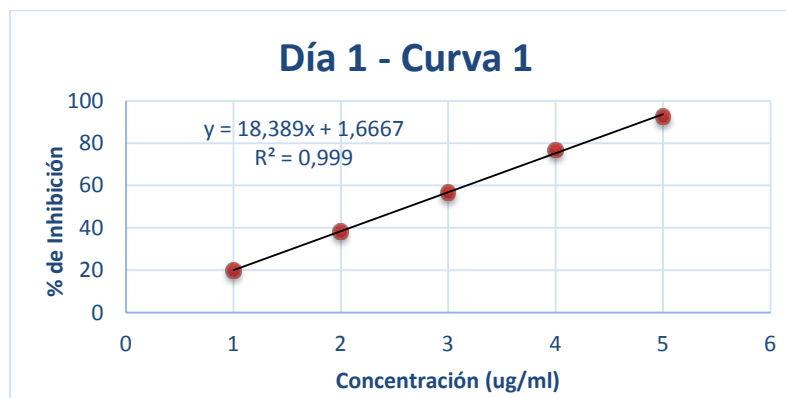
	(100:11:11:26)		glucorónido Escopoletina Umbeliferona		
Metanólico	A. etilo- metanol-agua (100:13,5:10)	Flavonoides	Quercetin Isorhamnetin Apigenin Quercetin 3 glucorónido	Productos naturales	12 x 10 cm
Metanólico	A. etilo-á. fórmico- á.acético glacial-agua (100:11:11:26)	Cumarinas	Escopoletina Umbeliferona	KOH al 10% en etanol absoluto	10 x 10 cm
Metanólico	A. etilo- metanol-agua (100:13,5:10)	Saponinas	Escina	Vainillina 1% en a. sulfúrico	9 x 10 cm
Diclorometano	Tolueno-éter (1:1)	Cumarinas	Escopoletina Umbeliferona	Productos naturales	10 x 10 cm
Diclorometano	Tolueno-éter (1:1)	Cumarinas	Escopoletina Umbeliferona	KOH al 10% en etanol absoluto	10 x 10 cm
Diclorometano	Tolueno- a. etilo (85:15)	Monoterpenos	Geraniol	Lieberman Bouchard	9 x 10 cm
Diclorometano	Tolueno- cloroformo- etanol	Triterpenos, balsamos, resinas, a. esenciales	Eugenol	Vainillina 1% en a. sulfúrico	10 x 10 cm

	(40.40:10)				
	Opcional: Tolueno- a. etilo (85:15)		Esclareol		
Diclorometano	Tolueno- cloroformo- etanol (40.40:10)	Triterpenos, bálsamos, resinas, a. esenciales	Eugenol	Á. Sulfúrico anisaldehído	10 x 10 cm
	Opcional: Tolueno- a. etilo (85:15)		Esclareol		
Diclorometano	Cloroformo-á. acético- metanol-agua (64:32:12:8)	Saponinas	Escina	Vainillina 1% en a. sulfúrico	9 x 10 cm
Diclorometano	Tolueno- dioxano- á. acético glacial (90:25:4)	Flavonoides	Quercetin	Productos naturales	12 x 10 cm
			Isorhamnetin		
			Apigenin		
			Quercetin 3 glucorónido		

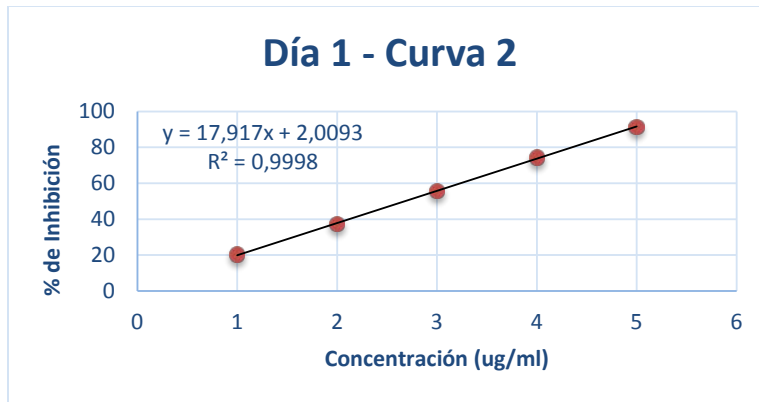
Anexo D. Marcha Fitoquímica para Cromatografía de Capa Fina.

Resultados de las curvas de calibración-DPPH
**DÍA 1
CURVA 1**

Concentración (ug/ml)	1	2	3	4	5	6	7	A _{Control} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Réplica 1 (nm)	0.290	0.223	0.153	0.087	0.028	0.023	0.017	0.360	2.63
Réplica 2 (nm)	0.284	0.223	0.161	0.083	0.024	0.022	0.018		
Réplica 3 (nm)	0.291	0.221	0.154	0.081	0.028	0.020	0.018		
Media	0.288	0.222	0.156	0.084	0.027	0.022	0.018		
Des. Estándar	0.004	0.001	0.004	0.003	0.002	0.002	0.001		
% Coef. Variación	1.31	0.52	2.79	3.65	8.66	7.05	3.27		
%inhibición	19.91	38.24	56.67	76.76	92.59	93.98	95.09		

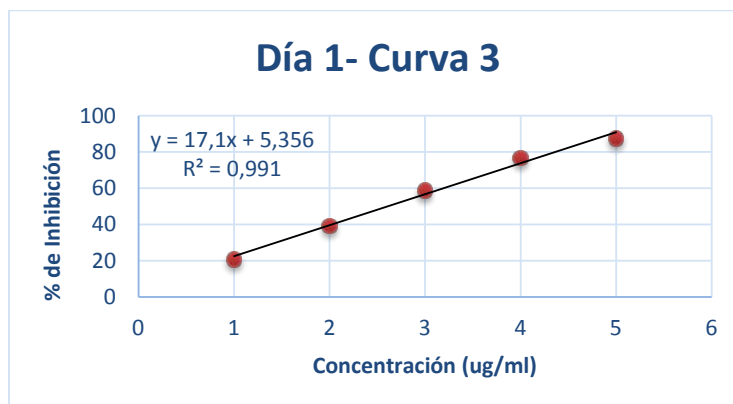

CURVA 2

Concentración (ug/ml)	1	2	3	4	5	6	7	A _{Control} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Réplica 1 (nm)	0.281	0.224	0.155	0.097	0.027	0.022	0.019	0.360	2.68
Réplica 2 (nm)	0.289	0.223	0.164	0.090	0.035	0.019	0.016		
Réplica 3 (nm)	0.291	0.231	0.159	0.092	0.031	0.023	0.020		
Media	0.287	0.226	0.159	0.093	0.031	0.021	0.018		
Des. Estándar	0.005	0.004	0.005	0.004	0.004	0.002	0.002		
% Coef. Variación	1.84	1.93	2.83	3.88	12.90	9.76	11.35		
%inhibición	20.28	37.22	55.74	74.17	91.39	94.07	94.91		



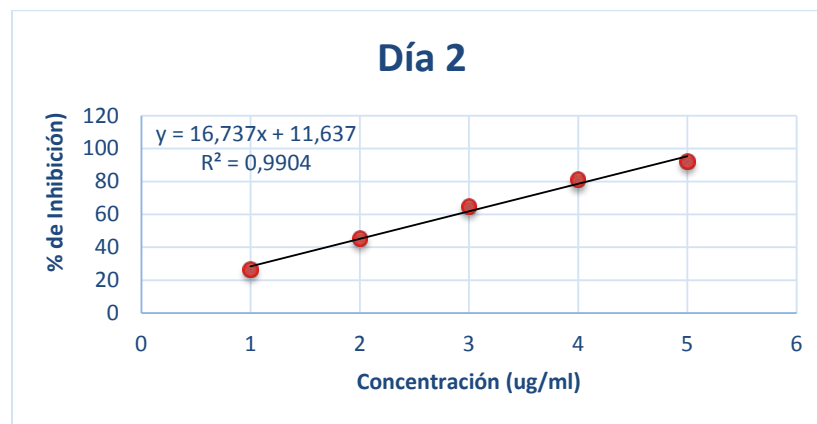
CURVA 3

Concentración (ug/ml)	1	2	3	4	5	6	7	A _{Control} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Réplica 1 (nm)	0.256	0.198	0.132	0.072	0.042	0.025	0.018	0.323	2.61
Réplica 2 (nm)	0.257	0.193	0.137	0.076	0.040	0.025	0.017		
Réplica 3 (nm)	0.254	0.197	0.131	0.077	0.038	0.027	0.020		
Media	0.256	0.196	0.133	0.075	0.040	0.026	0.018		
Des. Estándar	0.002	0.003	0.003	0.003	0.002	0.001	0.002		
% Coef. Variación	0.60	1.35	2.41	3.53	5.00	4.50	8.33		
%inhibición	20.85	39.32	58.72	76.78	87.62	92.05	94.32		

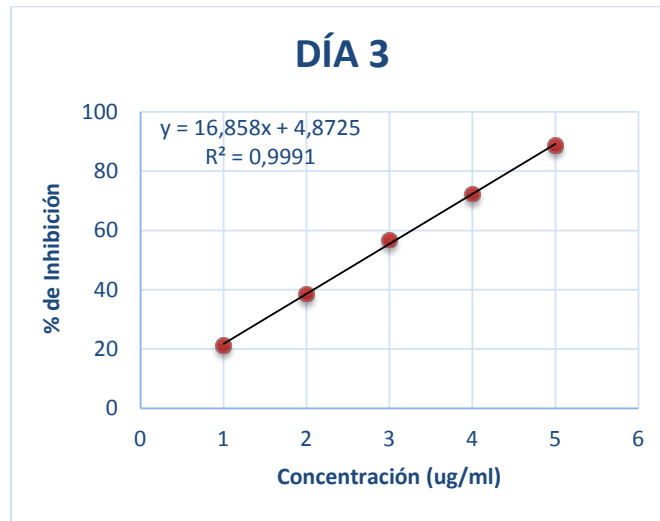


DÍA 2

Concentración (ug/ml)	1	2	3	4	5	6	7	A _{Control} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Réplica 1 (nm)	0.245	0.181	0.118	0.063	0.020	0.017	0.019	0.332	2.29
Réplica 2 (nm)	0.246	0.179	0.119	0.062	0.028	0.017	0.014		
Réplica 3 (nm)	0.243	0.185	0.116	0.065	0.030	0.015	0.015		
Media	0.245	0.182	0.118	0.063	0.026	0.016	0.016		
Des. Estándar	0.002	0.003	0.002	0.002	0.005	0.001	0.003		
% Coef. Variación	0.62	1.68	1.30	2.41	20.35	7.07	16.54		
%inhibición	26.31	45.28	64.56	80.92	92.17	95.08	95.18		


DÍA 3

Concentración (ug/ml)	1	2	3	4	5	6	7	A _{Control} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Réplica 1 (nm)	0.284	0.225	0.155	0.098	0.047	0.040	0.036	0.366	2.68
Réplica 2 (nm)	0.290	0.221	0.160	0.106	0.042	0.037	0.033		
Réplica 3 (nm)	0.292	0.229	0.160	0.100	0.037	0.035	0.033		
Media	0.289	0.225	0.158	0.101	0.042	0.037	0.034		
Des. Estándar	0.004	0.004	0.003	0.004	0.005	0.003	0.002		
% Coef. Variación	1.44	1.78	1.82	4.11	11.90	6.74	5.09		
%inhibición	21.13	38.52	56.74	72.31	88.52	89.80	90.71		

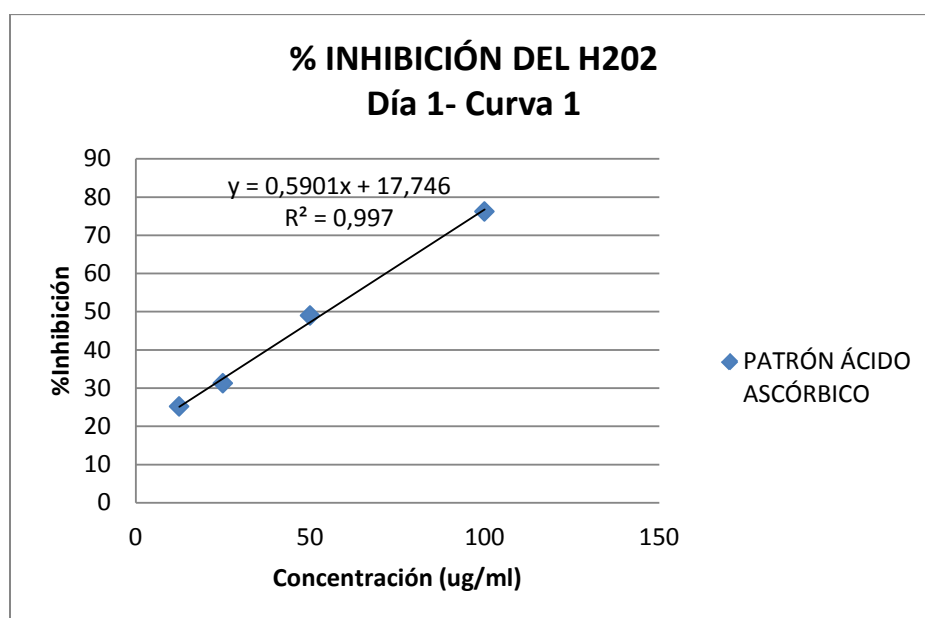


Anexo E. Resultados de las curvas de calibración del ácido ascórbico por la técnica del DPPH.

