

# UCUENCA

**Universidad de Cuenca**

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Actividad antioxidante del extracto metanólico y de las fracciones de  
*Desmodium molliculum* obtenidas por el método de partición líquido-líquido**

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


**Autores:**

Paola Michelle Pizarro Rosas

Jessica Marlene Tigre Palomino

**Director:**

Eugenia Peñaherrera Wilches

ORCID:  0000-0002-9042-5058

**Cuenca, Ecuador**

**2023-10-24**

## Resumen

En Ecuador, *Desmodium molliculum*, es conocida como “hierba del infante”, destaca por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

La literatura reporta que los compuestos fenólicos (flavonoides) son los componentes principales de la especie por ende es de interés debido a su actividad biológica, entre ellas la capacidad antioxidante mencionada, que podría retrasar o inhibir el daño celular protegiendo a las mismas. En el presente trabajo de investigación se evaluó la actividad antioxidante del extracto metanólico y de las fracciones obtenidas por el método partición líquido-líquido. La evaluación de la actividad antioxidante se realizó mediante las técnicas: DPPH, FRAP y ABTS, y el contenido de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu.

La capacidad antioxidante resultado de la aplicación de las técnicas de DPPH y FRAP fueron más altas para la fracción desengrasada con hexano con valores de  $234,72 \pm 5,11$  mg Trolox/g extracto seco y  $348,19 \pm 5,42$  mg Trolox/g extracto seco respectivamente, mientras que para ABTS fue la fracción clorofórmica con un valor de  $226,07 \pm 3,91$  mg Trolox/g extracto seco. El contenido de polifenoles totales fue de 146,7 mg AG/g extracto (extracto crudo), 195,07 mg AG/g extracto (fracción desengrasada), 188,22 mg AG/g extracto (fracción clorofórmica), 181,70 mg AG/g extracto (fracción acuosa), 112,18 mg AG/g extracto (fracción libre de taninos) y 108,58 mg AG/g extracto (fracción con taninos) con un valor de  $p=2,1391E-09$ . De estos resultados se concluye que el contenido de polifenoles totales es mayor en la fracción desengrasada existiendo una correlación del mismo con la capacidad antioxidante.

*Palabras clave:* Desmodium molliculum, flavonoides, extracto metanólico, antioxidante



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

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

### Abstract

In Ecuador, *Desmodium molliculum* is known as “infant herb” and stands out for its antioxidant and anti-inflammatory properties.

The literature reports that phenolic compounds (flavonoids) are the main components of the species, therefore it is of interest due to its biological activity, including the afore mentioned antioxidant capacity, which could delay or inhibit cell damage, protecting them. In the present research work, the antioxidant activity of the methanolic extract and the fractions obtained by the liquid-liquid partition method were evaluated. The evaluation of antioxidant activity was carried out using the techniques: DPPH, FRAP and ABTS, and the content of total polyphenols by the Folin Ciocalteu method.

The antioxidant capacity resulting from the application of the DPPH and FRAP techniques were higher for the fraction defatted with hexane with values of  $234.72 \pm 5.11$  mg Trolox/g dry extract and  $348.19 \pm 5.42$  mg Trolox/ g dry extract respectively, while for ABTS it was the chloroform fraction with a value of  $226.07 \pm 3.91$  mg Trolox/g dry extract. The content of total polyphenols was 146.7 mg AG/g extract (crude extract), 195.07 mg AG/g extract (defatted fraction), 188.22 mg AG/g extract (chloroform fraction), 181.70 mg AG/g extract (aqueous fraction), 112.18 mg AG/g extract (tannin-free fraction) and 108.58 mg AG/g extract (fraction with tannins) with a value of  $p=2.1391E-09$ . From these results it is concluded that the content of total polyphenols is higher in the defatted fraction and there is a correlation between it and the antioxidant capacity.

Keywords: *Desmodium molliculum*, flavonoids, methanolic extract, antioxidant



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

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

## Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	3
DEDICATORIA .....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	13
Objetivos General.....	13
Objetivos Específicos.....	13
CAPÍTULO I.....	14
MARCO TEÓRICO .....	14
1.1 GENERALIDADES DE LAS PLANTAS MEDICINALES .....	14
1.1.1 Descripción de <i>Desmodium molliculum</i> .....	14
1.1.2 Metabolismo de las plantas .....	15
1.1.2.1 Clasificación de los metabolitos secundarios .....	16
1. Terpenoides .....	16
2. Compuestos fenólicos .....	16
3. Alcaloides.....	17
1.1.2.2. Metabolitos secundarios del género <i>Desmodium</i> .....	17
1.2 OXIDACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO .....	17
1.3 ANTIOXIDANTES.....	19
1.3.1 Sistemas antioxidantes .....	19
1.3.2 Terapia antioxidante .....	20
1.3.3 Las plantas como fuente de antioxidantes .....	20
1.4 PROCESAMIENTO DE LAS PLANTAS PARA SU ESTUDIO.....	21
1.4.1 Procesos de extracción .....	21
1.4.2 Extracción de compuestos fitoquímicos por partición líquido- líquido.....	23
1.4.3 Análisis de los compuestos fitoquímicos y su actividad farmacológica .....	24
1.4.4 Actividad farmacológica.....	24

1.4.4.1 Ensayos basados en la transferencia de un solo electrón.....	25
1.4.4.2 Ensayos mixtos (HAT/SET) .....	26
CAPÍTULO II.....	27
MATERIALES y MÉTODOS .....	27
2.1 MATERIALES.....	27
2.1.1 Reactivos .....	27
2.1.3. Equipos .....	27
2.2 MÉTODOS.....	28
2.2.1 RECOLECCIÓN, SELECCIÓN, LAVADO Y SECADO DE LA PLANTA. ....	28
2.2.1.1 Recolección.....	28
2.2.1.2 Selección, lavado y secado al ambiente .....	28
2.2.1.3 Secado .....	28
2.2.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO .....	29
2.2.2.1 Humectación .....	29
2.2.2.2 Maceración.....	29
2.2.2.3 Maceración asistida.....	29
2.2.2.4 Eliminación del solvente.....	30
2.2.2.5 Secado con flujo de nitrógeno .....	30
2.2.2.6 Liofilización .....	31
2.2.3 PARTICIÓN LÍQUIDO-LIQUIDO DEL EXTRACTO METANÓLICO CRUDO	
31	
2.2.4 CROMATOGRAFÍA POR CAPA FINA (TLC) .....	32
2.2.4.1 Identificación de flavonoides.....	32
2.2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES .....	33
2.2.5.1 Determinación de la actividad antioxidante .....	33
2.2.5.1.1 Determinación de la capacidad antioxidante método DPPH .....	33
2.2.5.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante método FRAP .....	33
2.2.5.1.3 Determinación de la capacidad antioxidante método ABTS.....	34

2.2.5.2	Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu ...	34
2.2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	35
CAPÍTULO III .....		36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		36
3.2.	Cromatografía en capa fina (TLC) .....	36
3.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES ....		38
3.3.1	Evaluación de la actividad antioxidante .....	38
3.3.2	Polifenoles totales .....	41
3.1.6	Análisis estadístico TUKEY del extracto crudo y las fracciones de <i>Desmodium molliculum</i> .....	43
CAPÍTULO IV .....		45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		45
4.1	CONCLUSIONES .....	45
4.2	RECOMENDACIONES .....	46
REFERENCIAS .....		47
Anexos .....		53

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> <i>Desmodium molliculum</i> procedente de Barabón (Azuay) .....	15
<b>Figura 2</b> Proceso de secado de la especie <i>Desmodium molliculum</i> .....	29
<b>Figura 3</b> Recolección de la filtración.....	30
<b>Figura 4</b> Maceración asistida.....	30
<b>Figura 5</b> Secado con flujo de nitrógeno del extracto.....	31
<b>Figura 6</b> Resultado de placa TLC en UV- visible para Flavonoides .....	36
<b>Figura 7</b> Curva de calibración con ácido gálico por el método de polifenoles totales.....	53
<b>Figura 8</b> Curva de calibración con TROLOX por el método de DPPH.....	54
<b>Figura 9</b> Curva de calibración con TROLOX por la técnica ABTS .....	55
<b>Figura 10</b> Curva de calibración con TROLOX por la técnica FRAP .....	56

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Solventes usados en la extracción de componentes bioactivos.....	22
<b>Tabla 2</b> Fracciones obtenidas en el proceso .....	32
<b>Tabla 3</b> Actividad antioxidante por la técnica DPPH del extracto y sus fracciones de la especie <i>Desmodium molliculum</i> .....	38
<b>Tabla 4</b> Actividad antioxidante por la técnica FRAP del extracto y sus fracciones de la especie <i>Desmodium molliculum</i> .....	39
<b>Tabla 5</b> Actividad antioxidante por la técnica ABTS del extracto y sus fracciones de la especie <i>Desmodium molliculum</i> .....	39
<b>Tabla 6</b> Evaluación del contenido de polifenoles totales.....	42
<b>Tabla 7</b> Análisis estadístico por la prueba Tukey de las medias entre las fracciones y el extracto crudo de la especie <i>Desmodium molliculum</i> .....	43
<b>Tabla 8</b> Promedios de las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones para la elaboración de la curva de calibración para la evaluación del contenido de polifenoles totales.....	53
<b>Tabla 9</b> Promedios de las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones para la elaboración de la curva de calibración para la evaluación de la actividad antioxidante por la técnica DPPH.....	54
<b>Tabla 10</b> Promedios de las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones para la elaboración de la curva de calibración para la evaluación de la actividad antioxidante por la técnica ABTS .....	55



## Índice de anexos

<b>ANEXO A</b> <i>Promedios y curvas de calibración de las técnicas FRAP, ABTS, DPPH y del contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu)</i> .....	53
<b>ANEXO B</b> <i>Diagrama de cajas del análisis de los promedios obtenidos de la prueba de contenido de polifenoles totales para el extracto crudo y sus fracciones de la especie <i>Desmodium molliculm</i></i> .....	57
<b>ANEXO C</b> <i>Diagrama de cajas del análisis de los promedios obtenidos de la Técnica DPPH para el extracto crudo y sus fracciones de la especie <i>Desmodium molliculm</i></i> .....	58
<b>ANEXO D</b> <i>Diagrama de cajas del análisis de los promedios obtenidos de la Técnica ABTS para el extracto crudo y sus fracciones de la especie <i>Desmodium molliculm</i></i> .....	59
<b>ANEXO E</b> <i>Diagrama de cajas del análisis de los promedios obtenidos de la Técnica FRAP para el extracto crudo y sus fracciones de la especie <i>Desmodium molliculm</i></i> .....	60
<b>ANEXO F</b> <i>Resultado de placa TLC en UV- visible contenido de clorofila</i> .....	61
<b>ANEXO G</b> <i>Ficha de recolección de la especie <i>Desmodium molliculm</i></i> .....	62
<b>ANEXO H</b> <i>Caracterización botánica de <i>Desmodium molliculm</i></i> .....	63
<b>ANEXO I</b> <i>Metodología de la marcha Fitoquímica por Cromatografía en Capa Fina para la determinación de flavonoides en los extractos apolares de <i>Desmodium molliculm</i></i> .....	64

## DEDICATORIA

A mi Dios por permitirme cumplir uno de los más grandes sueños, quien me ha acompañado durante todo el proceso y ha sido testigo de todo el sacrificio realizado y me ha dado la bendición de culminar mis estudios, además por haberme brindado una maravillosa familia.

A mis padres Diego Pizarro y Eulalia Rosas, quienes me han apoyado de manera incondicional desde el primer momento, siendo mi soporte en buenos y sobre todo malos momentos, han sido un ejemplo de lucha, sacrificio, humildad y superación. Sin ustedes este sueño no sería posible, gracias por la confianza que han depositado en mí y que jamás he querido fallar.

A mi hijo Martín quien ha sido mi luz y guía para no decaer, mi motivación para continuar. Juntos hemos tenido que sacrificar momentos, pero siempre teniendo presente que el sacrificio tiene su recompensa, siendo mi triunfo también el tuyo.

A todas las personas que Dios me ha permitido conocer en el camino y que hoy se han convertido en parte fundamental en mi vida.

Paola Michelle

A Dios principalmente por acompañarme en todo momento, cada paso que he dado, decisión que he tomado y durante todo el trayecto de mi carrera, por permitirme despertar cada mañana y ver una oportunidad más para cumplir mi sueño de ser una profesional.

A mi familia, en especial a mi madre Luz Palomino que ha sido padre y madre durante toda mi vida, me ha acompañado durante todo el transcurso de mi carrera, me ha apoyado no únicamente de manera económica también lo ha hecho de manera moral e incondicional, y apoyo como tal no tiene precio. Gracias a ella, mi motor principal, por permitirme cumplir mis sueños de tener un título universitario, por confiar en mí y querer lo mejor para mi vida.

Y por último a las personas que me han permitido crecer como persona, me han dejado gratos momentos durante toda mi carrera universitaria, gracias a ellos estoy en uno de los capítulos de mi vida que serán recordados por toda mi vida.

Jessica Marlene

## INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales es una alternativa terapéutica de la población por factores tanto culturales como de acceso a la salud, bajo costo y la aparente ausencia de efectos adversos atribuidos en comparación a las drogas sintéticas. Dentro de las plantas utilizadas en los andes ecuatorianos se encuentra la hierba de infante la cual ha sido usada ampliamente como cicatrizante, depurativa, antiinflamatoria, antiasmática, anti-úlceras, anti nociceptiva, para problemas hepáticos, renales, entre otros. Puede ser utilizada tanto interna como externamente, generalmente se recolecta la planta entera y/o las hojas (Olascuaga et al., 2020).

En la bibliografía se ha encontrado diversos estudios sobre el género *Desmodium* y su capacidad antioxidante como *Desmodium gangeticum* los cuales fueron evaluadas mediante distintas técnicas (DPPH, óxido nítrico, ferril-bipiridilo y ácido hipocloroso) teniendo como resultado que el extracto obtenido de la misma tiene una potente actividad antioxidante (Govindarajan et al., 2003). *Desmodium incanum* también ha sido analizada en cuanto a su capacidad antioxidante *in vitro* y antinociceptiva del extracto metanólico obtenido, los resultados mostraron que posee actividad antioxidante y quelante de hierro (Bertuzzi et al., 2008). Además, en el extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* se encontraron compuestos fenólicos (flavonoides) como componentes mayoritarios los cuales son de especial interés en la investigación de productos naturales por presentar actividad biológica, tales como antioxidante, antiinflamatorio, hepatoprotector, antibacteriano y antiviral (Rengifo, 2018).

Los fitoterápicos son un tema de interés farmacológico, ya que al ser procedente de un ser vivo presentan actividad biológica entre ellos una prometedora capacidad antioxidante, por lo que se ha hecho necesario estudiarlo tanto *in vitro* como *in vivo*. Desde un punto de vista tradicional las plantas han tomado un importante papel en la salud del ser humano lo que conlleva a estudiarlas para conocer más a detalle el mecanismo por el cual actúa, para la especie que se pretende estudiar en esta investigación no existe reportes locales de dicha actividad y se ha visto la necesidad de corroborar su uso ancestral a través de técnicas de laboratorio, tanto del extracto crudo como de las fracciones que se obtienen a través de fraccionamiento líquido-líquido. Con los resultados del presente trabajo se busca contribuir con información científica que permitirá proponer futuras investigaciones y aplicaciones fitoterapéuticas.

## OBJETIVOS

### Objetivos General

Determinar la actividad antioxidante del extracto metanólico crudo y de las fracciones obtenidas por el método de partición líquido-líquido de *Desmodium molliculum* colectado en la provincia del Azuay.