Resultados de las curvas de calibración del ácido ascórbico por la técnica de barrido del peróxido de hidrógeno

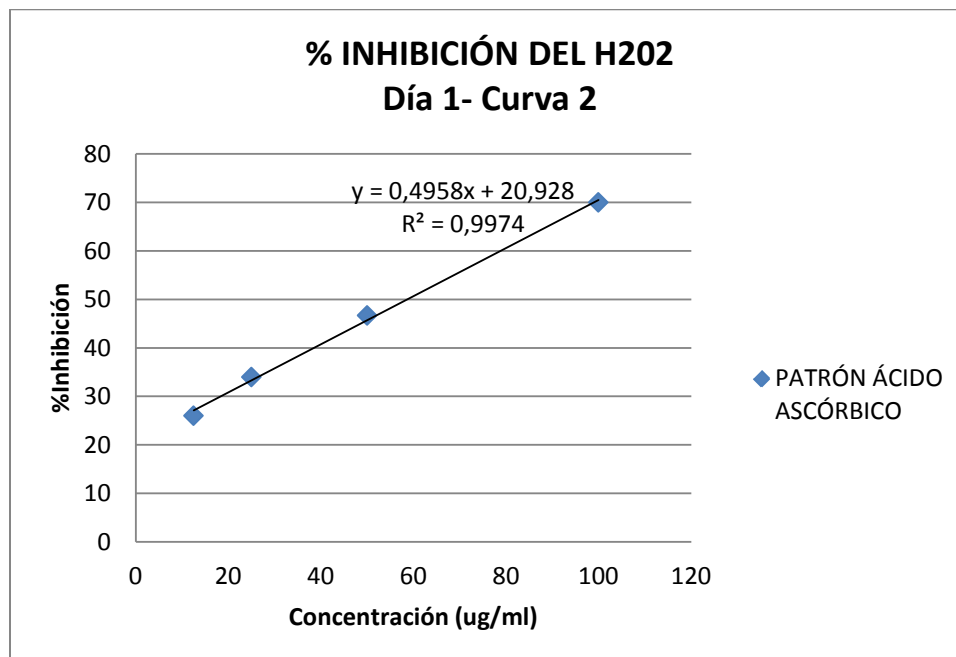
**DIA 1
CURVA 1**

Concentración (µg/ml)	12,5	25	50	100	Absorbancia C	H2O2 4mM
Lectura blanco patrón (nm)	0,131	0,254	0,509	1,031	0,049	0,337
Réplica 1 (nm)	0,169	0,287	0,533	1,041		
Réplica 2 (nm)	0,167	0,287	0,535	1,043		
Réplica 3 (nm)	0,167	0,289	0,534	1,044		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,038	0,033	0,024	0,01		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,036	0,033	0,026	0,012		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,036	0,035	0,025	0,013		
Media	0,037	0,034	0,025	0,012		
Des. Estándar	0,001	0,001	0,001	0,002		
Coeficiente de Variación	3,15%	3,43%	4,00%	13,09%		
%Inhibición	25	31	49	76		
IC50	54,66 µg/ml					



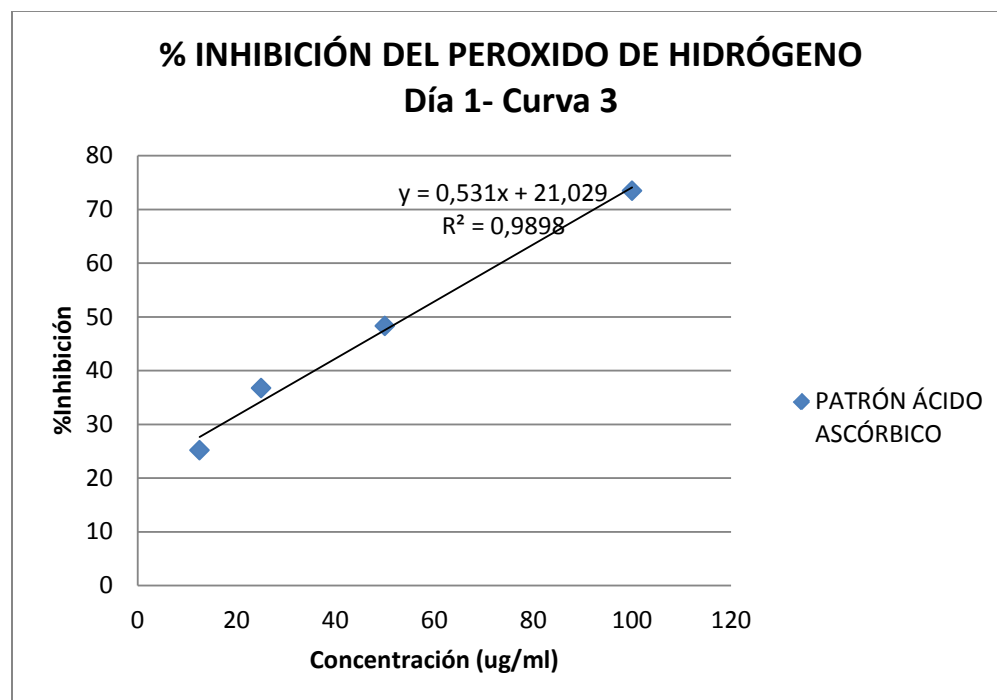
CURVA 2

Concentración (µg/ml)	12,5	25	50	100	A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,129	0,249	0,502	1,025	0,05	0,337
Réplica 1 (nm)	0,167	0,283	0,529	1,04		
Réplica 2 (nm)	0,165	0,281	0,528	1,041		
Réplica 3 (nm)	0,166	0,282	0,529	1,039		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,038	0,034	0,027	0,015		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,036	0,032	0,026	0,016		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,037	0,033	0,027	0,014		
Media	0,037	0,033	0,027	0,015		
Des. Estándar	0,001	0,001	0,001	0,001		
Coefficiente de Variación	2,70%	3,03%	2,17%	6,67%		
%Inhibición	26	34	47	70		
IC50	58,63 µg/ml					



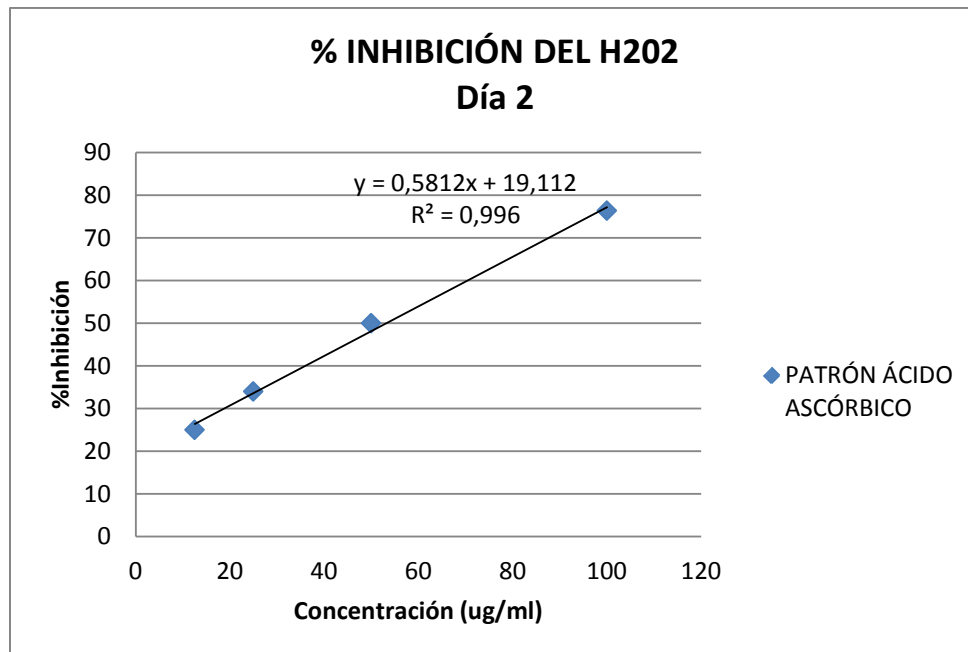
CURVA 3

Concentración (µg/ml)	12,5	25	50	100	A control (nm)	A _{H2O2 4Mm} (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,127	0,246	0,494	1,01	0,049	0,337
Réplica 1 (nm)	0,165	0,276	0,52	1,022		
Réplica 2 (nm)	0,164	0,278	0,520	1,024		
Réplica 3 (nm)	0,162	0,277	0,518	1,023		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,038	0,03	0,026	0,012		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,037	0,032	0,026	0,014		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,035	0,031	0,024	0,013		
Media	0,037	0,031	0,025	0,013		
Des. Estándar	0,002	0,001	0,001	0,001		
Coefficiente de Variación	4,17%	3,23%	4,56%	7,69%		
%Inhibición	25	37	48	73		
IC50	54,56 µg/ml					



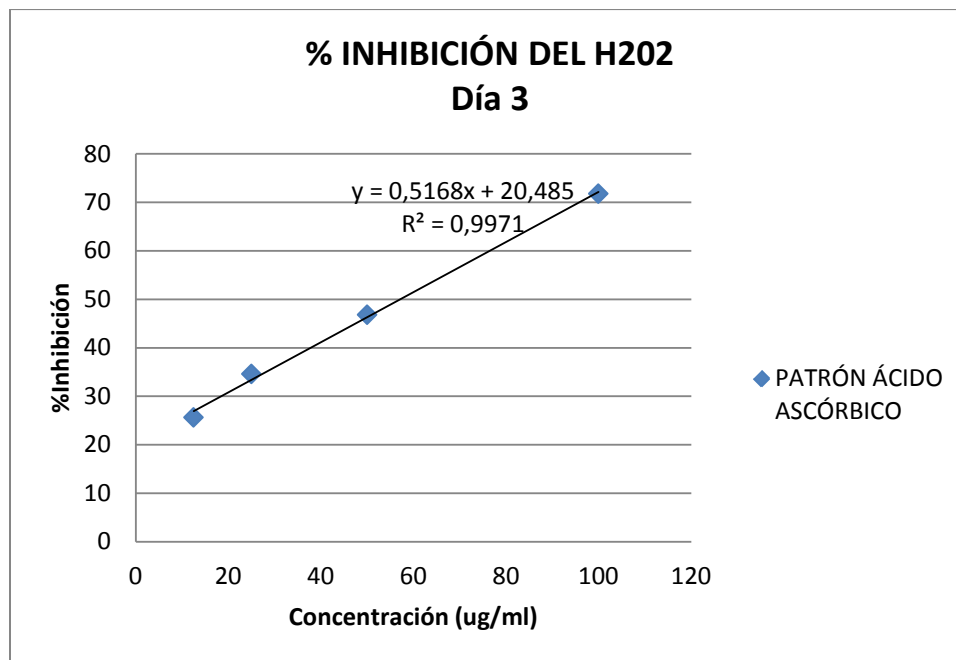
DIA 2

Concentración (µg/ml)	12,5	25	50	100	A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,13	0,254	0,506	0,988	0,048	0,335
Réplica 1 (nm)	0,167	0,288	0,53	0,998		
Réplica 2 (nm)	0,165	0,285	0,529	0,998		
Réplica 3 (nm)	0,166	0,284	0,531	1,002		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,037	0,034	0,024	0,01		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,035	0,031	0,023	0,01		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,036	0,03	0,025	0,014		
Media	0,036	0,032	0,024	0,011		
Des. Estándar	0,001	0,002	0,001	0,002		
Coefficiente de Variación	2,78%	6,57%	4,17%	20,38%		
%Inhibición	25	34	50	76		
IC50	53,15 µg/ml					



DIA 3

Concentración (µg/ml)	12,5	25	50	100	A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
PATRÓN ÁCIDO ASCÓRBICO	0,127	0,241	0,484	0,989	0,052	0,329
Lectura 1	0,166	0,275	0,514	1,004		
Lectura 2	0,164	0,274	0,510	1,003		
Lectura 3	0,167	0,276	0,511	1,004		
Ensayo 1 (L1-P)	0,039	0,034	0,03	0,015		
Ensayo 2 (L2-P)	0,037	0,033	0,026	0,014		
Ensayo 3 (L3-P)	0,04	0,035	0,027	0,015		
Media	0,039	0,034	0,028	0,015		
Des. estándar	0,002	0,001	0,002	0,001		
Coefficiente de Variación	3,95%	2,94%	7,52%	3,94%		
%Inhibición	26	35	47	72		
IC50	57,11 µg/ml					



Anexo F. Resultados de las curvas de calibración del ácido ascórbico por la técnica de barrido del peróxido de hidrógeno.

Resultados de los extractos de *Jungia rugosa less* y *Desmodium molliculum*

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (TÉCNICA DPPH)								
EXTRACTOS METANOLICOS								
CODIGO: GT-1 MET						PESO: 23 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.001	0.002	0.002	0.006	0.013	0.021	0.326	129.36
Réplica 1 (nm)	0.336	0.320	0.300	0.255	0.227	0.163		
Réplica 2 (nm)	0.334	0.321	0.306	0.256	0.218	0.164		
Réplica 3 (nm)	0.334	0.327	0.303	0.252	0.224	0.161		
Media Abs	0.335	0.323	0.303	0.254	0.223	0.163		
D. Estándar	0.001	0.004	0.003	0.002	0.005	0.002		
% Coef. Variación	0.35	1.17	0.99	0.82	2.05	0.94		
% Inhibición	-2.35	1.64	7.67	23.82	35.58	56.54		

CODIGO: GT-2 MET						PESO: 21.0 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.001	0.005	0.009	0.013	0.02	0.028	0.326	46.97
Réplica 1 (nm)	0.301	0.293	0.210	0.085	0.040	0.037		
Réplica 2 (nm)	0.305	0.294	0.209	0.086	0.039	0.038		
Réplica 3 (nm)	0.300	0.292	0.210	0.085	0.039	0.036		
Media Abs	0.302	0.293	0.210	0.151	0.039	0.037		
D. Estándar	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
% Coef. Variación	0.88	0.34	0.28	0.38	1.47	2.70		
% Inhibición	7.67	11.66	38.45	57.67	94.07	97.24		

CODIGO: GT-3 MET						PESO: 20 mg		
------------------	--	--	--	--	--	-------------	--	--



PARTE DE LA PLANTA: Hojas							A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6		
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150	0.349	50.28
B _{clorofila} (nm)	0.001	0.001	0.004	0.007	0.014	0.021		
Réplica 1 (nm)	0.328	0.320	0.215	0.172	0.057	0.043		
Réplica 2 (nm)	0.327	0.322	0.212	0.169	0.052	0.041		
Réplica 3 (nm)	0.332	0.320	0.209	0.167	0.050	0.040		
Media Abs	0.329	0.321	0.212	0.169	0.053	0.041		
D. Estándar	0.003	0.001	0.003	0.003	0.004	0.002		
% Coef. Variación	0.80	0.36	1.42	1.49	6.80	3.70		
% Inhibición	6.02	8.40	40.40	53.49	88.83	94.17		

CODIGO: GT-4 MET							PESO: 20.5 mg	
PARTE DE LA PLANTA: Hojas							A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6		
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150	0.326	74.59
B _{clorofila} (nm)	0.000	0.002	0.004	0.01	0.022	0.035		
Réplica 1 (nm)	0.371	0.357	0.326	0.270	0.152	0.080		
Réplica 2 (nm)	0.373	0.353	0.325	0.269	0.154	0.082		
Réplica 3 (nm)	0.37	0.351	0.326	0.270	0.151	0.078		
Media Abs	0.371	0.354	0.326	0.151	0.152	0.080		
D. Estándar	0.002	0.003	0.001	0.001	0.002	0.002		
% Coef. Variación	0.41	0.86	0.18	0.38	1.00	2.50		
% Inhibición	-13.91	-7.87	1.33	56.75	60.02	86.20		

CODIGO: GT-5 MET							PESO: 20.7 mg	
PARTE DE LA PLANTA: Hojas							A _{CONTROL}	IC ₅₀
	X1	X2	X3	X4	X5	X6		



Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150	(nm)	(ug/ml)
B_{clorofila} (nm)	0.001	0.002	0.004	0.009	0.015	0.023	0.349	38.37
Réplica 1 (nm)	0.332	0.294	0.203	0.071	0.039	0.039		
Réplica 2 (nm)	0.299	0.290	0.193	0.063	0.038	0.037		
Réplica 3 (nm)	0.316	0.287	0.200	0.063	0.040	0.037		
Media Abs	0.316	0.290	0.199	0.066	0.039	0.038		
D. Estándar	0.017	0.004	0.005	0.005	0.001	0.001		
% Coef. Variación	5.23	1.21	2.58	7.03	2.56	3.07		
% Inhibición	9.84	17.38	44.22	83.76	93.12	95.80		

CODIGO: GT-6 MET							PESO: 20.9 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas									
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)	
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150			
B_{clorofila} (nm)	0.000	0.002	0.005	0.009	0.013	0.018	0.349	49.27	
Réplica 1 (nm)	0.322	0.281	0.254	0.168	0.042	0.040			
Réplica 2 (nm)	0.324	0.280	0.256	0.165	0.045	0.039			
Réplica 3 (nm)	0.327	0.285	0.250	0.167	0.043	0.042			
Media Abs	0.324	0.282	0.253	0.167	0.043	0.040			
D. Estándar	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002	0.002			
% Coef. Variación	0.78	0.94	1.21	0.92	3.53	3.79			
% Inhibición	7.07	19.77	28.84	54.82	91.31	93.60			

CODIGO: GT-7 MET							PESO: 21,7mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas									



	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B_{clorofila} (nm)	-0.002	-0.001	0.000	0.004	0.009	0.016	0.317	45.53
Réplica 1 (nm)	0.302	0.282	0.216	0.091	0.032	0.031		
Réplica 2 (nm)	0.301	0.282	0.201	0.085	0.026	0.026		
Réplica 3 (nm)	0.306	0.286	0.230	0.088	0.028	0.025		
Media Abs	0.303	0.283	0.216	0.088	0.029	0.027		
D. Estándar	0.003	0.002	0.015	0.003	0.003	0.003		
% Coef. Variación	0.87	0.82	6.72	3.41	10.66	11.76		
% Inhibición	3.79	10.30	31.97	73.50	93.80	96.42		

CODIGO: GT-8 MET						PESO: 20 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B_{clorofila} (nm)	0.000	0.000	0.003	0.007	0.016	0.024	0.345	58.58
Réplica 1 (nm)	0.321	0.305	0.269	0.199	0.075	0.061		
Réplica 2 (nm)	0.328	0.307	0.268	0.204	0.073	0.063		
Réplica 3 (nm)	0.327	0.310	0.267	0.198	0.076	0.060		
Media Abs	0.325	0.307	0.268	0.200	0.075	0.061		
D. Estándar	0.004	0.003	0.001	0.003	0.002	0.002		
% Coef. Variación	1.16	0.82	0.37	1.60	2.05	2.49		
% Inhibición	5.70	10.92	23.19	43.96	83.00	89.18		

CODIGO: GT-9 MET						PESO: 21.5 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								



	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	-0.002	-0.001	0.000	0.003	0.011	0.021	0.345	91.90
Réplica 1 (nm)	0.339	0.324	0.305	0.263	0.176	0.099		
Réplica 2 (nm)	0.334	0.326	0.308	0.261	0.172	0.095		
Réplica 3 (nm)	0.339	0.319	0.300	0.259	0.168	0.098		
Media Abs	0.337	0.323	0.304	0.261	0.172	0.097		
D. Estándar	0.003	0.004	0.004	0.002	0.004	0.002		
% Coef. Variación	0.86	1.12	1.33	0.77	2.33	2.14		
% Inhibición	1.64	6.09	11.79	25.22	53.33	77.87		

CODIGO: GT-10 MET						PESO: 21.7 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	-0.001	-0.001	0.002	0.005	0.011	0.017	0.317	53.05
Réplica 1 (nm)	0.313	0.308	0.265	0.182	0.069	0.046		
Réplica 2 (nm)	0.310	0.302	0.258	0.181	0.066	0.04		
Réplica 3 (nm)	0.313	0.308	0.258	0.186	0.061	0.04		
Media Abs	0.312	0.306	0.260	0.183	0.065	0.042		
D. Estándar	0.002	0.003	0.004	0.003	0.004	0.003		
% Coef. Variación	0.56	1.13	1.55	1.45	6.19	8.25		
% Inhibición	1.26	3.15	18.51	43.85	82.86	92.11		

CODIGO: GT-11 MET						PESO: 20.3 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								



	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.000	0.001	0.003	0.008	0.019	0.031	0.317	49.94
Réplica 1 (nm)	0.304	0.281	0.232	0.144	0.043	0.040		
Réplica 2 (nm)	0.301	0.287	0.232	0.136	0.041	0.037		
Réplica 3 (nm)	0.303	0.288	0.235	0.136	0.041	0.038		
Media Abs	0.303	0.285	0.233	0.139	0.042	0.038		
D. Estándar	0.002	0.004	0.002	0.005	0.001	0.002		
% Coef. Variación	0.50	1.33	0.74	3.33	2.77	3.98		
% Inhibición	4.52	10.30	27.44	58.78	92.85	97.69		

CODIGO: GT-12 MET								
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.005	0.006	0.008	0.011	0.023	0.034	0.349	40.89
Réplica 1 (nm)	0.322	0.298	0.206	0.106	0.043	0.048		
Réplica 2 (nm)	0.318	0.296	0.212	0.107	0.042	0.049		
Réplica 3 (nm)	0.316	0.292	0.209	0.101	0.043	0.051		
Media Abs	0.319	0.295	0.209	0.105	0.043	0.049		
D. Estándar	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.002		
% Coef. Variación	0.96	1.03	1.44	3.02	1.35	3.10		
% Inhibición	10.12	17.10	42.41	73.15	94.36	95.61		

CODIGO: GT-13 MET						PESO: 20.4 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL}	IC ₅₀



Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150	(nm)	(ug/ml)
B_{clorofila} (nm)	0.003	0.005	0.009	0.014	0.025	0.036	0.349	46.40
Réplica 1 (nm)	0.335	0.312	0.243	0.130	0.051	0.051		
Réplica 2 (nm)	0.335	0.309	0.237	0.132	0.049	0.049		
Réplica 3 (nm)	0.333	0.309	0.240	0.130	0.049	0.049		
Media Abs	0.334	0.310	0.240	0.131	0.050	0.050		
D. Estándar	0.001	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001		
% Coef. Variación	0.35	0.56	1.25	0.88	2.32	2.32		
% Inhibición	5.06	12.61	33.81	66.57	92.93	96.08		

CODIGO: GT-14 MET						PESO: 21.1 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B_{clorofila} (nm)	0.000	0.001	0.005	0.011	0.021	0.028	0.326	51.32
Réplica 1 (nm)	0.313	0.305	0.241	0.134	0.047	0.043		
Réplica 2 (nm)	0.310	0.304	0.248	0.137	0.045	0.043		
Réplica 3 (nm)	0.31	0.306	0.248	0.131	0.047	0.041		
Media Abs	0.311	0.305	0.246	0.151	0.046	0.042		
D. Estándar	0.002	0.001	0.004	0.003	0.001	0.001		
% Coef. Variación	0.56	0.33	1.65	1.99	2.49	2.73		
% Inhibición	4.60	6.75	26.18	57.06	92.23	95.60		

CODIGO: GT-15 MET						PESO: 20 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.004	0.006	0.010	0.027	0.024	0.034	0.338	41.12
Réplica 1 (nm)	0.301	0.251	0.172	0.080	0.051	0.038		
Réplica 2 (nm)	0.299	0.252	0.175	0.082	0.052	0.04		
Réplica 3 (nm)	0.300	0.252	0.171	0.080	0.050	0.037		
Media Abs	0.300	0.252	0.173	0.151	0.051	0.038		
D. Estándar	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002		
% Coef. Variación	0.33	0.23	1.21	0.76	1.96	3.98		
% Inhibición	9.20	24.64	50.10	61.96	91.72	98.72		

CODIGO: GT-16 MET						PESO: 20 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	-0.002	-0.001	0.002	0.007	0.016	0.025	0.345	54.94
Réplica 1 (nm)	0.315	0.312	0.264	0.186	0.065	0.047		
Réplica 2 (nm)	0.315	0.307	0.26	0.18	0.062	0.047		
Réplica 3 (nm)	0.314	0.311	0.258	0.180	0.062	0.044		
Media Abs	0.315	0.310	0.261	0.182	0.063	0.046		
D. Estándar	0.001	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002		
% Coef. Variación	0.18	0.85	1.17	1.90	2.75	3.77		
% Inhibición	8.21	9.86	25.02	49.28	86.38	93.91		



CODIGO: GT-17 MET						PESO: 20.1 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A_{CONTROL} (nm)	IC₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B_{clorofila} (nm)	-0.001	0.000	0.001	0.006	0.012	0.02		
Réplica 1 (nm)	0.317	0.312	0.266	0.192	0.070	0.044		
Réplica 2 (nm)	0.317	0.314	0.263	0.19	0.067	0.045		
Réplica 3 (nm)	0.316	0.311	0.260	0.189	0.065	0.043		
Media Abs	0.317	0.312	0.263	0.190	0.067	0.044		
D. Estándar	0.001	0.002	0.003	0.002	0.003	0.001		
% Coef. Variación	0.18	0.49	1.14	0.80	3.74	2.27		
% Inhibición	-0.21	1.47	17.35	41.85	82.54	92.43		

CODIGO: GT-18 MET						PESO: 20 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A_{CONTROL} (nm)	IC₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B_{clorofila} (nm)	-0.001	-0.001	0.000	0.002	0.006	0.009		
Réplica 1 (nm)	0.306	0.302	0.243	0.172	0.046	0.035		
Réplica 2 (nm)	0.299	0.294	0.245	0.168	0.046	0.037		
Réplica 3 (nm)	0.302	0.298	0.241	0.173	0.048	0.038		
Media Abs	0.302	0.298	0.243	0.171	0.047	0.037		
D. Estándar	0.004	0.004	0.002	0.003	0.001	0.002		
% Coef. Variación	1.16	1.34	0.82	1.55	2.47	4.17		
% Inhibición	4.31	5.68	23.34	46.69	87.17	91.27		

CODIGO: GT-19 MET							
PARTE DE LA PLANTA: Hojas							



	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.000	0.000	0.003	0.004	0.011	0.019	0.317	50.22
Réplica 1 (nm)	0.300	0.292	0.227	0.133	0.04	0.034		
Réplica 2 (nm)	0.296	0.287	0.225	0.135	0.038	0.034		
Réplica 3 (nm)	0.298	0.291	0.229	0.131	0.042	0.038		
Media Abs	0.298	0.290	0.227	0.133	0.040	0.035		
D. Estándar	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002		
% Coef. Variación	0.67	0.91	0.88	1.50	5.00	6.54		
% Inhibición	5.99	8.52	29.34	59.31	90.85	94.85		

CODIGO: GT-20 MET						PESO: 20.5 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	-0.002	-0.001	0.001	0.005	0.016	0.026	0.317	54.96
Réplica 1 (nm)	0.306	0.300	0.258	0.182	0.072	0.047		
Réplica 2 (nm)	0.309	0.299	0.253	0.179	0.067	0.047		
Réplica 3 (nm)	0.305	0.300	0.256	0.181	0.059	0.044		
Media Abs	0.307	0.300	0.256	0.181	0.066	0.046		
D. Estándar	0.002	0.001	0.003	0.002	0.007	0.002		
% Coef. Variación	0.68	0.19	0.98	0.85	9.94	3.77		
% Inhibición	2.63	5.15	19.66	44.58	84.23	93.69		

CODIGO: GT-24 MET						PESO: 20.6 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	-0.003	-0.002	0.000	0.007	0.018	0.019	0.326	52.43
Réplica 1 (nm)	0.319	0.305	0.244	0.162	0.046	0.036		
Réplica 2 (nm)	0.317	0.307	0.241	0.16	0.045	0.036		
Réplica 3 (nm)	0.315	0.299	0.240	0.164	0.048	0.038		
Media Abs	0.317	0.304	0.242	0.151	0.046	0.037		
D. Estándar	0.002	0.004	0.002	0.002	0.002	0.001		
% Coef. Variación	0.63	1.37	0.86	1.32	3.30	3.15		
% Inhibición	1.84	6.24	25.87	55.83	91.31	94.58		

CODIGO: GT-25 MET						PESO: 20.4 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.004	0.004	0.006	0.012	0.019	0.026	0.349	116.99
Réplica 1 (nm)	0.348	0.334	0.328	0.271	0.224	0.178		
Réplica 2 (nm)	0.349	0.337	0.326	0.267	0.226	0.173		
Réplica 3 (nm)	0.347	0.335	0.325	0.265	0.226	0.171		
Media Abs	0.348	0.335	0.326	0.268	0.225	0.174		
D. Estándar	0.001	0.002	0.002	0.003	0.001	0.004		
% Coef. Variación	0.29	0.46	0.47	1.14	0.51	2.07		
% Inhibición	1.43	5.06	8.21	26.74	40.88	57.59		



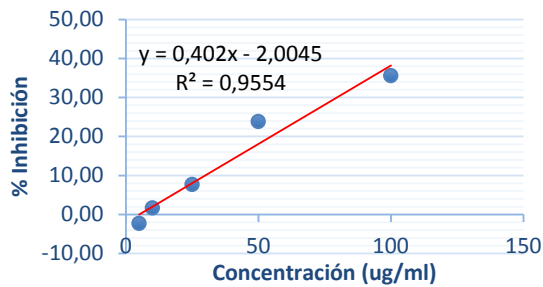
CODIGO: GT-26 MET						PESO: 19.4 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A_{CONTROL} (nm)	IC₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B_{clorofila} (nm)	-0.001	-0.001	0.000	0.004	0.012	0.017	0.345	71.38
Réplica 1 (nm)	0.305	0.289	0.218	0.098	0.033	0.032		
Réplica 2 (nm)	0.303	0.283	0.216	0.097	0.035	0.034		
Réplica 3 (nm)	0.301	0.283	0.217	0.099	0.035	0.035		
Media Abs	0.303	0.285	0.217	0.098	0.034	0.034		
D. Estándar	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001	0.002		
% Coef. Variación	0.66	1.22	0.46	1.02	3.36	4.54		
% Inhibición	11.88	17.10	37.10	72.75	93.53	95.17		

CODIGO: EC1- MET (1						PESO: 20 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A_{CONTROL} (nm)	IC₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B_{clorofila} (nm)	0.000	0.003	0.007	0.011	0.013	0.017	0.338	48.96
Réplica 1 (nm)	0.301	0.267	0.205	0.158	0.062	0.029		
Réplica 2 (nm)	0.303	0.266	0.204	0.158	0.061	0.030		
Réplica 3 (nm)	0.305	0.268	0.206	0.160	0.061	0.032		
Media Abs	0.303	0.267	0.205	0.151	0.061	0.030		
D. Estándar	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002		
% Coef. Variación	0.66	0.37	0.49	0.76	0.94	5.04		
% Inhibición	7.06	19.02	39.26	57.06	85.17	96.06		

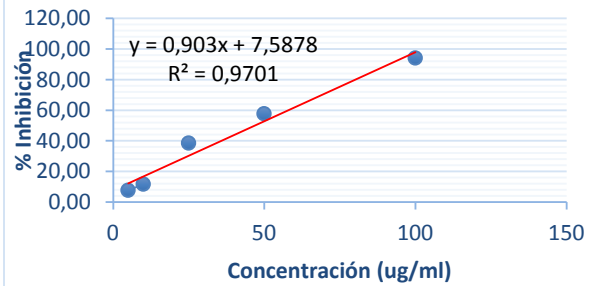


CODIGO: EC-1 MET (1-DPPH)				PESO: 20.6 mg		
PARTE DE LA PLANTA: Hojas						
	X1	X2	X3	X4	A _{CONTROL}	IC ₅₀
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	(nm)	(ug/ml)
B _{clorofila} (nm)	0.000	0.004	0.004	0.009	0.319	7.46
Réplica 1 (nm)	0.227	0.145	0.049	0.046		
Réplica 2 (nm)	0.231	0.141	0.048	0.040		
Réplica 3 (nm)	0.231	0.140	0.048	0.042		
Media Abs	0.230	0.142	0.048	0.043		
D. Estándar	0.002	0.003	0.001	0.003		
% Coef. Variación	1.01	1.86	1.19	7.16		
% Inhibición	31.66	59.76	86.98	90.24		