### Objetivos Específicos

- Determinar la composición fitoquímica del extracto crudo y fracciones de *Desmodium molliculum*.
- Cuantificar el contenido de polifenoles totales del extracto crudo de *Desmodium molliculum* obtenido por maceración asistida; así como de las fracciones obtenidas por el método de partición líquido-líquido.
- Cuantificar la actividad antioxidante del extracto crudo de *Desmodium molliculum* obtenido por maceración asistida; así como de las fracciones que se generan tras la aplicación del método de partición líquido-líquido a través de las técnicas DPPH, FRAP y ABTS y compararlas.

## CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

## 1.1 GENERALIDADES DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Una planta medicinal se define como una especie vegetal que contiene sustancias que se encuentran en la corteza, flores, frutos, raíces, semillas o tallos, que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o aquellas que poseen principios activos que sirven como precursores para la elaboración de fármacos, dicho en otras palabras, son una fuente directa de agentes terapéuticos (Miranda et al., 2005). Estos efectos biológicos de las plantas pueden ser beneficiosos o perjudiciales. El uso de las plantas medicinales se remonta a la prehistoria y persiste hasta la actualidad (Shehri et al., 2022).

1.1.1 Descripción de *Desmodium molliculum*

*Desmodium molliculum* es una planta conocida con el nombre de “hierba del infante”. El nombre del género deriva del griego, “*desmos*” que significa “lazo” o “cadena” y “*hode*” que significa “como”; debido a la disposición de sus semillas (Deshpande y Bhalsing, 2014).

Taxonomía:

*División: Magnoliophyta*

*Clase: Magnoliopsida*

*Subclase: Rosidae*

*Orden: Fabales*

*Familia: Fabaceae*

*Género: Desmodium molliculum (HBK) DC*

*Nombre Común: “hierba del infante” (Ecuador) y “Manayupa” (Perú) (Acaro, 2013).*

*Desmodium molliculum* es una hierba perenne de hasta 50 cm de altura, cuyo tallo es rígido, ligeramente ramificado, recostado sobre el suelo, acanalado y cubierto de pelos. Sus hojas son alternas y compuestas con tres folíolos, pecioladas con estípulas. Sus flores son blancas violáceas, se disponen en espiga con un largo de 1 cm (Paniagua, Bussmann & Romero, 2020).

El género *Desmodium* incluye de 350-450 especies que crecen en zonas tropicales y subtropicales. *Desmodium molliculum* es una planta andina que crece entre los 500-3500

msnm. Es una planta originaria de los andes peruanos, sin embargo, se distribuye desde México a Sudamérica. En Ecuador, por ejemplo, crece entre 1500 a 3500 msnm., en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha y Tungurahua (Olascuaga et al., 2020).

**Figura 1**

*Desmodium molliculum* procedente de Barabón (Azuay).



*Nota.* Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

### 1.1.2 Metabolismo de las plantas

El metabolismo está constituido por un conjunto de reacciones químicas de un organismo. La mayor parte del carbono, nitrógeno y energía terminan en moléculas fundamentales y necesarias para el funcionamiento de las células. Estas moléculas fundamentales son los aminoácidos, azúcares, nucleótidos y lípidos, denominándose metabolitos primarios. Las plantas destinan una cantidad importante y significativa de la energía y carbono asimilado a la elaboración de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos respiratorios, transporte de solutos, asimilación de nutrientes, procesos fotosintéticos, síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos y se denominan metabolitos secundarios o productos naturales (Ávalos & Pérez, 2009). Estos metabolitos secundarios tienen especial interés ya que se ha evidenciado algunas actividades biológicas derivadas de los mismos.

### 1.1.2.1 Clasificación de los metabolitos secundarios

1. Terpenoides: aceites esenciales, entre otros.
2. Compuestos fenólicos y sus derivados: cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
3. Compuestos nitrogenados y alcaloides.

(Hernández et al., 2018).

#### 1. Terpenoides

Los terpenos o también conocidos como terpenoides, son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que constituyen el grupo más grande y numeroso de metabolitos secundarios alrededor de 40.000 moléculas diferentes. Se caracterizan por ser insolubles en agua y su formación se da por unión de unidades de isopreno (5 átomos de carbono) (Vilela, González & Ravetta, 2011).

Los más pequeños y volátiles son los monoterpenos con dos unidades de isopreno; en sesquiterpenos, con tres; en diterpenos, con cuatro unidades; en triterpenos, con seis unidades de isopreno; en tetraterpenos, con ocho, y en politerpenos con más de 20 unidades de isopreno (Almaraz et al., 2017).

En este grupo incluyen hormonas (giberelinas y ácido abscísico), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), látex, derivados de esteroides (glucósidos cardiacos), aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas). Los terpenos gozan de una importancia medicinal gracias a las propiedades antiulcerosas, antimalaricales, anticarcinogénicas, antimicrobianas, etc. (Vilela, González & Ravetta, 2011).

#### 2. Compuestos fenólicos

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen en su estructura un grupo fenol, las mismas se conocen con distintos nombres como compuestos fenólicos, fenilpropanoides o polifenoles. Este es un grupo muy diverso que va desde moléculas sencillas (ácido fenólico) hasta polímeros complejos (lignina o taninos) (Ávalos & Pérez, 2009).



### 3. Alcaloides

Los alcaloides constituyen una amplia familia de alrededor de 15.000 metabolitos secundarios que comparten características en común como su solubilidad en agua, exhiben actividad biológica, poseen como mínimo un átomo de nitrógeno en la molécula. La mayoría son heterocíclicos, aunque con unas pocas excepciones en los compuestos alifáticos (no cíclicos) como la colchicina o la mescalina. Los alcaloides son capaces de producir respuestas fisiológicas y psicológicas debido a la interacción con los neurotransmisores. A dosis elevadas los alcaloides en su mayoría son tóxicos, sin embargo, a dosis bajas poseen un alto valor terapéutico como un tranquilizante, antitusivo, relajante muscular o analgésico (Ávalos & Pérez, 2009).

#### 1.1.2.2. Metabolitos secundarios del género *Desmodium*

Estudios fitoquímicos del género *Desmodium* han permitido caracterizar principalmente metabolitos como alcaloides y flavonoides, seguidos de esteroides, compuestos fenólicos, saponinas y taninos. En la especie *Desmodium molliculum* se han identificado la presencia de flavonoides (flavonoles, flavonas (vitexina) o isoflavonas (genisteína y 5-o-metilgenisteína), esteroides triterpenos, taninos, saponinas esteroidales, alcaloides, compuestos fenólicos y carbohidratos (Olascuaga et al., 2020).

## 1.2 OXIDACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

La oxidación es un proceso bioquímico que consiste en la pérdida de electrones o también se puede definir como un proceso en el cual un compuesto cede electrones. La oxidación es elemental para la vida ya que se asocia a los procesos de obtención de la energía celular. Sin embargo, cuando existe un exceso de oxidación, aparece el estrés oxidativo. Existen un sin número de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la producción de radicales libres (Elejalde, 2001).

El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio o desbalance entre la producción de especies reactivas y el sistema de defensa antioxidante. Cuando se produce estrés oxidativo significa que existe un desbalance a favor de un aumento significativo en la concentración de las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). La homeostasis se consigue al existir un ajuste o equilibrio entre los mecanismos generadores de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los sistemas de eliminación de los mismos. A bajas concentraciones las

Especies Reactivas de Oxígeno desempeñan un papel fundamental como mediadores del proceso de señalización intracelular sin embargo al incrementar sus concentraciones se vuelven nocivos para el organismo (Carvajal, 2019).

Las fuentes de Especies Reactivas de Oxígeno incluyen especies radicales y no radicales como, por ejemplo:

ERO:

- Radicales → superóxido, hidroxilo, radical alcoxilo, radical peroxilo.
- No radicales → Peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, ozono, etc.

Todas estas especies mencionadas son de importancia biológica y son producidas en varios sistemas celulares localizados en la membrana plasmática, retículo endoplásmico, mitocondria y citosol. La mayor parte de Especies Reactivas de Oxígeno son generadas a nivel mitocondrial, los radicales superóxidos son los principales Especies Reactivas de Oxígeno producidos y a su vez dan origen a las demás (Carvajal, 2019).

Es de conocimiento que existen diferentes tipos de procesos endógenos que conducen a la producción de Especies Reactivas de Oxígeno como la respiración mitocondrial, el metabolismo del ácido araquidónico, la activación de polimorfonucleares, las acciones enzimáticas, y la catálisis por liberación de cobre y hierro, etc. Por lo tanto, son necesarias fisiológicamente y debe existir un equilibrio armónico para el correcto funcionamiento de nuestro organismo (Núñez, 2011).

Como se describió anteriormente las acciones enzimáticas generan Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) principalmente la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH oxidasas), estas enzimas son las responsables de la producción de manera particular del radical superóxido. Además, se considera que este sistema enzimático es el encargado de la fabricación de Especies Reactivas de Oxígeno en patologías como la aterosclerosis, diabetes tipo 1 y 2 e hipertensión. La enzima Xantina Oxidasa cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y ácido úrico y se encuentra aumentada en las inflamaciones, daño isquémico por reperfusión, aterosclerosis, diabetes y enfermedades autoinmunes (Carvajal, 2019).

Las Especies Reactivas de Oxígeno también se forman por factores exógenos provocando un estrés en el cuerpo humano, entre estos factores se puede citar las radiaciones de todo

tipo, contaminación ambiental, alimentación inadecuada, consumo de alcohol, tabaco y estupefacientes, la exposición a sustancias tóxicas, estrés físico y mental, el metabolismo de ciertos fármacos. Algunos de los factores detallados pueden controlarse sin embargo otros no y como resultado el organismo está expuesto a la producción excesiva de Especies Reactivas de Oxígeno (Núñez, 2011).

### 1.3 ANTIOXIDANTES

Se define como antioxidante a una molécula estable con capacidad de donar un electrón a un radical libre con finalidad de neutralizar, de manera que reduce el daño oxidativo. Los antioxidantes pueden retrasar o inhibir el daño celular por medio de la eliminación de radicales libres, de manera segura protegiendo las células vitales (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010).

#### 1.3.1 Sistemas antioxidantes

Los seres humanos han desarrollado mecanismos antioxidantes debido a la necesidad de mantener a las Especies Reactivas de Oxígeno dentro de niveles adecuados y compatibles con el funcionamiento celular normal (Carvajal, 2019).

Estos mecanismos pueden ser de dos tipos: enzimáticos y no enzimáticos. El organismo se protege del estrés oxidativo con mecanismos que pueden ser: reparación, defensas físicas, preventivos y defensas antioxidantes. Las defensas antioxidantes desempeñan un papel fundamental y están compuestos por enzimas antioxidantes entre las que se encuentran el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión peroxidasa (GPx). El otro mecanismo es el no enzimático; y, en este tipo está: el ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), glutatión reducido (GSH), flavonoides, carotenoides y otros antioxidantes (Carillo et al., 2015).

Los antioxidantes minimizan el daño oxidativo en el organismo, su presencia en bajas concentraciones previene y retrasa de manera significativa la oxidación evitando la formación de las Especies Reactivas de Oxígeno. Los antioxidantes pueden ser exógenos es decir adquiridos a través de la dieta y endógenos al ser producidos por el organismo. La función de los antioxidantes es inhibir la oxidación de las moléculas de dos formas: la primera es mediante la captación de los radicales libres denominándose antioxidantes primarios, la

segunda a través de mecanismos que no se relacionan con la captación de los radicales libres denominándose antioxidantes secundarios (Carillo et al., 2015).

Los antioxidantes exógenos se obtienen principalmente de alimentos y plantas medicinales, como verduras, frutas, bebidas, flores, cereales, hongos, hierbas medicinales y especias. Los antioxidantes naturales de materiales vegetales son principalmente polifenoles (ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoides, estilbenos y lignanos), carotenoides (carotenos y xantofilas) y vitaminas (vitamina C y E). Estos antioxidantes naturales particularmente los polifenoles y los carotenoides, presentan una gran variedad de efectos biológicos, como antiinflamatorios, antivirales, antibacterianos, anticancerígenos y antienvjecimiento (Ping et al., 2017).

### **1.3.2 Terapia antioxidante**

La terapia antioxidante es un tema controversial en la comunidad médica y científica. La mayor parte de la población relaciona este término con la administración de fórmulas que están constituidas por antioxidantes ya sea como un coadyuvante o de forma única como tratamiento de una enfermedad específica. En evidencias de literatura científica se encuentra que existe una relación entre el estrés oxidativo y la progresión de las enfermedades sobre todo crónicas sin embargo la administración de productos antioxidantes no se considera como una terapia principal sino como suplementaria ya que el estrés oxidativo no es considerado como una categoría terapéutica (Núñez, 2011).

### **1.3.3 Las plantas como fuente de antioxidantes**

Existen múltiples antioxidantes que se encuentran en las plantas como los flavonoides, taninos, aceites esenciales, etc. pertenecientes a los distintos grupos de metabolitos secundarios (terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides) los cuales juegan un papel fundamental para la adaptación ante el estrés ambiental y en la defensa frente a patógenos y depredadores. Estos metabolitos llaman la atención de los investigadores ya que pueden ser aprovechados en la industria farmacéutica. Según la bibliografía en los últimos años las morbilidades han aumentado, así como la tendencia a nivel mundial hacia el uso de sustancias naturales presentes en plantas medicinales. Mediante estudios realizados se ha informado que existe una relación inversa entre la incidencia de enfermedades humanas y la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes y plantas medicinales. Su consumo es beneficioso para la salud y no presenta efectos nocivos en el cuerpo humano, en cuanto al tema

económico también se considera accesible para la población en general (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010).

Las plantas medicinales disponen de una riqueza ilimitada y desconocida de compuestos químicos con un gran potencial farmacológico para la elaboración de nutracéuticos, medicinas populares, complementos alimenticios, agroquímicos, productos farmacéuticos, biopesticidas y entidades químicas para drogas sintéticas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó recientemente una lista con 20000 plantas medicinales utilizados en diferentes países (Deshpande y Bhalsing, 2014).

## 1.4 PROCESAMIENTO DE LAS PLANTAS PARA SU ESTUDIO

### 1.4.1 Procesos de extracción

Constituye el primer paso para el análisis de compuestos fitoquímicos a partir de la materia vegetal. Entre los distintos métodos de extracción se han clasificado en tradicionales que incluye maceración, maceración asistida con agitación y extracción Soxhlet; y modernas como la extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido, la extracción acelerada con disolventes y la extracción con fluidos subcríticos y supercríticos. Es importante mencionar que cada técnica tiene tanto sus ventajas como sus desventajas, y va a depender de factores que de alguna manera afectará la difusividad y solubilidad, entre ellos tenemos la concentración del solvente a usar, la relación que tendrá el analito con el solvente, tiempo, temperatura, pH, el tamaño de partícula del soluto, etc. (Cujic, Savikin, Jankovic, Pljevljakusic, Zdunic, & Ibric, 2016)

El principio de la extracción de productos naturales cursa por varias etapas:

- Penetración del solvente a través de la matriz sólida
- Disolución de los solutos en el solvente
- Difusión del soluto fuera de la matriz sólida
- Recolección de los solutos extraídos (Zhang, Lin & Ye, 2018).

Como se mencionó anteriormente el primero paso para la extracción es la penetración del solvente, por lo tanto, la elección de este es fundamental, para ello es necesario considerar su solubilidad, el precio y su seguridad, basándose en la ley de la similitud e Inter miscibilidad (lo similar disuelve a lo similar). Los solventes de mayor uso para la investigación fitoquímica son el etanol y el metanol (Zhang, Lin & Ye, 2018). Un buen solvente para extracción debe ser de:

- Toxicidad baja
- Capacidad de evaporación a temperaturas bajas
- Rápida y fácil penetración
- Funcionar como conservante
- Evitar que el extracto se descomponga o disocie (Pandey & Tripathi, 2014).