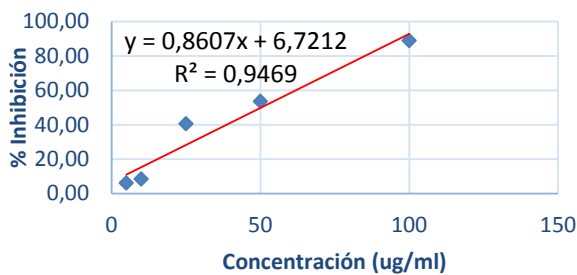
GT-1 MET



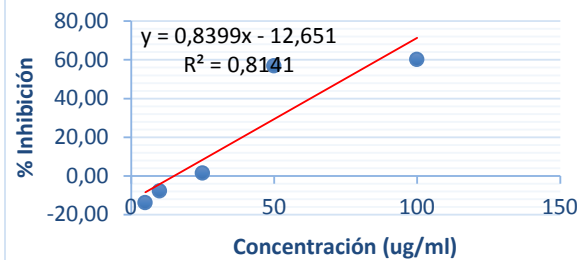
GT-2 MET



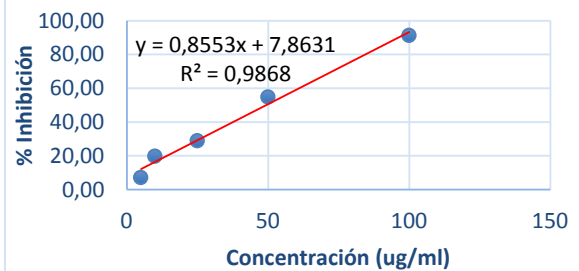
GT-3 MET



GT-4 MET

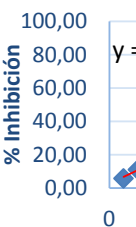
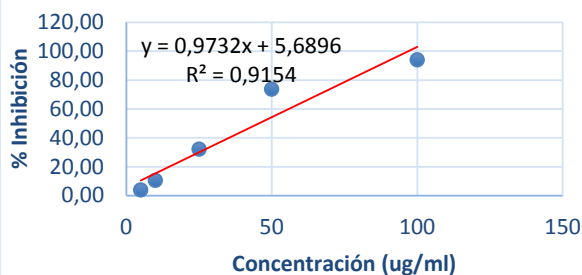


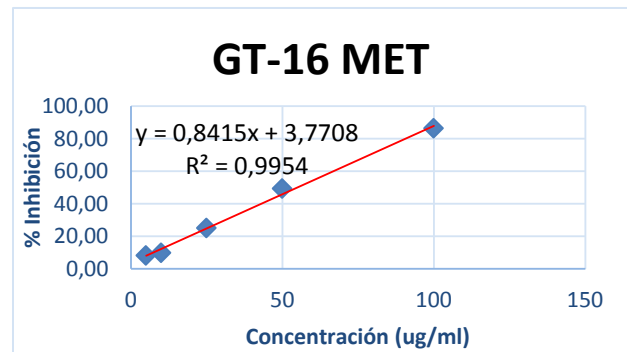
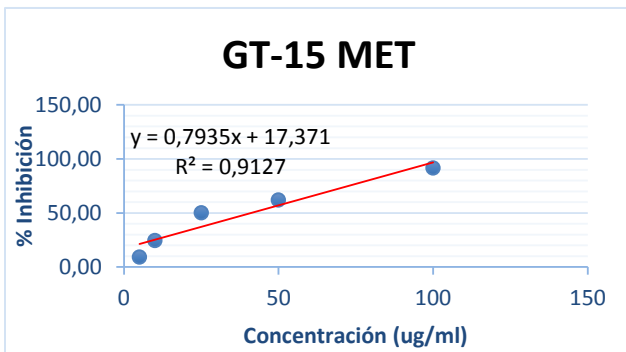
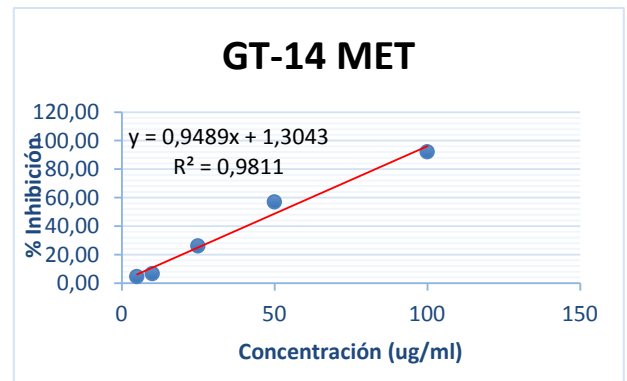
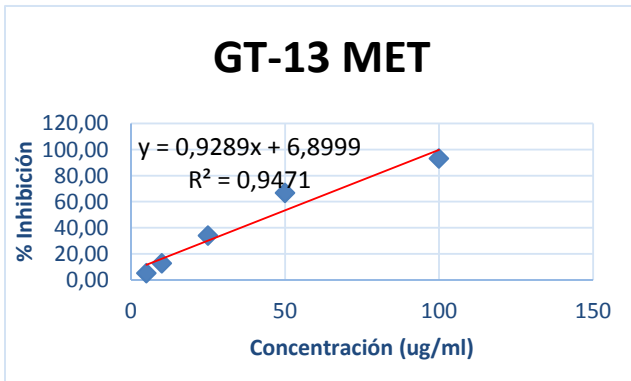
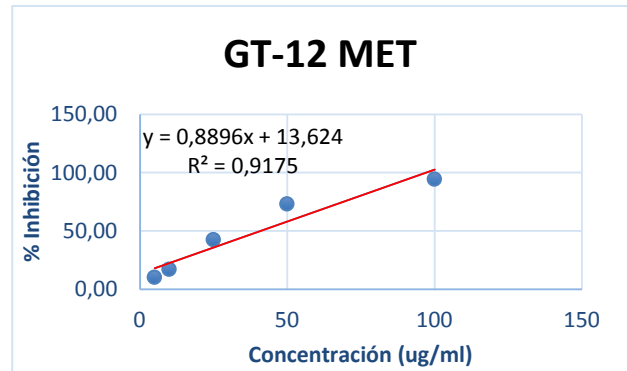
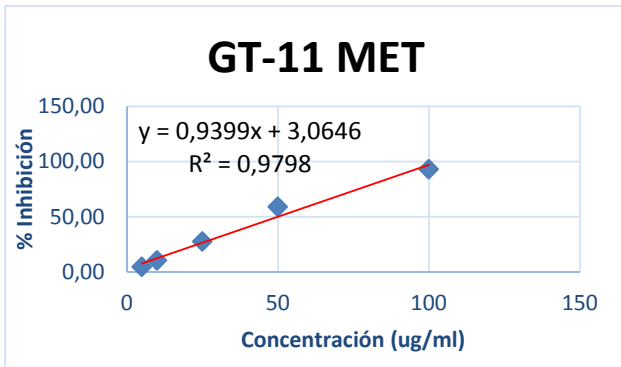
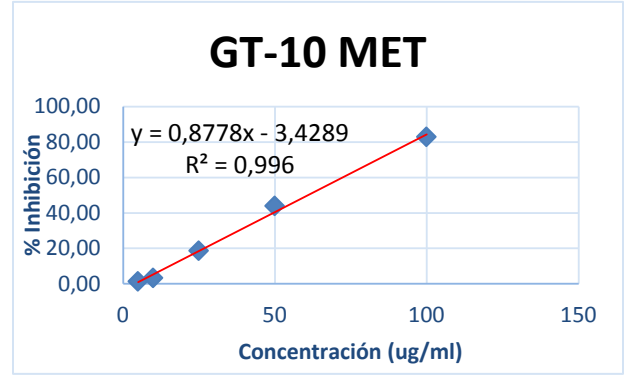
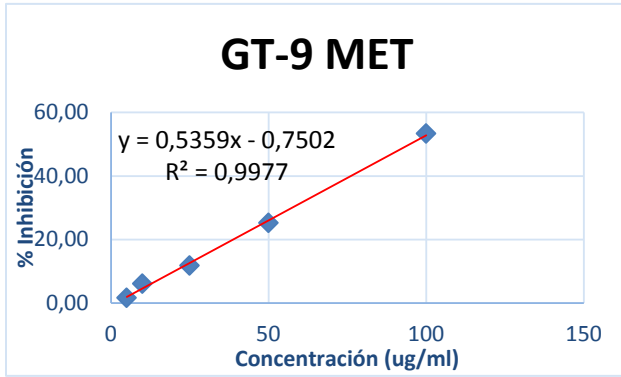
GT-6 MET

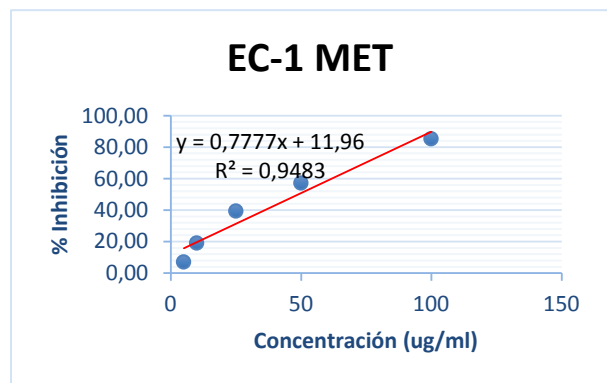
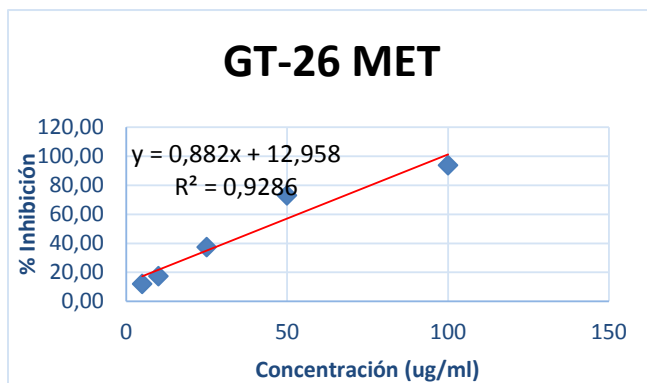
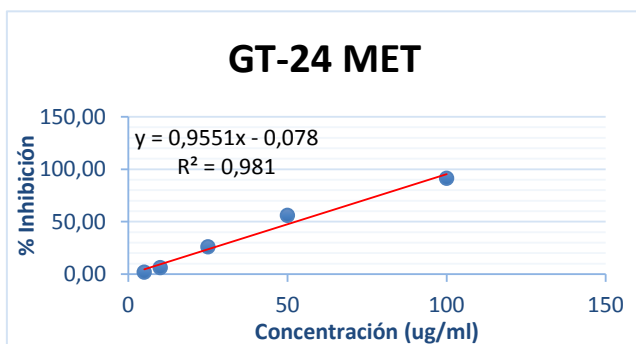
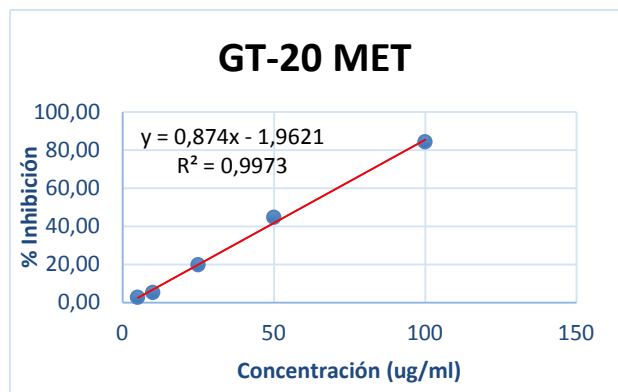
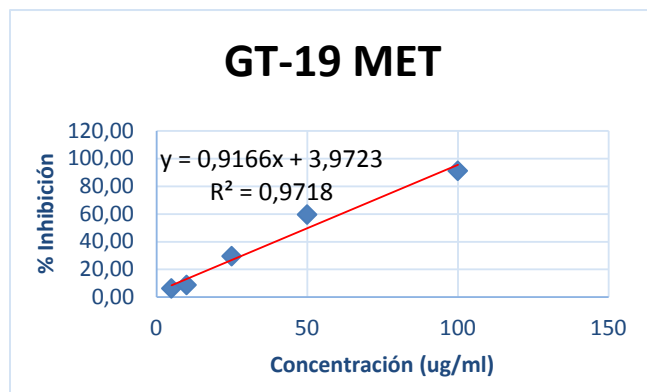
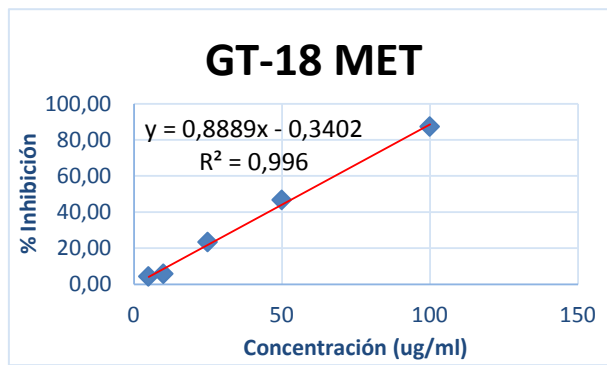
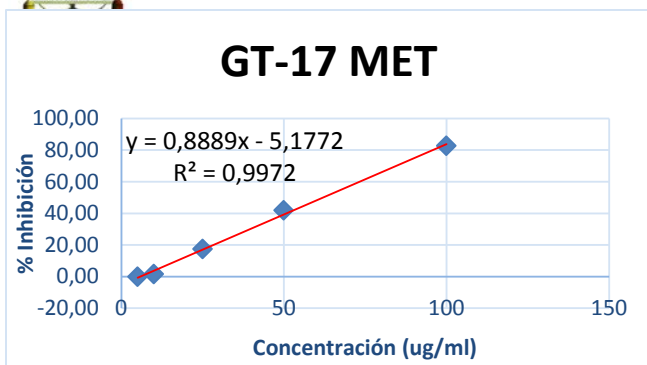


GT-5 MET

GT-7 MET







Anexo G. Resultados de los extractos metanólicos de *Jungia rugosa* Less y *Desmodium molliculum*- DPPH.

Resultados de los extractos en diclorometano de *Jungia rugosa* Less y *Desmodium molliculum*

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (TECNICA DPPH)
EXTRACTOS DICLOROMETANO

CODIGO: GT-4 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A_{CONTROL} (nm)	IC₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B_{clorofila} (nm)	0.001	0.006	0.022	0.043	0.088	0.128	0.341	118.45
Réplica 1 (nm)	0.358	0.350	0.341	0.325	0.290	0.260		
Réplica 2 (nm)	0.354	0.351	0.339	0.320	0.285	0.264		
Réplica 3 (nm)	0.355	0.352	0.341	0.323	0.289	0.262		
Media Abs	0.356	0.351	0.340	0.323	0.288	0.262		
D. Estándar	0.002	0.001	0.001	0.003	0.003	0.002		
% Coef. Variación	0.59	0.28	0.34	0.78	0.92	0.76		
% Inhibición	-4.62	-1.77	6.10	17.50	41.00	60.47		

CODIGO: GT-8 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A_{CONTROL} (nm)	IC₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B_{clorofila} (nm)	0.000	0.000	0.001	0.003	0.007	0.015	0.341	205.13
Réplica 1 (nm)	0.335	0.322	0.305	0.295	0.262	0.133		
Réplica 2 (nm)	0.336	0.319	0.303	0.294	0.261	0.132		
Réplica 3 (nm)	0.334	0.320	0.305	0.292	0.260	0.134		
Media Abs	0.335	0.320	0.304	0.294	0.261	0.133		
D. Estándar	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.001		
% Coef. Variación	0.30	0.48	0.38	0.52	0.38	0.75		
% Inhibición	1.18	5.51	10.52	14.26	25.07	65.19		



CODIGO: GT-9 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.000	0.000	0.001	0.007	0.019	0.027	0.341	196.96
Réplica 1 (nm)	0.340	0.328	0.320	0.309	0.270	0.147		
Réplica 2 (nm)	0.338	0.328	0.319	0.308	0.271	0.145		
Réplica 3 (nm)	0.339	0.328	0.314	0.307	0.273	0.146		
Media Abs	0.339	0.328	0.318	0.308	0.271	0.146		
D. Estándar	0.001	0.000	0.003	0.001	0.002	0.001		
% Coef. Variación	0.29	0.00	1.01	0.32	0.56	0.68		
% Inhibición	0.00	3.24	6.59	11.21	25.57	64.90		

CODIGO: GT-10 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.003	0.004	0.005	0.007	0.015	0.018	0.341	116.78
Réplica 1 (nm)	0.361	0.347	0.293	0.257	0.222	0.185		
Réplica 2 (nm)	0.360	0.346	0.295	0.259	0.224	0.185		
Réplica 3 (nm)	0.362	0.348	0.294	0.256	0.226	0.186		
Media Abs	0.361	0.347	0.294	0.257	0.224	0.185		
D. Estándar	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.001		
% Coef. Variación	0.28	0.29	0.34	0.59	0.89	0.31		
% Inhibición	-5.60	-1.18	14.75	26.16	38.35	50.64		

CODIGO: GT-11 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.013	0.017	0.024	0.033	0.058	0.068	0.339	168.20
Réplica 1 (nm)	0.353	0.348	0.345	0.330	0.298	0.269		
Réplica 2 (nm)	0.353	0.346	0.343	0.326	0.296	0.266		
Réplica 3 (nm)	0.354	0.347	0.342	0.328	0.297	0.265		
Media Abs	0.353	0.347	0.343	0.328	0.297	0.267		
D. Estándar	0.001	0.001	0.002	0.002	0.001	0.002		
% Coef. Variación	0.16	0.29	0.44	0.61	0.34	0.78		
% Inhibición	-0.39	2.65	5.80	12.98	29.50	41.40		

CODIGO: GT-12 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.010	0.011	0.015	0.025	0.039	0.070	0.339	167.45
Réplica 1 (nm)	0.362	0.355	0.343	0.306	0.287	0.232		
Réplica 2 (nm)	0.359	0.350	0.339	0.307	0.290	0.228		
Réplica 3 (nm)	0.357	0.353	0.341	0.299	0.289	0.231		
Media Abs	0.359	0.353	0.341	0.304	0.289	0.230		
D. Estándar	0.003	0.003	0.002	0.004	0.002	0.002		
% Coef. Variación	0.70	0.71	0.59	1.43	0.53	0.90		
% Inhibición	-3.05	-0.79	3.83	17.70	26.35	52.70		

CODIGO: GT-14 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	-0.001	0.000	0.003	0.007	0.019	0.029	0.341	340.15
Réplica 1 (nm)	0.354	0.357	0.355	0.339	0.322	0.288		
Réplica 2 (nm)	0.357	0.358	0.351	0.340	0.326	0.283		
Réplica 3 (nm)	0.357	0.358	0.353	0.346	0.324	0.285		
Media Abs	0.356	0.358	0.353	0.342	0.324	0.285		
D. Estándar	0.002	0.001	0.002	0.004	0.002	0.003		
% Coef. Variación	0.49	0.16	0.57	1.11	0.62	0.88		
% Inhibición	-5.31	-5.51	-3.24	1.28	10.03	24.39		

CODIGO: GT-16 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.004	0.005	0.016	0.026	0.048	0.071	0.339	74.59
Réplica 1 (nm)	0.427	0.422	0.407	0.342	0.321	0.301		
Réplica 2 (nm)	0.425	0.420	0.405	0.339	0.318	0.300		
Réplica 3 (nm)	0.426	0.421	0.403	0.340	0.321	0.298		
Media Abs	0.426	0.421	0.405	0.340	0.320	0.300		
D. Estándar	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002		
% Coef. Variación	0.23	0.24	0.49	0.45	0.54	0.51		
% Inhibición	-24.48	-22.71	-14.75	7.28	19.76	32.55		



CODIGO: GT-17 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.006	0.008	0.007	0.010	0.019	0.029	0.339	280.82
Réplica 1 (nm)	0.369	0.364	0.356	0.343	0.310	0.278		
Réplica 2 (nm)	0.366	0.363	0.353	0.342	0.314	0.275		
Réplica 3 (nm)	0.366	0.362	0.353	0.340	0.314	0.276		
Media Abs	0.367	0.363	0.354	0.342	0.313	0.276		
D. Estándar	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002		
% Coef. Variación	0.47	0.28	0.49	0.45	0.74	0.55		
% Inhibición	-6.49	-4.72	-2.36	2.16	13.37	27.04		

CODIGO: GT-18 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.002	0.006	0.007	0.010	0.019	0.029	0.339	269.77
Réplica 1 (nm)	0.370	0.364	0.356	0.343	0.310	0.298		
Réplica 2 (nm)	0.367	0.361	0.353	0.342	0.314	0.295		
Réplica 3 (nm)	0.371	0.361	0.353	0.340	0.314	0.296		
Media Abs	0.369	0.362	0.354	0.342	0.313	0.296		
D. Estándar	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002		
% Coef. Variación	0.56	0.48	0.49	0.45	0.74	0.52		
% Inhibición	-8.36	-5.01	-2.36	2.16	13.37	21.14		

CODIGO: GT-19 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.001	0.002	0.006	0.012	0.025	0.038	0.341	128.13
Réplica 1 (nm)	0.359	0.348	0.323	0.285	0.242	0.171		
Réplica 2 (nm)	0.358	0.348	0.324	0.287	0.244	0.173		
Réplica 3 (nm)	0.357	0.347	0.326	0.285	0.241	0.176		
Media Abs	0.358	0.348	0.324	0.286	0.242	0.173		
D. Estándar	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002	0.003		
% Coef. Variación	0.28	0.17	0.47	0.40	0.63	1.45		
% Inhibición	-5.31	-1.97	6.10	19.27	35.89	60.08		

CODIGO: GT-22 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.003	0.006	0.022	0.039	0.081	0.120	0.326	103.56
Réplica 1 (nm)	0.341	0.337	0.329	0.304	0.252	0.218		
Réplica 2 (nm)	0.340	0.337	0.328	0.301	0.246	0.216		
Réplica 3 (nm)	0.343	0.337	0.326	0.300	0.248	0.210		
Media Abs	0.341	0.337	0.328	0.302	0.249	0.215		
D. Estándar	0.002	0.000	0.002	0.002	0.003	0.004		
% Coef. Variación	0.45	0.00	0.47	0.69	1.23	1.94		
% Inhibición	-3.78	-1.53	6.24	19.43	48.57	70.96		

CODIGO: GT-23 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.004	0.007	0.017	0.028	0.056	0.081	0.339	114.10
Réplica 1 (nm)	0.355	0.345	0.330	0.301	0.251	0.212		
Réplica 2 (nm)	0.352	0.345	0.328	0.298	0.250	0.210		
Réplica 3 (nm)	0.351	0.348	0.328	0.300	0.248	0.208		
Media Abs	0.353	0.346	0.329	0.300	0.250	0.210		
D. Estándar	0.002	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002		
% Coef. Variación	0.59	0.50	0.35	0.51	0.61	0.95		
% Inhibición	-2.85	0.00	8.06	19.86	42.87	61.95		

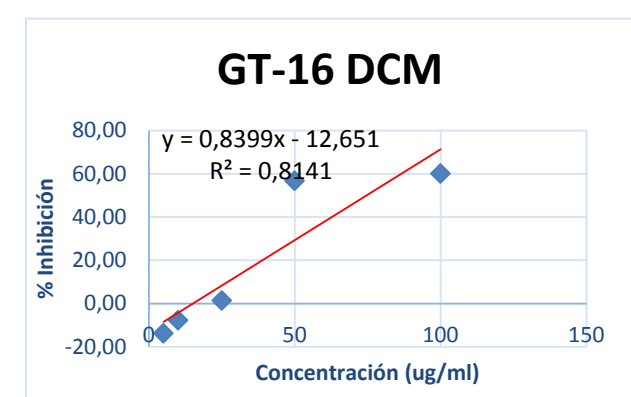
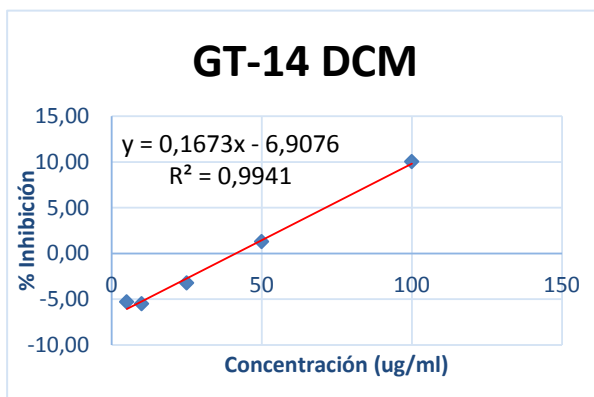
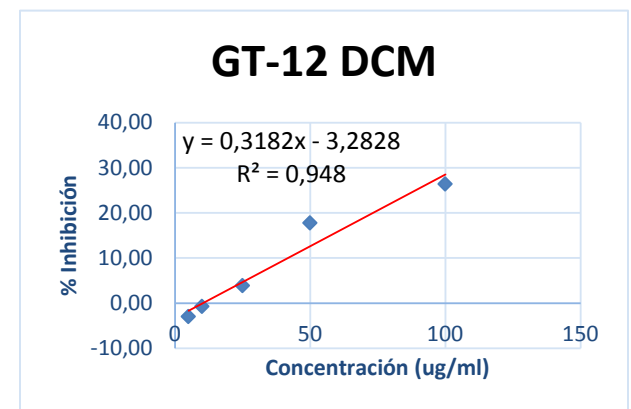
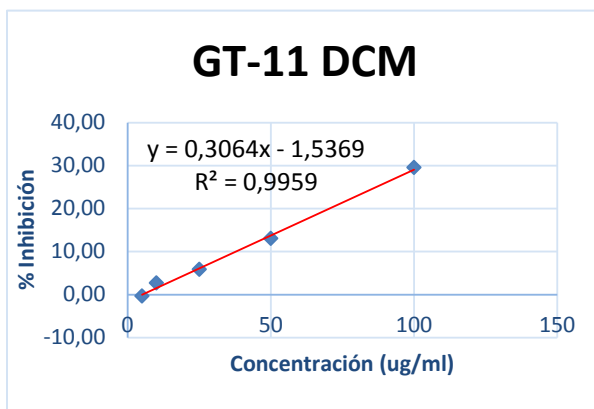
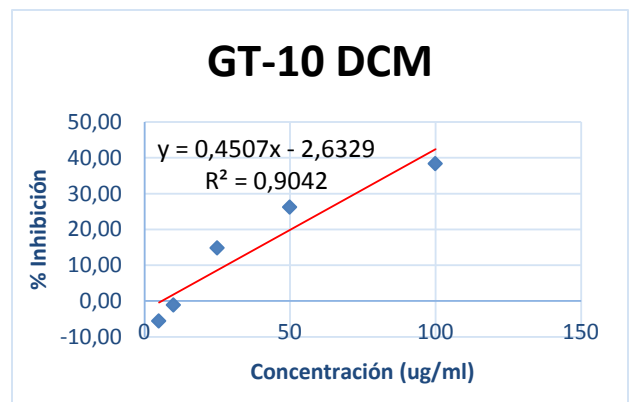
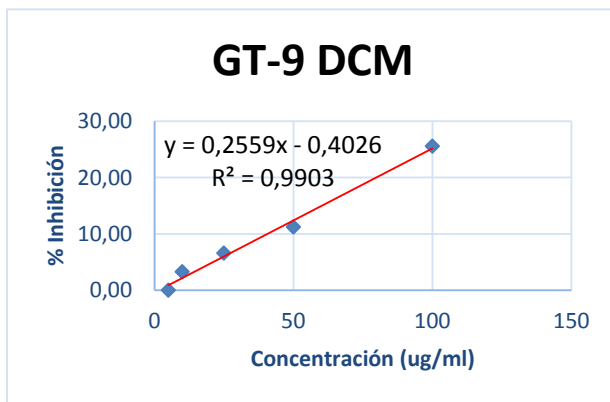
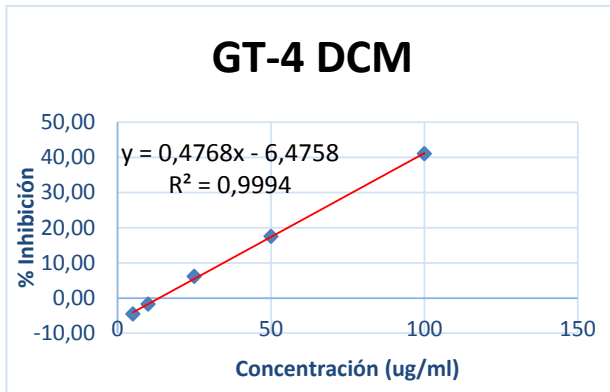
CODIGO: GT-25 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.005	0.006	0.017	0.038	0.083	0.122	0.341	89.55
Réplica 1 (nm)	0.360	0.349	0.324	0.290	0.232	0.198		
Réplica 2 (nm)	0.356	0.347	0.323	0.289	0.234	0.195		
Réplica 3 (nm)	0.357	0.347	0.321	0.288	0.230	0.195		
Media Abs	0.358	0.348	0.323	0.289	0.232	0.196		
D. Estándar	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002		
% Coef. Variación	0.58	0.33	0.47	0.35	0.86	0.88		
% Inhibición	-4.03	-0.79	9.83	25.96	56.05	78.17		