A continuación, se describen solventes y los componentes fitoquímicos capaces de extraer:

**Tabla 1**  
*Solventes usados en la extracción de componentes bioactivos*

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Éter	Acetona
		Antocianinas			
		Terpenoides			
Almidones	Polifenoles	Xantoxilinas			
Antocianina	Taninos	Totarol		Alcaloides	
Taninos	Poliacetileno	(terpenofenólico)	Terpenoides	Terpenoides	Fenol
Saponinas	Flavonoles	Taninos	Flavonoides	Cumarinas	Flavonoles
Terpenoides	Terpenoide	Saponinas		Ácidos	
Lecitinas	Alcaloides	Quasinoideas		grasos	
Polipéptidos	Esteroles	Flavonas			
		Polifenoles			
		Lactonas			

*Nota.* Fuente Pandey & Tripathi (2014).

En el presente estudio se utilizó el método de maceración asistida, el mismo que se describe a continuación:

La maceración hace referencia al ablandamiento de la droga, y se usa principalmente para la preparación de tinturas, extractos e infusiones concentradas. Dentro de la farmacopea India se cataloga como un método oficial. En las drogas vegetales el tiempo prolongado de contacto de la droga con el menstruo permite que este difunda a través de la pared celular con el fin de solubilizar los constituyentes que están dentro de las células. El recipiente donde ocurre

este proceso se recomienda que esté cerrado para evitar la evaporación del menstruo (Hidayat & Wulandari, 2021).

#### **1.4.2 Extracción de compuestos fitoquímicos por partición líquido- líquido**

La extracción líquido-líquido convencional es un método utilizado ampliamente para la extracción de varios compuestos a partir de soluciones de muestras acuosas. Se puede definir como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente. La extracción es efectiva y está recibiendo un interés creciente por parte de los investigadores debido al consumo mínimo de reactivos, el tiempo de extracción y el costo del análisis. Los solventes deben elegirse para garantizar una alta capacidad de extracción y selectividad (Chen et al., 2019)

Las drogas que se estudian con fines terapéuticos tienen una gran variedad de compuestos bioactivos, para lo cual un buen sistema de extracción permite obtener al máximo estos analitos, sin embargo, no existe un método universal para la extracción de metabolitos ya que siempre se debe tomar en consideración las particularidades que presentan. La partición líquido-líquido es un método de extracción con capacidad de aprovechar las diferentes polaridades de los compuestos bioactivos. El proceso consiste en usar solventes por lo general como dos fases inmiscibles como el agua y un solvente orgánico, en donde la distribución de las sustancias se transfiere al líquido para el cual tienen mayor solubilidad, hasta finalmente llegar a un equilibrio y la fase de mayor solubilidad contendrá mayor compuesto bioactivo. El líquido que menor concentración de soluto disuelto tiene suele llamarse refinado (Clement & Hao, 2012).

Este procedimiento separa compuestos disueltos o suspendidos en fases acuosas, el cual consiste en agitar vigorosamente la fase acuosa con un disolvente orgánico inmiscible en agua y dejar separar en el embudo de decantación. Los solutos presentes se distribuyen entre la fase acuosa y la fase orgánica, de acuerdo con las solubilidades relativas. Existen compuestos tales como el yodo, ésteres, alcoholes, etc., que son parcialmente solubles en ambas fases (orgánica y acuosa) por lo que al agitar una solución acuosa con un disolvente orgánico el compuesto se disuelve parcialmente en cada disolvente y se necesitará varias extracciones para alcanzar una separación eficaz (Ramachandrana et al., 2019).

### 1.4.3 Análisis de los compuestos fitoquímicos y su actividad farmacológica

Dentro de las técnicas analíticas de compuestos fitoquímicos está la Cromatografía en Capa Fina (TLC), la cual es muy utilizada porque nos da un acercamiento cualitativo a la composición de los extractos o sus fracciones. A su vez, siendo los polifenoles los compuestos con mayor actividad farmacológica, pueden cuantificarse por medio de técnicas espectrofotométricas. A continuación, se describen las mismas.

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica sencilla, rápida y económica que permite la separación de los componentes de una muestra, se basa en la separación por medio de adsorción de los analitos de la muestra mediante las diferencias de velocidad a la que estos son transportados por la fase móvil líquida a través de una fase fija o estacionaria (Vallejo, Barrios, & Anaya, 2021).

Para la evaluación en TLC como fase estacionaria se utiliza una placa de sílica gel y como fase móvil una mezcla de solventes que permiten la elución de los distintos metabolitos de acuerdo con la polaridad del solvente y a la afinidad del metabolito por este. Se debe considerar que cuanto mayor es el valor de  $R_f$ , menor será la interacción entre el compuesto y la fase estacionaria y su valor es específico para un compuesto cuando las condiciones cromatográficas se mantienen constantes (misma fase móvil, misma placa) (Lundanes, Reubsaet & Greibrokk, 2014).

El método Folin-Ciocalteu es utilizado para la determinación de la medida del contenido de compuestos fenólicos totales en plantas y vegetales. El reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con los compuestos fenólicos a un pH básico dando como resultado una coloración azul la cual es leída espectrofotométría a una longitud de onda de 765 nm. Este reactivo es de color amarillo por el ácido fosfomolibdotúngstico formado por las sales: molibdato sódico en ácido fosfórico y wolframato sódico y al ser reducido por los compuestos fenólicos presentes en la muestra a analizar da lugar a un complejo de color azul intenso evaluando el contenido de polifenoles. La reacción que se produce es una reacción redox, por lo tanto, se puede considerar como un método preciso y sensible. La cuantificación por espectrofotometría usa una recta patrón de ácido gálico (Martínez et al., 2020).

### 1.4.4 Actividad farmacológica

La actividad antioxidante es una de las propiedades farmacológicas más reportadas en plantas medicinales, la misma que puede ser evaluada a través de diferentes técnicas que se



han clasificado de diversas maneras, una de ellas como enzimáticas que evalúa la actividad de las enzimas antioxidantes como la catalasa o glutatión peroxidasa y no enzimáticas que se subclasifican como competitivos y no competitivos. Los competitivos como su nombre lo indica va a existir una competencia entre una sustancia cromógena y los antioxidantes por las especies reactivas, mientras que los ensayos no competitivos se subclasifican nuevamente de acuerdo a distintas reacciones, entre ellos: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, siglas en inglés), transferencia de un solo electrón (SET, siglas en inglés) y la combinación de las dos anteriores (HAT/SET), independientemente de su proceso por el cual trabajan llegan a los mismos resultados, y se describen a continuación por el uso en la presente investigación (Flieger, Baj & Maciejewski, 2021). Las actividades antioxidantes se expresan como equivalentes de un antioxidante de referencia, entre los más comunes están: TROLOX, ácido ascórbico u otro compuesto. Para la medición se suele usar la espectrofotometría, fluorimetría, quimioluminiscencia, resonancia paramagnética de electrones, infrarrojo y resonancia magnética nuclear (Skowrya, 2014).

#### **1.4.4.1 Ensayos basados en la transferencia de un solo electrón**

Miden la capacidad del antioxidante para eliminar los radicales libres por medio de la transferencia de un electrón con el fin de reducir radicales libres, además de iones metálicos y grupos carbonilos. Las reacciones miden la capacidad antioxidante, que cambia de color cuando se reducen, por ende, el cambio de la intensidad de color se correlaciona con la capacidad antioxidante total (Munteanu & Apetrei, 2021).

##### **1.4.4.1.1 FRAP (Poder reductor del ión férrico)**

Método basado en la reducción del complejo férrico TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) a un complejo ferroso por los antioxidantes donantes de electrones en un medio ácido y permite la transferencia de electrones, generando una coloración, cuya intensidad es proporcional a la capacidad reductora de la muestra (Munteanu & Apetrei, 2021). Tiene una limitada medición para detectar compuestos fenólicos y tioles que reaccionan lentamente, además que compuestos incluso sin actividad antioxidante pueden interferir en la medición y contribuyen al aumento del valor de la actividad en esta prueba generando resultados falsos positivos (Gan, Sulaiman & Khalo, 2012).

#### 1.4.4.2 Ensayos mixtos (HAT/SET)

Pertenece a ensayos que no pueden clasificarse claramente de acuerdo con su mecanismo, sin embargo, estos ensayos generalmente se basan en la eliminación del cromóforo radical estable (ABTS o DPPH) (Apak, Capanoglu & Shahidi, 2018).

##### 1.4.4.2.1 ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfónico) o TEAC (Capacidad antioxidante de equivalentes al Trolox)

Es una técnica espectrofotométrica que consiste en inhibir la absorbancia del catión radical de ABTS (2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) por acción de los antioxidantes, su coloración cambia de azul a verde, con una longitud de onda larga para el espectro de absorción (Shahidi & Zhongb, 2015).

El proceso consiste en generar cationes radicales partir del ABTS con agentes oxidantes fuertes como el peróxido de hidrógeno o el persulfato de potasio, mediante la acción de los antioxidantes se neutralizan estos cationes por transferencia tanto de los electrones como átomos de hidrógeno, esto permite que el radical ABTS que a la vez se considera un cromóforo vaya perdiendo su intensidad colorimétrica y por ende su lectura de absorción espectrofotométrica disminuya. Este ensayo ha sido altamente aplicado a la determinación de actividades antioxidantes en estudios con compuestos liposolubles e hidrosolubles (Antezana et. al, 2018).

##### 1.4.4.2.2 DPPH (Difenil Picril Hidrazilo).

El ensayo se basa en la medición de la capacidad de eliminación de antioxidantes hacia el mismo. El electrón impar del átomo de nitrógeno en DPPH se reduce al recibir un átomo de hidrógeno de los antioxidantes. Tan pronto como las soluciones de DPPH se combinan con con estos átomos, se forma el estado inferior de difenilpicrilhidrazina, perdiendo su color violeta distintiva que deja en evidencia la actividad antioxidante medida a 517 nm. Es un método conveniente para el ensayo antioxidante de sustancias como la cisteína, glutatión, ácido ascórbico, tocoferol y compuestos aromáticos polihidroxi (Munteanu & Apetrei, 2021).

## CAPÍTULO II

## MATERIALES y MÉTODOS

## 2.1 MATERIALES

Los materiales que se describen a continuación fueron utilizados durante todo el proceso práctico.

Tijeras podadoras, bolsas de papel, recipientes, cernidores, papel periódico, papel filtro Whatman #4, pinzas, matraces de fondo redondo, pipetas pasteur, viales ámbar, placas de sílica gel 60 F254, gradillas, balones de aforo de diferentes volúmenes (100ml, 50ml y 25 ml), papel aluminio, microplacas de poliestireno, tubos y tapas de liofilización, vasos de precipitación y pipetas automáticas.

## 2.1.1 Reactivos

Los reactivos etanol (99,5 %), cloroformo (99,5%), quercetina (98%), quercetina-3-glucorónido (95%), kaempferol (97%), kaempferol-3-glucorónido (97%), apigenina (97%), apigenina-7-glucorónido (95%), rutina (94%), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, trolox, persulfato de potasio (99%), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (98%), cloruro férrico (97%), folin y ácido gálico (97,5%) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemistry (Steinheim, Alemania). Metano absoluto calidad ACS, ISO, Reag. Ph Eur (99,9% puro), acetato de etilo (99,5% puro), ácido fórmico (98-100% puro), ácido acético glacial (100% puro), polietilenglicol y acetato de sodio fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania).

## 2.1.3. Equipos

- Balanza analítica Mettler Toledo.
- Balanza analítica Boeco BBL – 31.
- Baño ultrasonido Branson-Modelo 3510.
- Estufa VWR, serie N° 01053410, USA.
- Licuadora OSTER Clásica, BLST4655700.
- Equipo de fotodocumentación Camag TLC Visualizer, serie N° 200239.
- Cámara extractora de gases Quimis, serie N° 07111126, Brasil.
- Congelador Biofreezer serie N° 014590310140804.
- Estufa VWR, serie N° 01053410, USA.
- Refrigerador Modelo RI-480-INDURA serie N° 10503290019.
- Liofilizador de banco de 2,5 LT, 115V, serie N° 270776.

- Rotavapor Heildolph, Laborota 4000 efficient.
- Destilador de agua Fanem, modelo 724, serie TAD – 30979.
- Centrífuga sigma 2-6, serie N° 120303.
- Agitador Horizontal NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, serie N° 471203
- Congelador dairei freezeer -45/-85°C ULTF80, USA.
- Destilador de agua Fanem, modelo 724, serie TAD – 30979, Brasil.
- Horno Pro-3 TC-96N, Ecuador.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 RECOLECCIÓN, SELECCIÓN, LAVADO Y SECADO DE LA PLANTA.

#### 2.2.1.1 Recolección

La recolección de la especie *Desmodium molliculum* se llevó a cabo en horas de la mañana en Barabón, parroquia rural del cantón Cuenca en las coordenadas: latitud: -2,92072973 y longitud: -79, 09075823 a una altura de 2788 msnm. Las hojas, tallos y muestra botánica se colocaron en bolsas de papel etiquetadas para posteriormente ser llevadas al laboratorio.

#### 2.2.1.2 Selección, lavado y secado al ambiente

Las partes de la planta seleccionadas fueron: hojas, tallos secundarios, flores y lomentos, y posteriormente se procedió al lavado con agua potable por tres veces sucesivas, con un último lavado en agua destilada. Se escurrió en cernidores, se colocó sobre mallas forradas con papel absorbente y se dejó en reposo por 14 horas.

#### 2.2.1.3 Secado

Las partes de la planta secadas en el punto 2.2.1.2 se colocaron en la estufa de secado a una temperatura de 37°C por un tiempo de 29 horas y 30 minutos, hasta la obtención de un peso constante. Finalmente, se trituro la materia vegetal con ayuda de una licuadora OSTER para obtener un tamaño de partícula homogéneo.

**Figura 2**

Proceso de secado de la especie *Desmodium molliculum*.



## 2.2.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

### 2.2.2.1 Humectación

Se tomó 20 g de muestra triturada en el punto anterior dividida en 4 frascos de vidrio. Se agregó metanol cuya cantidad fue el doble del peso de la droga para humectar la muestra sin dejar sobrenadante, se cubrió con papel aluminio y se dejó en reposo por 15 horas.

### 2.2.2.2 Maceración

Con la muestra previamente humectada se colocó el metanol que usó como solvente en una proporción de 9:1, se cerró herméticamente y se llevó al agitador horizontal por un tiempo de 23 horas y 12 minutos, a 100 rpm.

### 2.2.2.3 Maceración asistida

Transcurrido el tiempo del proceso anterior se procedió a la filtración, y se recolectó en balones de fondo redondo, como se observa en la figura 3. El residuo del papel filtro se regresó al frasco original y se renovó con metanol en proporción 5:1 y se llevó a baño ultrasónico por un tiempo de 60 minutos a una temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  (figura 4) por 3 veces con un intervalo. La de 1 hora, todo lo filtrado se colocó en balones de fondo redondo y se almacenó en refrigeración para el análisis posterior.