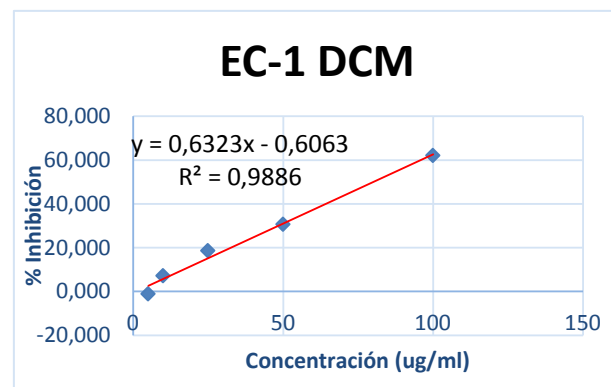
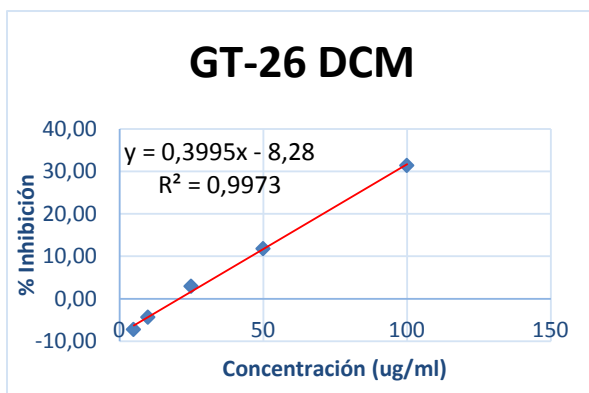
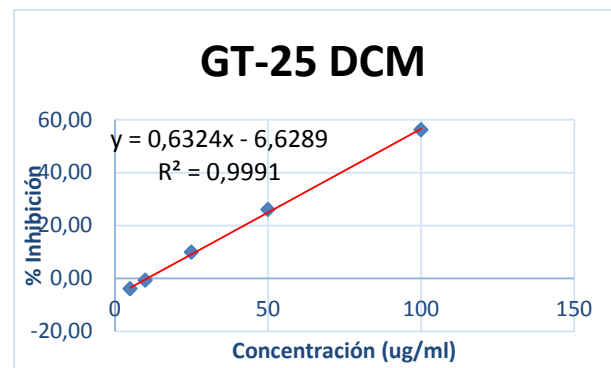
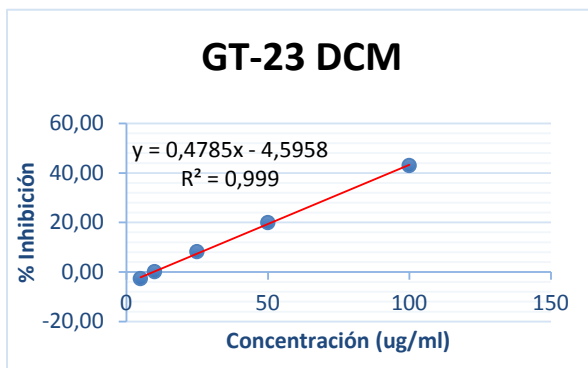
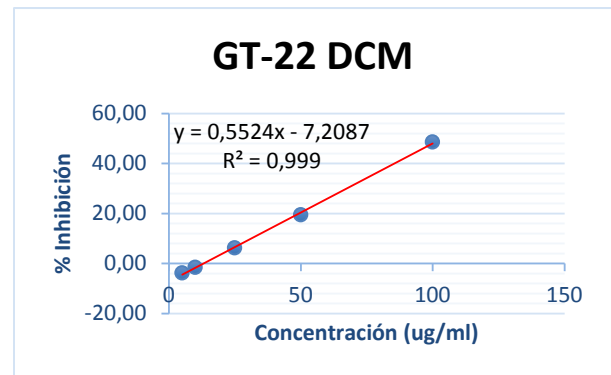
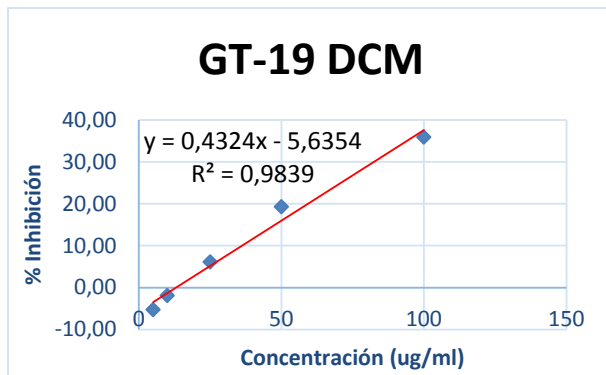
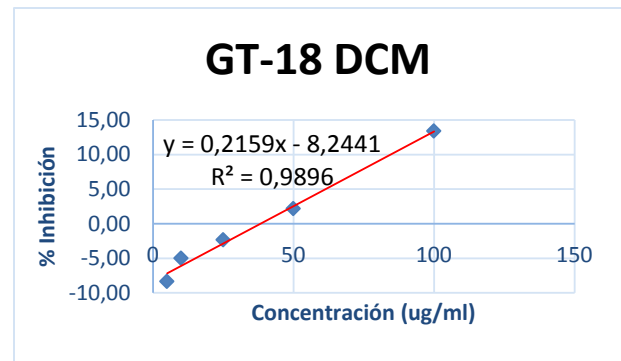
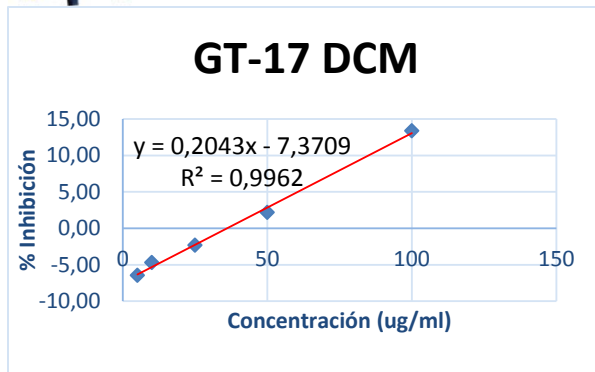
CODIGO: GT-26 DCM					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.005	0.011	0.022	0.039	0.080	0.108	0.339	145.88
Réplica 1 (nm)	0.370	0.366	0.352	0.339	0.315	0.299		
Réplica 2 (nm)	0.368	0.365	0.352	0.338	0.312	0.295		
Réplica 3 (nm)	0.368	0.363	0.349	0.337	0.311	0.293		
Media Abs	0.369	0.365	0.351	0.338	0.313	0.296		
D. Estándar	0.001	0.002	0.002	0.001	0.002	0.003		
% Coef. Variación	0.31	0.42	0.49	0.30	0.67	1.03		
% Inhibición	-7.28	-4.33	2.95	11.80	31.37	44.64		

CODIGO: EC-1 DCM (1)					PESO: 20 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A _{CONTROL} (nm)	IC ₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
B _{clorofila} (nm)	0.007	0.011	0.029	0.058	0.120	0.186	0.341	80.04
Réplica 1 (nm)	0.344	0.327	0.306	0.294	0.247	0.205		
Réplica 2 (nm)	0.359	0.326	0.304	0.294	0.250	0.208		
Réplica 3 (nm)	0.347	0.325	0.305	0.292	0.249	0.205		
Media Abs	0.350	0.326	0.305	0.293	0.249	0.206		
D. Estándar	0.008	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002		
% Coef. Variación	2.27	0.31	0.33	0.39	0.61	0.84		
% Inhibición	-1.180	7.080	18.584	30.580	62.045	94.100		



CODIGO: EC-1 DCM (2)					PESO: 20.7 mg			
PARTE DE LA PLANTA: Hojas								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	A_{CONTROL} (nm)	IC₅₀ (ug/ml)
Concentración (ug/ml)	5	10	25	50	100	150		
Concentración (ug/ml)	0.005	0.009	0.023	0.055	0.117	0.159	0.341	72.41
B_{clorofila} (nm)	0.337	0.307	0.302	0.265	0.223	0.196		
Réplica 1 (nm)	0.332	0.307	0.298	0.267	0.231	0.197		
Réplica 2 (nm)	0.341	0.302	0.296	0.268	0.234	0.194		
Réplica 3 (nm)	0.337	0.305	0.299	0.267	0.229	0.196		
Media Abs	0.005	0.003	0.003	0.002	0.006	0.002		
D. Estándar	1.34	0.95	1.02	0.57	2.48	0.78		
% Coef. Variación	2.163	12.586	18.682	37.561	66.863	89.184		





Anexo H. Resultados de los extractos en diclorometano de *Jungia rugosa* less y *Desmodium molliculum*-DPPH.

Resultados de los extractos de *Jungia rugosa* Less y *Desmodium molliculum*
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (Técnica de barrido del Peróxido de Hidrógeno)
EXTRACTOS METANÓLICOS

CODIGO: EC-1 MET (ENSAYO 1)			Peso: 20,3 mg			
			Parte de la planta: hojas			
Concentración (µg/ml)	25	50	100	150	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,379	0,763	1,509	2,264	0,056	0,332
Réplica 1 (nm)	0,417	0,791	1,525	2,276		
Réplica 2 (nm)	0,415	0,793	1,527	2,275		
Réplica 3 (nm)	0,416	0,795	1,529	2,277		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,038	0,028	0,016	0,012		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,036	0,03	0,018	0,011		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,037	0,032	0,02	0,013		
Media	0,037	0,030	0,018	0,012		
Des. Estándar	0,001	0,002	0,002	0,001		
CV%	2,7%	6,7%	11,1%	8,3%		
%Inhibición	34	46	68	79		
IC50	61,61					

CODIGO: EC-1 MET (ENSAYO 2)			Peso: 20 mg			
			Parte de la planta: hojas			
Concentración (µg/ml)	25	50	100	150	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,362	0,742	1,487	2,27	0,056	0,332
Réplica 1 (nm)	0,398	0,771	1,505	2,281		
Réplica 2 (nm)	0,397	0,773	1,506	2,286		
Réplica 3 (nm)	0,395	0,777	1,505	2,279		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,036	0,029	0,018	0,011		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,035	0,031	0,019	0,016		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,033	0,035	0,018	0,009		
Media	0,035	0,032	0,018	0,012		
Des. Estándar	0,002	0,003	0,001	0,004		
CV%	4,4	9,7	3,2	30		
%Inhibición	38	43	67	79		
IC50	61,3					

CODIGO: EC-1 MET (ENSAYO 3)					Peso: 20,6 mg	
Parte de la planta: hojas						
Concentración (µg/ml)	25	50	100	150	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,353	0,72	1,435	2,13	0,055	0,332
Réplica 1 (nm)	0,389	0,748	1,458	2,143		
Réplica 2 (nm)	0,39	0,749	1,457	2,145		
Réplica 3 (nm)	0,392	0,75	1,46	2,143		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,036	0,028	0,023	0,013		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,037	0,029	0,022	0,015		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,039	0,03	0,025	0,013		
Media	0,037	0,029	0,023	0,014		
Des. Estándar	0,002	0,001	0,002	0,001		
CV%	4,1%	3,4%	6,5%	8,4%		
%Inhibición	32	47	58	75		
IC50	61,98					

CODIGO: GT-1 MET					Peso: 23 mg		
Parte de la planta: hojas							
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,605	0,902	1,191	1,505	1,808	0,056	0,332
Réplica 1 (nm)	0,651	0,947	1,231	1,535	1,827		
Réplica 2 (nm)	0,652	0,944	1,227	1,539	1,830		
Réplica 3 (nm)	0,65	0,944	1,229	1,538	1,835		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,046	0,045	0,04	0,03	0,019		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,047	0,042	0,036	0,034	0,022		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,045	0,042	0,038	0,033	0,027		
Media	0,046	0,043	0,038	0,032	0,023		
Des. Estándar	0,001	0,002	0,002	0,002	0,004		
CV%	2,2	4	5,3	6,4	17,8		
%Inhibición	18	23	32	42	60		
IC50	273,21						

GT2-MET			Peso: 21.0 mg				A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas					
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250				
Lectura blanco patrón (nm)	1,127	1,733	2,32	2,897	0,057 0,332			
Réplica 1 (nm)	1,178	1,767	2,344	2,917				
Réplica 2 (nm)	1,177	1,768	2,345	2,922				
Réplica 3 (nm)	1,179	1,769	2,343	2,923				
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,051	0,024	0,024	0,02				
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,05	0,025	0,025	0,025				
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,052	0,026	0,023	0,026				
Media	0,051	0,025	0,024	0,024				
Des. Estándar	0,001	0,001	0,001	0,003				
CV%	1.9	2.9	4,2	13,1				
%Inhibición	11	39	58	58				
IC50	201.44							

GT-3 MET			Peso: 20 mg			A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas				
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300		
Lectura blanco patrón (nm)	0,673	1,024	1,369	1,715	2,062	0,062 0,33	
Réplica 1 (nm)	0,734	1,062	1,407	1,744	2,094		
Réplica 2 (nm)	0,736	1,069	1,407	1,751	2,095		
Réplica 3 (nm)	0,732	1,068	1,406	1,75	2,091		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,061	0,038	0,038	0,029	0,032		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,063	0,045	0,038	0,036	0,033		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,059	0,044	0,037	0,035	0,029		
Media	0,061	0,042	0,038	0,033	0,031		
Des. Estándar	0,002	0,004	0,001	0,004	0,002		
CV%	3,3	8,9	1,5	11,4	6,6		
%Inhibición	2	32	39	46	49		
IC50	274,18						

GT-4 MET			Peso: 20.5 mg					A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas						
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300				
Lectura blanco patrón (nm)	0,826	1,191	1,589	1,986	2,53	0,054	0,335		
Réplica 1 (nm)	0,861	1,233	1,617	2,007	2,537				
Réplica 2 (nm)	0,863	1,226	1,615	2,010	2,538				
Réplica 3 (nm)	0,868	1,217	1,619	2,009	2,539				
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,035	0,042	0,028	0,021	0,007				
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,037	0,035	0,026	0,024	0,008				
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,042	0,026	0,03	0,023	0,009				
Media	0,038	0,034	0,028	0,023	0,008				
Des. Estándar	0,003	0,005	0,002	0,001	0,001				
CV%	7	14,7	7,1	4,3	12,5				
%Inhibición	31	35	52	56	85				
IC50	192,72								

GT-5 MET			Peso: 20.7 mg					A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas						
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300				
Lectura blanco patrón (nm)	0,909	1,09	1,837	2,304	2,778	0,052	0,335		
Réplica 1 (nm)	0,953	1,126	1,869	2,339	2,795				
Réplica 2 (nm)	0,954	1,125	1,873	2,331	2,793				
Réplica 3 (nm)	0,947	1,127	1,872	2,331	2,801				
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,044	0,036	0,032	0,035	0,017				
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,045	0,035	0,036	0,027	0,015				
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,038	0,037	0,035	0,027	0,023				
Media	0,042	0,036	0,034	0,030	0,018				
Des. Estándar	0,004	0,001	0,002	0,005	0,004				
CV%	8,9	2,9	6	15,6	22,7				
%Inhibición	19	31	34	43	65				
IC50	256,41								

GT-6 MET			Peso: 20.9 mg			
			Parte de la planta: hojas			
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	1,049	1,581	2,069	2,586	0,056	0,335
Réplica 1 (nm)	1,096	1,629	2,103	2,615		
Réplica 2 (nm)	1,095	1,625	2,108	2,614		
Réplica 3 (nm)	1,1	1,624	2,095	2,617		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,047	0,048	0,034	0,029		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,046	0,044	0,039	0,028		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,051	0,043	0,026	0,031		
Media	0,048	0,045	0,033	0,029		
Des. Estándar	0,003	0,003	0,007	0,002		
CV%	5,5	5,9	19,9	5,2		
%Inhibición	14	20	41	48		
IC50	254,610951					

GT-7 MET			Peso: 21,7mg				
			Parte de la planta: hojas				
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300	A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	1,01	1,478	1,961	2,468	2,918	0,061	0,334
Réplica 1 (nm)	1,053	1,515	1,991	2,488	2,942		
Réplica 2 (nm)	1,057	1,511	1,987	2,489	2,938		
Réplica 3 (nm)	1,056	1,513	1,992	2,488	2,937		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,043	0,037	0,03	0,02	0,024		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,047	0,033	0,026	0,021	0,02		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,046	0,035	0,031	0,02	0,019		
Media	0,045	0,035	0,029	0,020	0,021		
Des. Estándar	0,002	0,002	0,003	0,001	0,003		
CV%	4,6	5,7	9,1	2,8	12,6		
%Inhibición	26	43	52	67	66		
IC50	197,06						

GT-8 MET			Peso: 20 mg					A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas						
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300				
Lectura blanco patrón (nm)	0,893	1,332	2,23	2,668	2,791	0,058	0,33		
Réplica 1 (nm)	0,945	1,372	2,262	2,696	2,819				
Réplica 2 (nm)	0,938	1,374	2,258	2,705	2,815				
Réplica 3 (nm)	0,932	1,386	2,269	2,697	2,817				
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,052	0,04	0,032	0,028	0,028				
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,045	0,042	0,028	0,037	0,024				
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,039	0,054	0,039	0,029	0,026				
Media	0,045	0,045	0,033	0,031	0,026				
Des. Estándar	0,007	0,008	0,006	0,005	0,002				
CV%	14,4	16,7	16,9	15,7	7,7				
%Inhibición	22	22	43	46	55				
IC50	266,11								