**Figura 3***Recolección de la filtración***Figura 4***Maceración asistida*

#### 2.2.2.4 Eliminación del solvente

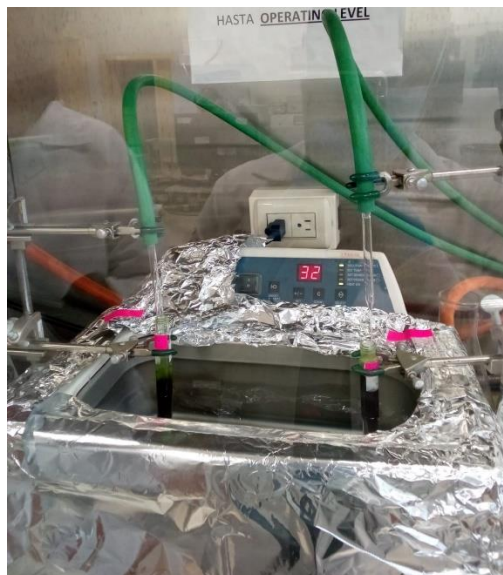
La eliminación del solvente se realizó con un rotavapor a 35 °C, para ello se encendió el equipo hasta obtener la temperatura indicada en el baño maría, se conectó el balón de fondo redondo hasta tener contacto con el baño y se ajustó en forma ascendente de 30, 90 y por último 150 rpm hasta la formación de una película delgada de metanol sobre el balón. Una vez evaporado todo el solvente se colocó alícuotas de metanol para disolver y transferir del balón de fondo redondo a tubos.

#### 2.2.2.5 Secado con flujo de nitrógeno

Se colocaron los tubos obtenidos en el punto anterior con los extractos en contacto con el baño maría y se encendió el flujo de nitrógeno sobre los mismos hasta que el volumen del extracto fuese de aproximadamente 4 mL para ser transferidos posteriormente a tubos de liofilización (figura 5).

**Figura 5**

*Secado con flujo de nitrógeno del extracto.*



#### **2.2.2.6 Liofilización**

Previo a la liofilización se preparó la muestra, para ello se llevó a congelación los tubos de liofilización a una temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , rotándose los mismos cada 3 minutos de manera que el extracto forme una capa congelada alrededor de todo el tubo. Posteriormente se quitaron las tapas, se reemplazaron con papel aluminio y se dejó por 24 horas en el congelador. Se encendió el equipo de liofilizado (Marca: LABONCO-2,5L). Se verificó en la pantalla que la temperatura llegue a un rango de entre  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se procedió a generar el vacío en el liofilizador y dejar una hora para la estabilización de la presión. Transcurrida la hora se insertaron los tubos y permanecieron en el equipo por 24 horas hasta secado completo. Se retiraron los tubos del liofilizador y con ayuda de cucharetas se pasó el extracto a un tubo y a viales.

#### **2.2.3 PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DEL EXTRACTO METANÓLICO CRUDO**

Para el primer fraccionamiento se disolvieron las muestras a una concentración de  $20\text{ mg/ml}$  con el extracto vegetal crudo y el solvente metanol/agua (80:20), y se agitó a  $100\text{ rpm}$  por 16 horas. Posterior a ello se transfirió a un embudo de separación y se agregó n-hexano, se agitó

de manera horizontal y se colocó en reposo hasta su separación en 2 fases, siendo la fracción inferior metanol/agua (fracción 1) la de interés para el siguiente fraccionamiento.

Para el fraccionamiento 2, se preparó la fracción 1, la cual fue disuelta hasta lograr una concentración de 20 mg/ml usando los solventes cloroformo y agua en proporción 2:1 y se dejó en reposo por 24h. Se observó la formación de 2 fases: fase clorofórmica (fracción 2) y fase acuosa (fracción 3).

Para el fraccionamiento 4, se partió de la fracción 2 y se preparó a una concentración de 40 mg/ml usando los solventes: cloroformo y NaCl al 1%. Se procedió a agitar en el vortex y se dejó en reposo hasta la formación de 2 fases: fase libre de taninos (fracción 4) y fase con taninos (fracción 5). En la **tabla 2** se describe las fracciones obtenidas.

**Tabla 2**

*Fracciones obtenidas en el proceso*

Extracto crudo	Extracto metanólico
Fracción 1	Fracción metanólica desengrasado con hexano
Fracción 2	Fracción clorofórmica
Fracción 3	Fracción acuosa obtenido del fraccionamiento con cloroformo
Fracción 4	Fracción clorofórmica libre de taninos
Fracción 5	Fracción clorofórmica con presencia de taninos

*Nota.* Fuente: Pizarro, Paola & Tigre, Jessica.

## 2.2.4 CROMATOGRAFÍA POR CAPA FINA (TLC)

### 2.2.4.1 Identificación de flavonoides

Se disolvieron las muestras a una concentración de 5 mg/mL con los solventes respectivos para cada fracción (extracto crudo, fracción 1, fracción 3, fracción 5). Se preparó: la fase móvil, fase estacionaria y reveladores de acuerdo al ANEXO H.

En un frasco de vidrio se colocó la fase móvil y cerró herméticamente por 30 minutos antes de colocar la placa. En la fase estacionaria se trazó una línea horizontal a 1 cm de los bordes inferior y superior, en la línea inferior trazada, se colocó 5 µL de las diferentes fracciones y patrones a una distancia considerable (2 cm).

Una vez seca la placa, se limpió la parte trasera y con ayuda de una pinza se sumergió en el revelador (productos naturales) por 10 segundos, nuevamente se retiró y se dejó en posición vertical hasta sequedad completa y posteriormente se observó en la lámpara UV.



## 2.2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

### 2.2.5.1 Determinación de la actividad antioxidante

De igual manera que en el apartado anterior, en los cálculos se consideró la preparación de reactivos para la curva de calibración y las muestras conjuntamente.

Para la curva de calibración en las tres técnicas descritas a continuación se usó como patrón de referencia: TROLOX. Esto se preparó de la siguiente manera: Se pesó en un vial el Trolox a concentración de 1 mg/mL y se diluyó con metanol como solución madre y se tomó alícuotas para preparar en las siguientes concentraciones: 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL, 0,015625 mg/mL.

#### 2.2.5.1.1 Determinación de la capacidad antioxidante método DPPH

En la preparación del reactivo DPPH, se pesó 0,019716 g del reactivo DPPH y se aforó a 250 mL, se homogeneizó por inversión y se sonicó por 3 minutos en baño maría.

Para la determinación de la actividad antioxidante por la técnica PPH se tomó 50  $\mu$ L de cada extracto y patrón y se colocó en un tubo eppendorf, luego en cada tubo se añadió 1000  $\mu$ L de reactivo DPPH y se mezcló en un vortex. Las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad, y posterior a ello se tomaron 100  $\mu$ L de cada tubo eppendorf y se colocó en un pocillo de la microplaca por triplicado cada tubo eppendorf. Finalmente, la absorbancia se midió a 517 nm.

#### 2.2.5.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante método FRAP

En esta técnica la preparación del reactivo se basa en 3 soluciones de acuerdo a lo descrito a continuación:

**Solución A** (Buffer ácido acético-acetato de sodio-300 mM): en la preparación del buffer se tomó 858  $\mu$ L y se mezcló con 25 ml de agua ultrapura, por otro lado, se pesó 1,2303g de acetato de sodio y se aforó a 10 ml de agua ultrapura, finalmente ambas soluciones se mezclaron y se completó a un volumen de 50 ml. **Solución B** (Cloruro Férrico-20 mM): para su preparación se pesó 0,0324 g de cloruro férrico y se aforó a 10 mL de agua ultrapura.

**Solución C** (TPTZ-10 mM en HCl-40 Mm): primero se preparó el HCl considerando su riqueza (37%) y densidad (1,19 g/ml), se tomó 33,12  $\mu$ L y se aforó a 10 mL de agua ultrapura, mientras que para la preparación del reactivo TPTZ se pesó 0,0312 g y se aforó por último a la solución de HCl preparada previamente. Al finalizar se realizó una mezcla de las tres soluciones en una proporción 10:1:1. Se calentó la mezcla a 40° C por 10 minutos.

Para la determinación de la actividad antioxidante por esta técnica se tomó 20  $\mu$ L de cada extracto y patrón, y se colocó en tubos eppendorf previamente protegidos con papel aluminio, después se añadió 600  $\mu$ L de la mezcla A+B+C en cada eppendorf y posteriormente se mezcló en el vórtex, se dejó reaccionar por 30 minutos en oscuridad, y finalmente se tomó 100  $\mu$ L de cada tubo eppendorf y se colocó en un pocillo de microplaca por triplicado para por último ser medido a 593 nm.

#### **2.2.5.1.3 Determinación de la capacidad antioxidante método ABTS**

En la preparación del reactivo ABTS, se pesó 0,0384 g del reactivo ABTS y se aforó a 10 mL, por otro lado, se pesó 0,0066 g de persulfato de potasio y se aforó a 10 mL, después se mezcló 5 mL de ABTS + 5 mL de persulfato de potasio en un frasco ámbar y se dejó en reposo por 16 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se ajustó el reactivo ABTS con etanol hasta llegar a una absorbancia adecuada 0,7 (Leída a 734 nm).

Para la determinación de la actividad antioxidante se tomó 40  $\mu$ L de cada extracto y patrón, colocándose en tubos eppendorf envueltos previamente con aluminio y se añadió a cada tubo 800  $\mu$ L de reactivo ABTS, se mezcló en un Vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Por último, se tomó 200  $\mu$ L de cada tubo eppendorf y se colocó en un pocillo por triplicado de la microplaca, finalmente la absorbancia se midió a 734 nm.

#### **2.2.5.2 Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu**

Para la preparación de los reactivos utilizados en esta técnica se ha considerado los cálculos incluidos para la curva de calibración y las muestras a analizar, para ello se procedió de la siguiente manera:

Para la curva de calibración, se usó un patrón de referencia (ácido gálico), este se pesó en un vial cubierto con papel aluminio a una concentración de 1 mg/mL como solución madre y se diluyó en agua destilada, por consiguiente, se tomó alícuotas para preparar en las

siguientes concentraciones: 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL, 0,015625 mg/mL.

En la obtención del reactivo de FOLIN-CIOCALTEU, se preparó folin al 10%, para lo cual se tomó 1 mL de folin y 9 mL de agua destilada ultrapura y se mezcló en un frasco ámbar. Se procedió a preparar el carbonato de sodio a 700 mM, y se aforó en agua destilada ultrapura. En la determinación del contenido de polifenoles, se tomó 100  $\mu$ L de cada extracto a las diferentes concentraciones preparadas, así mismo para la curva de calibración y se añadió 100  $\mu$ L de folin al 10% en los eppendorf, esto se mezcló con ayuda de un vortex y se dejó en reposo para su reacción por 5 minutos. Luego de ello añadieron 800  $\mu$ L de carbonato de sodio (700 Mm), se mezcló nuevamente y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en oscuridad, después se centrifugó por 2 minuto y se tomó 200  $\mu$ L de cada tubo eppendorf (sin tomar el precipitado) y se colocó en un pocillo de microplaca que luego se midió a 765 nm.

### 2.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**ANOVA:** también conocido como análisis de varianza, esta es una prueba estadística útil para el análisis de comparación de grupos con mediciones repetidas en varias ocasiones (Dagnino, 2014). Las evaluaciones de la actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas mediante el test ANOVA de una vía o factor, aplicada en cada prueba de actividad antioxidante realizada, mediante el nivel de significancia establecido de  $P < 0,05$ , que se consideró como diferencias significativas (Wade, 1996).

**Prueba Tukey-Kramer:** En conjunto con la prueba de análisis de varianzas (ANOVA) permiten evaluar de manera simultánea la existencia de la igualdad o diferencia significativa entre las medias con un valor de ( $\alpha = 0,05$ ) entre las distintas medias obtenidas (Driscoll, 1972).

Tanto el análisis estadístico como la prueba complementaria Tukey se aplicó a los valores obtenidos del extracto crudo y sus fracciones para conocer si existe o no una diferencia significativa entre estos, en la prueba del contenido de polifenoles totales y cada técnica de evaluación de la actividad antioxidante por separado, considerando como valor de  $p < 0,05$  como diferencia entre grupos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Rendimiento

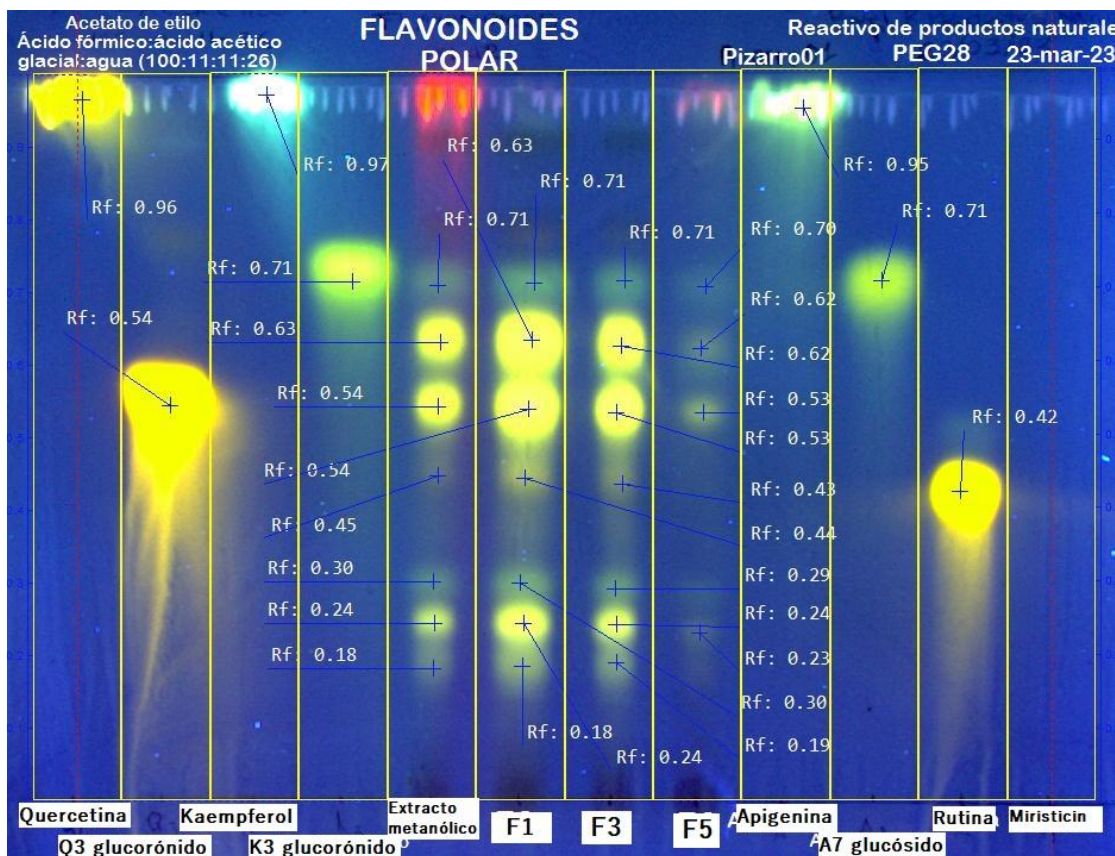
Como resultado inicial se presenta el valor obtenido de la relación droga-extracto que se expresa por medio del  $DER_{native}$ , para el caso de la especie *Desmodium molliculum* colectada para esta investigación fue de 4,74:1.

3.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

En el análisis de cromatografía en capa fina realizado, se evaluó el extracto metanólico crudo y las fracciones polares 1, 3 y 5, corriéndose frente a patrones del grupo perteneciente a los flavonoides: quercetina, quercetina-3-glucurónido, kaempferol, kaempferol-3-glucurónido, apigenina, apigenina-7-glucósido, rutina y miristicina.

Figura 6

Resultado de placa TLC en UV- visible para Flavonoides



Nota: análisis por cromatografía en capa fina de flavonoides de los extractos obtenidos por fraccionamiento de *Desmodium molliculum*. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

Para interpretar los resultados de la placa TLC, es importante considerar dos características: el valor de Rf y la intensidad del color de los patrones y las muestras que se corren en la placa. En la gráfica 6, para el patrón quercetina-3-glucorónido, se describe un valor de Rf de 0,54 junto a una intensidad de color alta. Del mismo modo, para las muestras evaluadas, se puede observar que el extracto metanólico, la fracción 1, 2 y 3 poseen el mismo valor de Rf que el patrón antes mencionado, sin embargo, en relación con la intensidad del color, para la fracción 5 es muy baja. Por lo tanto, las muestras evaluadas contienen quercetina-3-glucorónido.