GT-9 MET			Peso: 21.5 mg					A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas						
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300				
Lectura blanco patrón (nm)	0,726	1,089	1,491	1,882	2,263	0,061	0,332		
Réplica 1 (nm)	0,776	1,139	1,535	1,919	2,284				
Réplica 2 (nm)	0,778	1,134	1,536	1,917	2,289				
Réplica 3 (nm)	0,779	1,137	1,535	1,918	2,288				
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,05	0,05	0,044	0,037	0,021				
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,052	0,045	0,045	0,035	0,026				
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,053	0,048	0,044	0,036	0,025				
Media	0,052	0,048	0,044	0,036	0,024				
Des. Estándar	0,002	0,003	0,001	0,001	0,003				
CV%	3	5,1	1,3	2,8	11				
%Inhibición	15	22	27	41	61				
IC50	276,33								

GT-10 MET			Peso: 21.7 mg				A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas					
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250				
Lectura blanco patrón (nm)	1,052	1,51	2,032	2,534	0,055	0,332		
Réplica 1 (nm)	1,095	1,542	2,06	2,561				
Réplica 2 (nm)	1,091	1,544	2,062	2,563				
Réplica 3 (nm)	1,094	1,544	2,061	2,56				
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,043	0,032	0,028	0,027				
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,039	0,034	0,03	0,029				
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,042	0,034	0,029	0,026				
Media	0,041	0,033	0,029	0,027				
Des. Estándar	0,002	0,001	0,001	0,002				
CV%	5,0	3,5	3,5	5,6				
%Inhibición	25	39	47	50				
IC50	231,63							

GT-11 MET			Peso: 20.3 mg			A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas				
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300		
Lectura blanco patrón (nm)	0,714	1,062	1,453	1,833	2,067	0,056	0,33
Réplica 1 (nm)	0,765	1,099	1,478	1,854	2,087		
Réplica 2 (nm)	0,761	1,1	1,477	1,853	2,084		
Réplica 3 (nm)	0,76	1,101	1,474	1,853	2,093		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,051	0,037	0,025	0,021	0,02		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,047	0,038	0,024	0,02	0,017		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,046	0,039	0,021	0,02	0,026		
Media	0,048	0,038	0,023	0,020	0,021		
Des. Estándar	0,003	0,001	0,002	0,001	0,005		
CV%	5,5	2,6	8,9	2,8	21,8		
%Inhibición	14	32	58	64	63		
IC50	214,84						

CÓDIGO:GT-12 MET			Peso: 20.4			
			Parte de la planta: hojas			
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	1,174	1,77	2,366	2,948	0,057	0,333
Réplica 1 (nm)	1,218	1,803	2,393	2,976		
Réplica 2 (nm)	1,212	1,807	2,405	2,979		
Réplica 3 (nm)	1,21	1,803	2,399	2,973		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,044	0,033	0,027	0,028		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,038	0,037	0,039	0,031		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,036	0,033	0,033	0,025		
Media	0,039	0,034	0,033	0,028		
Des. Estándar	0,004	0,002	0,006	0,003		
CV%	10,6	6,7	18,2	10,7		
%Inhibición	31	40	42	51		
IC50	248,113					

CÓDIGO: GT-13 MET			Peso: 20.4 mg				
			Parte de la planta: hojas				
Lectura blanco patrón (nm) Réplica 1 (nm)	100	150	200	250	300	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Réplica 2 (nm)	0,893	1,332	1,791	2,23	2,668	0,058	0,333
Réplica 3 (nm)	0,946	1,372	1,83	2,266	2,692		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,938	1,374	1,829	2,261	2,695		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,932	1,374	1,824	2,262	2,691		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,053	0,04	0,039	0,036	0,024		
Media	0,045	0,042	0,038	0,031	0,027		
Des. Estándar	0,039	0,042	0,033	0,032	0,023		
CV%	0,046	0,041	0,037	0,033	0,025		
%Inhibición	0,007	0,001	0,003	0,003	0,002		
IC50	15,4	2,8	8,8	8	8,4		
%Inhibición	21	29	37	43	57		
IC50 (µg/ml)	272,13						

CÓDIGO: GT-14 MET			Peso: 21.1 mg					A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas						
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300				
Lectura blanco patrón (nm)	0,923	1,403	1,884	2,369	2,822	0,05	0,335		
Réplica 1 (nm)	0,963	1,434	1,911	2,399	2,845				
Réplica 2 (nm)	0,967	1,439	1,915	2,392	2,842				
Réplica 3 (nm)	0,963	1,431	1,916	2,395	2,848				
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,04	0,031	0,027	0,03	0,023				
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,044	0,036	0,031	0,023	0,02				
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,04	0,028	0,032	0,026	0,026				
Media	0,041	0,032	0,030	0,026	0,023				
Des. Estándar	0,002	0,004	0,003	0,004	0,003				
CV%	5,6	12,8	8,8	13,3	13				
%Inhibición	17	37	40	47	54				
IC50	264,60								

CÓDIGO:GT-15 MET			Peso: 20 mg					A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
			Parte de la planta: hojas						
Lectura blanco patrón (nm) Réplica 1 (nm)	100	150	200	250					
Réplica 2 (nm)	1,163	1,738	2,325	2,907	0,058	0,332			
Réplica 3 (nm)	1,206	1,768	2,352	2,923					
Réplica corregida 1 (R1-BP)	1,204	1,763	2,354	2,922					
Réplica corregida 2 (R2-BP)	1,205	1,774	2,355	2,925					
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,043	0,03	0,027	0,016					
Media	0,041	0,025	0,029	0,015					
Des. Estándar	0,042	0,036	0,03	0,018					
CV%	0,042	0,030	0,029	0,016					
%Inhibición	0,001	0,006	0,002	0,002					
IC50	2,4	18,2	5,3	9,4					
%Inhibición	28	48	51	72					
IC50 (µg/ml)	177,10								

CÓDIGO:GT-16 MET			Peso: 20 mg			
			Parte de la planta: hojas			
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	1,053	1,574	2,112	2,638	0,056	0,334
Réplica 1 (nm)	1,096	1,614	2,148	2,666		
Réplica 2 (nm)	1,096	1,615	2,143	2,664		
Réplica 3 (nm)	1,097	1,614	2,149	2,665		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,043	0,04	0,036	0,028		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,043	0,041	0,031	0,026		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,044	0,04	0,037	0,027		
Media	0,043	0,040	0,035	0,027		
Des. Estándar	0,001	0,001	0,003	0,001		
CV%	1,3	1,4	9,3	3,7		
%Inhibición	23	28	38	52		
IC50	251,27					

CÓDIGO: GT-17 MET			Peso: 20.1 mg			
			Parte de la planta: hojas			
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	1,156	1,673	2,241	2,798	0,057	0,334
Réplica 1 (nm)	1,203	1,709	2,274	2,829		
Réplica 2 (nm)	1,204	1,707	2,275	2,828		
Réplica 3 (nm)	1,205	1,708	2,269	2,827		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,047	0,036	0,033	0,031		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,048	0,034	0,034	0,03		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,049	0,035	0,028	0,029		
Media	0,048	0,035	0,032	0,030		
Des. Estándar	0,001	0,001	0,003	0,001		
CV%	2,1	2,9	10,2	3,3		
%Inhibición	16	39	44	47		
IC50	241,82					

CÓDIGO: GT-18 MET			Peso: 20 mg			
			Parte de la planta: hojas			
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	1,049	1,599	2,097	2,62	0,057	0,335
Réplica 1 (nm)	1,104	1,634	2,124	2,645		
Réplica 2 (nm)	1,094	1,643	2,137	2,647		
Réplica 3 (nm)	1,099	1,652	2,135	2,649		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,055	0,035	0,017	0,025		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,045	0,044	0,05	0,027		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,05	0,053	0,038	0,029		
Media	0,050	0,044	0,035	0,027		
Des. Estándar	0,005	0,009	0,007	0,002		
CV%	10	20,5	20	7,4		
%Inhibición	12	23	39	53		
IC50	242,29					

CÓDIGO: GT-19 MET			Peso: 20.6 mg				
			Parte de la planta: hojas				
Concentración (ug/ml)	100	150	200	250	300	A control (nm)	A H ₂ O ₂ 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,815	1,241	1,665	2,11	2,532	0,063	0,332
Réplica 1 (nm)	0,858	1,279	1,698	2,145	2,564		
Réplica 2 (nm)	0,862	1,285	1,705	2,149	2,566		
Réplica 3 (nm)	0,863	1,28	1,71	2,149	2,568		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,043	0,038	0,033	0,035	0,032		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,047	0,044	0,04	0,039	0,034		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,048	0,039	0,045	0,039	0,036		
Media	0,046	0,040	0,039	0,038	0,034		
Des. Estándar	0,003	0,003	0,006	0,002	0,002		
CV%	5,8	7,9	15,3	6,1	5,9		
%Inhibición	27	36	38	40	46		
IC50	349,20						

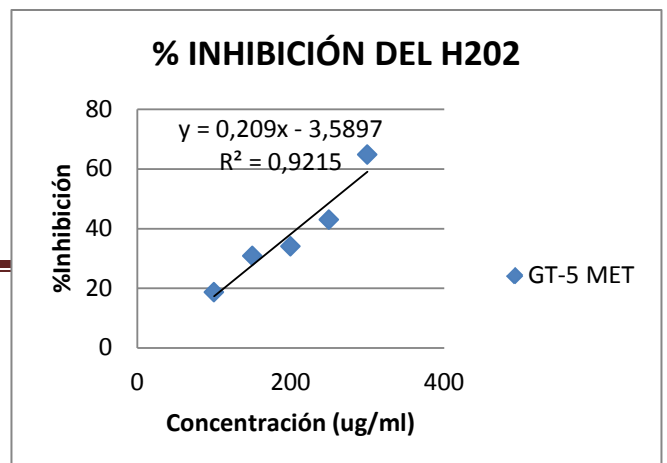
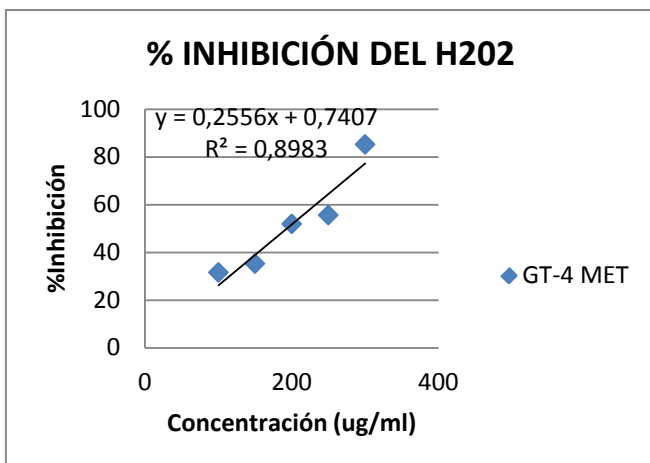
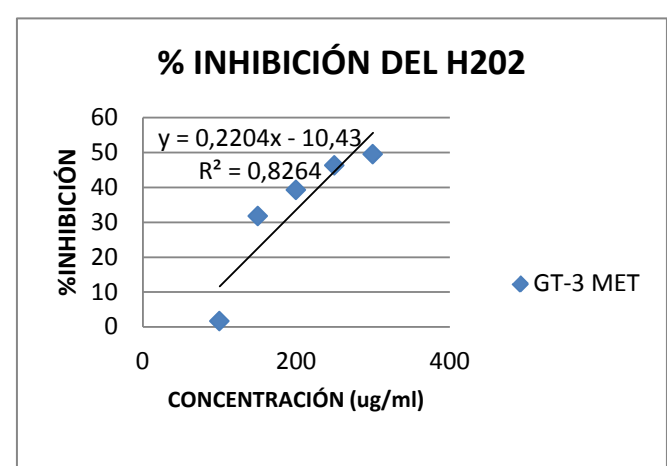
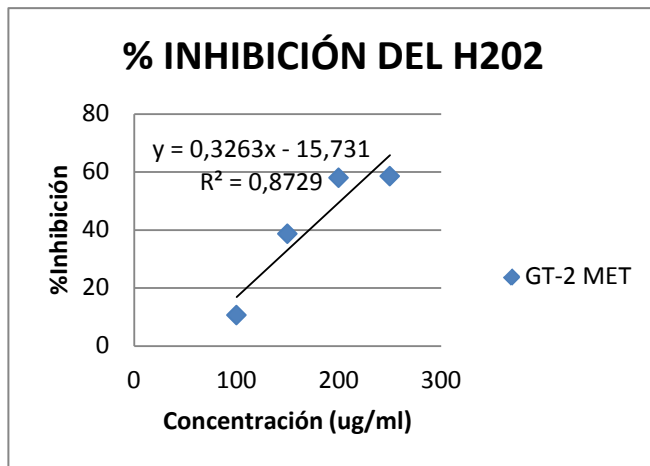
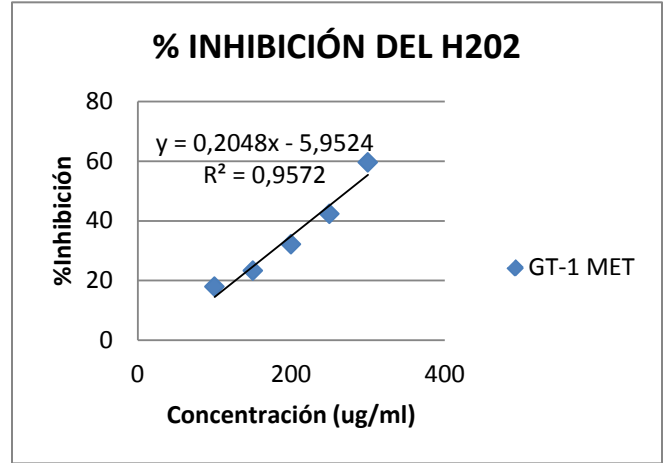
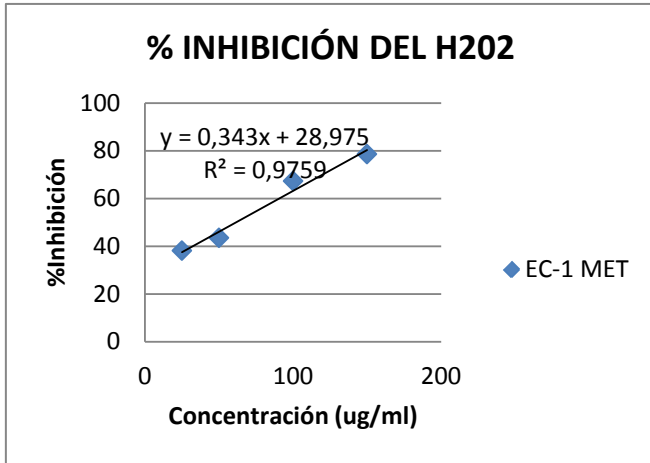


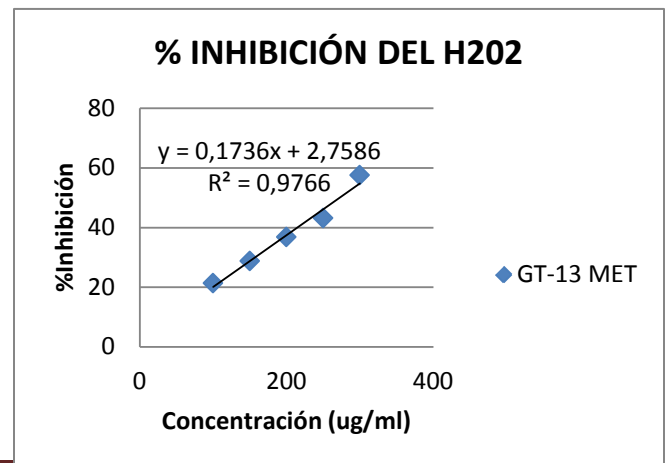
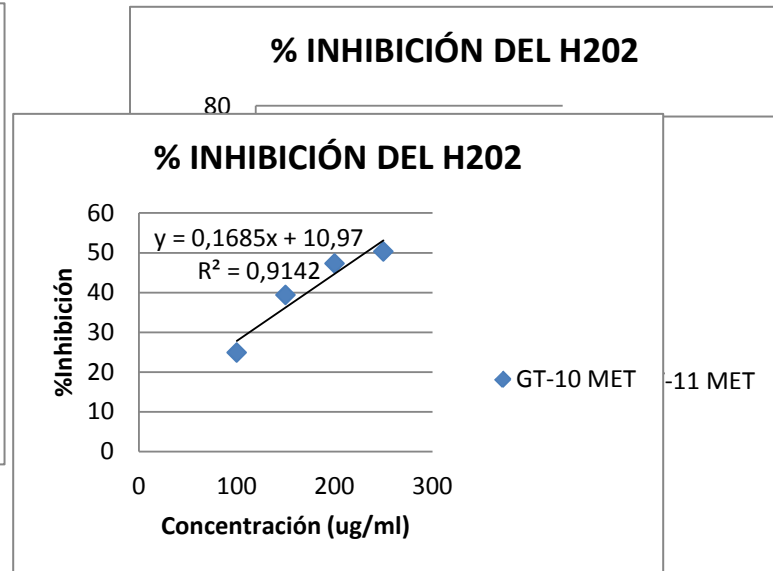
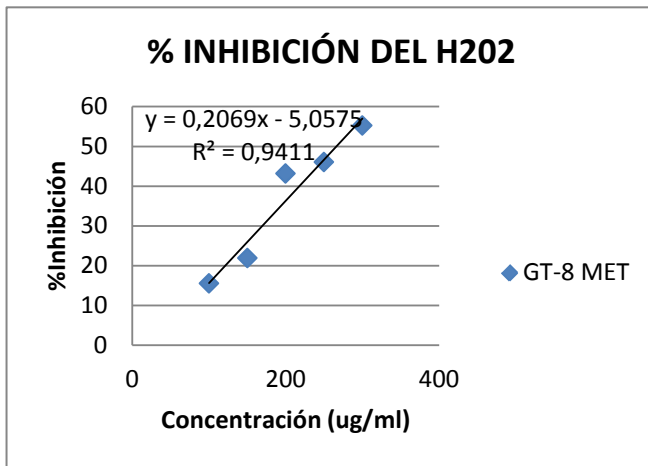
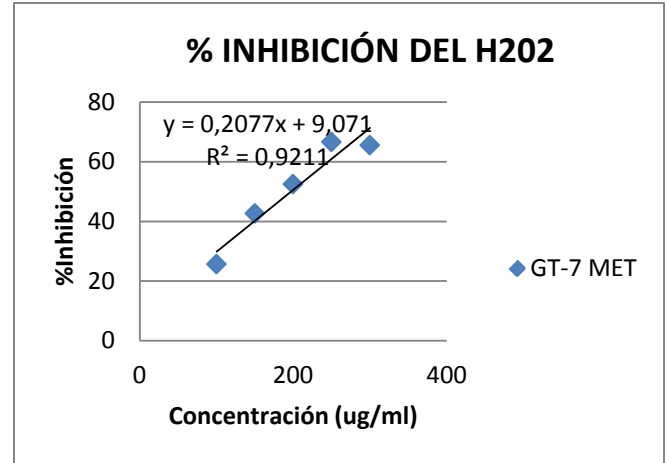
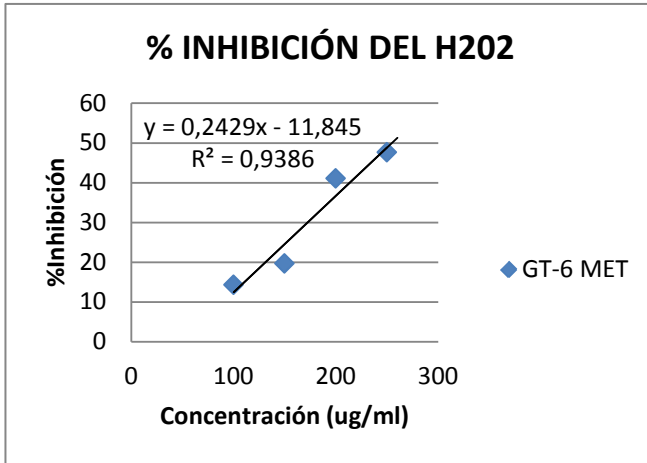
CÓDIGO: GT-20 MET				Peso: 20.5 mg		
Parte de la planta: hojas						
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	1,156	1,673	2,241	2,798	0,057	0,334
Réplica 1 (nm)	1,204	1,716	2,274	2,821		
Réplica 2 (nm)	1,204	1,719	2,275	2,822		
Réplica 3 (nm)	1,203	1,715	2,269	2,823		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,048	0,043	0,033	0,023		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,048	0,046	0,034	0,024		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,047	0,042	0,028	0,025		
Media	0,048	0,044	0,032	0,024		
Des. Estándar	0,001	0,002	0,003	0,001		
CV%	1,2	4,8	10,2	4,2		
%Inhibición	16	23	44	58		
IC50	224,72					

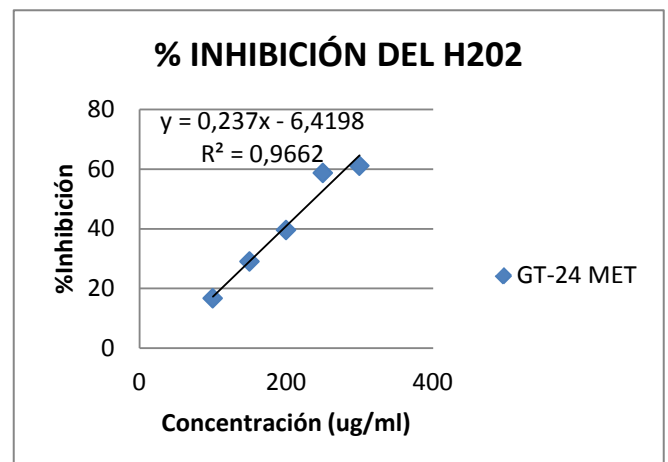
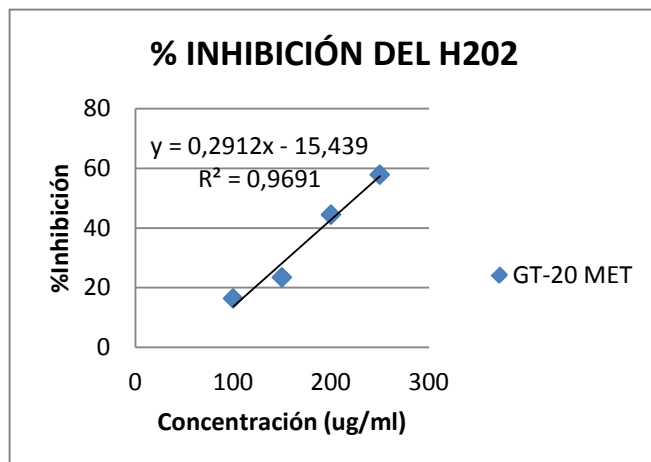
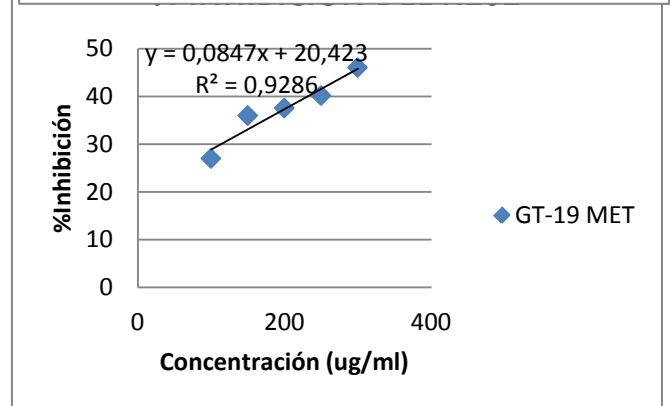
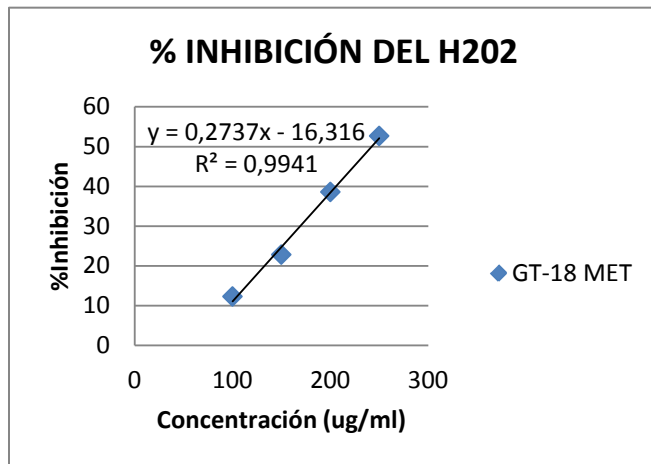
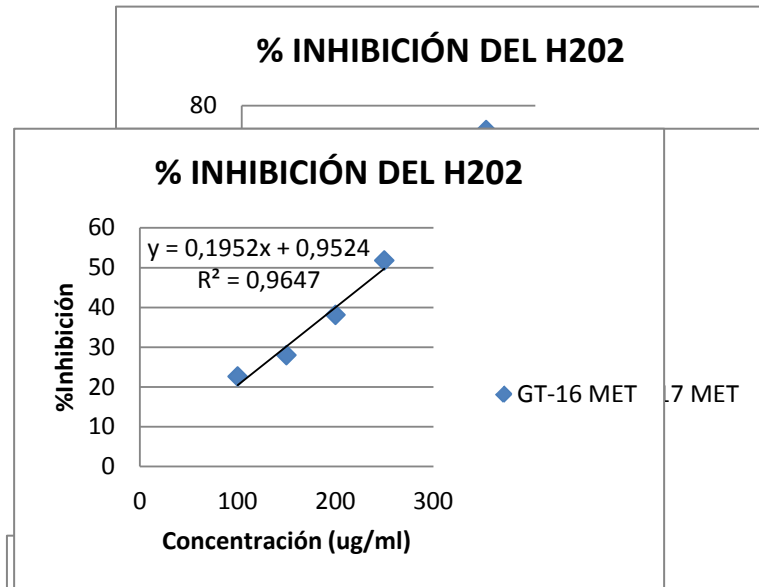
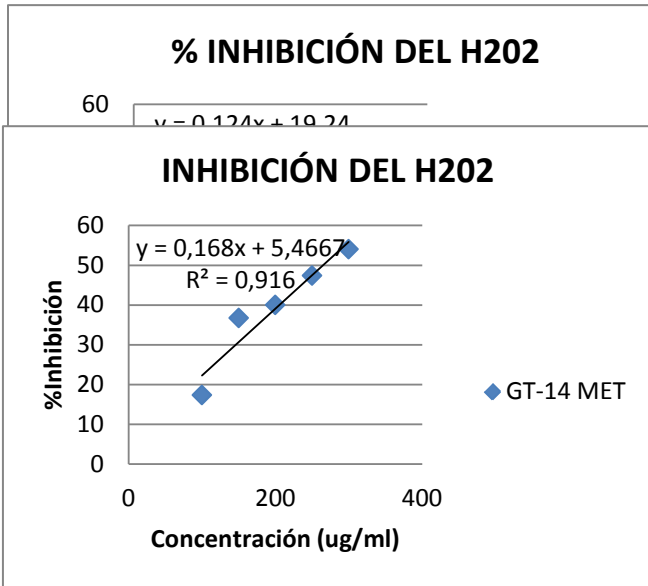
CÓDIGO: GT-24 MET				Peso: 20.6 mg			
Parte de la planta: Hojas							
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300	A control (nm)	A H2O2 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,191	0,286	0,384	0,485	0,583	0,054	0,33
Réplica 1 (nm)	0,237	0,325	0,416	0,51	0,607		
Réplica 2 (nm)	0,235	0,323	0,416	0,505	0,605		
Réplica 3 (nm)	0,236	0,325	0,418	0,507	0,6		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,046	0,039	0,032	0,025	0,024		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,044	0,037	0,032	0,02	0,022		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,045	0,039	0,034	0,022	0,017		
Media	0,045	0,038	0,033	0,022	0,021		
Des. Estándar	0,001	0,001	0,001	0,003	0,004		
CV%	2,2	3	3,5	11,3	17,2		
%Inhibición	17	29	40	59	61		
IC50	238,06						

CÓDIGO: GT-25 MET			Peso: 20.4 mg				
			Parte de la planta: hojas				
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300	A control (nm)	A H₂O₂ 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,84	1,261	1,652	2,992	2,512	0,057	0,334
Réplica 1 (nm)	0,776	1,139	1,535	1,919	2,284		
Réplica 2 (nm)	0,778	1,134	1,536	1,917	2,289		
Réplica 3 (nm)	0,779	1,137	1,535	1,918	2,288		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,05	0,05	0,044	0,037	0,021		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,052	0,045	0,045	0,035	0,026		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,053	0,048	0,044	0,036	0,025		
Media	0,052	0,048	0,044	0,036	0,024		
Des. Estándar	0,002	0,003	0,001	0,001	0,003		
CV%	3	5,3	1,3	2,8	11		
%Inhibición	9	16	22	37	58		
IC50	291,28						

CÓDIGO: GT-26 MET			Peso: 19.4 mg				
			Parte de la planta: Hojas				
Concentración (µg/ml)	100	150	200	250	300	A control (nm)	A H₂O₂ 4Mm (nm)
Lectura blanco patrón (nm)	0,91	1,377	1,825	2,275	2,729	0,06	0,335
Réplica 1 (nm)	0,961	1,42	1,868	2,317	2,753		
Réplica 2 (nm)	0,96	1,414	1,86	2,301	2,753		
Réplica 3 (nm)	0,952	1,43	1,865	2,315	2,757		
Réplica corregida 1 (R1-BP)	0,051	0,043	0,043	0,042	0,024		
Réplica corregida 2 (R2-BP)	0,05	0,037	0,035	0,026	0,024		
Réplica corregida 3 (R3-BP)	0,042	0,053	0,04	0,04	0,028		
Media	0,048	0,007	0,003	0,007	0,002		
Des. Estándar	0,004	0,736	0,976	1,216	1,459		
CV%	8.5	14.9	8.4	19.8	7.5		
%Inhibición	21	26	34	40	58		
IC50	280,45						







Anexo I. Resultados de los extractos metanólicos de *Jungia rugosa* Less y *Desmodium molliculum*- Peróxidos.