Por otro lado, para los patrones kaempferol-3-glucorónido y apigenina-7-glucósido, se puede observar que tienen el mismo Rf (0,71), al igual que la intensidad de color, lo que dificulta la diferenciación entre uno y otro patrón. Adicionalmente, se puede observar que las muestras del extracto metanólico, F1, F3 y F5 poseen el mismo valor de Rf que los patrones kaempferol-3-glucorónido y apigenina-7-glucósido; en relación a la intensidad del color, estos son muy bajos, de tal manera que se puede indicar que las muestras analizadas poseen estos patrones, pero en baja concentración.

En lo que respecta al patrón de rutina, el extracto metanólico, F1 y F3 tienen un valor de Rf que se aproxima a este patrón (0,42). Por lo tanto, para este patrón, no es concluyente la presencia del mismo en las muestras. Por último, las fracciones que se analizaron demuestran la ausencia de otros flavonoides como la quercetina, kaempferol y apigenina.

La marcha fitoquímica sobre el análisis de compuestos fenólicos enfocada en el grupo de flavonoides realizada en este trabajo permite confirmar la existencia de estos compuestos, y de igual manera concuerda con otros trabajos realizados sobre el género *Desmodium* y la presencia de flavonoides. Si bien no existe una amplia disponibilidad de estudios sobre la especie, Barreto y Bonilla (2020), evalúan los isoflavonoides (daizeina, genisteina) y un flavonoide (vitexina) para esta especie, encontrando la presencia de las mismas además de saponinas, metabolitos no evaluados en nuestro estudio pero que nos permite encaminar a buscar otros metabolitos correspondiente a los compuestos fenólicos, por otro lado, en el estudio realizado por Olascuaga, Rubio, Blanco y Valdiviezo (2020), sobre el perfil etnobotánico, fitoquímico farmacológico de la especie *Desmodium molliculum* describe la presencia abundante y la reporta con tres cruces de compuestos fenólicos y flavonoides, que

confirman nuestro estudio, la elección de estos patrones al igual que la evaluación específica de este grupo de compuestos se ha realizado en base a otros estudios del género *Desmodium*, pues manifiestan que tanto los flavonoides como los alcaloides son los principales responsables de la mayoría de las actividades demostradas por este género y con base en la disponibilidad de los patrones del laboratorio se realizó el análisis de los metabolitos como el kaempferol, la rutina, quercetina y la apigenina (Ma, et al., 2011).

Ahora como se ha podido observar en la imagen de TLC, se ilustra que tanto el patrón kaempferol-3-glucorónido (flavonol) como el patrón apigenina-7-glucorónido (flavona) tienen el mismo recorrido con un Rf similar (0,71), la diferencia poco evidente es la intensidad del color lo que no permite la identificación clara de si nuestro extracto crudo y sus fracciones obtenidas poseen el uno o el otro compuesto, además de indicar que no existe suficiente evidencia de la presencia de estos en otros estudios, lo que sí se puede acotar es que al estar hablando de compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los flavonoides van a presentar una similitud en su estructura, como base se componen de dos anillos aromáticos bencénicos unidos por medio de 3 moléculas de carbono, lo que diferencia a estas dos moléculas es un grupo hidroxilo adicional en el patrón kaempferol en la posición 3 de su estructura, de ahí la limitada distinción entre una y otra para nuestras fracciones polares obtenidas y el extracto crudo (Cartaya & Reinaldo, 2001).

### 3.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

#### 3.3.1 Evaluación de la actividad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante del extracto crudo y sus fracciones de *Desmodium molliculum* se usaron las pruebas descritas en el apartado 2.2.5.1, los resultados finalmente fueron expresados en mg de patrón de referencia (Trolox) por 1 g de extracto seco, los resultados obtenidos se detallan a continuación en la tabla 3.

**Tabla 3**

*Actividad antioxidante por la técnica DPPH del extracto y sus fracciones de la especie Desmodium molliculum.*

Muestra	mg Trolox/g extracto seco	ANOVA (p)
Extracto crudo	154,06 ± 5,38	
Fracción 1	234,72 ± 5,11	
Fracción 2	214,54 ± 8,73	5,05 E-13

Fracción 3	231,59 ± 8,12
Fracción 4	91,44 ± 8,05
Fracción 5	133,75 ± 7,75

Nota. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

**Tabla 4**

*Actividad antioxidante por la técnica FRAP del extracto y sus fracciones de la especie Desmodium molliculum.*

Muestra	mg Trolox/g Extracto seco	ANOVA (p)
Extracto crudo	302,92 ± 4,54	
Fracción 1	348,19 ± 5,42	
Fracción 2	347,62 ± 4,87	
Fracción 3	345,71 ± 4,45	2,13E-15
Fracción 4	172,47 ± 3,04	
Fracción 5	192,21 ± 6,29	

Nota. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

**Tabla 5**

*Actividad antioxidante por la técnica ABTS del extracto y sus fracciones de la especie Desmodium molliculum.*

Muestra	mg Trolox/g Extracto seco	ANOVA (p)
Extracto crudo	159,18 ± 5,69	
Fracción 1	193,84 ± 1,09	
Fracción 2	226,07 ± 3,91	
Fracción 3	203,17 ± 3,58	2,44 E-13
Fracción 4	108,42 ± 7,54	
Fracción 5	121,22 ± 6,63	

Nota. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

De acuerdo a los resultados presentados en las tablas anteriores se puede observar que existe mayor actividad antioxidante para las fracciones 1, 2 y 3, sin embargo, es importante mencionar que los valores varían en cada técnica aplicada, es decir, para la técnica DPPH y FRAP se puede ver que la fracción con mayor actividad antioxidante es la fracción 1 con valores de 234,72 ( $\pm 5,11$ ) mg Trolox/g extracto seco y 348,19 ( $\pm 5,42$ ) mg Trolox/g extracto seco respectivamente, y esta corresponde a la fracción metanólica desengrasada con hexano que teóricamente al ser el primer proceso es la fracción que mayor metabolitos va a poseer, pero, en la técnica de ABTS parece ser que la fracción 2 que es la fracción clorofórmica es la que mayor actividad antioxidante posee con un valor de 226,07 ( $\pm 3,91$ ) mg Trolox/g extracto seco.

En la presente investigación, la evaluación de la actividad antioxidante por varias técnicas de la especie *Desmodium molliculum* y sus fracciones resultantes de distintos procesos, indican que cada técnica es distinta y los resultados que se obtienen pueden ser tan diferentes como similares entre sí; la diferencia como lo manifiesta Santos y Gocalves (2016), puede deberse a la forma en la que los componentes bioactivos se encuentran en la planta, la especie vegetal que se está analizando, el tipo de extracción que se emplea incluye el orden de los solventes y su polaridad, esta última idea toma sentido por la diversidad de estructura que poseen los metabolitos de interés farmacológico en especial los compuestos fenólicos, por ejemplo el uso de solventes altamente polares son utilizados para la extracción de flavonoides glicosilados mientras que el cloroformo un solvente apolar es usado mayormente para la extracción de flavonoides menos polares como isoflavonas, flavanonas, flavonas y flavonoles (Pérez, et al, 2013), lo que da a entender que nuestra especie estudiada tiene una gran abundancia de compuestos fenólicos que aún no se ha evaluado a profundidad.

Los resultados de la actividad antioxidante determinados por diferentes técnicas permiten afirmar lo que varios artículos han descrito sobre el género *Desmodium* con relación a su actividad antioxidante, si bien cada técnica que se empleó tiene diferencias metodicas que llegan al mismo objetivo, que es conocer la capacidad de neutralizar los radicales libres por parte de la especie vegetativa, no obstante, no hay estudios a detalle sobre la actividad antioxidante de los diferentes fraccionamientos realizados en esta investigación de *Desmodium molliculum*, en todas las técnicas empleadas de acuerdo a la sección de resultados se puede ver que la fracción "1", fracción "2" y fracción "3" son las que mayor actividad antioxidante tienen, e incluso en todas las técnicas estas fracciones superan la actividad antioxidante del extracto metanólico crudo.

En la actividad antioxidante para la técnica ABTS se ha encontrado una investigación realizada por Chih, et al (2016) sobre la actividad antioxidante y proliferativa de *Desmodium*



*triflorum*, en este estudio se realiza el mismo fraccionamiento al igual que en este trabajo similar hasta el fraccionamiento con cloroformo, por supuesto su trabajo continúa con más fraccionamientos con distintos solventes, a nosotros nos basta para decir que al igual que en esa investigación, la fracción “2” (fracción clorofórmica) es la que presenta mayor actividad antioxidante, por el contrario, la diferencia de este estudio con el nuestro radica en la fracción desengrasada con hexano que posee menor actividad antioxidante frente al extracto crudo, lo que no ocurre en nuestro estudio ya que, esta fracción desengrasada presenta mayor actividad antioxidante en la técnica ABTS, dejando en evidencia que la afinidad de los metabolitos por el solvente y sobre todo que la especie juega un papel importante en el contenido de metabolitos con actividad antioxidante.

Por otro lado, los taninos también juegan un rol importante dentro de la actividad antioxidante, aunque no más que los flavonoides en general ambos pertenecen al grupo de compuestos fenólicos con función protectora ante situaciones de estrés, por lo tanto, una especie vegetal no trabaja solo con un grupo de metabolitos, es necesario la interacción para producir un efecto sinérgico entre todos los metabolitos para la supervivencia de un ser vivo (Echavarría, et al., 2016) y en nuestra investigación podemos comparar las últimas dos fracciones, la penúltima libre de taninos y la última con presencia de taninos, dentro de estos resultados es claro evidenciar que tras el análisis de la actividad antioxidante, los flavonoides no son las únicas sustancias que le confieren a la especie *Desmodium molliculum* su capacidad para neutralizar radicales libres, si no que en menor proporción los taninos también juegan un papel importante en este proceso. Además de ello también podemos señalar que la afinidad por los solventes es crucial en la obtención de metabolitos de interés, pues la literatura nos indica que los taninos tienden a tener mayor solubilidad en extractos acuosos mientras que los flavonoides son más afines a los compuestos orgánicos (Ma, et al., 2011), y efectivamente en nuestras determinaciones se puede ver la diferencia entre la presencia y ausencia de taninos sobre todo en el análisis de la técnica DPPH evidenciada con mayor claridad, en donde el extracto que se lavó con solución salina que representa la fracción “5” tiene un valor de  $133,75 \pm 7,75$  mg TROLOX/g extracto, a diferencia de la fracción “4” que muestra un valor de  $91,44 \pm 8,05$  mg TROLOX/g de extracto.

### 3.3.2 Polifenoles totales

Para la evaluación del contenido de polifenoles totales se preparó una curva de calibración de acuerdo con el apartado 2.2.5.2 y los resultados del extracto crudo y sus fraccionamientos se detallan en la tabla 6, cuyos datos fueron expresados en mg de Ácido Gálico por 1g de extracto seco.

**Tabla 6**  
*Evaluación del contenido de polifenoles totales*

Muestra	Contenido de polifenoles (mg AG/g extracto seco)	ANOVA (p)
Extracto Crudo	146,70 ± 6,15	
Fracción 1	195,07 ± 3,34	
Fracción 2	188,22 ± 6,10	2,1391E-09
Fracción 3	181,70 ± 5,86	
Fracción 4	112,18 ± 6,17	
Fracción 5	108,58 ± 3,82	

*Nota.* Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

Como se puede apreciar en la tabla descrita anteriormente, se puede observar que la fracción 1 correspondiente al primer fraccionamiento con hexano presenta mayor contenido de polifenoles que las otras muestras, seguida de la fracción clorofórmica (fracción 2), si bien no se ha evaluado en estudios por medio de fraccionamientos de la especie *Desmodium molliculum*, para conocer la mejor actividad antioxidante, existen artículos que se han enfocado de manera general en manifestar que *Desmodium molliculum* posee actividad antioxidante en su extracto metanólico. Según Gutiérrez, Ortiz y Mendoza (2008), el contenido de polifenoles en el extracto metanólico de *Desmodium molliculum* es mayor dentro del grupo de plantas estudiadas presentando un valor de 125,82±0,40 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco, valor relativamente próximo al obtenido en nuestro estudio de 146,70 mg AG/g de extracto seco, en relación al aislamiento de metabolitos en base al solvente parece ser que la cantidad de compuestos fenólicos son más polares que apolares por su afinidad al solvente y de igual manera en el estudio realizado por Arroyo, et al (2007) sobre la evaluación del extracto metanólico y sus fracciones de la especie *Bidens pilosa* indica que la fracción metanólica posee abundante compuestos fenólicos descrita como tres cruces a comparación de la fracción clorofórmica que indica una cruz, es decir, que la especie estudiada posee mayor cantidad de metabolitos fenólicos polares.

Dado que el valor de p en la evaluación de ANOVA para polifenoles totales fue menor a 0,05 se puede afirmar que existe una diferencia significativa entre las fracciones obtenidas y es evidente sobre todo en la fracción 1 y la fracción 5, en donde prácticamente la fracción 1 (fracción metanólica desengrasada) abarca mayor contenido de metabolitos en comparación que la fracción 5 que es aquella que únicamente por teoría aísla solo taninos de acuerdo al proceso realizado.

### 3.1.6 Análisis estadístico TUKEY del extracto crudo y las fracciones de *Desmodium molliculum*

Durante el análisis estadístico por el método ANOVA se ha observado que todas las técnicas incluida la prueba de contenido de polifenoles totales existe una gran diferencia entre las fracciones y su extracto crudo cuyo valor de p para todas las pruebas es menor a 0,05 es decir, que existe diferencia entre ellos, pero si observamos en las 3 primeras fracciones a simple vista y en comparación con las otras fracciones parecen ser similares entre ellas, para analizar más a profundidad se ha implementado la prueba de TUKEY para evaluar los promedios entre los distintos grupos, a continuación se presenta los resultados que se obtuvieron con un valor de p mayor a 0 (tabla 8), y para más detalle en la sección de ANEXOS se ilustra los diagramas de cajas para el análisis gráfico.

**Tabla 7**

*Análisis estadístico por la prueba Tukey de las medias entre las fracciones y el extracto crudo de la especie Desmodium molliculum*

Comparación entre grupos	POLIFENOLES TOTALES	TÉCNICA DPPH	TÉCNICA FRAP	TÉNICA ABTS
Fracción 2– Fracción 1	0,1958	0,0	0,9999	0,0
Fracción 3 – Fracción 1	0.00024	0,78	0,9804	1,9 E-6
Fracción 3 – Fracción 2	0,2414	0,0	0,9939	0,0
Fracción 5 – Fracción 4	0,9182	0,0	0,00018	3,9 E-6

*Nota.* Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

Los resultados del análisis TUKEY permiten evidenciar que los valores en las cuatro pruebas aplicadas son similares para la fracción 1, fracción 2 y fracción 3, sin embargo, entre pruebas los valores de p varían entre sí, si se analiza la relación entre la fracción 1 y 2, en la técnica FRAP existe una gran relación ( $p=0,9999$ ) a comparación de las técnicas DPPH y ABTS, que prácticamente al parecer no están relacionadas ( $p=0$ ), en la relación entre las fracciones 1 y 3, de igual manera para técnica FRAP se presenta con un valor de  $p=0,9804$  y para la técnica DPPH tiene un valor de  $p>0,05$ , es decir, que para estas dos técnicas existe mayor relación entre su actividad antioxidante, mientras que si se analiza en el contenido de polifenoles y la técnica ABTS los valores obtenidos no se encuentran relacionados entre sí, para la relación

de las fracciones 2 y 3, ocurre lo mismo que entre la fracción 1 y 2, y por último en la evaluación de la fracción 4 y 5, correspondientes a las últimas fracciones únicamente en el contenido de polifenoles totales sus medias están relacionadas entre sí, con un valor de  $p > 0,05$ .

Por otro lado, en la tabla 7 no se menciona la relación del extracto crudo y sus fracciones, lo que indica que no existe relación entre estos grupos, y como ya se ha manifestado con anterioridad un extracto crudo tiene un mayor contenido de metabolitos asociados entre ellos a comparación de sus fraccionamientos que posee metabolitos con mayor afinidad al solvente aplicado es decir, se encuentran aislados, por ende, estos metabolitos parecen ser más evidentes cuando se aplica un proceso de fraccionamiento. Por último, es muy complicado evaluar la relación entre las fracciones y emitir un juicio concreto sobre el tema, puesto que cada prueba empleada, como ya se ha mencionado anteriormente, posee una condición y una técnica específica para determinar el contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante. Por ejemplo, las técnicas DPPH y ABTS miden la capacidad tanto de captar electrones como la de donar iones de hidrógeno, lo que no ocurre en la técnica de FRAP, que únicamente mide la capacidad de donar electrones. Es importante mencionar este punto, ya que los metabolitos bioactivos trabajan de manera diferente al neutralizar radicales libres. Además, es importante mencionar que cada prueba tiene sus desventajas. En el caso de la técnica DPPH, debido a su solubilidad en solventes orgánicos y no acuosos, tiende a medir principalmente antioxidantes lipofílicos en lugar de los hidrofílicos. Por otro lado, en la técnica ABTS, al ser un radical que no se encuentra en un sistema biológico propio, puede generar resultados no representativos y, en ocasiones, también puede interferir en la termodinámica de la reacción sobre los compuestos bioactivos, lo que lleva a sobreestimaciones o subestimaciones sobre la capacidad antioxidante (Echegaray, et al., 2021).

## CAPÍTULO IV

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 4.1 CONCLUSIONES

Finalizado el trabajo de investigación podemos concluir que:

La maceración fue un proceso extractivo efectivo para la obtención de metabolitos con actividad antioxidante.

En la composición fotoquímica evaluada por TLC para la detección de flavonoides del extracto metanólico y sus fracciones polares usando como revelador acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético glacial:agua (100:11:11:26) se observó que el extracto crudo y las fracciones 1(desengrasada con hexano), 3 (clorofórmica) y 5 (con taninos) tienen un contenido importante de quercetina-3-glucoronido. Por otro lado, también se observa en las muestras un Rf que podría corresponder a kaempferol-3-glucoronido o apigenina-7-glucósido; y, finalmente se observa la presencia de rutina en menor concentración de los compuestos antes descritos.

La técnica aplicada de cromatografía en capa fina estableció que la especie *Desmodium molliculum* presenta metabolitos flavonoides como el Kamferol-3-glucoronido y la Apigenina-7-glucoronido con difícil diferenciación entre sí por mantener un mismo Rf e intensidad en la placa evaluada, además de poseer también metabolitos como la quercetina-3-glucoronido y rutina.

El método de partición líquido-líquido a partir del extracto metanólico permitió evidenciar que las fracciones con mejor actividad antioxidante por las técnicas DPPH y FRAP fue para la fracción desengrasada con hexano del extracto crudo, mientras que por la técnica ABTS la actividad que mayor actividad antioxidante demostró tener fue para la fracción clorofórmica.

Finalmente, dentro la determinación del contenido de polifenoles totales se puede evidenciar que existe mayor cantidad para la fracción desengrasada con hexano ( $195,07 \pm 3,34$  mg AG/g extracto seco), seguida de la fracción clorofórmica ( $188,22 \pm 6,10$  mg AG/g extracto seco) y la fracción acuosa ( $181,70 \pm 5,86$  mg AG/g extracto seco) cuyos valores se encuentran relacionados con la capacidad antioxidante.

## 4.2 RECOMENDACIONES

- Realizar la recolección de la especie a estudiar en épocas de lluvia y no de sequía, de esta manera la podremos encontrar de manera abundante.
- Si bien se logró extraer metabolitos de interés en este trabajo de investigación mediante la maceración asistida, se recomendaría utilizar otro método extractivo para conocer el rendimiento y poder compararlos entre sí, de manera que a largo plazo se pueda aprovechar de mejor manera estos metabolitos desde el punto de vista farmacológico.
- Es importante seguir con el estudio de la especie *Desmodium molliculum* pues hasta ahora parece tener un prometedor avance dentro del estudio de la farmacología por su contenido en metabolitos con capacidad de neutralizar radicales libres lo que beneficiaría a nuestra salud como seres humanos.

## Referencias

- Abukabar, A. & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 12(1), pp. 1-10. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS\_175\_19.
- Almaraz, Norma., Ávila, José., Delgado, Elí., Naranjo, Estor. & Herrera, Jesús. (2017). Metabolismo secundario de las plantas. *Universidad Politécnica Nacional*. Obtenido de:  
<https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8292/1/METABOLISMO%20SECUNDARIO-ALMARAZ.pdf>
- Aguirre, Jaramillo, & Quizhpe. (2019). *Universidad Nacional Loja*. Obtenido de Arvenses asociadas a cultivos y pastizales del Ecuador. Obtenido de:  
[https://unl.edu.ec/sites/default/files/archivo/2019-12/ARVENSES%20ASOCIADOS%20A%20CULTIVOS%20Y%20PASTIZALES%20DEL%20ECUADOR\\_compressed.pdf](https://unl.edu.ec/sites/default/files/archivo/2019-12/ARVENSES%20ASOCIADOS%20A%20CULTIVOS%20Y%20PASTIZALES%20DEL%20ECUADOR_compressed.pdf)
- Antezana, A., Vizaluque, B., Rossel, E., Tejada, L., Book, O., Mollinedo, P. & Peñarrieta, J. (2018). Determination of the Total Antioxidant Capacity, Total Phenols, and the Enzymatic Activity in a Non-Dairy Beverage Based on Grains of *Chenopodium Quinoa*. *Revist Boliviana de Química*, 35(5), pp. 168-176. Obtenido de:  
<https://www.redalyc.org/journal/4263/426358213006/html/>
- Apak, R., Capanoglu, E. & Shahidi, F. (2018). Measurement of Antioxidant Activity & Capacity. *Functional Food Science and Technology* (Primera Edición). Wiley.
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). *REDUCA*. Obtenido de Metabolismo secundario de plantas:  
[https://eprints.ucm.es/id/eprint/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](https://eprints.ucm.es/id/eprint/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)  
ISSN: 1989-3620
- Barreto, D. & Bonilla, P. (2017). Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de hojas de *Desmodium molliculu* (Kunth) DC. (Manayupa). *Artículo de Ciencia e Investigación*, 20(1), pp. 3-8.
- Cartayaa, O. & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Revista de Cultivos Tropicales*, 22(2), pp. 5-14.
- Carvajal Carvajal, Carlos. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36 (1), 91-100. Recuperado el 01 de junio

de 2023, de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es).

Chen W, Tu X, Wu D, Gao Z, Wu S, Huang S. Comparación de las eficiencias de partición de múltiples compuestos fenólicos contenidos en propóleos en diferentes modos de extracción de líquido homogéneo a base de agua con acetonitrilo. *Moléculas* . 2019; 24(3):442. <https://doi.org/10.3390/molecules24030442>

Chih, S., Ling, Y., Chih, S., Hung, T., Rung, Z., Rei, C., Yuan, K. & Shiun, Y. (2010). Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Desmodium triflorum* (L.) DC. *The American Journal of Chinese Medicine*, 38(2), pp. 329-342. DOI: 10.1142/S0192415X10007889

Clement, R. & Hao, C. (2012). Liquid-Liquid Extraction: Basic Principles and Automation. *Elsevier*, 2(1), pp. 51-63. Obtenido de: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.10063-8>

Cujic, N., Savikin, K., Jankovic, T., Pljevljakusic, D., Zdunic, G. & Ibric, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Journal Food Chemistry*, 194 (1), pp. 135-142. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>.

Dagnino, Jorge. (2014). Análisis de varianza. *Revista Chilena*, (43), 206-310. Obtenido de: <http://revistachilenadeanestesia.cl/PII/revchilanestv43n04.07.pdf>.

Deshpande, H. y Bhalsing, S. (Febrero 2014). A Review of Phytochemical Profile of *Desmodium gangeticum* (L.) *International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care* Issue 4, Vol 1 pag. 36-48. Recuperado de <http://rspublication.com/ijphc/2014/feb14/4.pdf>

Driscoll, W. (1972). Robustness of the ANOVA and Tukey-Kramer Statistical Test. *Departament of Industrial and Systems Engineering of Pergamoa*, 31(2), pp. 265-268.

Echavarría, A., Armas, H., Matute, Nubia., Jaramillo, C., Rojas, L. & Benítez, R. (2016). *Revista Ciencia UNEMI*, 9(20), pp. 29-35.

Echegaray, N., Pateiro, M., Munekata, P., Lorenzo, J., Chabani, Z., Farg, M. & Domínguez, R. (2021). Measurement of Antioxidant Capacity of Met and Meat Products: Methods and Applications, *Molecules*, 26(3380), pp. 2-21.



- Elejalde Guerra, J.I.. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 50-59. Recuperado en 09 de julio de 2023, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&tlng=es).
- Flieger, J., Baj, J. & Maciejewski, R. ( 2021). Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. *Materials*, 4(15), pp. 1-54. DOI: 10.3390/ma14154135
- Gan, S., Sulaiman, S. & Khali, S. (2012). Advances in the Analytical Methods for Determining the Antioxidant Properties of Honey: A review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines: AJTCAM*, 9(1), pp. 36-42.
- Gutierrez, D.M, Ortiz, C.A. & Mendoza, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio de Metrología*. Obtenido de: [https://www.cenam.mx/simposio2008/sm\\_2008/memorias/m2/sm2008-m220-1108.pdf](https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/m2/sm2008-m220-1108.pdf)
- Hernández-Alvarado, Jerelly, Zaragoza-Bastida, Adrian, López-Rodríguez, Gabino, Peláez-Acero, Armando, Olmedo-Juárez, Agustín, & Rivero-Perez, Nallely. (2018). Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico veterinario*, 8(1), 14-27. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.1>
- Hidayat, R. & Wulandari, P. (2021). Methods of Extraction: Maceration, Percolation and Decoction. *Journal Eureka Herba Indonesia*, 2(1), pp. 68-74. DOI: 10.37275/ehi.v2i1.15.
- Kim, S., Bisson, J., Brent, J., Pauli, G. & Simmler, C. (2020). Selective Chlorophyll Removal Method to “Degreen” Botanical Extracts. *Journal of Natural Products*, 83(6), pp. 1846-1858.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). *Pub med*. Obtenido de Radicales libres, antioxidantes y alimentos funcionales: Impacto en la salud humana: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/>
- Loyola-Vargas, Víctor M., Sánchez-Iturbe, Patricia, Canto-Canché, Blondy, Gutiérrez-Pacheco, Luis C., Galaz-Ávalos, Rosa M., & Moreno-Valenzuela, Oscar. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos: Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad*

- Química de México*, 48(1), 67-94. Recuperado en 09 de julio de 2023, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0583-76932004000100013&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0583-76932004000100013&lng=es&tlng=es).
- Lundanes, E., Reubsaet, L. & Greibrokk, T. (2014). *Chromatography. Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. WILEY-BCH.
- Ma, X., Zheng, C., Hu, C., Rahman, K. & Qin, L. (2011). The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(1), pp. 314-332.
- Martínez García, Eva., Fernández Segovia, Isabel. & Fuentes López, Ana. (2020) Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *Revista de la Universidad Politécnica de Valencia*. Obtenido de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>.
- Miguel, M. (2009). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(1), pp. 291-312. DOI: 10.1002/ffj.1961
- Mohammed, R. (2018). Convetional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disvantages. *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing (IJBSAC)*, 2(6), pp. 10-14. Obtenido de: <https://www.ijbsac.org/wp-content/uploads/papers/v2i6/F0082122618.pdf>.
- Munteanu, G. & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), pp. 1-30. Obtenido de: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Mushtaq, M., Hae, Y., Verpoorte, R. & Wilson, E. (2013). Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome. *Journal Phytochemical Analysis*, 25(4), pp. 291-306.
- Núñez Sellés, Alberto J. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37(Supl. 5), 644-660. Recuperado en 12 de junio de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-34662011000500013&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662011000500013&lng=es&tlng=es).

Olascuaga, K., Rubio, S., Blanco, C. & Valdiviezo, J. (2020). *Desmodium molliculum* (Kunth) DC (Fabaceae); Perfil etnobotánico, fitoquímico y farmacológico de una planta andina peruana. *Investigación y aplicaciones de etnobotánica*, 19(1), pp.1-13.

Oliveira, María., Velázquez, Dilia. & Bermúdez, Alexis. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. *Ciencia y tecnología de América*, 30 (8), 453-459. ISSN 0378-1844.

Pérez, V., Lugo, E., Gutiérrez, M. & Del Toro, C. (2012). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso,) y determinación de su actividad antioxidante. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 15(3), pp. 18-22.

Ramachandran, G., Rajivgandhi, G., Maruthupandy, M., & Manoharan, N. (2019). Extracción y purificación parcial de metabolitos secundarios de actinomicetos endófitos de algas verdes marinas *Caulerpa racemosa* contra uropatógenos multirresistentes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17 (2019), 750-757. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.016>.

Santos, M. & Goncalves, E. (2016). Effect of different extracting solvents on antioxidant activity and phenolic compounds of a fruit and vegetable residue flour. *Journal Scientia Agropecuaria*, 7(1), pp. 7-14. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2016.01.01.

Shehri, Samiha., Alhadlaq, Rasha., Bin, Khuzama., Aldosri, Noura, & Alghamdi, Mai. (2022). A Review of Medicinal Plants, their Definition, Uses, Active Ingredients and Prevalence in the Kingdom of Saudi Arabia. *International Journal of Science and Research*. ISSN: 2319-7064. DOI: 10.21275/SR221220120109 .

SIERRA VARGAS, MARTHA PATRICIA, GUZMÁN GRENFELL, ALBERTO MARTÍN, OLIVARES CORICHI, IVONNE MARÍA, TORRES RAMOS, YESSICA DORIN, & HICKS GÓMEZ, JUAN JOSÉ. (2004). PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LAS ENFERMEDADES PULMONARES. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(2), 135-148. Recuperado en 09 de julio de 2023, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-75852004000200010&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000200010&lng=es&tlng=es)

Vallejo, Y., Barrios, L., & Anaya, J. (2021). Revista Química. Obtenido de Cromatografía en Capa Fina: <file:///C:/Users/HP%20i3/Downloads/23788-Texto%20del%20art%C3%ADculo-95185-1-10-20210908.pdf>

- Vilela, Alejandra E, González-Paleo, Luciana, & Ravetta, Damián A. (2011). Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología austral*, 21(3), 317-327. Recuperado en 09 de julio de 2023, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1667-782X2011000300007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2011000300007&lng=es&tlng=es).
- Pandey, A. & Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5), pp. 115-119. Obtenido de: [https://www.phytojournal.com/vol2Issue5/Issue\\_jan\\_2014/11.pdf](https://www.phytojournal.com/vol2Issue5/Issue_jan_2014/11.pdf)
- Román, D. & Gómez, A. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), pp. 1-32. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fijms18010096>.
- Shahidi, F. & Zhongb, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Funtional Foods*, 18(B), pp. 757-781. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Skowrya, M. (2014). Antioxidant propiedades of extracts form selected plant materials (*Caesalpinia spinose*, *Perilla Frutescens*, *Artemisia annua* and *Viola wittrockiana*) *in vitro* and in model food systems. Tesis previa a la obtención de un Título. Universidad Politecnica de Catalunya, Barcelona. Obtenido de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/284828/TMSk1de1.pdf?sequence=1>.
- Wade C, Driscoll. (1996). Robustez de las pruebas estadísticas ANOVA y Tukey-Kramer. *Química Analítica*. 31 (1-2), 265-268. Doi: 10.1016/0360-8352 (96) 00127-1.
- Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ, Li HB. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 5;18(1):96. doi: 10.3390/ijms18010096. PMID: 28067795; PMCID: PMC5297730.
- Zhang, Q., Lin, L. & Ye, W. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Journal Chinese Medicine*, 13(20), pp. 1-26. DOI: <https://doi.org/10.1186%2Fs13020-018-0177-x>.

## Anexos

## ANEXO A

Tabla 8

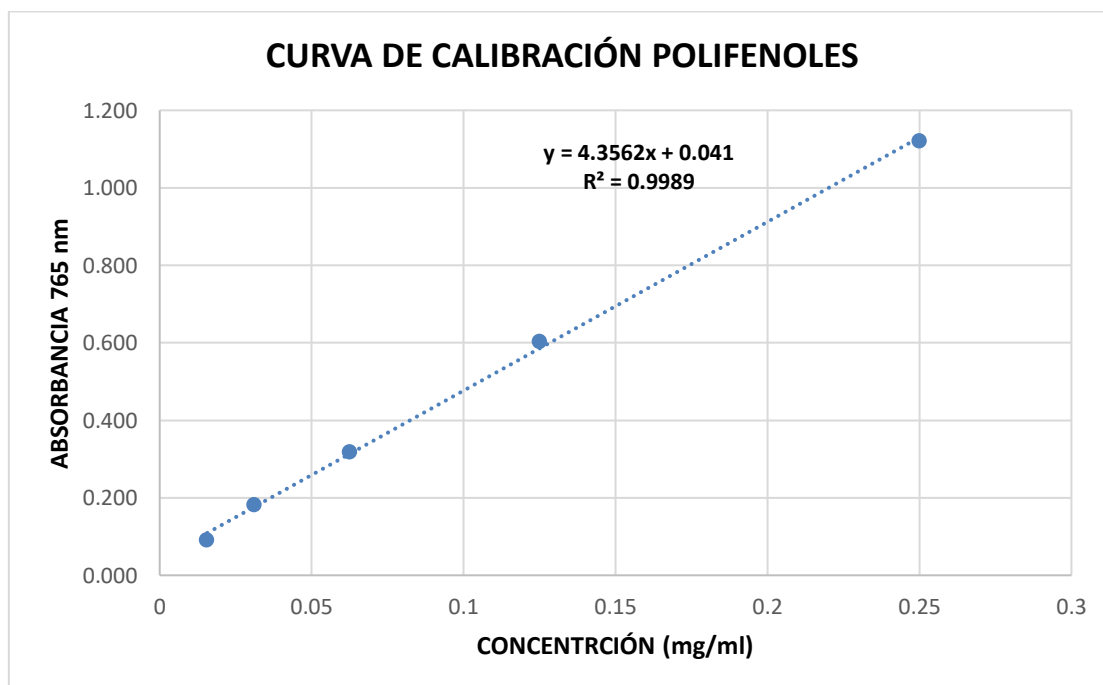
Promedios de las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones para la elaboración de la curva de calibración para la evaluación del contenido de polifenoles totales.

Concentración (mg/ml)	PROMEDIO (absorbancias)
0,25	1,1206
0,125	0,6031
0,0625	0,3181
0,03125	0,1822
0,015625	0,0911

Nota. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

Figura 7

Curva de calibración con ácido gálico por el método de polifenoles totales



Nota. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

**Tabla 9**

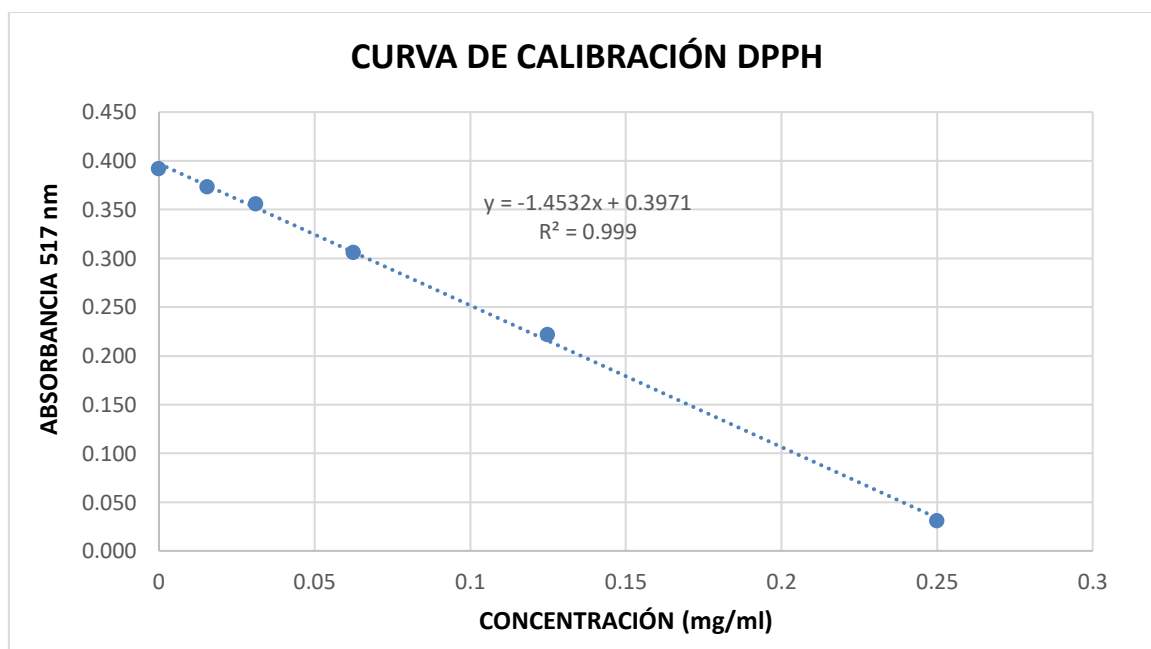
*Promedios de las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones para la elaboración de la curva de calibración para la evaluación de la actividad antioxidante por la técnica DPPH*

<b>Concentración (mg/ml)</b>	<b>PROMEDIO (absorbancias)</b>
0,25	0,030
0,125	0,221
0,0625	0,306
0,03125	0,356
0,015625	0,373
0	0,3919

*Nota.* Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

**Figura 8**

*Curva de calibración con TROLOX por el método de DPPH*



*Nota.* Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

Tabla 10

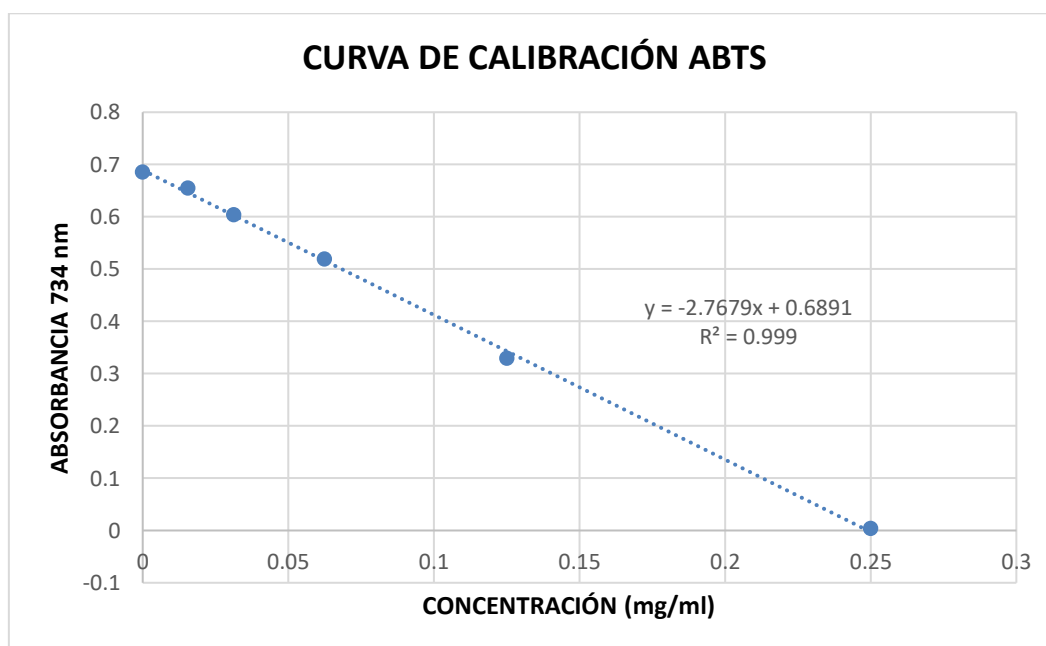
Promedios de las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones para la elaboración de la curva de calibración para la evaluación de la actividad antioxidante por la técnica ABTS

Concentración (mg/ml)	PROMEDIO (absorbancias)
0,25	0,00311
0,125	0,32856
0,0625	0,51844
0,03125	0,60356
0,015625	0,65667
0	0,68544

Nota. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

Figura 9

Curva de calibración con TROLOX por la técnica ABTS



Nota. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

**Tabla 11**

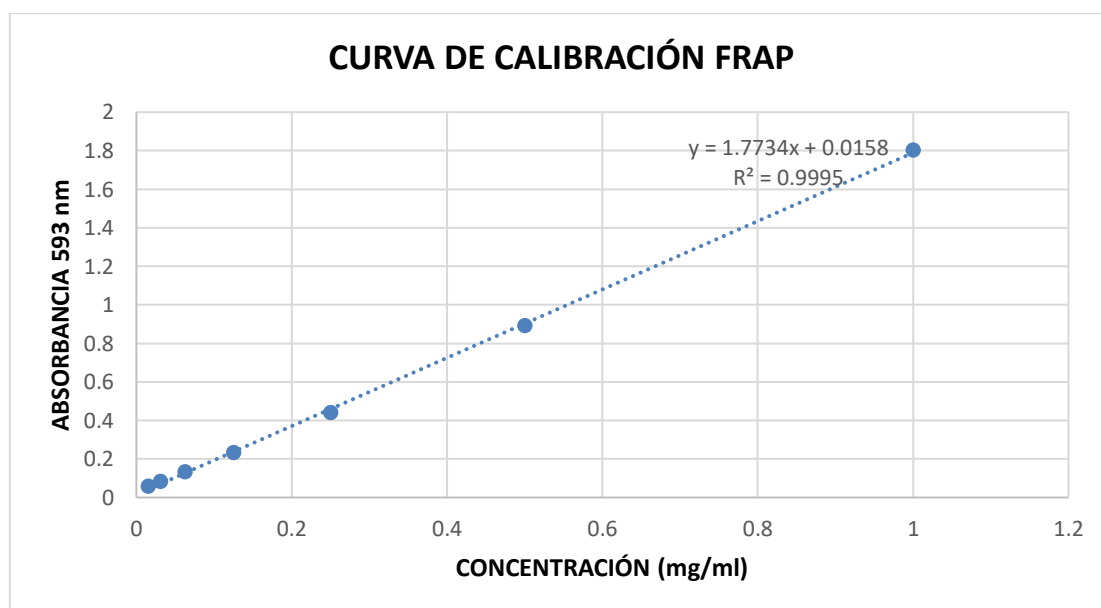
Promedios de las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones para la elaboración de la curva de calibración para la evaluación de la actividad antioxidante por la técnica FRAP

Concentración (mg/ml)	PROMEDIO (absorbancias)
1	1,8010
0,5	0,8893
0,25	0,4386
0,125	0,2306
0,0625	0,1304
0,03125	0,0820
0,015625	0,0579

Nota. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

**Figura 10**

Curva de calibración con TROLOX por la técnica FRAP

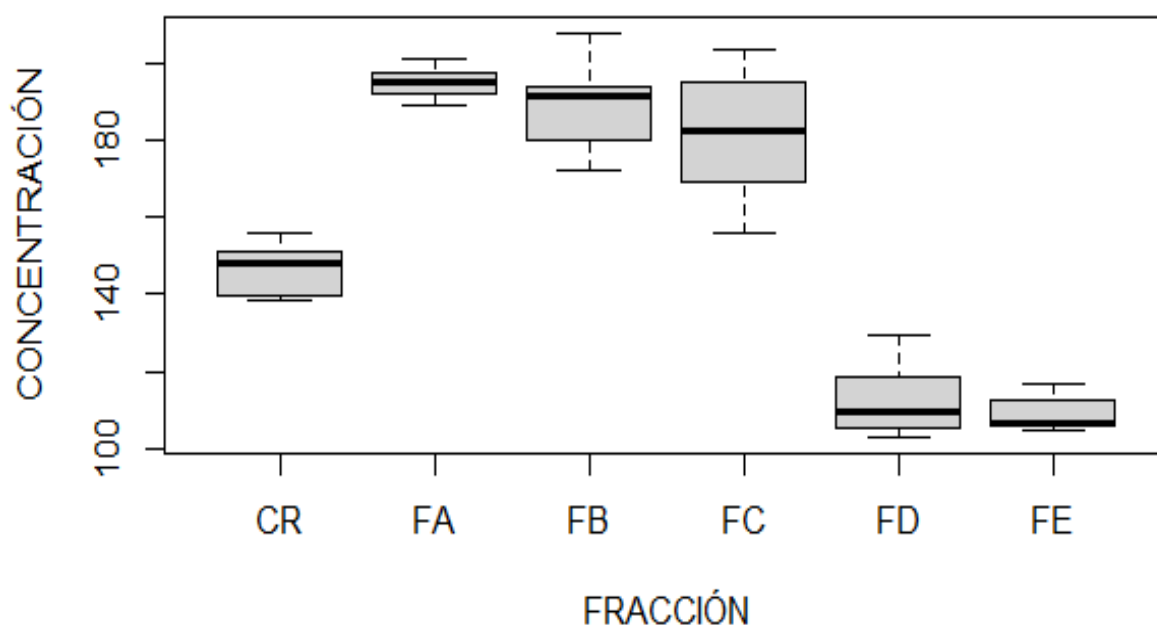


Nota. Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica



## ANEXO B

Diagrama de cajas del análisis de los promedios obtenidos de la prueba de contenido de polifenoles totales para el extracto crudo y sus fracciones de la especie *Desmodium molliculm*

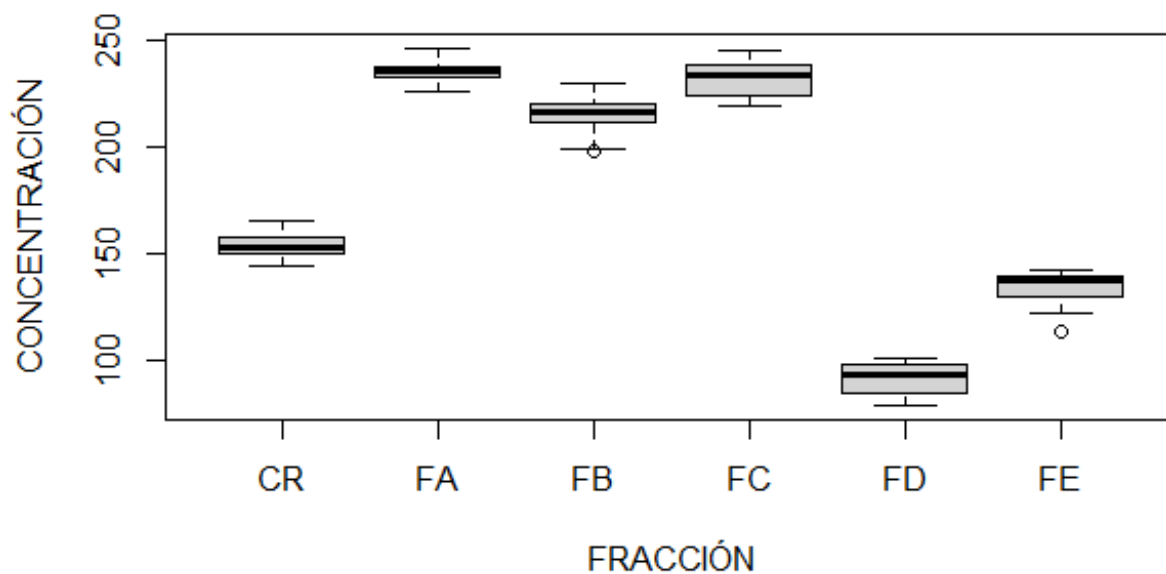


Nota. CR=Extracto crudo, FA=Fracción 1, FB= Fracción 2, FC= Fracción 3, FD= Fracción 4, FE=Fracción 5.

Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

## ANEXO C

Diagrama de cajas del análisis de los promedios obtenidos de la Técnica DPPH para el extracto crudo y sus fracciones de la especie *Desmodium molliculm*

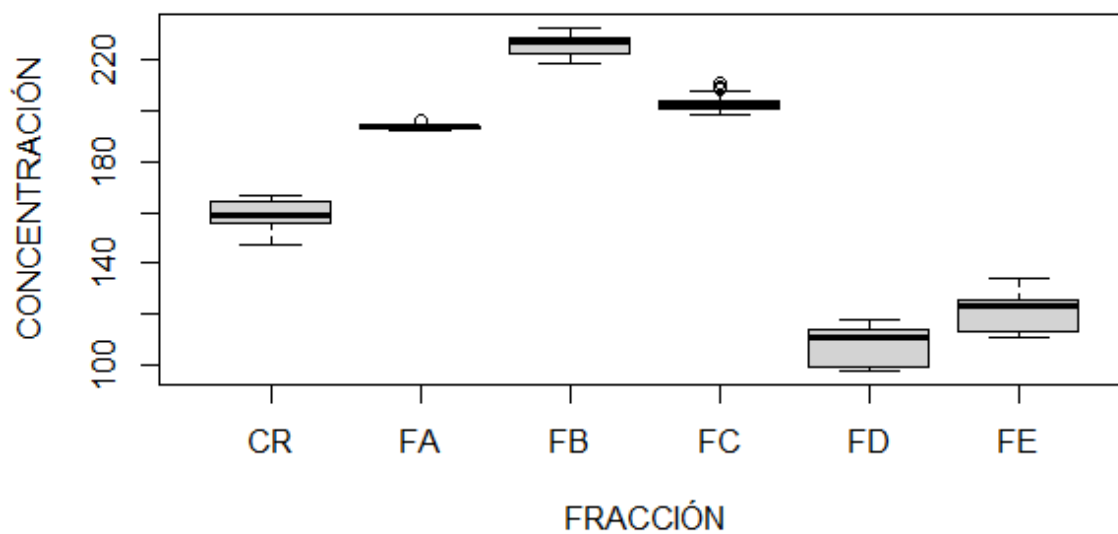


Nota. CR=Extracto crudo, FA=Fracción 1, FB= Fracción 2, FC= Fracción 3, FD= Fracción 4, FE=Fracción 5.

Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

## ANEXO D

Diagrama de cajas del análisis de los promedios obtenidos de la Técnica ABTS para el extracto crudo y sus fracciones de la especie *Desmodium molliculum*

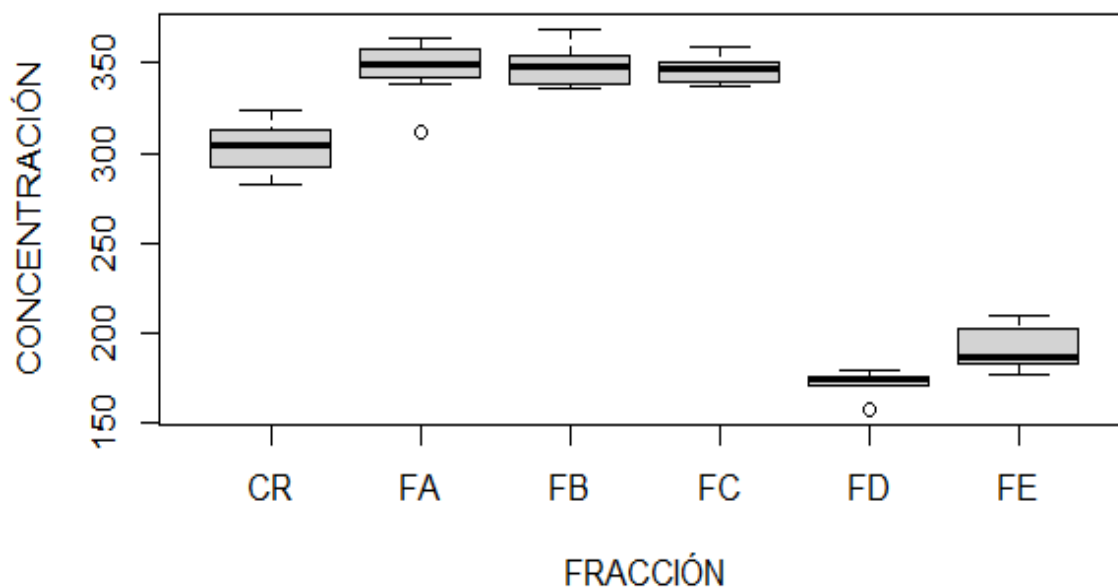


Nota. CR=Extracto crudo, FA=Fracción 1, FB= Fracción 2, FC= Fracción 3, FD= Fracción 4, FE=Fracción 5.

Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

ANEXO E

Diagrama de cajas del análisis de los promedios obtenidos de la Técnica FRAP para el extracto crudo y sus fracciones de la especie *Desmodium molliculum*

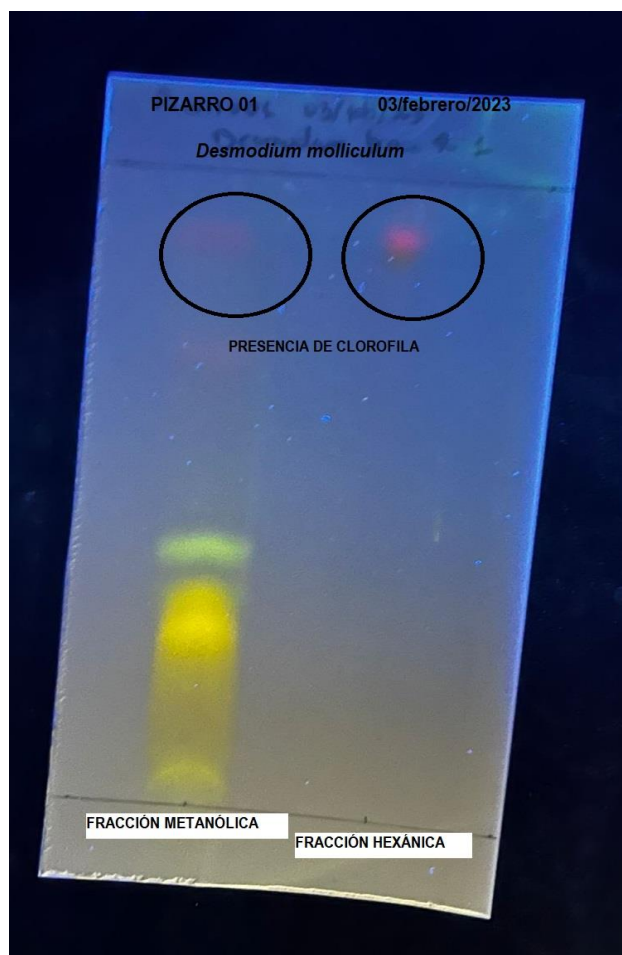


Nota. CR=Extracto crudo, FA=Fracción 1, FB= Fracción 2, FC= Fracción 3, FD= Fracción 4, FE=Fracción 5.

Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

## ANEXO F

*Resultado de placa TLC en UV- visible contenido de clorofila*



*Nota.* Fuente: Pizarro, Paola. & Tigre, Jessica.

Durante el primer fraccionamiento con hexano, se realizó la evaluación por TLC para conocer si el volumen utilizado fue suficiente para la eliminación de clorofila durante el proceso, en la figura 2 se puede observar que la intensidad de color naranja representa la presencia de clorofila tanto en la fracción metanólica (baja intensidad) frente a la fracción hexánica (mayor intensidad), y como se muestra en la figura, todavía existía la presencia de clorofila en la fracción metanólica por lo que se procedió a repetir el proceso para lograr una mejor separación.

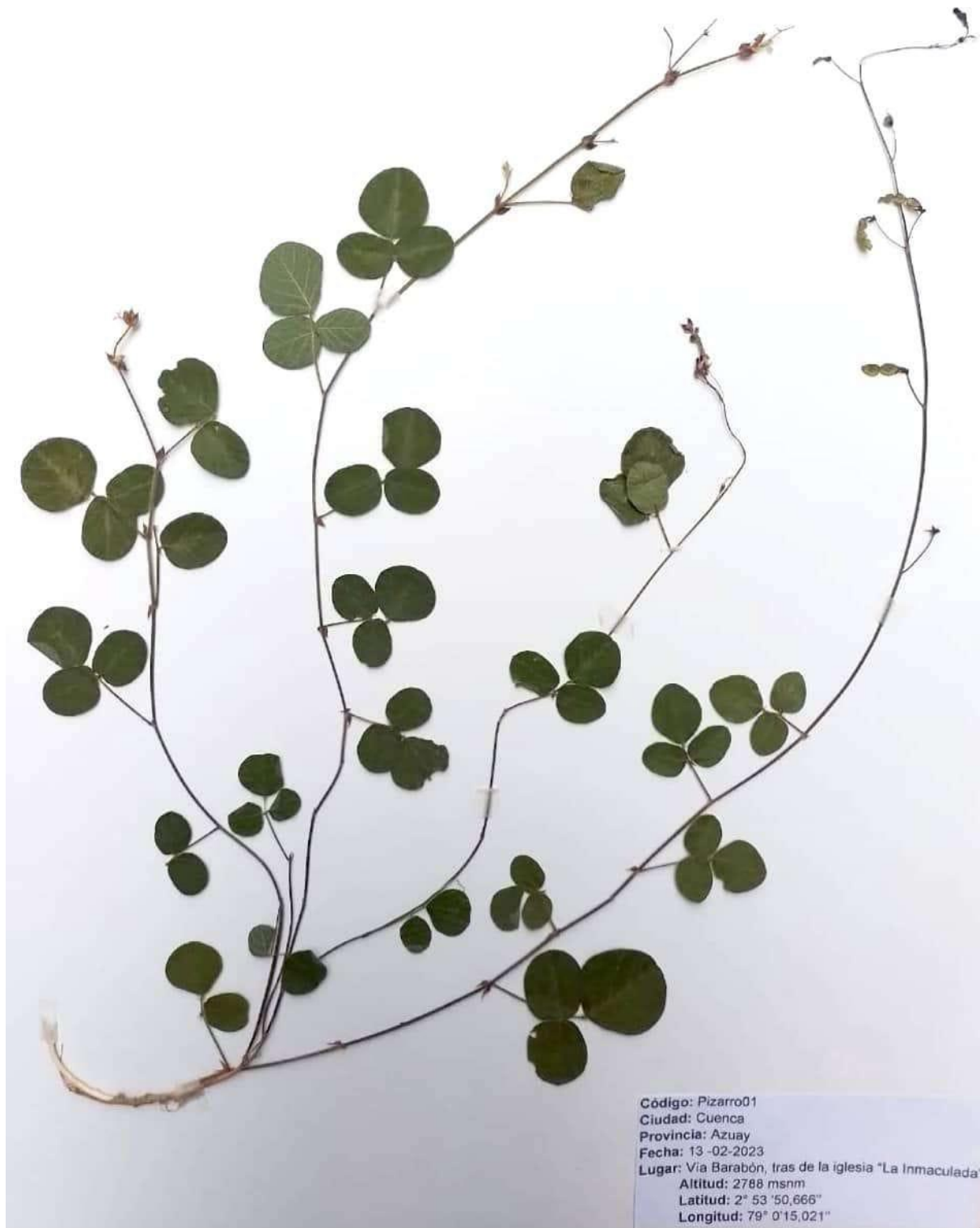
## ANEXO G

Ficha de recolección de la especie *Desmodium molliculum*

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE PLANTAS

CÓDIGO	FECHA	HORA	ALTITUD	COORDENADA X	COORDENADA Y	COLECTOR	
Pizarro 01	13/07/23	9:30 am	2788 m	079°0'15,021"	52°53'50,66"	Paola Pizarro Jessica Tigre	
PROVINCIA	ZONA	REFERENCIA DE LUGAR					
Azuay	Barabón	En la parte posterior de una iglesia, alrededor de un tanque de agua.					
<u>PARTE COLECTADA DE LA PLANTA</u>					<u>FOTOS NRO.</u> (registrar el nro. de la parte inferior izquierda de la cámara)		
HOJAS	FLORES	TALLOS	RAÍCES	BROTOS	FRUTOS		
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<u>HABITAT</u>							
ACEQUIA	AL CAMINO	CERCO	ENREDADA EN OTRAS PLANTAS	SIN TREPAP EN EL SUELO	JUNTO AL RÍO	JUNTO A POTRERO	OTROS
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<u>CARACTERÍSTICAS DEL SUELO</u>				<u>CLIMA</u>		<u>TEMPERATURA</u>	
COLOR	TIPO	HUMEDAD	LLUVIOSO	SOLEADO	NUBLADO	18°C	
Café	Humífero	Abundante			X		
Muestra botánica:	<input checked="" type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2					
No. Bags of plant collected:	<input type="checkbox"/>						

## ANEXO H

*Caracterización botánica de Desmodium molliculum*

Código: Pizarro01  
Ciudad: Cuenca  
Provincia: Azuay  
Fecha: 13-02-2023  
Lugar: Vía Barabón, tras de la iglesia "La Inmaculada"  
Altitud: 2788 msnm  
Latitud: 2° 53' 50,666"  
Longitud: 79° 0' 15,021"

## ANEXO I

*Metodología de la marcha Fitoquímica por Cromatografía en Capa Fina para la determinación de flavonoides en los extractos apolares de Desmodium molliculum*

Metabolito	Patrones	Muestra	Fase móvil	Revelador	N° placas (cms)		Tipo de soporte
<b>Flavonoides</b> Quercetina Astragalina Kaempferol Miristicin	1. Quercetina 2. Quercetina 3 glucoronido 3. Kaempferol 4. Kaempferol 3 Glucósido 5. Apigenina 6. Apigenina 7 gucósido 7. Rutina 8. Miristicin	F1: polar F2: polar F4: polar F6: polar	Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26) (50;5,5;5,5;3)	Reactivo de productos naturales (NPIPEG No. 28)	13 X10 cm	365 nm intensa fluorescencia amarilla, anaranjada o verdosa	Placas con gel sílica F254  Placa de soporte plástico
<b>Observaciones</b>	La columna del patrón mirisitcin no eluyó						
<b>Resultados</b>	Existe presencia de flavonoides para los patrones, Quercetina-3-glucurónido, kaempferol-3-glucurónido, apigenina-7-glucósido y rutina.						